



Dérivés de flavonoïdes et de vérapamil comme ligands des transporteurs MRP1 et ABCG2 : de la conception à l'activité anticancéreuse

Estelle Genoux

► To cite this version:

Estelle Genoux. Dérivés de flavonoïdes et de vérapamil comme ligands des transporteurs MRP1 et ABCG2 : de la conception à l'activité anticancéreuse. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GREN015 . tel-00596929

HAL Id: tel-00596929

<https://theses.hal.science/tel-00596929>

Submitted on 30 May 2011

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« Estelle GENOUX »

préparée au sein du Laboratoire « **Département de
Pharmacochimie Moléculaire** »

dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

«Dérivés de flavonoïdes et de vérapamil comme ligands des transporteurs MRP1 et ABCG2 : De la conception à l'activité anticancéreuse»

Thèse soutenue publiquement le « **06 mai 2011** », devant le jury
composé de :

Professeur DECOU Jean-Luc
Université de Grenoble

Président

Professeur WALCHSHOFER Nadia
Université Lyon 1, Lyon

Rapporteur

Docteur KACHADOURIAN Rémy
National Jewish Health, Denver, (USA).

Rapporteur

Professeur CARRUPT Pierre-Alain
Université de Genève, Genève (SUISSE)

Examineur

Docteur DI PIETRO Attilio
Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon,

Examineur

Docteur CORTAY Hélène
Université Lyon 1, Lyon,

Invité

Professeur BOUMENDJEL Ahcène
Université de Grenoble

Directeur de thèse



Ces quelques lignes vont me permettre de remercier toutes les personnes qui m'ont beaucoup apporté au niveau scientifique mais aussi personnel, et sans qui mon travail n'aurait pu aboutir. La difficulté tient dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Alors un grand MERCI.....

*à **Ahcène BOUMENDJEL**, mon directeur de thèse,
pour sa disponibilité, pour son œil critique et avisé,
pour m'avoir laissé la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux
et pour ses encouragements quotidiens,*

*à **Nadia WALCHSHOFER** et **Rémy KACHADOURIAN**, d'avoir accepté de décortiquer et de juger ce travail,*

*à **Pierre-Alain CARRUPT** et **Attilio DI PIETRO**, d'avoir accepté d'examiner et juger ce travail,*

*à **Hélène CORTAY**, pour avoir accepté notre invitation à faire partie de ce jury,*

*à **Jean-Luc DECOUT**, de bien vouloir présider ce jury et d'examiner ce travail,*

*à la **Région Rhône-Alpes**, pour le financement de cette thèse,*

*aux membres de l'équipe **EPSON**,*

*et en particulier **Edwige NICOLLE** pour sa relecture et ses conseils avisés,*

*à l'équipe lyonnaise, en particulier **Attilio, Hélène, Dorianne** et **Raphaël**,
pour notre collaboration et nos riches échanges scientifiques,*

*à tous les membres du laboratoire,
à toutes les personnes du **second étage**, pour leur soutien,
pour leurs encouragements et les fous-rire des pauses café,*

à tous mes compagnons de fortune importants pendant ces trois années,

***Pascale, Delphine, Angèle, Marie-Carmen**, une fine et belle équipe,*

pour leur sympathie, leur humour, le sport et leurs épaules attentives,

*à **Chantal**, pour notre entente sans faille,*

pour ton soutien et pour m'avoir supportée cinq années durant,

*à **Valérie**, pour ton amitié, ton aide, tes conseils,*

et nos discussions au-delà de la science (et c'est la cas de le dire !!),

*à **mes amis**, basketteuses et stéphanois,*

*à ma famille, **mes parents**, mon **frère**, ma **sœur**, et mes **beaux-parents**,*

pour avoir écarté mes doutes, soigné les blessures et partagé les joies,

*et enfin à mon **mari** et ma **fille**,
pour cette thèse remplie d'émotions avec une naissance et un mariage,
pour leur amour, leur soutien quotidien indéfectible,
leur enthousiasme pour mes travaux et pour la vie en général.*

La résistance aux agents chimiothérapeutiques (Multidrug Resistance ou MDR) est caractérisée par la surexpression de différentes protéines membranaires de type ABC, parmi lesquelles, MRP1 et ABCG2 sont largement impliquées. Ces transporteurs diminuent les concentrations intracellulaires des agents chimiothérapeutiques en augmentant leur efflux de la cellule cancéreuse. Dans le but de contrecarrer cette chimiorésistance, nous avons conçu, synthétisé et étudié des activateurs de MRP1 et des inhibiteurs d'ABCG2.

Les activateurs de MRP1 sont des dérivés de flavonoïdes et de vérapamil. Ces activateurs sont capables d'induire un efflux rapide et massif de glutathion cellulaire *via* MRP1 qui entraîne l'apoptose des cellules cancéreuses.

Nous avons également conçu et synthétisé de nouveaux composés, dérivés de chromone, inhibiteurs sélectifs d'ABCG2, afin de restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques.

Mots clés : MRP1, ABCG2, flavonoïdes, analogues de vérapamil, chromones, inhibiteurs, activateurs

Resistance to chemotherapeutic agents (Multidrug Resistance or MDR) is characterized by the overexpression of membrane ABC proteins, such as MRP1 and ABCG2. These transporters decrease intracellular concentrations of chemotherapeutic agents by increasing their efflux from the cancer cell. In order to find effective modulators of drug resistance, we have designed, synthesized and investigated MRP1 activators and ABCG2 inhibitors.

We designed and synthesized new derivatives of flavonoids and verapamil as activators of MRP1. These activators are capable of inducing a rapid and massive efflux of intracellular glutathione *via* MRP1 and causing cells death by apoptosis.

We have also designed and synthesized new compounds, derivatives of chromone, as selective inhibitors of ABCG2, to restore sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents. The biological evaluation of investigated compounds enabled us to identify new activators of MRP1 as well as potent and selective inhibitors of ABCG2.

Keywords: MRP1, ABCG2, flavonoids, verapamil analogs, chromone, inhibitors, activators

SOMMAIRE

PREAMBULE	7
INTRODUCTION	9
I.1. LE CANCER ET SES TRAITEMENTS	9
I.1.1. <i>Le cancer</i>	9
I.1.2. <i>Les traitements</i>	9
I.1.3. <i>Résistance et phénotype MDR</i>	12
LES TRANSPORTEURS ABC	14
II.1 GENERALITES	14
II.2. TOPOLOGIE GENERALE DES TRANSPORTEURS ABC	16
II.3. MECANISME FONCTIONNEL DES TRANSPORTEURS ABC	18
II.4. IMPLICATION DES TRANSPORTEURS ABC DANS DES PATHOLOGIES HUMAINES	19
II.5. LES TROIS PRINCIPAUX TRANSPORTEURS ABC HUMAINS IMPLIQUES DANS LE PHENOTYPE MDR	21
LES PROTEINES MRP1 ET ABCG2	22
III.1. LA PROTEINE MRP1	22
III.1.1. <i>Organisation structurale</i>	22
III.1.2. <i>Localisations et fonctions physiologiques</i>	23
III.1.3 <i>Cycle de transport</i>	25
III.2. LA PROTEINE ABCG2	26
III.2.1. <i>Origine et découverte</i>	26
III.2.2. <i>Organisation structurale</i>	27
III.2.3. <i>Localisations et fonctions biologiques</i>	27
III.3. LES PROTEINES MRP1 ET ABCG2 COMME CIBLES DANS LA DECOUVERTE DE NOUVELLES MOLECULES A POTENTIALITE ANTICANCEREUSE	30
III.3.1. <i>Exemples d'inhibiteurs de MRP1</i>	32
III.3.2. <i>Ligands de MRP1 agissant comme activateurs</i>	33
III.3.3. <i>Exemples d'inhibiteurs sélectifs d'ABCG2.</i>	36
TRAVAUX DE THESE	40
IV.1. OBJECTIFS	40
IV.2. ACTIVATEURS DE MRP1 COMME ANTICANCEREUX POTENTIELS CIBLANT SELECTIVEMENT LES CELLULES TUMORALES RESISTANTES	41
IV. 2.1. <i>Activateurs de MRP1 : molécules cibles</i>	41
IV.2.2. <i>Synthèse, activité biologique et relation structure-activité des dérivés de flavone</i>	43
	5

IV.2.2.1. Synthèse des dérivés de flavone	43
IV.2.2.2. Evaluation biologique des dérivés de flavones	48
IV.2.2.3. Relations structure-activité	54
<i>IV.2.3. Synthèse, activité biologique et relation structure-activité des dérivés de xanthone.</i>	<i>58</i>
IV.2.3.1. Synthèse des dérivés de xanthone	58
IV.2.3.2. Evaluation biologique des dérivés de xanthone	62
IV.2.3.3. Relations structure-activité des dérivés de xanthone	65
<i>IV.2.4. Synthèse, activité biologique et relation structure-activité des dérivés de vérapamil</i>	<i>67</i>
IV.2.4.1. Synthèse des dérivés de vérapamil	67
IV.2.4.1. Evaluation biologique des dérivés de vérapamil	70
IV.2.4.3. Relations structure-activité des dérivés de vérapamil	72
<i>IV.2.5. Bilan global sur la totalité des molécules étudiées comme activateurs de MRP1</i>	<i>72</i>
IV.3. INHIBITEURS D'ABCG2 COMME AGENTS CHIMIOSENSIBILISANTS DES TRAITEMENTS CHIMIOThERAPEUTIQUES	74
<i>IV.3.1 Etat des lieux au début de ce projet</i>	<i>74</i>
<i>IV.3.2. Choix et conception des molécules</i>	<i>75</i>
<i>IV.3.3. Synthèse et activité biologique</i>	<i>78</i>
IV.3.3.1. Synthèse des chromones de série III	78
IV.3.3.1. Activité biologique	81
IV.3.3.2. Bilan des résultats biologiques des dérivés de chromone	82
<i>IV.3.4. Sélectivité vis-à-vis de P-gp et de MRP1</i>	<i>85</i>
<i>IV.3.5. Bilan</i>	<i>86</i>
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	87
EXPERIMENTAL SECTION	89
CHEMICAL SECTION	89
BIOLOGICAL SECTION	126
BIBLIOGRAPHIE	128

PREAMBULE

Le cancer forme un enjeu de **santé publique** fort. Un tiers des décès masculins et un quart des décès féminins lui sont dus. Bien que sa mortalité diminue depuis deux décennies, au moins pour certains types de cancer, son incidence globale augmente (de 60 % entre 1980 et 2000).

Le cancer est une maladie grave qui se traduit par une perturbation de la communication cellulaire, associée à une absence de mort cellulaire, engendrant le développement d'amas de cellules cancéreuses (appelés tumeurs) qui échappent aux règles de fonctionnement du corps. La cellule cancéreuse est une cellule dérégulée qui se multiplie sans contrôle. En se multipliant de façon anarchique, les cellules cancéreuses donnent naissance à des tumeurs de plus en plus grosses qui se développent en envahissant puis détruisant les zones qui les entourent. Les cellules cancéreuses peuvent également essaimer à distance d'un organe pour former une nouvelle tumeur, ou circuler sous forme libre. En détruisant son environnement, le cancer peut devenir un réel danger pour la survie de l'être vivant.

La chimiothérapie occupe une place considérable dans le traitement des cancers, notamment pour ceux qui ne peuvent pas être traités par chirurgie ou radiothérapie, comme les lymphomes, leucémies et tumeurs métastatiques. Malheureusement, très peu parmi les patients traités auront une rémission prolongée à cause de la résistance fréquente des cellules cancéreuses à la chimiothérapie.

Cette chimiorésistance résulte souvent de la présence d'un système d'efflux capable de diminuer la concentration intracellulaire de nombreux médicaments, diminuant ainsi leur activité. Ce mécanisme de résistance est conféré à des transporteurs (protéines) membranaires, membres de la superfamille des transporteurs ABC et notamment les transporteurs MRP1 (Multidrug Resistance Protein 1) et ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein).

Les deux grandes approches utilisées à ce jour pour tenter de pallier la résistance aux agents anticancéreux sont :

La recherche de drogues nouvelles ayant une forte toxicité cellulaire ou des drogues qui ciblent sélectivement les cellules cancéreuses.

La recherche d'inhibiteurs de l'efflux des drogues, qui sont des composés à utiliser en combinaison avec des anticancéreux, afin de *resensibiliser* la cellule aux traitements.

C'est dans ce contexte relatif à la mise au point de traitements efficaces contre le cancer qu'il m'a été confié ce sujet de thèse, à double facette :

1) **Mettre au point des molécules anticancéreuses sélectives des cellules tumorales résistantes.**

Sur la cible MRP1 : l'objectif est de valider et d'optimiser un nouveau concept thérapeutique consistant à éliminer sélectivement des cellules cancéreuses surexprimant MRP1. L'utilisation de ligands activateurs du transporteur permet de stimuler l'export du glutathion des cellules cancéreuses *via* MRP1, cette extrusion rapide et massive du glutathion intracellulaire entraîne la mort par apoptose.

2) **Améliorer la chimiothérapie par administration d'adjuvants aux traitements.**

Sur la cible ABCG2 : l'objectif est la mise au point de nouveaux inhibiteurs sélectifs du transporteur ABCG2, empêchant ainsi l'efflux des médicaments anticancéreux.

Ce projet est le fruit d'un travail pluridisciplinaire impliquant une collaboration entre notre équipe et l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), équipe « Mécanisme et Modulation de la Résistance aux Drogues » du Dr. Attilio DI PIETRO.

INTRODUCTION

I.1. Le cancer et ses traitements

I.1.1. Le cancer

Le cancer est une maladie décrite depuis l'antiquité qui a longtemps été incurable, mais aujourd'hui grâce aux progrès de la médecine, nombre de cancers sont guéris. Le cancer est une perturbation de la communication cellulaire, associée à une absence de mort cellulaire, engendrant le développement d'amas cellulaire formant une tumeur qui échappent aux règles de fonctionnement du corps. La survenue et la progression d'une tumeur est le résultat d'une accumulation d'évènements génétiques complexes altérant un certain nombre de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. La cellule cancéreuse est donc une cellule altérée, atteinte de dysrégulation, qui se multiplie sans contrôle et qui acquiert des avantages en terme de prolifération, d'adaptation, de survie et de dissémination au sein de l'organisme.

Les cancers sont classés selon le type de cellules, de tissus ou d'organes affectés au départ. Certaines tumeurs sont dites « tumeurs solides », désignant ainsi un cancer formé d'une tumeur principale représentant une masse individualisée, accompagnée ou non de métastases par opposition aux hémopathies malignes. En effet, ces dernières sont des cancers atteignant des cellules sanguines diffuses dans l'organisme, principalement dans la moelle osseuse, les ganglions ou le sang : c'est le cas des leucémies, des lymphomes, du myélome multiple. Les tumeurs solides représentent plus de 90 % des cas de cancers. Par ailleurs, certaines tumeurs primaires peuvent progresser vers un envahissement plus global de l'organisme, par échappement des cellules tumorales issues de cette tumeur primaire : on parle alors de métastases.

I.1.2. Les traitements

Le traitement d'un cancer comprend l'ensemble des soins médicaux destinés à combattre la maladie pour en limiter les conséquences, éviter la mort, rétablir la santé et entraîner la guérison. Le traitement requiert plusieurs stratégies : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie. Ces stratégies peuvent être mises en œuvre indépendamment les unes des

autres ou au contraire, dans le cadre de protocoles multiples, l'un après l'autre ou les uns associés aux autres.

- **Traitements locorégionaux :**

La **chirurgie** est un traitement local du cancer qui a pour objectif d'enlever la tumeur et qui occupe une place prépondérante dans le traitement de la plupart des tumeurs cancéreuses dites solides. En traitement unique, la chirurgie s'adresse aux formes localisées de cancers, découverts à un stade précoce, et elle est souvent associée à d'autres modalités de traitement.

La **radiothérapie** est également un traitement locorégional des cancers. Elle consiste à utiliser des rayonnements (rayons ou radiations) pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier, tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants.

Ces derniers traitements concentrent leur action au niveau de la tumeur et de sa région avoisinante, mais en cas de cancer à un stade de dissémination métastatique, soit en phase de généralisation, les traitements les plus efficaces sont les traitements systémiques.

- **Traitements systémiques :**

La **chimiothérapie** anti-cancéreuse consiste à injecter, le plus souvent par voie intraveineuse, des substances antitumorales. Ces agents antitumoraux s'utilisent dans le cas de métastases ou de cancers non localisés, comme dans le cas des leucémies. Le but de la chimiothérapie est d'enrayer ou de ralentir l'évolution de la prolifération des cellules tumorales. Un agent antitumoral (anticancéreux, antinéoplasique) se définit comme un agent cytotoxique qui détruit sélectivement les cellules cancéreuses. La plupart des agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie anticancéreuse interagissent avec l'ADN ou ses précurseurs. La classification des agents anticancéreux se fait suivant leur mécanisme d'action thérapeutique.

- **Inhibition de la synthèse de l'ADN :**

- **Agents antimétabolites.** Ils bloquent ou détournent une ou plusieurs voies de synthèse des acides nucléiques.

- **Inhibiteurs d'enzymes** impliquées dans la synthèse de l'ADN : inhibiteurs de la topoisomérase I et II.

- **Interaction avec l'ADN :**

- **Agents alkylants et apparentés.** Ils forment des liaisons covalentes avec les nucléotides de la chaîne ADN et inhibent ainsi la réplication.

- **Agents intercalants.** Ils s'intercalent entre deux brins d'ADN, altèrent la réplication et la transcription de l'ADN.
- **Agents scindants.** Ils créent de multiples cassures dans l'ADN, altèrent la réplication et la transcription de l'ADN.
- **Interactions avec des protéines ou des enzymes :**
 - **Agents poisons du fuseau et apparentés.** Produits naturels d'origine végétale qui affectent de façon sélective la fonction du fuseau mitotique par liaison à la tubuline.
 - **Inhibiteurs des tyrosines-kinases** impliquées dans des voies de signalisation menant à l'activation de facteurs de transcription et/ou influençant la synthèse d'ADN.

D'autres traitements généraux peuvent être également utilisés. Ils sont regroupés sous le nom de **biothérapie** et sont des moyens biologiques naturels, modifiés ou détournés de leur rôle habituel. Ce ne sont pas des méthodes nouvelles mais elles se sont multipliées, améliorées et rationalisées à partir des années 1980. Ces techniques biologiques sont regroupées sous deux rubriques principales : les hormones et les facteurs immunitaires.

L'**hormonothérapie** est utilisée lorsque certains cancers, comme ceux du sein ou de la prostate, ont leur croissance favorisée par des hormones.

L'**immunothérapie** (cytokines : interférons, interleukine 2, anticorps monoclonaux) a pour but de stimuler les défenses immunitaires de l'organisme pour combattre la tumeur maligne mais aussi pour protéger contre certains effets secondaires provoqués par les traitements.

Les rétinoïdes représentent une nouvelle voie de biothérapie. Ils agissent sur certaines cellules pour leur permettre de mûrir, de se différencier normalement et de reprendre leur place dans l'équilibre général. Selon le progrès des connaissances on pourra utiliser des substances qui freinent ou inhibent l'activité des gènes produisant les facteurs de croissance d'une cellule ou, à l'inverse, qui stimulent des gènes suppresseurs et ralentissent les fonctions cellulaires. À côté des moyens traditionnels et encore très prépondérants qui détruisent les cellules tumorales, les nouvelles biothérapies cherchent plutôt à corriger leur comportement anarchique. Plutôt que de les tuer, on cherche à les réguler pour leur permettre de retrouver leur fonctionnalité normale dans l'organisme.

Malheureusement, cet arsenal thérapeutique se heurte à un problème majeur lié au développement de la **résistance des cellules à la chimiothérapie**.

I.1.3. Résistance et phénotype MDR

La résistance des cellules tumorales aux médicaments anticancéreux est un problème majeur de la chimiothérapie. Les cellules cancéreuses possèdent ou acquièrent la possibilité de contourner les mécanismes d'action des médicaments chimiothérapeutiques. La résistance aux anticancéreux peut être naturelle ou acquise :

- Résistance naturelle : une tumeur ne répond pas d'emblée à un ou des traitements cytotoxiques.
- Résistance acquise : la tumeur est initialement sensible à la chimiothérapie anticancéreuse puis devient résistante en cours de traitement ou lors de la rechute.

Les cellules cancéreuses, probablement suite à une mutation ou à une amplification génique, empruntent ou contournent diverses voies métaboliques pour survivre à l'effet cytotoxique des médicaments. Les mécanismes qui peuvent induire la résistance sont très complexes et très divers, et sont propres à chaque modèle cellulaire :

Tumeurs non accessibles par les médicaments

- Mauvaise vascularisation.
- Tumeur protégée par une « barrière naturelle » (ex : barrière hémato-encéphalique du système nerveux central).

Altération du métabolisme du médicament

- Augmentation de l'inactivation de la substance active par hyperactivité d'enzymes impliquées dans le métabolisme.
- Diminution de la formation de métabolites actifs par diminution de l'activation de médicaments de type « pro-drugs ».

Altération de la cible du médicament

- Altération quantitative de la cible : surexpression ou diminution de l'expression de la cible.
- Altération qualitative de la cible : modification de la structure de la cible empêchant la reconnaissance.

Activation des mécanismes de réparation de l'ADN

- Les anomalies induites par le médicament sont réparées par exacerbation des mécanismes de réparation.

Modification de l'expression des gènes apoptotiques

- Surexpression des gènes anti-apoptotiques.
- Inactivation des gènes pro-apoptotiques.

Diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments

- Diminution de l'entrée du médicament dans la cellule.
- Augmentation de l'efflux du médicament de la cellule.

Ce dernier mode de résistance est le mécanisme principal par lequel de nombreux cancers développent une résistance aux médicaments chimiothérapeutiques. Il implique des transporteurs membranaires et concourt au phénotype MDR (Multi-Drug Resistance) caractérisé par une diminution des concentrations intracellulaires des cytotoxiques et une résistance croisée à des xénobiotiques d'une grande variété chimique et fonctionnelle. Une cellule résistante "multidrug" est une cellule qui a été sélectionnée pour sa résistance à un agent thérapeutique unique et qui s'avère être simultanément résistante à tout un groupe de produits auxquels elle n'a jamais été exposée auparavant. Les transporteurs incriminés sont des protéines membranaires qui expulsent les agents cytotoxiques maintenant ainsi leur concentration intracellulaire en dessous du seuil de mortalité pour la cellule. Ils appartiennent à la superfamille des **protéines ABC** (ATP-Binding Cassette).

LES TRANSPORTEURS ABC

II.1 Généralités

Les protéines ABC constituent une famille de protéines large et très diversifiée présente dans l'ensemble du monde vivant, des procaryotes aux eucaryotes, et des espèces animales aux espèces végétales. La plupart de ces protéines sont des protéines membranaires qui ont un rôle de transport d'une grande variété de substrats endogènes ou exogènes en utilisant l'énergie procurée par l'hydrolyse de l'ATP. Une séquence de gène hautement conservée « ATP-Binding Cassette » est présente et spécifique de cette superfamille de protéines. Chez *Escherichia coli*, 5 % de la totalité du génome code pour ces transporteurs (Linton 1998) au nombre de 70 et ayant des fonctions d'import et d'export de substrats divers. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 28 gènes codant pour des transporteurs ABC ont été identifiés (Bauer 2001).

Quant à l'Homme il existe 48 gènes distincts dans le génome humain (Dean 2001) classés en 7 sous-familles de ABCA à ABCG (Tableau 1). Malgré une grande variété de substrats transportés, des localisations tissulaires différentes et la multiplicité des fonctions assurées, ces protéines présentent des homologies structurales.

Symbole	Alias	Gène	Expression	Orient- ation	Fonction
ABCA1	ABC1	9q31.1	Nombreux tissus		Efflux des phospholipides et du cholestérol
ABCA2	ABC2	9q34.3	Cerveau, rein, poumon, cœur		Résistance aux médicaments
ABCA3	ABC3, ABCC	16p13.3	Poumons et autres tissus		Sécrétion de surfactant ?
ABCA4	ABCR	1p21.3	Rétine, cellules photoréceptrices		Efflux de <i>N</i> -rétynylidène-PE
ABCA5		17q24.3	Muscles, cœur testicules		NR
ABCA6		17q24.3	Foie		NR
ABCA7		19p13.3	Leucocytes, thymus, rate, moelle osseuse		NR
ABCA8		17q24.3	Ovaire		NR
ABCA9		17q24.3	Cœur		NR
ABCA10		17q24.3	Muscle, cœur, monocytes		NR
ABCA12		2q34	Estomac		NR
ABCA13		7p12.3	Trachée, testicules, moelle osseuse		NR
ABCB1	P-gp, MDR	7q21.12	Nombreux tissus	A	MDR
ABCB2	TAP1	6p21.3	Nombreux tissus		Transport de peptides
ABCB3	TAP2	6p21.3	Nombreux tissus		Transport de peptides
ABCB4	PGY3	7q21.12	Hépatocytes	A	Transport de phosphatidylcholine biliaire
ABCB5		7p21.1	Nombreux tissus		NR
ABCB6	MTABC3	2q35	Mitochondries		Transport du fer

ABCB7	ABC7	Xq21-q22	Mitochondries		Transport des précurseurs Fer/Soufre (hème)
ABCB8	MABC1	7q36.1	Mitochondries		NR
ABCB9		12q24.31	Cœur, cerveau, lysosome		NR
ABCB10	MTABC2	1q42.13	Mitochondries		NR
ABCB11	SPGP	2q24.3	Hépatocytes		Transport des sels biliaires
ABCC1	MRP1	16p13.2	Nombreux tissus	B	MDR
ABCC2	MRP2	10q24.2	Foie, intestin, rein	A	Efflux d'anions organiques + MDR
ABCC3	MRP3	17q21.33	Intestin, rein	B	Efflux d'anions organiques + MDR
ABCC4	MRP4	13q32.1	Nombreux tissus	A / B	Transport de nucléosides (MDR)
ABCC5	MRP5	3q27.1	Nombreux tissus	B	Transport de nucléosides (MDR)
ABCC6	MRP6	16p13.12	Rein, hépatocytes	B	Transport de peptides et conjugués anioniques
ABCC7	CFTR	7q31.31	Poumon, intestin	A	Canal ions chlorures
ABCC8	SUR	11p15.1	Pancréas		Régulation de canaux potassiques ATP dépendants
ABCC9	SUR2	12p12.1	Tous tissus		Régulation de canaux potassiques ATP dépendants
ABCC10	MRP7	6p21.1	Tous tissus (faibles)		Transport d'oestradiol et leucotriène C4
ABCC11	MRP8	16q12.1	Tous tissus	A	Transport de nucléotides cycliques + MDR
ABCC12		16q12.1	Tous tissus (faibles)		NR
ABCC13		21q11.2	Foie fœtal, moelle osseuse, leucocytes		NR
ABCD1	ALD	Xq28	Peroxisomes		Transport d'acides gras à longue chaîne
ABCD2	ALDL1, ALDR	12q11	Peroxisomes		Transport d'acides gras
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22.1	Peroxisomes		Transport d'acides gras
ABCD4	PMP69, P70R	14q24.3	Peroxisomes		Transport d'acides gras
ABCE1	OABP, RNS4I	4q31.31	Ovaires, testicules, rate		Inhibiteurs de la ribonucléase L
ABCF1	ABC50	6p21.1	Tous tissus		NR
ABCF2		7q36.1	Tous tissus		NR
ABCF3		3q27.1	Tous tissus		NR
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	Cerveau, rate, poumon		Transport de cholestérol
ABCG2	MXR, BCRP	4q22	Placenta, Sein, Foie, intestins	A	MDR
ABCG4	White2	11q23	Macrophages, cerveau, œil, rate		NR
ABCG5	White3	2p21	Foie, intestin grêle	A	Transport des stérols
ABCG8		2p21	Foie, intestin grêle	A	Transport des stérols

Tableau 1. Les membres de la famille des transporteurs ABC. A = Apical, B = Basolatéral, MDR = Résistance multiple aux agents thérapeutiques, NR = Non renseigné

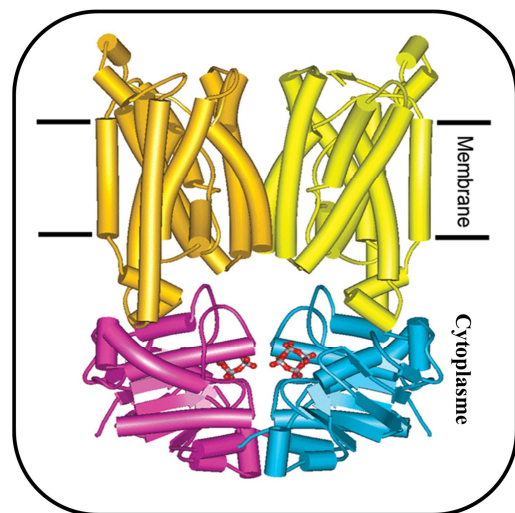
II.2. Topologie générale des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC ont une structure relativement bien conservée. Cette organisation structurale commune comprend 4 domaines codés par un ou plusieurs polypeptides (Figure 1) (Higgins 2004) :

- Deux domaines transmembranaires ou TMDs (TransMembrane Domains) qui permettent la fixation des substrats et leur passage à travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique
- Deux domaines nucléotidiques cytosoliques ou NBDs (Nucleotide Binding Domains) qui assurent la fixation de l'ATP et son hydrolyse pour alimenter le processus de transport.

Figure 1. Représentation schématique du transporteur de la vitamine B12 BtuCD de *E. coli* (Higgins et Linton 2004).

Dans ce transporteur, les deux TMDs (jaune et orange) sont identiques les uns aux autres, comme le sont les deux NBD (rose et bleu). Deux molécules de tétravanadate cyclique (rouge en boule et bâton) imitent les nucléotides de l'ATP lié dans les deux poches formées à l'interface protéine-protéine du dimère NBD.



Chaque domaine transmembranaire est constitué de 6 hélices α transmembranaires. Une fois la protéine repliée, les TMDs forment un pore par lequel divers substrats pourront traverser la membrane plasmique. Les TMDs, de séquences génétiques très variables permettent la fixation et la spécificité de différents substrats (Higgins 2004). Pour certains transporteurs comme la P-gp (glycoprotéine-P ou ABCB1), il existerait plusieurs sites de fixation des substrats.

Les domaines nucléotidiques (NBDs) catalysent l'hydrolyse du phosphate γ de l'ATP avec intervention dans le site actif d'une molécule d'eau et d'un cofacteur métallique divalent, le magnésium (Mg^{2+}). Ils sont situés dans le cytosol et sont hautement conservés chez tous les transporteurs et permettent ainsi un mécanisme commun de fixation et d'hydrolyse de l'ATP. Sur les trois séquences conservées, deux motifs sont caractéristiques des protéines fixant

l'ATP : les **motifs A et B de Walker** (Walker 1982) et un motif caractéristique des transporteurs ABC : la **signature S** (Figure 2).

Le motif A de Walker porté par une boucle suivie d'une hélice α interagit par interactions électrostatiques avec la chaîne phosphate (phosphates α et β) de l'ATP (Chen 2003). Le motif B de Walker porté par un feuillet β possède un résidu d'acide aspartique (aspartate) formant une liaison de coordination avec l'ion magnésium, cofacteur nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP (Smith 2002).

La signature S est une séquence consensus d'une douzaine d'acides aminés commençant par « LSGGQ » et située entre les motifs A et B de Walker. Ce domaine permet de contacter le phosphate γ et joue un rôle dans la fonctionnalité des transporteurs (Gottesman 1995).

Outre les motifs A et B de Walker et la signature ABC, d'autres résidus conservés semblent jouer un rôle important dans le mécanisme catalytique des domaines nucléotidiques comme la H-loop et la Q-loop. La H-loop et l'histidine en C-terminal du motif B de Walker permettraient le positionnement des chaînes latérales, du cation Mg^{2+} , et de la molécule d'eau dans le site actif pour l'hydrolyse (Zaitseva 2005). La Q-loop, grâce à un résidu glutamine conservé, assurerait la communication entre les TMDs et les NBDs (Georges 2002).

Les hélices de couplage (coupling helices) sont d'autres motifs qui permettraient de coupler les changements conformationnels entre les TMDs et les NBDs (Locher 2002) (Figure 3).

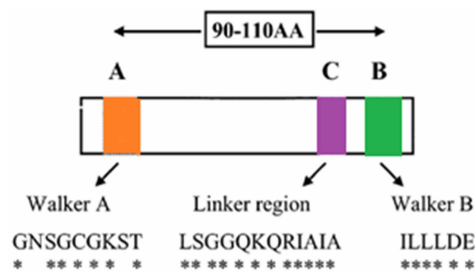


Figure 2. Schéma illustrant les séquences consensus des domaines de liaison des nucléotides (NBD). Les motifs A et B de Walker sont distants de 90 à 110 acides aminés. La signature ABC précède le motif B de Walker. (Gottesman et Ambudkar, 2001)

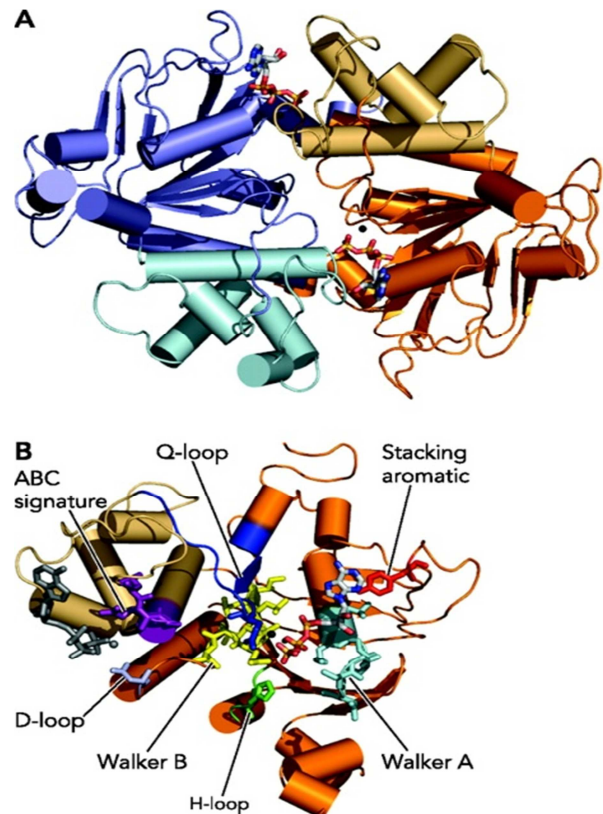


Figure 3. Modèle de la P-glycoprotéine modélisée d'après l'aménagement du dimère MJ0796 (Stenham 2003). Dimère des NBDs fermés et ses motifs conservés. A: le dimère de NBDs fermé vu de la membrane avec deux molécules d'ATP prises en sandwich à l'interface des NBDs tête-bêche. B: La position des motifs conservés des protéines ABC (décrits pour la plupart dans le texte) est indiquée .

II.3. Mécanisme fonctionnel des transporteurs ABC

De nombreuses études ont tenté d'expliquer le mécanisme de transport des substrats par les transporteurs ABC. Le premier modèle a été décrit par Higgins et Linton en 2004 (Higgins 2004): l'«ATP-switch model» qui implique des corrélations de modifications conformationnelles dans les deux directions entre les NBDs et TMDs. Les différentes étapes du mécanisme ATP-switch sont schématisées dans la figure 4 et comprennent :

- Etape 1 : A l'état de repos, le transporteur est dans une forme dépourvue d'ATP et dispose d'une forte affinité pour le ligand. La liaison du ligand aux TMDs entraîne un changement de conformation des NBDs et par conséquent une augmentation de l'affinité des NBDs pour l'ATP.

- Etape 2 : La liaison de l'ATP à la conformation fermée des NBDs. Ces changements altèrent alors l'affinité pour le ligand et permettent sa libération.
- Etape 3 : L'hydrolyse de l'ATP initie la dissociation du dimère de NBDs, par destabilisation de la conformation fermée du dimère.
- Etape 4 : Le phosphate, produit de l'hydrolyse de l'ATP, est libéré, provoquant ainsi des changements conformationnels des NBDs et des TMDs. Le dimère de NBDs est alors dissocié et retourne en position ouverte car l'affinité pour l'ADP produit est faible. Celui-ci est alors libéré. Le cycle de transport est complet permettant également de restaurer l'état de haute affinité du transporteur pour le substrat.

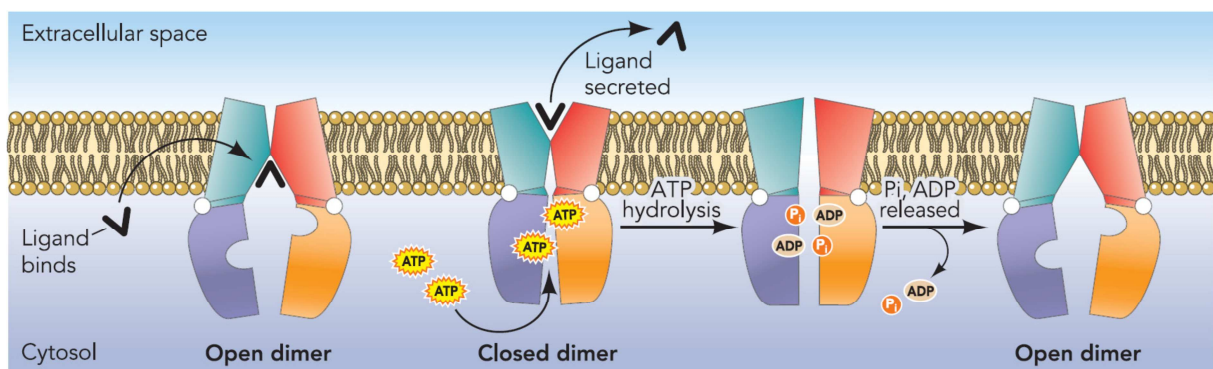


Figure 4. Modèle du cycle de transport des transporteurs ABC (Linton 2007).

Des adaptations de ce modèle peuvent être prises en compte en fonction des différents transporteurs. La libération du substrat pourrait être couplée à l'une des trois dernières étapes du cycle en fonction du transporteur ou du substrat. Pour certains transporteurs l'hydrolyse d'une seule molécule d'ATP suffirait à rétablir le cycle de transport.

II.4. Implication des transporteurs ABC dans des pathologies humaines

Du fait de leur nombre important, les transporteurs ABC sont impliqués dans diverses manifestations pathologiques humaines (Tableau 2). Des mutations de gènes codant pour ces protéines modifient leur fonction. De plus, de nombreux organismes pathogènes utilisent des transporteurs ABC pour exporter des facteurs de virulence ou pour résister aux médicaments.

Transporteurs ABC	Gènes	Maladie associée
<i>Transporteurs dont l'inactivation cause une maladie génétique</i>		
CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator)	ABCC7	Mucoviscidose
SUR1 SUR2 (Sulfonyl Urea Receptor 1 et 2)	ABCC8 ABCC9	Hyperinsulinisme familial
MRP2 (Multidrug Resistance Protein2)	ABCC2	Syndrome de Dubin-Johnson
ALDP (AdrénoLeucoDystrophie Protein)	ABCD1	
ABCR (ABC retina)	ABCA4	Maladie de Stargardt/ Dégénérescence maculaire liée à l'âge
ABC1	ABCA1	Maladie de Tangier
PMP70 (Peroxisomal Membrane Protein 70)	PMP70	Syndrome de Zellweger
TAP1et TAP2 (Transporter associated with Antigen Presentation 1 et 2)	ABCB2 et ABCB3	Immunodéficience
ABC7	ABC7	Anémie sidéroblastique et ataxie
MDR3 (Multidrug Resistance 3)	mdr3	Syndrome de cholestase intra hépatique de type 3
SPGP (Sister P-GlycoProtein)	ABCB11	Syndrome de cholestase intra hépatique de type 2
<i>Transporteurs dont la surexpression provoque résistance ou virulence</i>		
MRP1(Multidrug Resistance Protein2)	ABCC1	Résistance multiple aux agents anti-cancéreux
MDR1 (P-gP) (Multidrug Resistance 3)	ABCB1	Résistance multiple aux agents anti-cancéreux
BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)	ABCG2	Résistance multiple aux agents anti-cancéreux
Pfmdr (Plasmodium Falsiparum Multidrug Resistance)	pfmdr 1	Résistance multiple des parasites aux agents antiparasitaires
HlyB		Virulence de bactéries pathogènes
CDR1		Résistance multiple des levures aux agents antifongiques
OleB, MsrA		Résistance multiple des bactéries aux antibiotiques

Tableau 2. Transporteurs ABC impliqués dans des pathologies humaines.

II.5. Les trois principaux transporteurs ABC humains impliqués dans le phénotype MDR

Un mécanisme de résistance aux drogues dû à un transport actif des agents chimiothérapeutiques hors de la cellule en induisant une baisse de leur concentration intracellulaire a été décrit pour la première fois par Dano en 1973 (Dano 1973). La première protéine impliquée dans ce phénomène est connue sous le nom de MDR (Multidrug Resistance) ou P-gp (glycoprotéine-P), protéine de surface surexprimée dans les lignées cancéreuses résistantes et codée par le gène *mdr1* (Juliano 1976).

En 1992, Cole et ses collaborateurs mettent en évidence la surexpression d'un autre transporteur dans certaines lignées cellulaires, ce dernier a été baptisé : MRP1 (Multidrug Resistance protein 1) (Cole 1992). Puis vers la fin des années 90, le phénotype MDR de différents tissus humains ou lignées cancéreuses humaines fût imputé à d'autres transporteurs. Ces transporteurs ont été appelés BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) pour celui trouvé dans les cellules de cancer du sein (Yang 1995), ABCP (transporteur ABC du placenta) pour celui découvert dans les cellules du placenta (Allikmets 1998) et MXR pour le transporteur spécifique de cellules cancéreuses résistantes à la mitoxantrone (Miyake 1999).

Dans le cadre de ce travail de thèse, il sera question de l'étude de ces deux derniers transporteurs que nous appellerons par la suite, dans un souci d'homogénéité tout au long de la thèse MRP1 et ABCG2.

III.1.2. Localisations et fonctions physiologiques

MRP1 est largement exprimée dans tout l'organisme, avec de hauts niveaux d'expression dans les poumons, les testicules, les reins, les cellules mononucléaires du sang, et les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Cole 1992, Nies 2004). MRP1 est localisée sur la membrane baso-latérale des cellules épithéliales des capillaires sanguins et sur la membrane luminaire des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Figure 6).

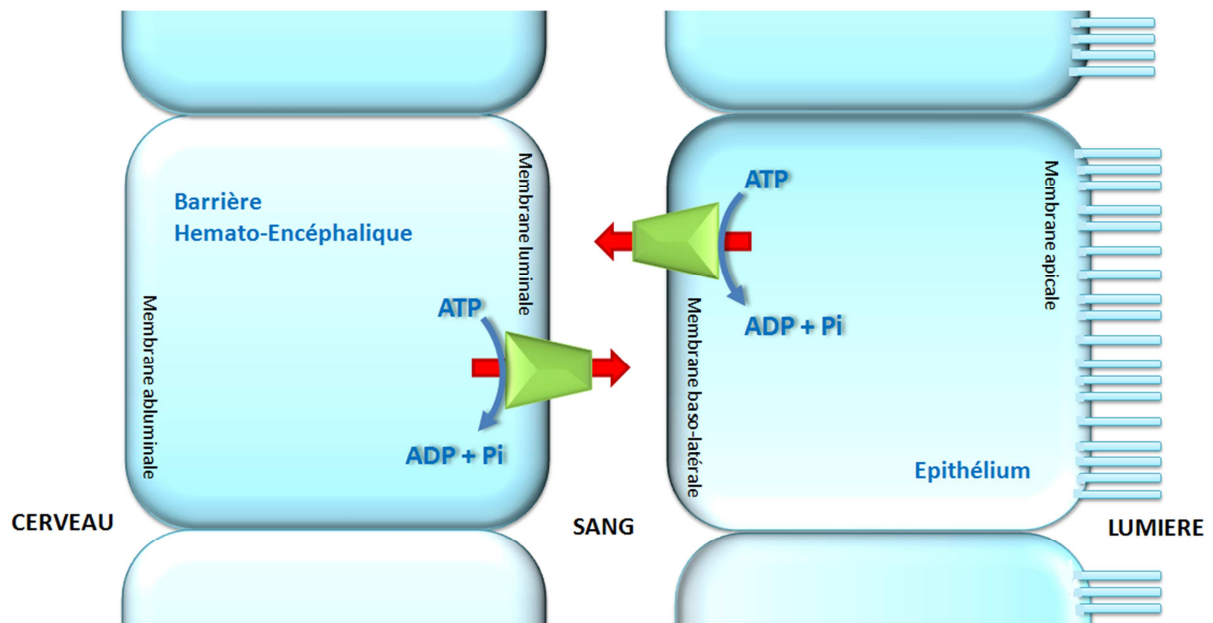


Figure 6. Localisation de MRP1 dans les cellules polarisées et dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux.

La protéine MRP1 est impliquée dans un grand nombre de fonctions biologiques compte tenue de sa distribution étendue au sein de l'organisme et de la diversité de ses substrats. MRP1 assure le transport de divers substrats anioniques, tel que le leucotriène C₄, des substrats glucuronoconjugués, des sulfates organiques ou des sulfonates, des sels biliaires, mais aussi des substrats glutathioconjugués (-GS), le glutathion (GSH) lui-même ou encore le glutathion oxydé (GSSG) (Tableau 3). Par ce mécanisme, MRP1 joue certainement un rôle contre les phénomènes de stress oxydant par contribution dans le maintien du potentiel redox de la cellule. La protéine MRP1 est également impliquée dans le transport des xénobiotiques:

- conjugués au glutathion (ex : GS-Aflotoxine B1 époxyde).
- non conjugués au glutathion, il s'agit alors d'un co-transport, c'est le cas de la vincristine qui est co-transportée avec le GSH.

- transportés indépendamment du GSH tels que le méthotrexate.

MRP1 utilise alors différents modes de transport impliquant le GSH (Figure 7).

<u>SUBSTRATS CONNUS DE MRP1</u>
Leukotriènes C4 (LTC4), D4 (LTD4) et E4 (LTE4)
Glutathioconjugués (-GS) Aflotoxine B1 epoxide-GS Dinitrophényl-GS Prostaglandines A ₂ -GS Acides Ethacryniques-GS Melphalan-GS GSSG (Glutathion oxydé)
Glucuronoconjugués (-G) Bilirubine-G Estradiol 17βD-G Etoposide-G Hydrodéoxycholate-G
Sulfoconjugués Estone 3-sulfate Taurocholate 3-sulfate Déhydroepiandrosterone 3-sulfate
Anticancéreuses Anthracyclines (daunoribicine, doxorubicine, mitoxantrone) Camptothécines (topotecan, irinotecan, SN-38, metothrexate) Epipodophyllotoxines Imatinib, vinca alcaloïdes (vincristine)

Tableau 3. Substrats endogènes ou exogènes connus de MRP1

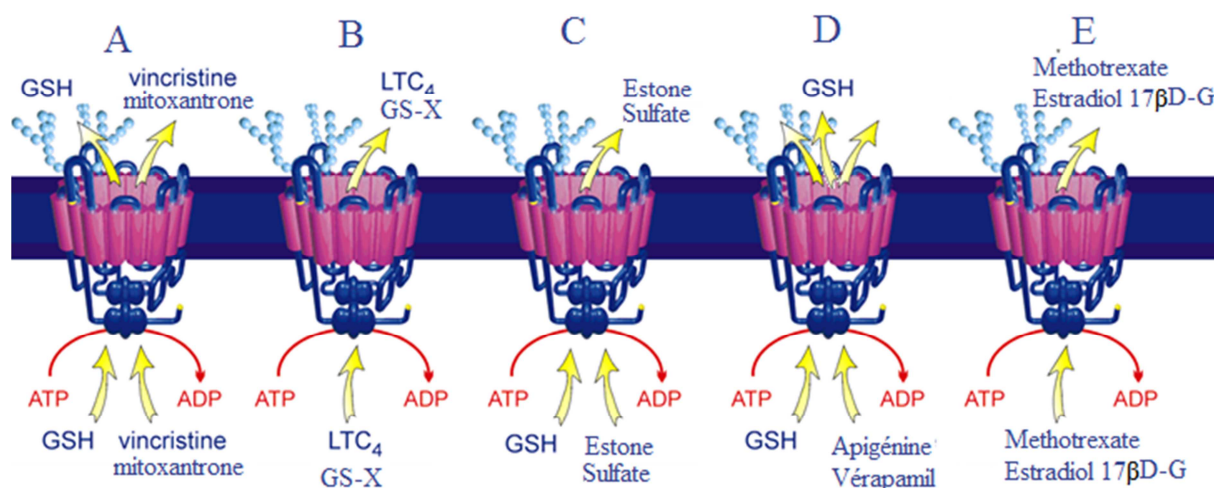


Figure 7. Représentation schématique des différents modes de transport de MRP1 impliquant le GSH (Image de Cole 1998, adaptée avec Rothnie 2008) ; A : co-transport de GSH et anti-cancéreux, B : transport de substrats glutathioconjugués, C : transport d'anions organiques conjugués induit par le GSH, D : Modulateurs stimulant l'efflux de GSH, E : transport de substrats indépendamment du GSH.

III.1.3 Cycle de transport

Le cycle de transport de MRP1 (ou ABCC1) suit le modèle « ATP-switch » des transporteurs ABC. En revanche pour les transporteurs de la famille des ABCC, la fixation et l'hydrolyse de l'ATP est séquentielle et se déroule comme indiqué ci-dessous (Figure 8) :

- La fixation d'une molécule d'ATP avec une faible affinité sur le site NBD1 permet d'augmenter l'affinité du site NBD2 pour l'ATP.
- L'hydrolyse de l'ATP au site NBD2 est suffisante pour achever le cycle de transport mais le retour de la protéine à sa conformation initiale soit en basse affinité pour l'ATP soit en haute affinité pour le substrat est encore inconnu et des questions demeurent sur le fonctionnement exact du site NBD1 : Est-il un site catalytique ou non ?

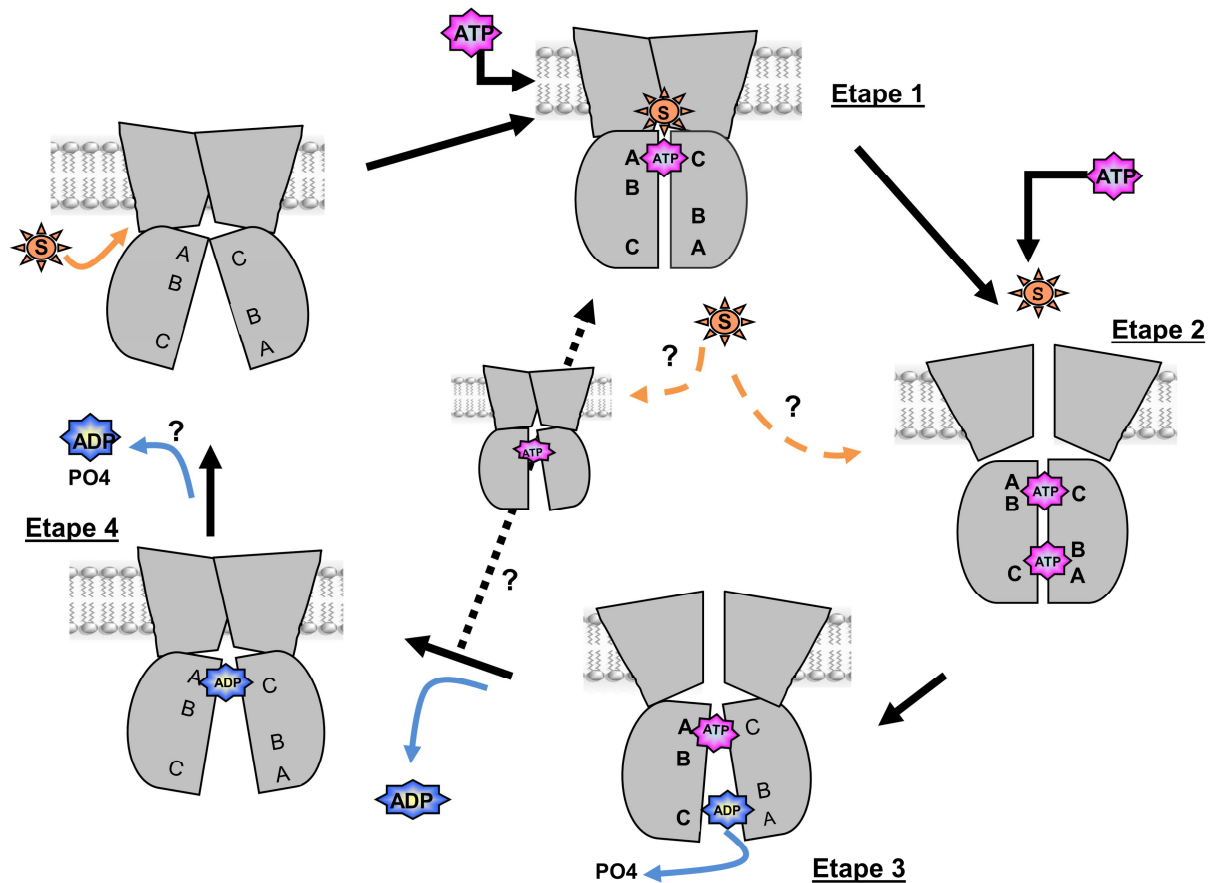


Figure 8 : Représentation schématique du cycle de transport de MRP1 (Boumendjel 2009).

III.2. La protéine ABCG2

III.2.1. Origine et découverte

Le gène codant pour cette protéine a été découvert dans les années 90 par trois équipes. En 1995, des cellules de carcinome du sein ont montré une résistance à la mitoxantrone mais également à des inhibiteurs de la topoisomérase de type I comme la camptothécine et ses dérivés (Yang 1995). Puis en 1998, le gène responsable de cette résistance fût séquencé et cloné par Doyle et coll. sur des lignées cellulaires du cancer du sein, d'où son nom BCRP (Breast Cancer Resistance Protein). La même année, un gène pratiquement identique et codant pour cette même protéine fût découvert dans des cellules du placenta et appelée ABCP (ABC transporter in Placenta) (Allikmets 1998). Une quatrième équipe découvrit également un gène codant pour une protéine responsable du phénotype de résistance à la mitoxantrone sur une lignée cellulaire de carcinome de colon qui fût alors nommée MXR (Mitoxantrone Resistance-associated gene) (Miyake 1999). L'analyse phylogénétique de ce transporteur avec

d'autres transporteurs ABC a permis le rapprochement avec ABCG1. Il appartient donc à la sous-famille des ABCG et la protéine a donc été ensuite appelée ABCG2.

III.2.2. Organisation structurale

ABCG2 est une protéine de 72 kDa et de 665 acides aminés. C'est un demi-transporteur, qui comporte un TMD constitué de 6 hélices transmembranaires et un NBD. Comparés aux autres transporteurs connus (P-gp et MRP1), les domaines d'ABCG2 ont une organisation inverse : le TMD est du côté C-terminal et le NBD est du côté N-terminal (Figure 9). Seule une homodimérisation permet de rendre la protéine fonctionnelle. L'unité minimale fonctionnelle d'ABCG2 est un homodimère, mais plusieurs équipes ont démontré la présence d'oligomères de taille supérieure.

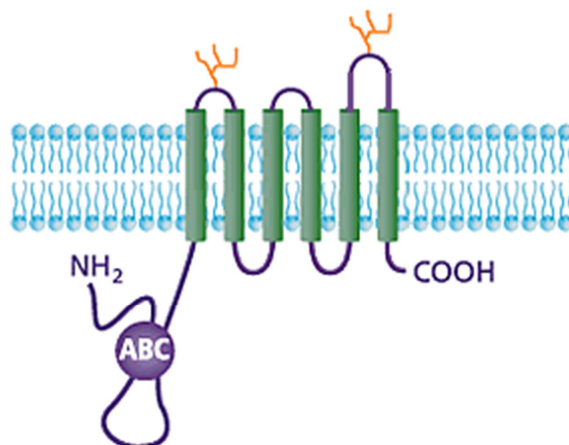


Figure 9. Topologie d'ABCG2

III.2.3. Localisations et fonctions biologiques

ABCG2 est exprimée de manière quantitativement variable dans la membrane plasmique des cellules de nombreux tissus : placenta, système nerveux central, foie, glandes surrénales, prostate, testicules, utérus, intestin grêle, ovaires, côlon, estomac, poumons, reins et pancréas. Pour les cellules épithéliales, la protéine est retrouvée au niveau de la membrane apicale, et pour la barrière hémato-encéphalique (BHE) elle est retrouvée du côté luminal. Du fait de son importante distribution au sein de l'organisme, cette protéine joue certainement un rôle dans la protection contre les xénobiotiques. Récemment, une étude a démontré l'implication de cette protéine dans le maintien de l'équilibre redox des cellules. En effet, cette protéine est capable de transporter, d'effluer le glutathion et ainsi de réguler son taux intracellulaire (Brebuhl 2010). ABCG2 est également capable de transporter de nombreux substrats

hydrophobes, chargés positivement ou négativement. Les premières études sur ABCG2 ont été effectuées sur des lignées cellulaires sélectionnées résistantes à un agent chimiothérapeutique donné. Les premiers substrats alors connus d'ABCG2 sont essentiellement des anticancéreux, comme par exemple la mitoxantrone, la camptothécine et ses dérivés à savoir le topotécan, le SN-38, l'irinotécan... Du fait de l'implication de cette protéine dans le phénotype MDR, d'autres anticancéreux s'ajoutent à la liste tels que le flavopiridol, des antimétabolites comme le méthotrexate (antifolate), des indocarbazoles inhibiteurs des topoisomérases, des inhibiteurs des tyrosines kinases comme le gefitinib ou imatinib. Des molécules appartenant à d'autres groupes pharmacologiques sont également transportées : des antibiotiques, des flavonoïdes, des porphyrines et des antiviraux (Tableau 4).

<u>SUBSTRATS CONNUS D'ABCG2</u>	
<u>Agents anticancéreux</u> Intercalant de l'ADN <u>Inhibiteurs de topoisomérase II</u> - Anthracyclines (antibiotiques antitumoraux) - Daunorubicine - Doxorubicine - Epirubicine - Anthracène - Mitoxantrone - Bisantrène - Podophylotoxines - Etoposide - Teniposide <u>Inhibiteurs de topoisomérase I</u> - Dérivés de la camptothécine 9-Aminocamptothécine - Topotécan - Irinotécan - SN-38 - Diflomotécan - Homocamptothécine - Exatécan - BNP13 - Indolocarbazoles - J-107088 - NB-506	<u>Agents anticancéreux (suite)</u> Inhibiteurs de kinases cyclines-dépendantes (Cdk) - Flavopiridol - UCN-01 <u>Antimétabolites (antifolates)</u> - Méthotrexate - GW1843 - Tomudex - Triglutamate <u>Inhibiteurs de tyrosine kinase</u> - Imatinib - Gefitinib - CI1033 <u>Substrats endogènes</u> - Estrone-3-sulfate 17β-estradiol sulfate 17 β-estradiol - Folates <u>Toxines</u> - Phéophorbide a - Pyrophéophorbide a methyl ester - Chlorin6 <u>Porphyrines</u> : Protoporphyrine IX <u>Fluorophores</u> : Rhodamine 123, Hoechst 33342

Tableau 4. Substrats connus d'ABCG2

III.3. Les protéines MRP1 et ABCG2 comme cibles dans la découverte de nouvelles molécules à potentialité anticancéreuse

La chimiorésistance des cellules cancéreuses est un obstacle majeur auquel se heurtent les cliniciens. Afin de pallier cette difficulté, le développement de stratégies thérapeutiques ciblées, alternatives aux traitements conventionnels ou complémentaires de ceux-ci est nécessaire. Il s'agit notamment de lever les verrous moléculaires qui protègent la cellule tumorale contre la mort cellulaire par apoptose et/ou d'inhiber son métabolisme énergétique. Afin de maîtriser et d'inverser le phénotype MDR lié aux transporteurs ABC, plusieurs approches ont été envisagées comme l'utilisation d'anticancéreux échappant à ce type de résistance, ou encore de combinaisons de cytotoxiques.

Actuellement, les efforts sont principalement focalisés sur la découverte de composés capables de s'opposer à la réduction de l'accumulation des anticancéreux dans les cellules de phénotype MDR. Ces composés, appelés chimiosensibilisateurs, sont des modulateurs « reversal agents », capables d'inhiber l'efflux produit par les transporteurs, ce qui rend les cellules résistantes à nouveau sensibles au traitement, et permet une réversion partielle ou totale de la résistance multiple aux agents chimiothérapeutiques.

Plusieurs types de modulateurs peuvent induire ce phénomène :

- Des composés inhibiteurs : leur fixation sur la protéine transmembranaire empêche le transport des agents anticancéreux par compétition.
- Certains anticorps dirigés contre un épitope extracellulaire du transporteur potentialisent la cytotoxicité de médicaments impliqués dans le phénotype de résistance de façon dose-dépendante. Cet anticorps entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en bloquant l'efflux des médicaments. La fixation de l'anticorps à la protéine entraînerait un changement conformationnel de celle-ci empêchant le transport de l'anticancéreux coadministré ou alors entraînerait la resensibilisation de la cellule cancéreuse pour l'anticancéreux (Mickisch 1992).

D'autres stratégies sont également en cours d'étude *via* :

- les immunotoxines : une combinaison d'un anticorps dirigé contre ces même épitopes avec une endotoxine de *Pseudomonas*, qui s'avérerait létale pour les cellules cancéreuses résistantes (Fitzgerald 1987).

- La stratégie anti-sens : un oligonucléotide complémentaire de la séquence d'ARNm de la protéine cible, à savoir le transporteur, s'hybriderait sur cet ARNm et en empêcherait ainsi la synthèse.
- L'encapsulation d'agents anti-cancéreux dans des liposomes, de même que la conjugaison de médicaments à la transferrine (doxorubicine-transferrine), peuvent augmenter les concentrations intracellulaires de médicaments dans les cellules cancéreuses (P. Lemieux et M. Page, 1994)
- Des inhibiteurs de kinases peuvent agir indirectement sur le transport des anticancéreux *via* ces transporteurs. En effet, les protéines kinases jouent un rôle essentiel dans la phosphorylation des transporteurs impliqués et dans la régulation du transport par cette phosphorylation (phénomènes observés avec la P-gP (Basu, 1993, Bates 1993)).
- Des modulateurs permettant une activation d'efflux de glutathion. Par fixation au transporteur, ces molécules seraient capables d'activer un efflux de glutathion soudain et massif. Une mort des cellules cancéreuses par apoptose a été observée, corrélée à cet efflux.

Dans la conception de nouveaux modulateurs plus actifs et plus sélectifs des transporteurs ABC, plusieurs approches peuvent être mises en œuvre.

Dans le cas de la conception d'inhibiteurs d'ABCG2 ou de MRP1, les difficultés comme pour d'autres transporteurs ABC, sont nombreuses. Tout d'abord l'absence de structure cristalline 3D, rendant impossible toute approche rationnelle. La deuxième difficulté provient de la grande variété, chimique et structurale, des substrats reconnus par la protéine, il est alors difficile d'établir un modèle d'inhibiteur. La découverte et l'optimisation de nouvelles substances actives pour ces cibles devront alors se fonder sur le criblage de molécules et l'étude des relations structure-activité des ses ligands ou encore sur l'utilisation d'un modèle structuré par homologie de séquence. Ce modèle devrait permettre une conception « rationnelle ».

L'analyse de la littérature montre clairement que les stratégies poursuivies reposent toutes sur le criblage de molécules afin d'identifier une molécule touche (hit), qui devra subir des modifications de structure ou pharmacomodulation afin d'optimiser son activité. Cette approche a déjà permis la découverte d'inhibiteurs très actifs.

III.3.1. Exemples d'inhibiteurs de MRP1

Outre les travaux biologiques qui visent l'élucidation de la structure, la localisation des sites actifs et du mode d'action, la plupart des efforts ont été axés sur la recherche de molécules qui agissent comme inhibiteurs de MRP1. En raison des similitudes structurales et fonctionnelles entre la P-gp et MRP1, il est logique que la plupart des inhibiteurs de la P-gp aient été testés pour leur effet sur MRP1.

Les composés conduisant à une inhibition de MRP1 sont représentés ci-après (Figure 10) (Boumendjel 2005). L'interaction entre les flavonoïdes et MRP1 a été indiquée pour la première fois par Versantvoort en 1994, qui a démontré que des flavonoïdes connus tels que la génistéine, la biochanine A, l'apigénine et la quercétine pouvaient inhiber l'activité de transport de MRP1 (Versantvoort 1994). Depuis, de nombreuses molécules appartenant à différentes familles ont été rapportées. Hormis, le peptidomimétique, nommé TER199 (Figure 10) qui a été conçu de façon *semi-rationnelle* (analogue du GSH), tous les autres inhibiteurs ont été obtenus par modifications aléatoires de hits obtenus par screening de chimiothèques. La diversité structurale de ces inhibiteurs laisse penser que ce transporteur est multi-sites, capable de reconnaître un grand nombre de molécules. Cette variation structurale indique également que toute conception est rendue difficile.

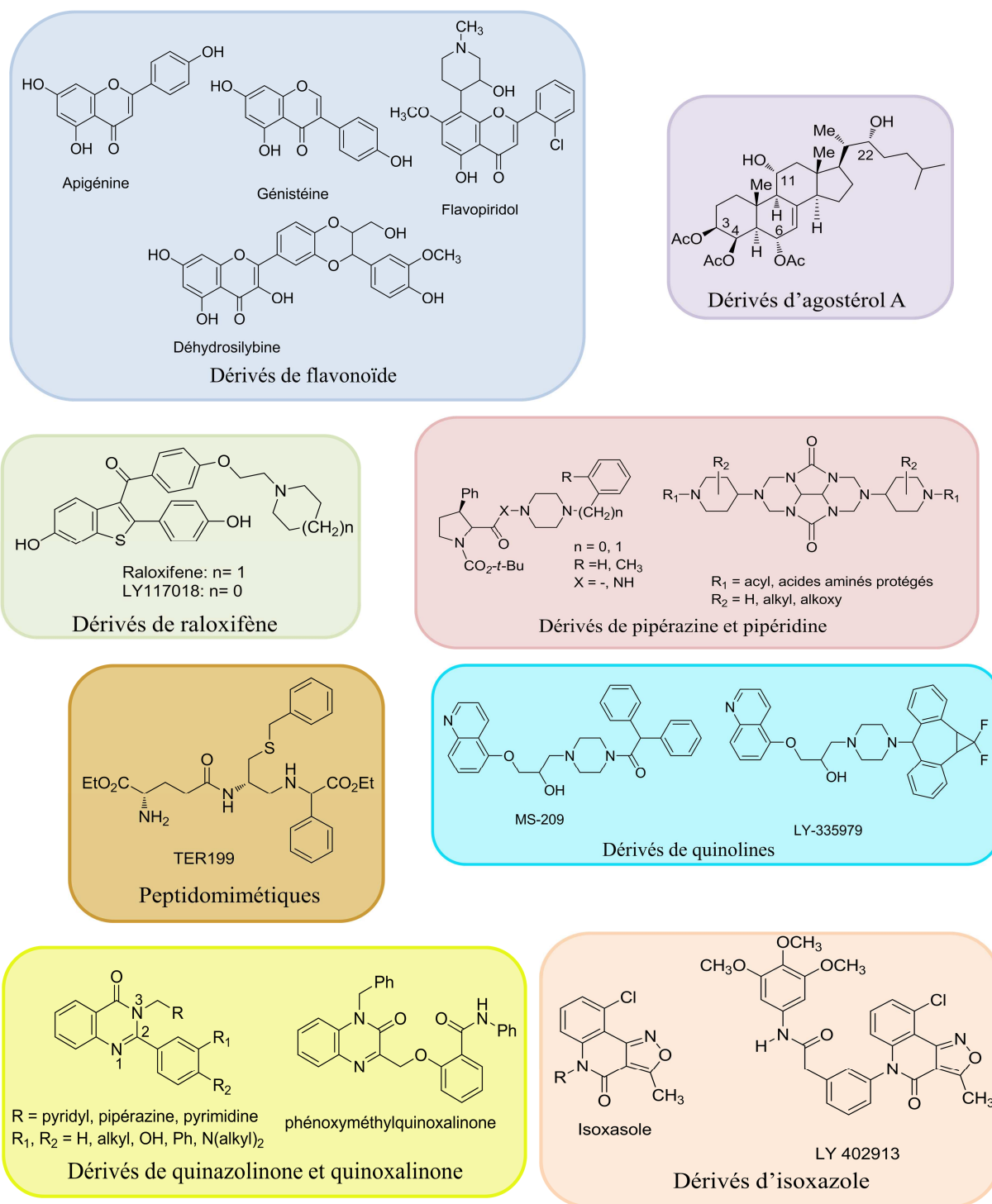


Figure 10. Inhibiteurs connus de MRP1.

III.3.2. Ligands de MRP1 agissant comme activateurs

De nombreuses investigations ont été menées sur MRP1 dans le but de moduler son activité qui concourt au phénotype MDR. Comme nous l'avons souligné, des efforts ont été axés sur la recherche de molécules qui agissent comme inhibiteurs de MRP1. Une des stratégies

utilisées pour identifier des inhibiteurs de MRP1 est axée sur le criblage de certains inhibiteurs connus d'autres transporteurs. Parmi ces inhibiteurs, le vérapamil, inhibiteur de référence de la glycoprotéine-P (Naito 1989), qui se révèle inefficace pour restaurer la sensibilité à la vincristine des cellules cancéreuses du col de l'utérus résistantes et surexprimant MRP1 (Cole 1994). Le même phénomène est observé sur des cellules leucémiques traitées à l'épirubicine (Davey 1995). En revanche, dans la dernière décennie, plusieurs études ont démontré la capacité du vérapamil à sensibiliser les cellules par la déplétion en GSH transporté *via* MRP1. Grech et ses collaborateurs illustrent ce phénomène. Leurs résultats montrent que la modulation de la cytotoxicité à l'étoposide de cellules leucémiques surexprimant MRP1 est liée aux changements dans le métabolisme du glutathion plutôt qu'à des changements dans l'accumulation du cytotoxique (Grech 1998). Les auteurs proposent alors une amélioration de la cytotoxicité de l'étoposide par le vérapamil non pas corrélée à son accumulation intracellulaire mais à la stimulation de l'efflux de GSH. Des études *a posteriori* ont appuyé cette hypothèse : le vérapamil, sans être transporté, peut stimuler l'efflux du glutathion par MRP1 (Loe 2000). Par la suite d'autres investigations ont démontré la capacité du vérapamil à induire un efflux de GSH entraînant l'apoptose cellulaire, phénomène ne faisant pas intervenir de cytotoxiques. En ce sens, l'effet du vérapamil est alors étudié en 2004 sur des cellules de hamster (BHK-21) transfectées, surexprimant MRP1. Ces cellules sont sélectivement tuées contrairement aux cellules BHK-21 parentales. Cette mort sélective est liée à l'extrusion rapide et massive du glutathion intracellulaire (Trompier 2004) (Figure 11). Un nouveau concept voit alors le jour, celui de l'apoptose provoquée.

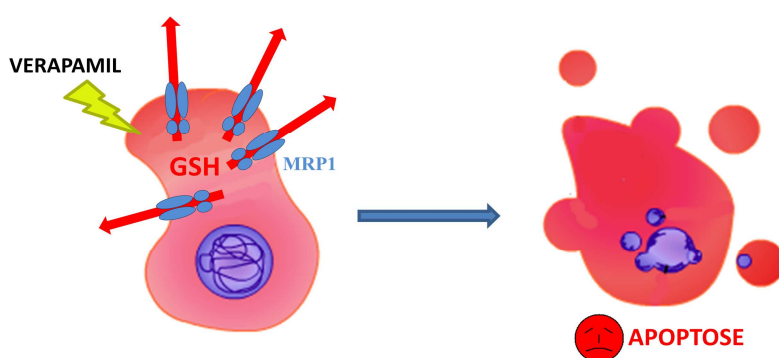


Figure 11. Schéma du mécanisme d'apoptose provoquée.

Lors de cette étude, l'effet apoptotique d'un dérivé iodé du vérapamil, le NMeOHI₂, a également été rapporté (Barratin 2010). Ce dérivé s'est avéré 10 fois plus apoptogène que le vérapamil avec une IC₅₀ de 0,1 μ M (Figure 12). Mais le vérapamil et son dérivé présentent le

désavantage d'être fortement cardiotoxique aux concentrations utilisées en modulation du phénotype MDR. De plus, ces deux molécules étant chirales, des études ont été menées sur l'activité de chaque énantiomère. Il a été ainsi établi que cette chiralité a une influence sur la capacité à stimuler le transport de glutathion (Loe 2000b). En ce qui concerne le vérapamil, seul l'isomère *S* induit l'apoptose par efflux massif de glutathion alors que l'énantiomère *R* resensibilise la cellule à la vincristine par inhibition de MRP1 (Perrotton 2007). Ces récentes découvertes sur le mécanisme et la modulation de l'induction de l'apoptose de cellules surexprimant MRP1 représentent donc une nouvelle approche dans le traitement sélectif des tumeurs résistantes.

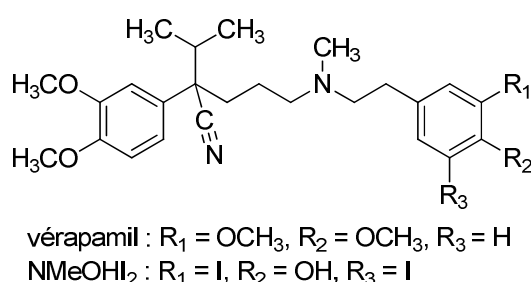


Figure 12. Structure du vérapamil et de son dérivé iodé.

Par la suite, d'autres travaux ont montré que des flavonoïdes d'origine naturelle peuvent être de bons inducteurs d'efflux du glutathion (Leslie 2003, Nguyen 2003, Kachadourian 2006) (Figure 13). En 2007, il a été démontré que l'apigénine est capable d'induire la mort des cellules de type Hela surexprimant MRP1 (Laberge 2007). D'autres dérivés de flavonoïdes, à savoir des flavones et des flavonols prénylés synthétisés au laboratoire, ont présenté une activité d'induction d'efflux de GSH (Perrotton 2007b).

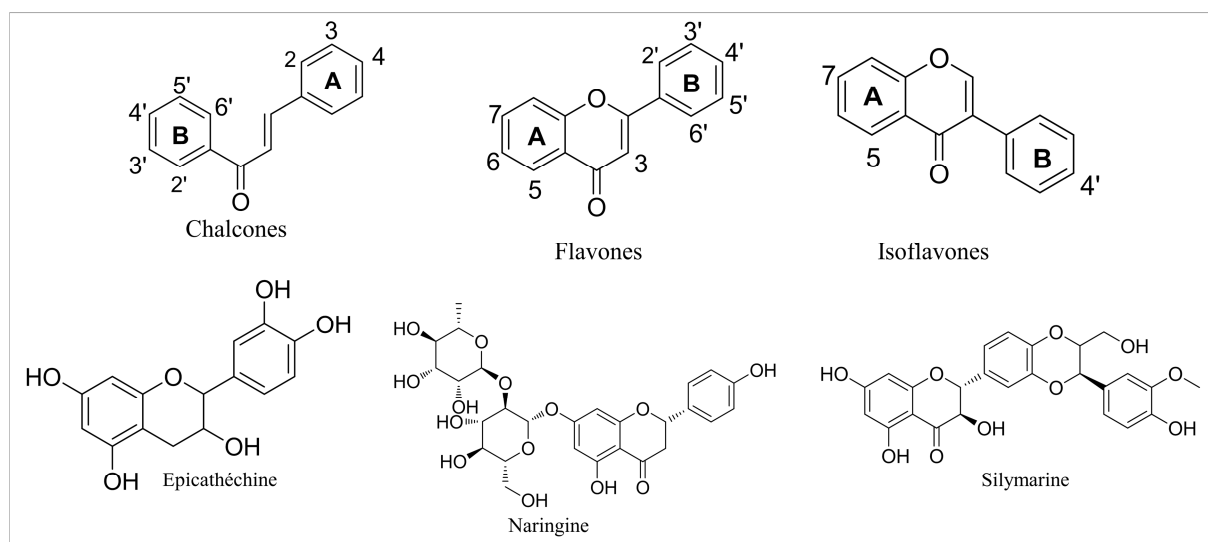
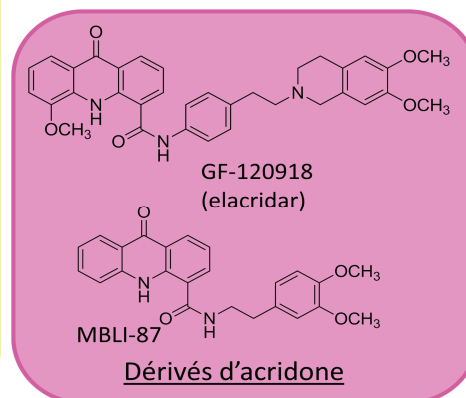
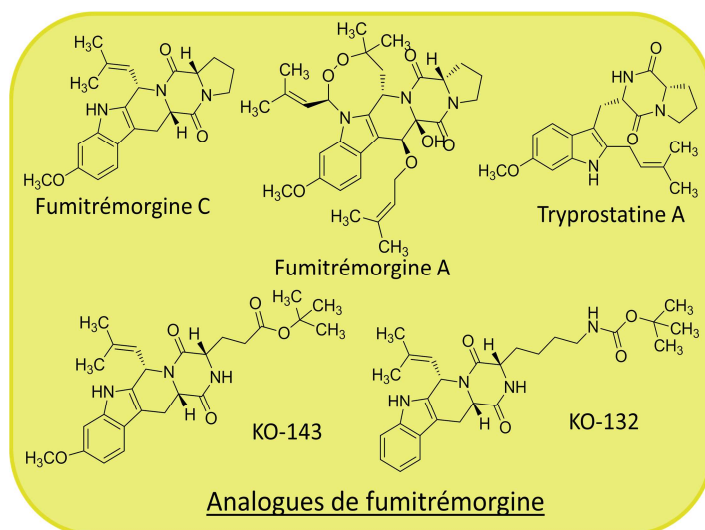
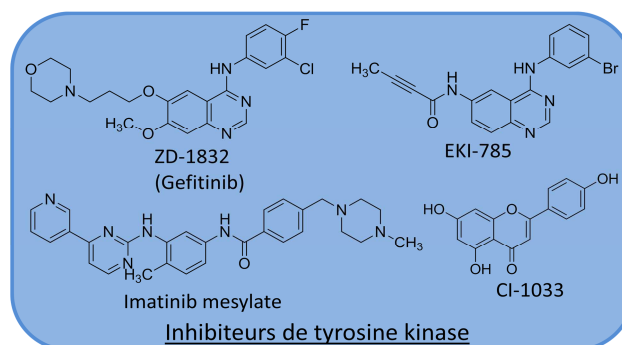
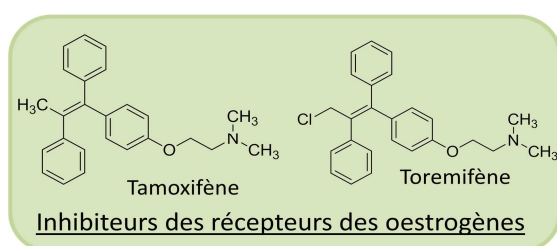
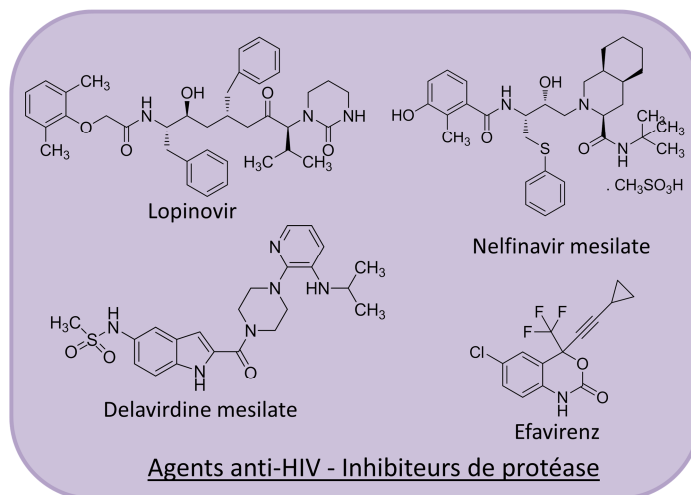


Figure 13. Structure des dérivés de flavonoïdes identifiés comme inducteurs d'efflux du glutathion.

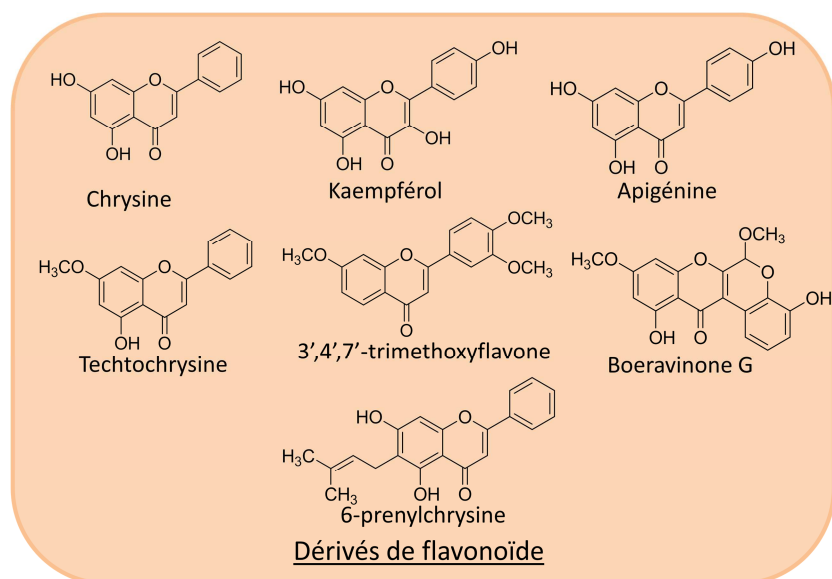
III.3.3. Exemples d'inhibiteurs sélectifs d'ABCG2.

En raison du rôle d'ABCG2 dans l'efflux d'un grand nombre de médicaments anticancéreux, le développement d'inhibiteurs de ce transporteur représente une stratégie très intéressante visant à contourner la chimiorésistance induite par son expression ou sa surexpression dans les cellules cancéreuses. De part leur fonction, leur expression dans de nombreux organes et leur rôle dans l'efflux de nombreux cytotoxiques, les inhibiteurs d'ABCG2 ont fait l'objet de nombreuses études. Actuellement, différents composés ont été identifiés dont certains sont particulièrement actifs et sélectifs.

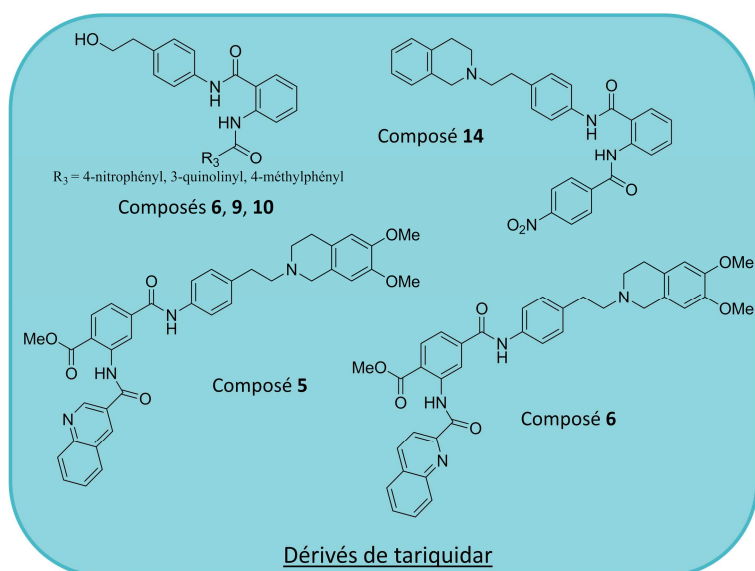
Les inhibiteurs sélectifs connus d'ABCG2 sont d'une grande variété structurale et appartiennent à des classes chimiques différentes (Figure 14). Les stratégies qui ont été adoptées pour identifier ces molécules sont multiples. La plus utilisée est celle qui a consisté à cribler des inhibiteurs connus de P-gp, compte tenu de l'homologie structurale entre les deux transporteurs. A titre d'exemple, l'élacridar (GF120918), un inhibiteur de P-gp a été identifié comme inhibiteur d'ABCG2 (de Bruin 1999) et a été largement utilisé comme pharmacophore pour mettre au point des inhibiteurs sélectifs.



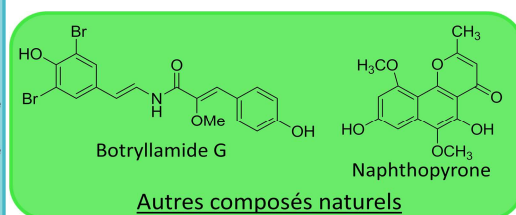
(Florin 2008)



(Zhang 2004, Imai 2004, Katayama 2007)



(Pick 2010, Kühnle 2009)



(Henrich 2009, Bokesch 2010)

Figure 14. Inhibiteurs connus d'ABCG2 (liste non exhaustive).

Depuis quelques années, une partie des activités du laboratoire est axée sur la conception et l'étude de molécules capables de réverser le phénotype MDR par inhibition d'ABCG2.

Les travaux antérieurs de l'équipe ont permis d'identifier plusieurs molécules capables d'inhiber sélectivement ABCG2 tels que : des pipérazinobenzopyranones et phénalkylaminobenzopyranones (Boumendjel 2005b) et des dérivés d'acridones (Boumendjel 2007). Suite à cette dernière étude, une acridone, MBLI-87, a été jugée aussi efficace *in vitro* que le GF120918 pour inhiber sélectivement ABCG2. Cette acridone a donc fait l'objet d'investigations supplémentaires et a démontré sa capacité *in vitro* à inhiber l'efflux d'autres

anti-cancéreux comme l'irinotécan. Les études menées sur des souris xénogreffes par des cellules embryonnaires humaines de cancer du rein (HEK293) ont révélé que le MBLI-87 était capable de potentialiser l'effet de l'irinotécan (Arnaud 2011). A notre connaissance, cette étude est la première de la littérature, effectuée sur un modèle animal ABCG2-positif soulignant tout l'intérêt pour le futur de cette stratégie pour contourner le phénomène MDR découlant de la surexpression d'ABCG2.

TRAVAUX DE THESE

IV.1. Objectifs

L'objectif recherché au cours de cette thèse était de concevoir, synthétiser et étudier les effets biologiques de nouveaux ligands de MRP1 et d'ABCG2.

Les ligands de MRP1 sont destinés à agir **comme activateurs de MRP1** par induction de l'efflux du GSH qui aboutit à terme à la mort cellulaire par apoptose. Ces molécules agiraient comme **médicaments anticancéreux ciblant sélectivement les cellules tumorales résistantes**.

D'autre part, nous avons ciblé la conception et l'étude d'une nouvelle génération **d'inhibiteurs d'ABCG2** avec comme ultime but, d'identifier des molécules hautement actives, ABCG2-sélectives et non toxiques, afin de réunir les conditions optimales pour mener ces molécules vers les études *in vivo*. Ces composés pourraient être utilisés **en association avec les médicaments chimiothérapeutiques** (Figure 15).

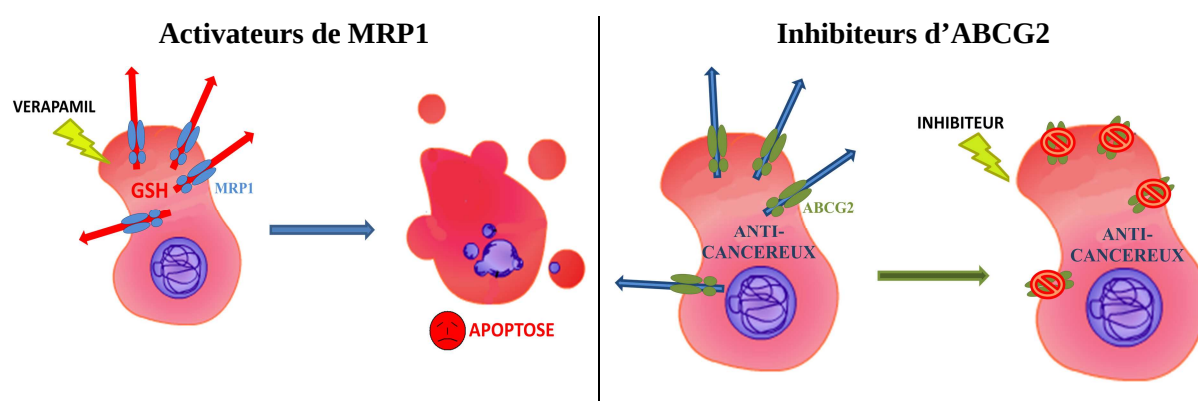


Figure 15. Représentation schématique des objectifs recherchés

IV.2. Activateurs de MRP1 comme anticancéreux potentiels ciblant sélectivement les cellules tumorales résistantes

IV. 2.1. Activateurs de MRP1 : molécules cibles

Nous avons entrepris un travail de prospection, centré sur la famille des flavonoïdes et en particulier les flavones et les xanthones. Ci-dessous sont résumées les démarches de conception entreprises.

Par ailleurs, les résultats obtenus par l'étude du vérapamil comme inducteur d'apoptose dans les cellules résistantes, font de cette molécule la référence et l'étalon incontournable dans le domaine. Dans le but de concevoir des activateurs plus actifs que le vérapamil et dépourvus de toxicité, nous nous sommes intéressés à l'étude de ses analogues.

Dérivés de flavones

De nombreuses études sur l'interaction des flavones avec les transporteurs ABC et leur activité modulatrice du phénomène MDR ont été réalisées au cours de ces dix dernières années (Boumendjel 2002, Boumendjel 2005).

L'approche pharmacochimique envisagée consiste en l'introduction de modifications ayant déjà montré un impact sur l'affinité des flavones sur des protéines ABC. Ainsi, les modifications envisagées sont soulignées ci-dessous et illustrées dans la figure 16.

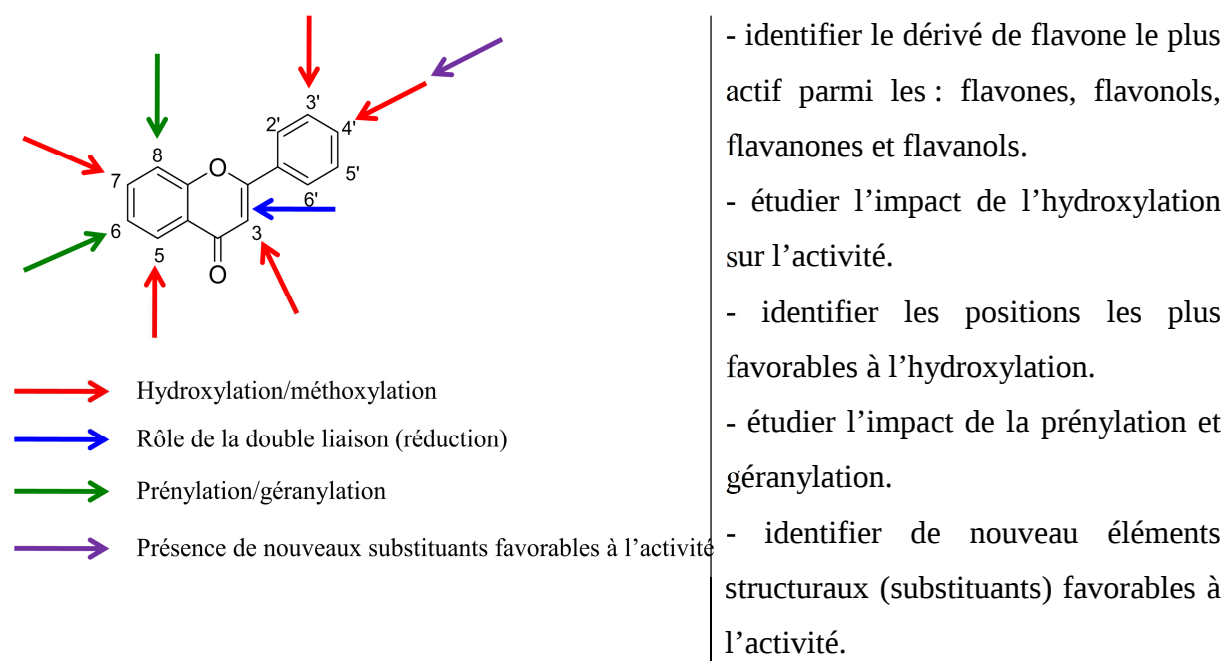


Figure 16. Pharmacomodulation des flavones

Dérivés de xanthones

Des études antérieures ont révélé que des dérivés de xanthone sont capables d'interagir avec la pompe P-gp (Noungoué-Tchamo 2000). Plus récemment, certaines xanthones ont été décrites comme inducteurs de l'apoptose (Matsumoto 2003) ou capables de réduire la croissance cellulaire *in vitro* de lignées cellulaires cancéreuses (Pedro 2002) sans précision sur le mécanisme d'action.

L'ensemble de ces éléments nous ont amené à étudier le potentiel des xanthones à induire sélectivement l'apoptose parmi les cellules cancéreuses résistantes et surexprimant le transporteur MRP1.

Notre approche pharmacochimique est illustrée dans la figure 17 (ci-dessous) avec les sites et types de modifications effectuée :

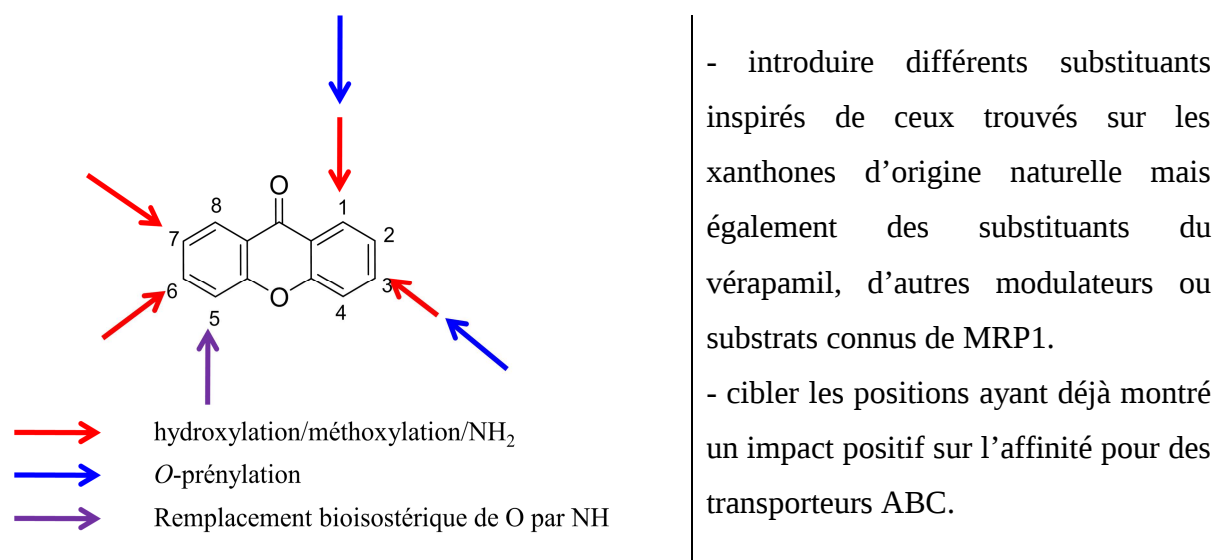


Figure 17. Pharmacomodulation des xanthones.

Dérivés de vérapamil

Le choix porté sur l'étude des dérivés de vérapamil a pour objectif de mettre au point des structures dépourvues du motif identifié comme responsable de la cardiotoxicité. En effet, des études de relation structure-activité du vérapamil ont conclu que la suppression du groupe cyano et/ou de la chaîne isopropyle aboutissent à des dérivés non cardiotoxiques (Loe 2000b). La figure 18, suivante, représente la structure générale de ces composés et notre approche pharmacochimique.

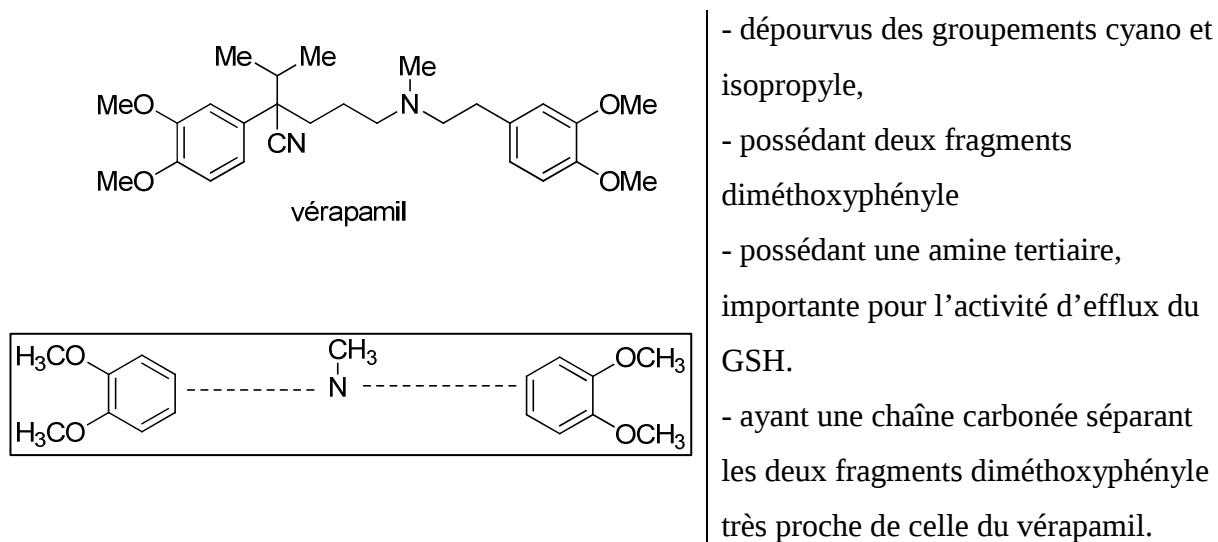


Figure 18. Pharmacomodulation du vérapamil.

IV.2.2. Synthèse, activité biologique et relation structure-activité des dérivés de flavone

IV.2.2.1. Synthèse des dérivés de flavone

Une des principales voies de synthèse des flavones a été mise au point par Allan et Robinson en 1924 (Allan 1924). Elle consiste en la condensation, à température élevée, d'une 2-hydroxyacétophénone avec un anhydride benzoïque, en milieu basique (Schéma 1). Les faibles rendements obtenus selon cette méthode ont conduit à de nombreuses adaptations. Une des plus connues est celle de Looker et coll qui a remplacé le benzoate métallique par une amine tertiaire. Celle-ci joue à la fois le rôle de base et de solvant, permettant ainsi d'augmenter les rendements au-delà de 60% (Looker 1978). Par ailleurs, d'autres méthodes utilisant des conditions de condensation différentes ont été récemment décrites (Dahlén 2006, Bennardi 2007).

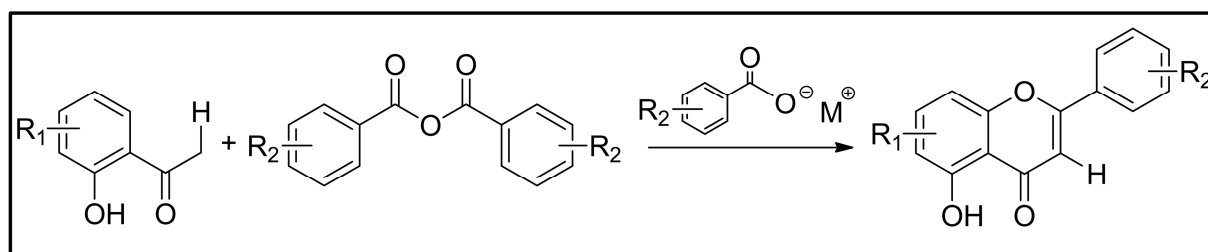


Schéma 1. Voie de synthèse d'Allan et coll.

L'accès aux dérivés de flavones (Figure 19), candidats inducteurs d'apoptose, a été envisagé selon deux méthodes de synthèse.

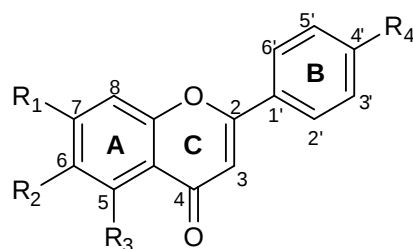


Figure 19. Dérivés de flavone substitués.

La première méthode de synthèse est basée sur la sy,thèse d'Allan modifiée et comporte quatre étapes. Les dérivés de flavones sont obtenus à partir de la 2,4,6-trihydroxyacétophénone et un dérivé de chlorure d'acide benzoïque. Dans un premier temps, la 2,4,6-trihydroxyacétophénone est protégée sélectivement en 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacétophénone après traitement par un excès de diméthylsulfate en milieu basique. L'acétophénone protégée est traitée par un chlorure d'acide benzoïque pour donner l'ester correspondant. Ce dernier est alors traité par KOH qui permet une déprotonation sur le méthyle de l'acétophénone, qui par attaque nucléophile intramoléculaire du carbanion sur le carbonyle, forme un hétérocycle à six atomes. Enfin, un traitement en milieu acide fort permet une déshydratation et donne la flavone (Zembower 1998). Pour obtenir des dérivés de flavone hydroxylés sur le cycle A, une dernière étape est nécessaire et consiste en une déprotection de la flavone méthoxylée en présence d'un excès de tribromure de bore (BBr_3) dans le dichlorométhane. Cette méthode a permis l'obtention de trois dérivés (Schéma 2 et Figure 20).

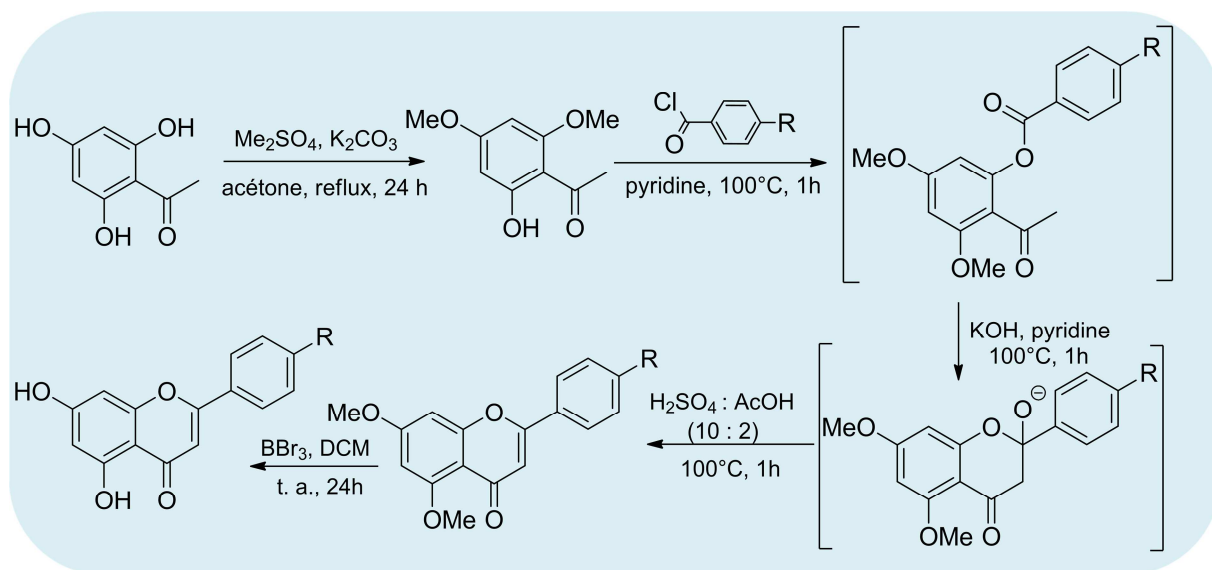


Schéma 2. Schéma de synthèse des dérivés de flavone.

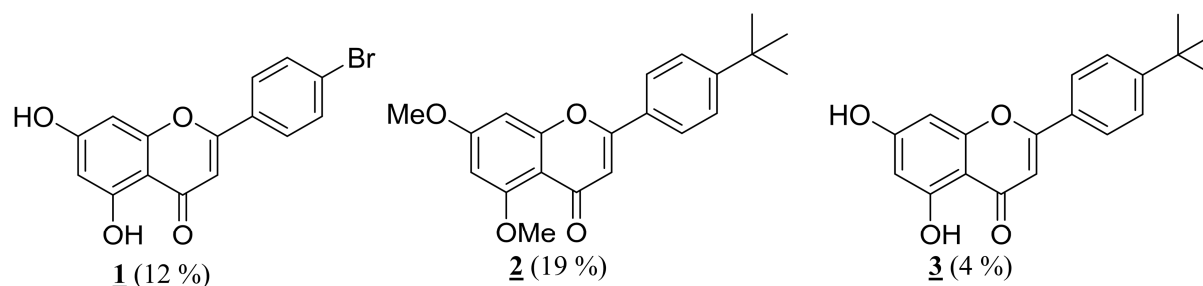


Figure 20. Structures et rendements des trois composés obtenus.

Afin d'améliorer les rendements de cette méthode, nous nous sommes intéressés à une autre méthode qui passe par un intermédiaire 1,3-diphénylpropénone (chalcone), obtenu par la condensation de la 2,4,6-triméthoxyacétophénone et d'un dérivé de benzaldéhyde (Schéma 3). La chalcone obtenue subit ensuite une cyclisation oxydante pour donner la flavone correspondante en une étape (Yao 2007).

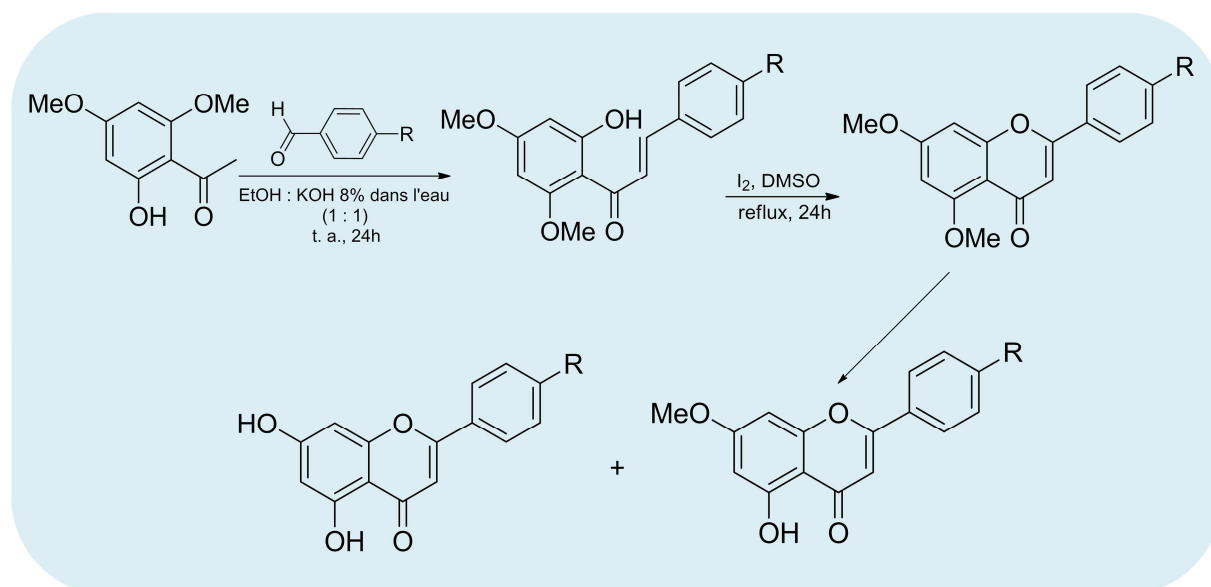
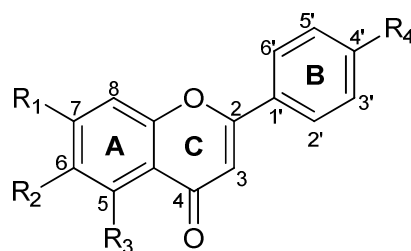


Schéma 3. Schéma de la deuxième méthode de synthèse.

Les rendements globaux des étapes 2 et 3 de cette méthode sont de l'ordre de 60%. Bien que ces rendements restent encore optimisables, la séquence réactionnelle de cette deuxième méthode est plus efficace que la première (Tableau 5).



N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendement final (%)
<u>5</u>	OMe	H	OMe	NO ₂	85
<u>6</u>	OMe	H	OH	NO ₂	41
<u>7</u>	OMe	H	OMe	OE _t	85
<u>8</u>	OMe	H	OMe	F	35
<u>9</u>	OMe	H	OH	F	2
<u>10</u>	OH	H	OH	F	3
<u>11</u>	OMe	I	OMe	iPr	10
<u>12</u>	OMe	H	OMe	iPr	10

Tableau 5. Tableau récapitulatif des résultats issus de la deuxième méthode de synthèse.

Dans ces deux méthodes de synthèse, la réaction de déméthylation s'est avérée être l'étape la plus délicate. Lorsque la réaction a été rendue possible, les rendements sont très faibles. Sur certains composés, nous ne sommes pas parvenus aux composés hydroxylés et ce, même après plusieurs conditions de déméthylation décrites dans la littérature : BBr₃, AlCl₃, BCl₃, HBr, HI (Greene, 1999).

Nous nous sommes intéressés par la suite à la préparation de la 4'-aminoflavone. Trois raisons ont guidé ce choix. D'une part, l'amine est un bioisostère de l'hydroxyle et peut être intéressant pour l'établissement de relations structure-activité en comparaison avec l'apigénine. Ensuite, la préparation de l'amine se fait avec le composé 5 nitré, qui est obtenu en une étape avec de très bons rendements. D'autre part, le groupement amine peut permettre facilement l'accès à d'autres séries de dérivés par le greffage de différents substituants. Nous avons synthétisé le dérivé de flavone aminé par réduction de la 4'-nitroflavone 5. Cette réduction s'effectue en présence du chlorure d'étain (SnCl₂) en milieu acide *via* un intermédiaire hydroxylamine pour donner l'amine correspondante (Cholody 1990) (Schéma 4).

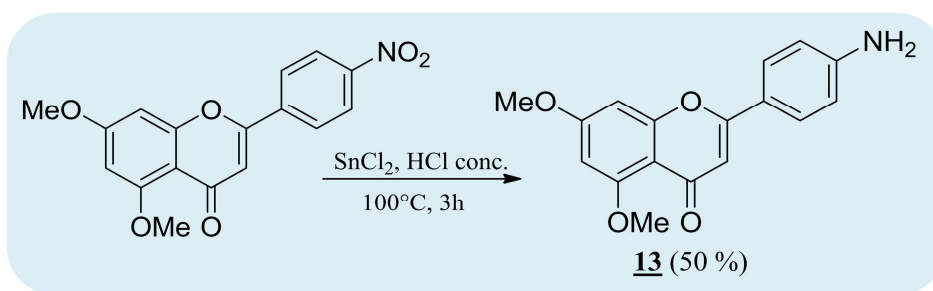


Schéma 4. Préparation du composé aminé.

L'amine obtenue a été couplée avec différents chlorures d'acide convenablement substitués en présence de BOP-Cl (Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride) comme agent de couplage (Schéma 5).

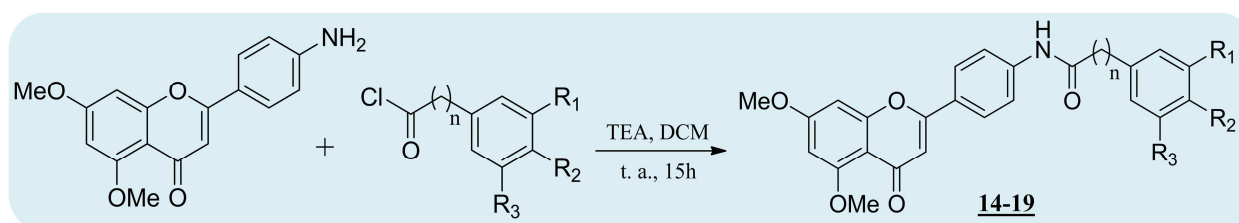


Schéma 5. Schéma de synthèse du couplage entre la flavone aminée et un chlorure de benzoyle.

Cette méthode de couplage nous a permis d'obtenir 6 dérivés avec des rendements acceptables de 50 à 80% (Tableau 6).

N°	R ₁	R ₂	R ₃	n	Rendement de couplage (%)
14	F	H	F	0	78
15	H	OMe	OMe	0	71
16	H	H	OMe	0	65
17	H	OEt	H	0	52
18	H	F	F	0	51
19	H	OMe	OMe	1	65

Tableau 6. Tableau récapitulatif des résultats issus du couplage.

Synthèse des dérivés de flavonols

Une double liaison entre les carbones 2 et 3 et une hydroxylation en position 3, sont caractéristiques des flavonols (Figure 21).

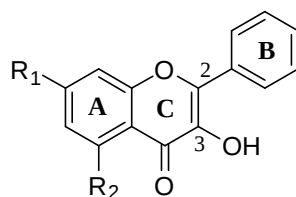


Figure 21. Flavonol substitué

La méthode que nous avons adoptée pour accéder à ces composés nécessite la préparation au préalable de la 2,4,6-trihydroxy- ω -méthoxyacétophénone. Cette dernière est obtenue à partir du 1,3,5-trihydroxybenzène (phloroglucinol) et du méthoxyacétonitrile selon la méthode décrite par Wähälä et coll.. (Wähälä 1991) (Schéma 6). Le flavonol est synthétisé en deux étapes à partir de la 2,4,6-trihydroxy- ω -méthoxyacétophénone. Sa condensation avec un chlorure de benzoyle substitué de façon appropriée en présence de K_2CO_3 dans de l'acétone donne la dicétone qui n'est pas isolée, mais directement cyclisée par traitement avec du KOH 50% dans le méthanol pour conduire à la 5,7-dihydroxy-3-méthoxy-flavone **4** (Schéma 6).

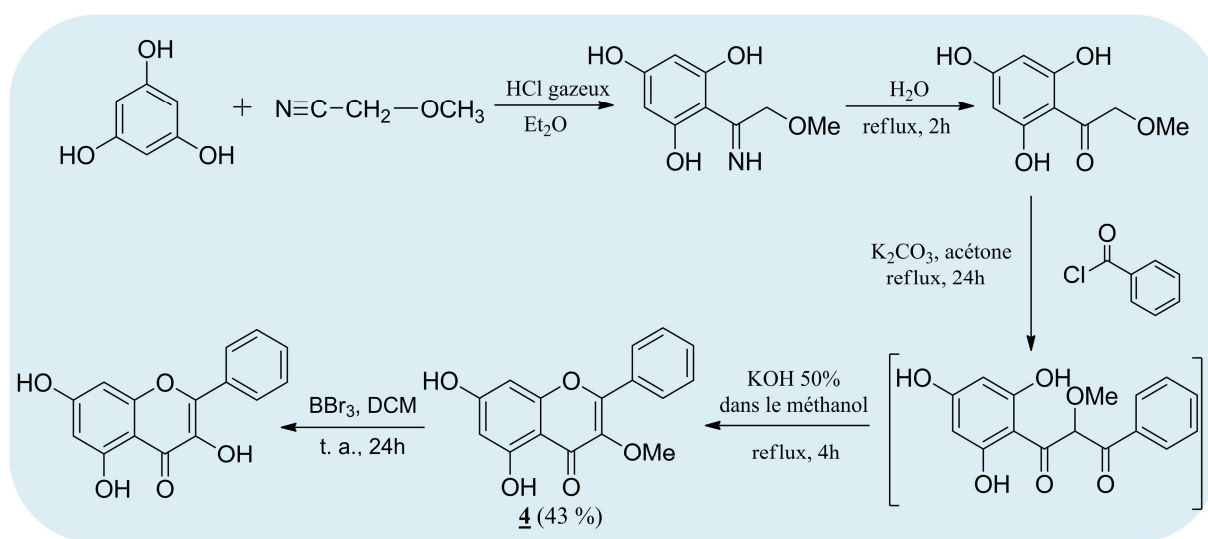


Schéma 6. Préparation des flavonols.

IV.2.2.2. Evaluation biologique des dérivés de flavones

Les composés synthétisés sont testés chez nos partenaires biologistes à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines, dans l'équipe « Mécanisme et Modulation de la Résistance aux Drogues » dirigée par Dr. Attilio DI PIETRO.

Ces composés sont évalués selon deux tests :

Test 1 : Mise en évidence de la capacité des molécules à modifier le niveau intracellulaire de GSH de deux lignées cellulaires:

- Baby Hamster Kidney-21 sauvage (**BHK-21 wt**) utilisées comme contrôle.
- BHK-21 transfectées par le gène MRP1 (**BHK-21-MRP1**).

Test 2 : Test de cytotoxicité qui permet de vérifier l'existence d'une corrélation entre l'efflux du GSH et la mort cellulaire. Ce test a été réalisé sur les composés provoquant un efflux de GSH supérieur à 40 % et est effectué sur deux lignées cellulaires :

- des cellules **NCI-H69** sensibles, issues d'un cancer du poumon à petites cellules.
- des cellules **H69AR** résistantes surexprimant MRP1, obtenues par exposition des cellules NCI-H69 à l'adriamycine.

Le premier test (test 1) constitue une méthode indirecte de dosage par cinétique enzymatique qui permet de mesurer, de manière automatisée, la concentration intracellulaire totale en glutathion après traitement par la molécule étudiée.

Cette détermination a été effectuée en utilisant la méthode enzymatique de Tietze (Tietze, 1969), adaptée par Anderson (Anderson 1985). Le contenu total en glutathion correspond à la somme du glutathion (GSH) et du glutathion oxydé (GSSG). Cette réaction est basée sur l'activité de réduction de GSSG en GSH par la GSH réductase, au dépend de l'oxydation d'une molécule de β -NADPH (β -Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate). Le GSH total ainsi formé permet la réduction d'une molécule de DTNB (réactif d'Ellman ou acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque) en 2 molécules de TNB de couleur jaune (acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque) qui sont alors quantifiées par absorbance à 412 nm (Figure 22). Le contenu total en glutathion est finalement quantifié par comparaison avec une courbe d'étalonnage. Le résultat obtenu correspond à des dosages en triplicat.

Le taux de GSH est déterminé à une concentration de 20 μ M de la molécule étudiée.

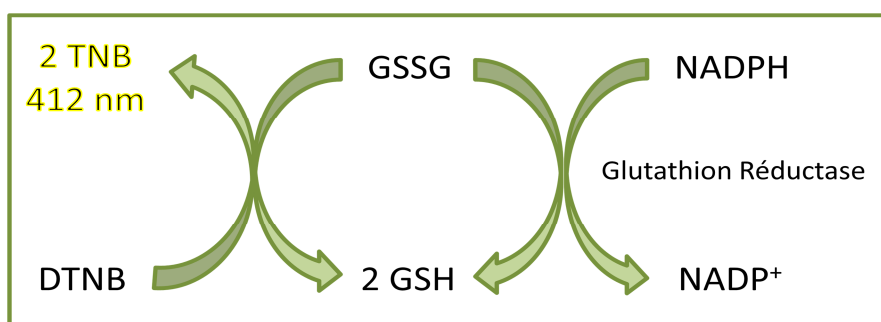


Figure 22. Principe du dosage de GSH intracellulaire total.

Le deuxième test biologique effectué est un test MTT, qui permet d'évaluer la toxicité des composés par une méthode de numération des cellules vivantes. C'est un test colorimétrique basé sur le clivage d'un réactif de couleur jaune MTT, en un produit détectable spectrophotométriquement. En effet, le MTT est clivé en formazan suite à l'action de la succinate-tétrazolium réductase appartenant à la chaîne respiratoire mitochondriale uniquement dans les cellules métaboliquement actives. Ceci conduit à la formation d'un précipité de couleur violette dans la mitochondrie. L'intensité de la coloration est alors proportionnelle au nombre de cellules vivantes et à leur activité métabolique. Ce test permet alors de mettre en évidence la cytotoxicité de la molécule et ainsi de calculer leur IC₅₀ (concentration à laquelle on atteint 50 % de mort cellulaire) (Figure 23).

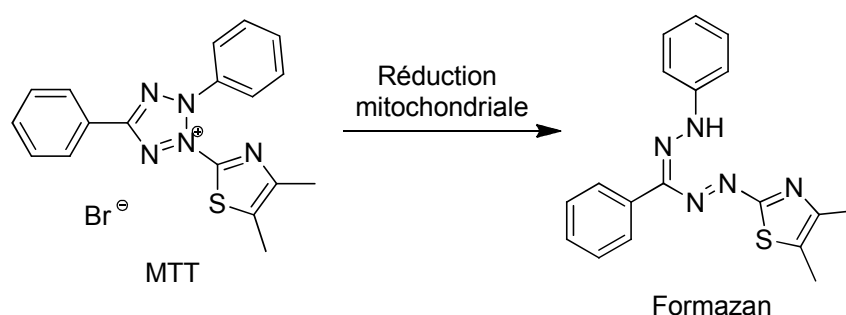
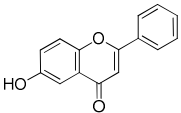
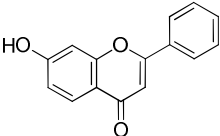
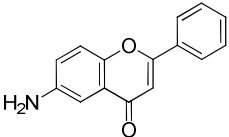
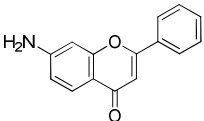
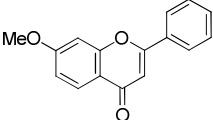
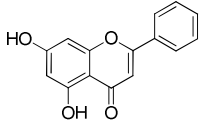
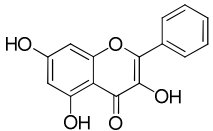
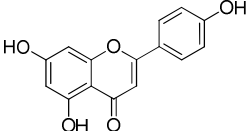
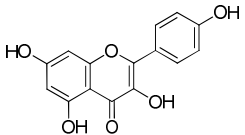
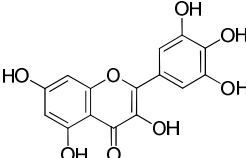
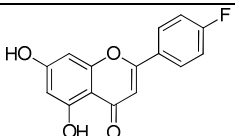
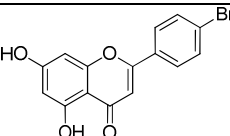
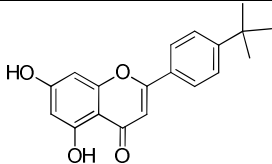
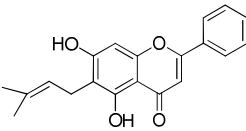
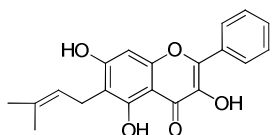
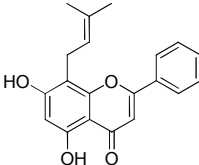
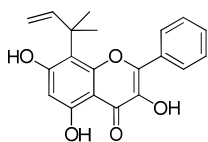
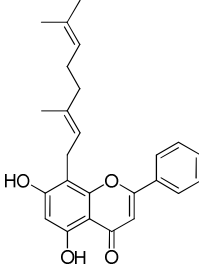
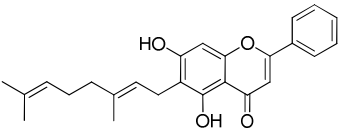
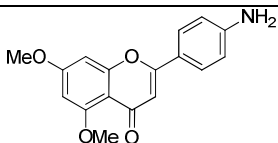


Figure 23. Schéma de la réaction enzymatique du test MTT.

Bilan des résultats biologiques des dérivés de flavone

Le tableau 7, ci-dessous, dresse le bilan des structures des 42 dérivés testés. Parmi ces composés, certains ont été obtenus antérieurement.

<u>Molécule</u>	<u>Structure</u>	<u>% Efflux net de GSH</u>	<u>Molécule</u>	<u>Structure</u>	<u>% Efflux net de GSH</u>
Flavone		41	Flavanone		4
3-hydroxy-flavone		12	5-hydroxy-flavone		64

6-hydroxy-flavone		17	7-hydroxy-flavone		76
6-amino-flavone		12	7-amino-flavone		25
7-methoxy-flavone		42	Chrysine		77
Galangine		85	Apigénine		43
Kaempférol		73	Myricétine		10
10		75	1		47
3		39	6(3,3DMA)-chrysine		39
6(3,3DMA)-galangine		24	8(3,3DMA)-chrysine		46
8(1,1DMA)-galangine		59	8-géranyl-chrysine		52
6-géranyl-chrysine		87	13		49

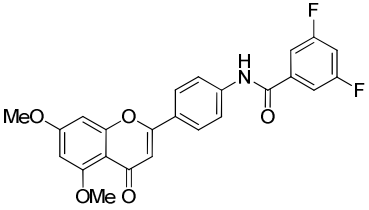
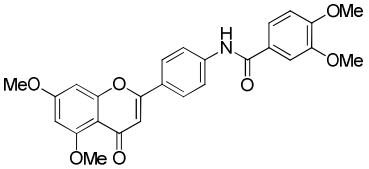
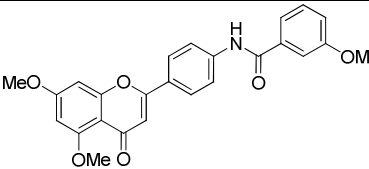
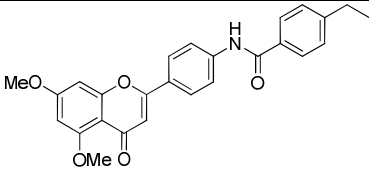
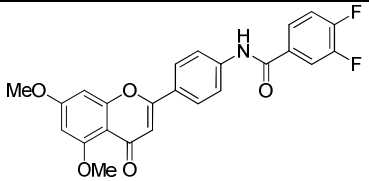
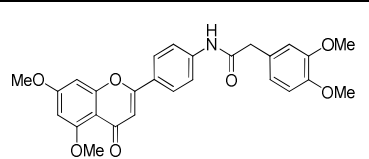
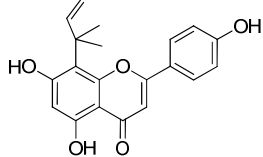
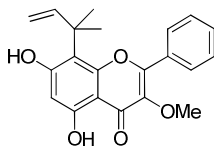
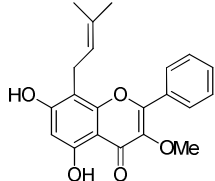
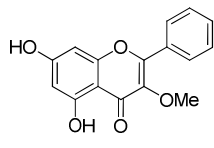
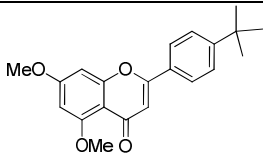
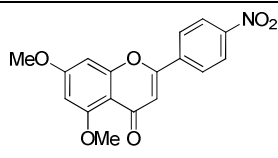
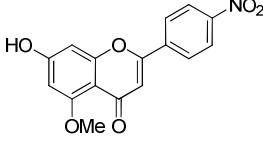
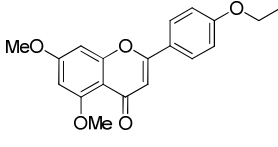
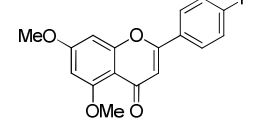
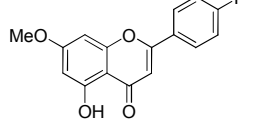
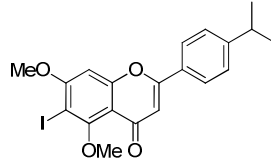
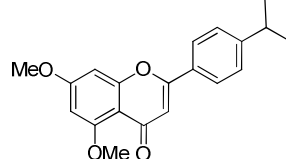
14		54	15		2
16		0	17		1
18		15	19		14
8(1,1DMA) -apigénine		59	8(1,1DMA) -3OMe- galangine		43
8(3,3DMA) -3OMe- galangine		58	4		66
2		0	5		0
6		36	7		27
8		44	9		43
11		12	12		15

Tableau 7. Bilan des dérivés de flavone testés à 20 μ M. DMA = Diméthyl allyl.

Sur ces 42 dérivés de flavone testés, 21 ont une activité d'efflux de GSH supérieure ou égale à 40 %. Le diagramme suivant (Figure 24) illustre les mesures de l'activité d'efflux net de GSH des molécules induisant un effet supérieur à 40%.

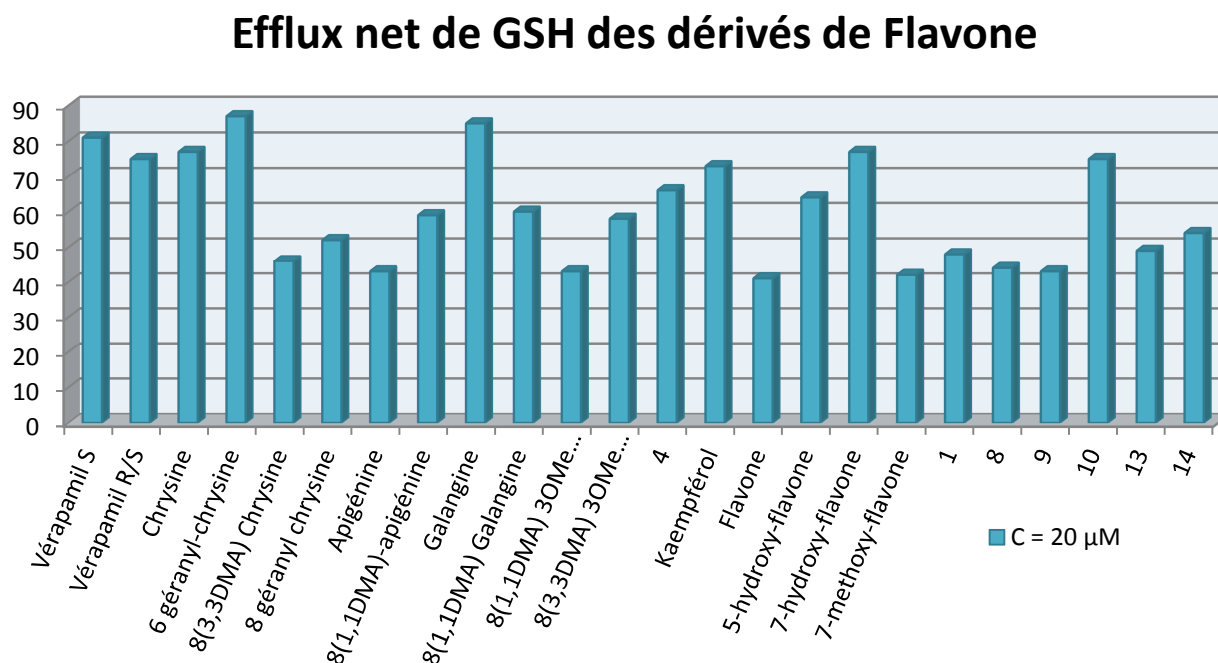


Figure 24. Représentation de l'efflux net de GSH supérieur à 40 % des dérivés flavone testés à 20 μM. Les résultats sont exprimés en % d'efflux net GSH / quantité de protéine. Le pourcentage d'efflux net de GSH est la différence entre le pourcentage d'efflux dans les cellules BHK-21 WT (sensibles) et le pourcentage d'efflux dans les cellules BHK-21 surexprimant MRP1 (résistantes).

Pour évaluer la cytotoxicité de ces 21 molécules et ainsi déterminer leur IC_{50} , un test MTT a été effectué. Sur les 21 molécules, 11 ont pu être testées à ce jour pour leur activité cytotoxique (Tableau 8). L' IC_{50} de trois molécules testées n'a pu être déterminé car aucune mort cellulaire n'a été observée avec la gamme de concentrations étudiée. Trois molécules ont présenté une IC_{50} inférieure ou égale à 10 μM. Aucune toxicité des molécules testées n'a été observée sur les cellules contrôle dans les conditions utilisées.

Molécule	IC₅₀ (μM)	
	NCI-H69 (MRP1-)	H69AR (MRP1+)
Vérapamil S	>100 μM	5
Vérapamil R/S	>100 μM	15
Chrysine	nt	nt
6-géranyl-chrysine	nt	nt
8(3,3DMA)-chrysine	nt	nt
8-géranyl-chrysine	nt	nt
Apigénine	nt	nt
8(1,1DMA)-apigénine	nt	nt
Galangine	>100 μM	>100 μM
8(1,1DMA)-galangine	nt	nt
8(1,1DMA)-3OMe-galangine	nt	nt
8(3,3DMA)-3OMe-galangine	nt	nt
Kaempférol	nt	nt
Flavone	>100 μM	24
5-hydroxy-flavone	>100 μM	21
7-hydroxy-flavone	>100 μM	13
7-methoxy-flavone	>100 μM	50
1	>100 μM	10
4	>100 μM	8
8	>100 μM	96
9	>100 μM	>100 μM
10	>100 μM	7
13	>100 μM	>100 μM

Tableau 8. Cytotoxicité (exprimée en IC₅₀) des molécules provoquant un efflux de GSH supérieur ou égal à 40 %. Sont indiquées les molécules non testées (nt en blanc), molécules testées (bleu) avec les molécules les plus efficaces (bleu foncé).

IV.2.2.3. Relations structure-activité

A notre connaissance, aucun travail de pharmacochimie n'a été effectué à ce jour pour étudier l'effet des flavonoïdes, de xanthones et de vérapamil comme inducteurs d'apoptose via MRP1. Lorsque ce travail de thèse a débuté, seules deux études étaient connues : une étude effectuée sur des composés analogues du vérapamil par l'équipe de Cole (Loe, 2000b), et les

travaux issus du laboratoire du Dr. Di Pietro, Institut de Biologie et Chimie des Protéines sur le vérapamil, son dérivé iodé et quelques flavonoïdes (Perrotton, 2007).

Une partie de cette thèse se voulait être un travail prospectif afin d'identifier des molécules chefs de file puis de débiter la pharmacomodulation de ces hits comme inducteurs d'apoptose. L'évaluation biologique a été réalisée en soumettant les molécules synthétisées à un test de dépistage pour évaluer leur capacité à modifier le niveau de GSH intracellulaire puis à un deuxième test afin de mesurer de façon concomitante l'efflux de GSH et leur cytotoxicité.

Relations structure-activité des dérivés de flavone

Comme nous l'avons déjà souligné, l'objectif principal de ce travail était d'identifier les éléments structuraux contribuant à l'effet des flavones sur l'efflux du glutathion dans les cellules surexprimant MRP1. Ainsi, nous avons choisi le noyau flavone non substitué comme « lead ». Les modifications structurales entreprises, en vue de l'optimisation de l'activité, consistent en l'introduction de différents substituants choisis parmi ceux qui ont déjà démontré leur effet positif sur les interactions des flavones avec des protéines ABC. Les positions ciblées comme site de substitution sont aussi celles qui sont reconnues comme sensibles.

Effet de la double liaison C2-C3

Comme le montre le tableau 7, testée à 20 μ M, la flavone a induit un effet sur l'efflux du glutathion de 40%. La réduction de la double liaison C2-C3 (dihydroflavone, appelée aussi flavanone) a abouti à un composé inactif. Cette perte d'activité indique clairement l'importance de la double liaison C2-C3 comme cela a été démontré précédemment avec P-gp et ABCG2 (Boumendjel 2002, Zhang 2004).

Effet de l'hydroxylation sur le noyau A

Un groupe hydroxyle a été introduit sur les positions C-3 (3-hydroxyflavone), C-5 (5-hydroxyflavone), C-6 (6-hydroxyflavone) ou C-7 (7-hydroxyflavone). Le choix de ces positions est guidé par le fait que les flavones naturelles sont fréquemment isolées hydroxylées sur ces carbones. Comme le montre le tableau 7, la 5-hydroxyflavone et la 7-hydroxyflavone sont les plus actives en induisant un net efflux du GSH de 64% et 76%, respectivement. Notons que ces éléments pharmacophoriques sont semblables à ceux mis en

évidence lors d'études d'interactions des flavones avec ABCG2. Afin de vérifier si le remplacement d'un hydroxyle par un bioisostère, comme un groupe amino (NH₂) est permis, nous avons testé les analogues 6-aminoflavone et 7-aminoflavone. Les effets induits, plus faibles que leurs analogues hydroxylés, viennent confirmer le rôle prépondérant du groupe OH. La substitution du OH en 7 par un groupe méthoxyle, qui supprime la capacité donneur de liaison hydrogène de l'hydroxyle tout en conservant sa capacité accepteur, a abouti à une nette baisse d'efflux. Ceci souligne le rôle primordial de l'hydroxyle à cette position, probablement en tant que donneur de liaison hydrogène.

La présence simultanée de deux hydroxyles en C-5 et C-7 (chrysine) n'a pas amélioré l'activité de la 7-hydroxyflavone. Il est intéressant de constater que l'hydroxylation en position C-3 de la chrysine n'a pas aboli l'activité. Ce résultat qui peut être considéré comme surprenant, est intéressant. Il démontre clairement un concept classique en chimie médicinale, qu'est la complémentarité entre les substituants.

Effet de l'hydroxylation sur le noyau B

Il peut être évalué par la mesure de l'activité d'efflux du GSH de l'apigénine, kaempférol et myricétine. Globalement, ces résultats indiquent que l'hydroxylation joue plutôt un rôle négatif sur cette partie de la molécule. Là aussi, le résultat est superposable aux travaux antérieurs du laboratoire, montrant que l'hydroxylation de ce noyau est synonyme de diminution de l'affinité des flavones pour les protéines P-gp et ABCG2.

Effet de l'halogénéation sur le noyau B

Lors de travaux antérieurs du laboratoire, il a clairement été établi que la présence d'un halogène sur le C-4' d'une flavone était très favorable pour l'affinité à la P-gp. Aussi, nous avons voulu vérifier l'impact de ce paramètre sur l'efflux du GSH dans les cellules surexprimant MRP1 en choisissant la chrysine comme modèle. Comme le démontre le tableau 7, l'introduction du fluor (composé **10**) n'a pas de réel impact sur l'efflux tandis que la bromation (composé **1**) a clairement un effet négatif. Cette différence peut s'expliquer par l'hydrophobie et/ou taille de l'atome de brome qui défavorise l'activité. Le rôle négatif des deux derniers éléments (taille et hydrophobie) a été confirmé par la synthèse et l'évaluation de la 4'-*tert*-butylchrysine (composé **3**) : 38% d'efflux vs 47% pour la 4'-bromochrysine (composé **1**).

Effet de la prénylation sur le noyau A

Les flavones sont fréquemment isolées sous forme prénylées. Cette prénylation, confère aux flavonoïdes hydroxylés un caractère amphiphile, leur permettant une meilleure interaction avec leur cible. L'interaction des flavonoïdes prénylés avec les deux transporteurs, P-gp et ABCG2 a été étudiée et a démontré son impact très positif. Dans le cadre de notre étude, le rôle de la prénylation a été vérifié en utilisant la chrysine et la galangine comme modèles. Comme le montre le tableau 7, la prénylation de la chrysine et de la galangine en C-6 (6(3,3DMA)-chrysine et 6(3,3DMA)galangine) ou en C-8 (8(3,3DMA)-chrysine et 8(1,1DMA)-galangine) provoque une diminution d'efflux du GSH. La géranylation en C-8 (8-géranyl-chrysine) n'est pas non plus favorable à l'activité alors que la géranylation en C-6 (6-géranyl-chrysine) semble augmenter légèrement l'activité par rapport à la chrysine. La géranylation en C-6 permet peut être de combiner plusieurs paramètres favorables à l'activité comme l'augmentation de l'hydrophobie, une meilleure occupation de l'espace du site actif avec une forme linéaire de la molécule en comparaison à la 8-géranyl-chrysine qui s'oriente dans une autre direction de l'espace du site actif. Il était intéressant de poursuivre ces investigations avec d'autres flavones.

Le travail de pharmacomodulation s'est poursuivi dans l'objectif d'utiliser la chrysine comme « lead » optimisé relativement à la flavone et d'introduire de nouveaux motifs structuraux sur le carbone C-4' du noyau B. La stratégie a consisté en la synthèse de la 4-aminochrysine protégée sur les OH en 5 et 7 pour permettre l'introduction de nouveaux motifs *via* une liaison amide. Dans ce cadre, nous avons synthétisé une série de molécules porteuses de différents substituants greffés sur l'azote. Les substituants greffés sur l'azote ont été choisis parmi ceux retrouvés dans le vérapamil comme le 2,3-diméthoxyphényle ou 2,3-(diméthoxyphényl) ou simplement des phényles substitués. Ainsi plusieurs dérivés ont pu être synthétisés sous leur forme protégée (5,7-diméthoxy). Malheureusement les différentes tentatives de déprotection n'ont pas permis d'obtenir les dérivés désirés. Des réactions secondaires importantes, comme par exemple l'hydrolyse de l'amide, ont été observées.

Comme prévu, l'activité d'efflux du GSH des dérivés méthoxylés s'est révélée très faible. Le choix d'autres groupes protecteurs plus faciles à déprotéger pourrait apporter une solution.

Les molécules les plus actives sur l'efflux de glutathion n'ont pu être toutes testées pour leur effet apoptotique (tableau 8). Mais des résultats préliminaires rendent compte que l'hydroxylation en C-5 et C-7 est favorable à la cytotoxicité, puisque sur tous les composés testés les plus efficaces sont la 7-hydroxyflavone et les composés **1**, **4**, **10** qui sont

monohydroxylés en 7 et dihydroxylés en 5 et 7 respectivement (Figure 25). La galangine qui se trouve être active pour effluer le glutathion se révèle inefficace pour induire la mort des cellules cancéreuses.

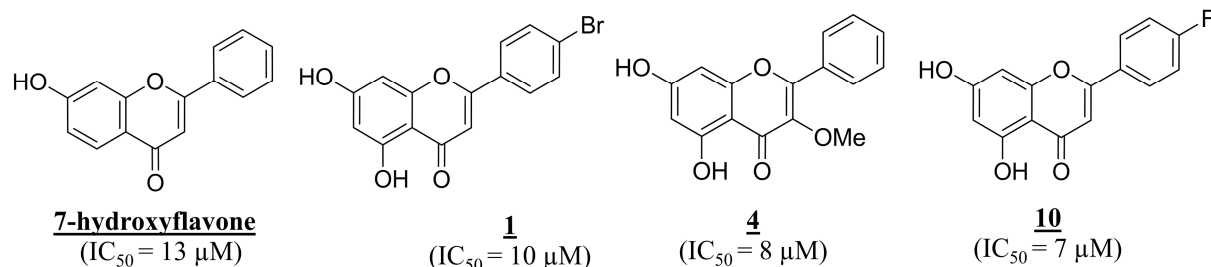


Figure 25. Structure des flavones activateurs de MRP1 les plus efficaces.

IV.2.3. Synthèse, activité biologique et relation structure-activité des dérivés de xanthone.

IV.2.3.1. Synthèse des dérivés de xanthone

Des xanthones d'origine naturelle ont été décrites comme inducteurs d'apoptose dans des cellules leucémiques humaines, mais aucun mécanisme d'action n'a été reporté (Matsumoto 2003). D'autres études ont également souligné la capacité de nombreuses xanthones à ralentir la croissance cellulaire *in vitro* de trois lignées cellulaires cancéreuses différentes (Pedro 2002). En outre, les xanthones prénylées ont été décrites pour leur capacité à se lier à un transporteur MDR, la P-glycoprotéine (Pgp) (Noungoué Tchamo 2000). L'activité d'inhibition des xanthones sur cette protéine ABC (P-gp) ainsi que leur capacité à induire l'apoptose de cellules cancéreuses, nous ont incité à faire la lumière sur un des mécanismes possibles reliant ces deux effets. Notre attention s'est portée sur des xanthones diversement substituées (Figure 26), où le type et la position des substituants ont été inspirés du modèle de substitution des xanthones naturelles issues des plantes, ou déjà identifiées comme ligands de protéines ABC.

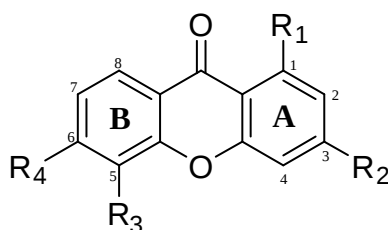


Figure 26. Formule générale des xanthones étudiées.

L'obtention des xanthones a été accomplie par des méthodes connues (Schéma 7). La condensation d'un dérivé d'acide 2-hydroxybenzoïque avec un phénol substitué (phloroglucinol ou dérivé de résorcinol) en présence d'un mélange d'acide méthane sulfonique et de pentoxyde de phosphore (P_2O_5) a fourni le dérivé de xanthone attendu.

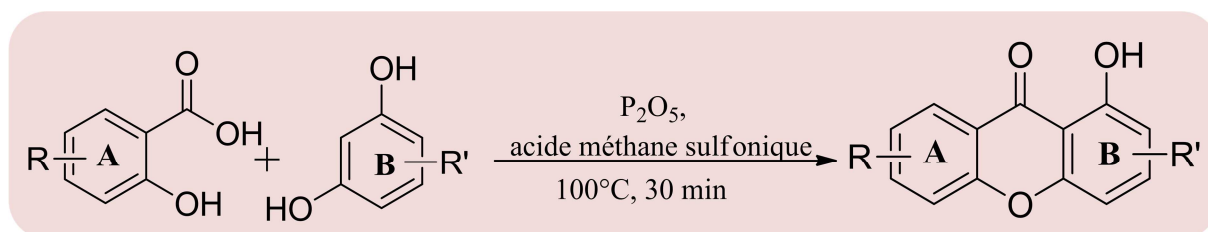
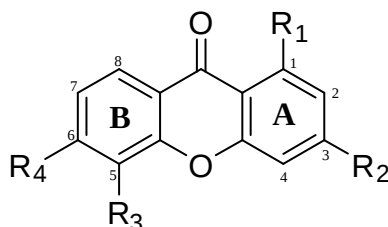


Schéma 7 : Schéma de synthèse des xanthones.

Cette méthode nous a permis de synthétiser 14 dérivés de xanthone avec des rendements très variables (Tableau 9).



N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendement final (%)
<u>20</u>	OH	H	H	H	45
<u>21</u>	OH	H	OMe	H	50
<u>22</u>	OH	H	H	Me	47
<u>23</u>	OH	H	Me	H	40
<u>24</u>	OH	Me	H	H	28
<u>25</u>	OH	Me	OMe	H	10
<u>26</u>	OH	OH	OMe	H	40
<u>27</u>	OH	OH	H	H	66
<u>28</u>	OH	OH	H	OMe	95
<u>29</u>	OH	OH	H	Me	25
<u>30</u>	OH	Me	H	Me	22
<u>32</u>	OH	OH	OH	OH	98
<u>41</u>	OH	OH	H	NH-CO-CF ₃	35
<u>42</u>	OH	OH	H	NH ₂	57

Tableau 9. Tableau récapitulatif des dérivés de xanthone obtenus.

Les xanthones O-alkylées ont été obtenues par traitement des xanthones hydroxylées par un bromure d'alkyle ou du diméthylsulfate (pour une méthylation) en présence d'une base, ici le carbonate de potassium dans l'acétone (Schéma 8).

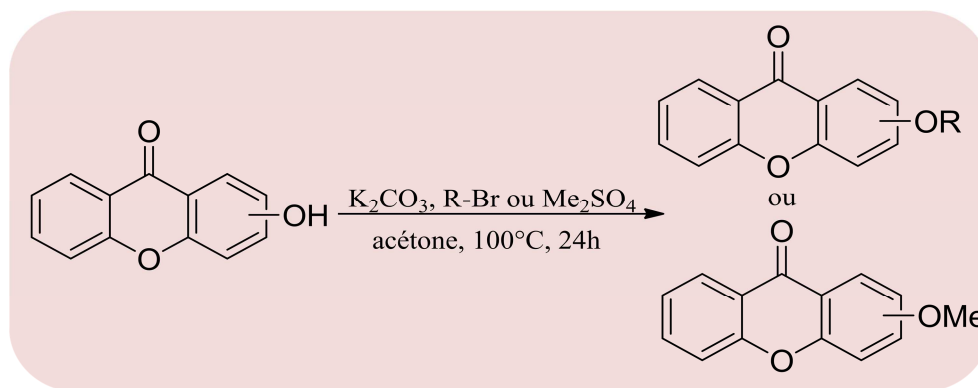


Schéma 8. Schéma de synthèse des xanthones O-alkylées.

Les réactions d'O-alkylation ont permis d'insérer sur le squelette xanthone des substituants que l'on retrouve sur les xanthones naturelles tels que les groupements prényles ou encore les groupements méthoxyles (Tableau 10).

N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendement final (%)
<u>31</u>	OH	OMe	H	H	53
<u>35</u>	OH	O-prényl	H	OMe	11
<u>36</u>	O-prényl	O-prényl	H	OMe	31
<u>37</u>	OH	OMe	H	OMe	19
<u>38</u>	OMe	OMe	H	OMe	31
<u>39</u>	OH	O-benzyl	H	OMe	17
<u>40</u>	OMe	O-benzyl	H	OMe	85

Tableau 10. Tableau récapitulatif des résultats issus des O-alkylations.

Les déméthylations s'effectuent avec du BBr₃ dans le dichlorométhane avec de meilleurs rendements que pour les flavones (Schéma 9 et Tableau 11).

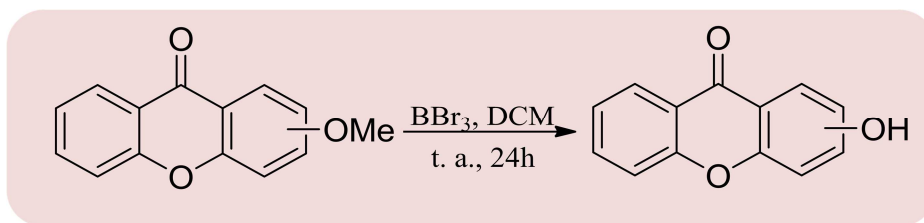


Schéma 9. Schéma de synthèse des déméthylations

N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendement final (%)
33	OH	OH	OH	H	56
34	OH	OH	H	OH	24

Tableau 11. Tableau récapitulatif des résultats issus des déméthylations.

Synthèse de dérivés d'azaxanthones (acridones)

Afin d'enrichir l'étude de relations structure-activité, nous nous sommes intéressés aux azaxanthones, connues sous le nom d'acridones (Figure 27).

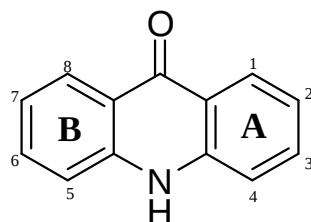


Figure 27. Squelette de base d'une acridone.

Les acridones sont synthétisées en deux étapes selon la méthode de Tercio et coll. (Tercio 1987), qui consiste en la condensation d'un dérivé d'acide 2-chlorobenzoïque et d'une aniline substituée le tout en présence de cuivre II comme catalyseur suivie d'une cyclisation en milieu acide (Schéma 10 et Tableau 12).

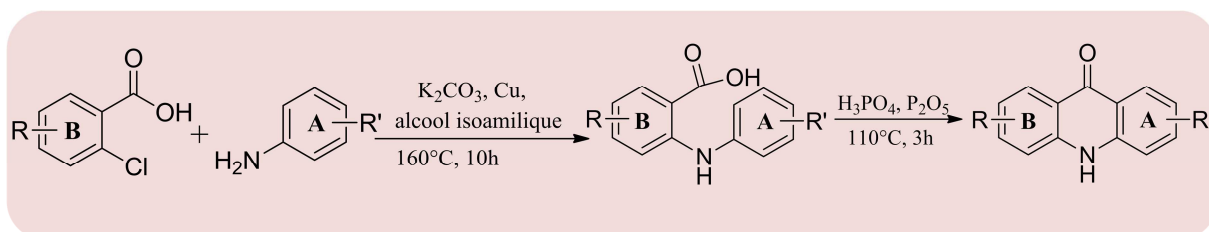
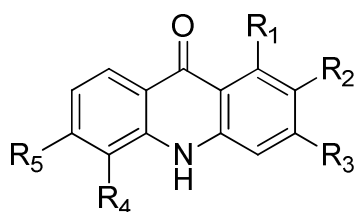


Schéma 10. Schéma de synthèse d'une acridone substituée.



N°	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Rendement final (%)
<u>43</u>	OMe	H	OMe	H	H	53
<u>44</u>	OH	OMe	H	H	H	50
<u>45</u>	OMe	OMe	H	H	H	40
<u>46</u>	OMe	OMe	H	OMe	OMe	40

Tableau 12. Structure des acridones obtenues.

IV.2.3.2. Evaluation biologique des dérivés de xanthone

Le tableau 13 (ci-dessous) dresse l'activité des 27 dérivés de xanthone testés. Le diagramme suivant (Figure 28) illustre le bilan des mesures de l'activité d'efflux net de GSH de toutes les molécules ayant induit un taux d'efflux supérieur à 40%.

<u>Molécule</u>	<u>Structure</u>	<u>% efflux net GSH</u>	<u>Molécule</u>	<u>Structure</u>	<u>% efflux net GSH</u>
20		0	21		15
22		2	23		2
24		27	25		41
26		46	27		52
28		82	29		65

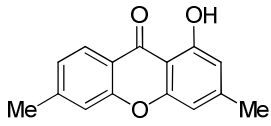
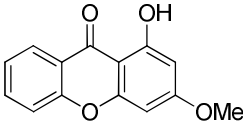
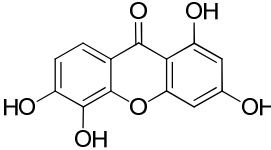
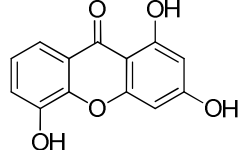
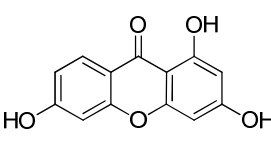
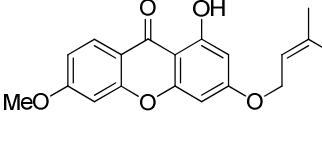
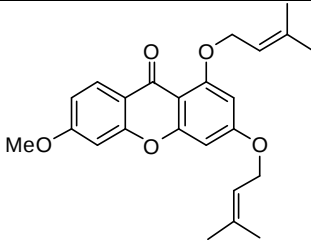
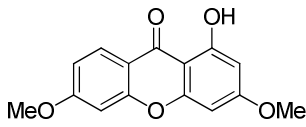
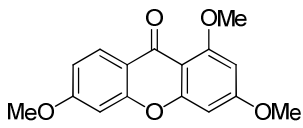
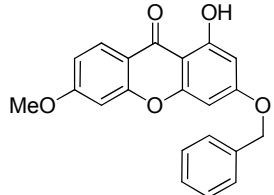
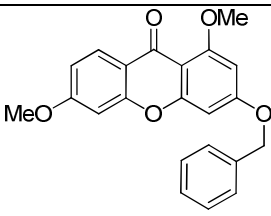
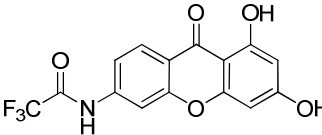
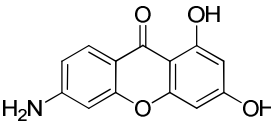
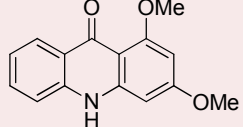
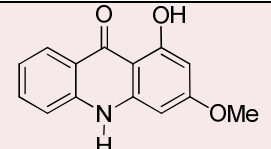
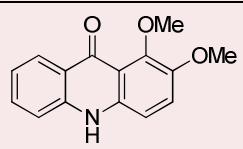
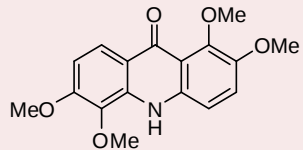
30		14	31		28
32		1	33		29
34		43	35		12
36		36	37		66
38		42	39		6
40		45	41		75
42		70	43		45
44		48	45		6
46		42			

Tableau 13. Bilan des dérivés de xanthone et dérivés d'acridone (rose clair) testés et pourcentages d'efflux net de glutathion.

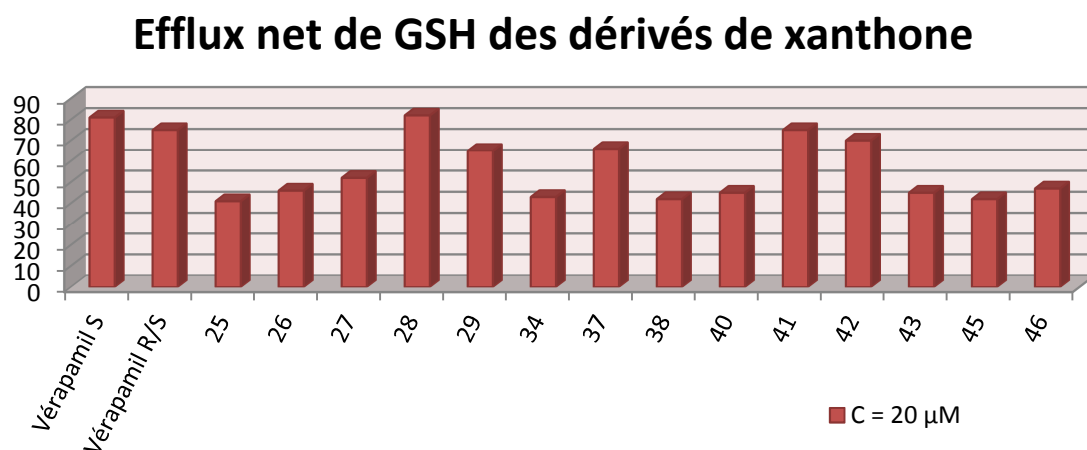


Figure 28. Bilan des dosages d'efflux net de GSH des dérivés de xanthone testés à 20 µM. Les résultats sont exprimés en % d'efflux net GSH / quantité de protéine. Le pourcentage d'efflux net de GSH est la différence entre le pourcentage d'efflux dans les cellules BHK-21 WT (sensibles) et le pourcentage d'efflux dans les cellules BHK-21 surexprimant MRP1 (résistantes).

Sur ces 29 dérivés de xanthone testés à 20 µM, 14 ont une activité d'efflux de GSH supérieure ou égale à 40 %. Afin d'évaluer la cytotoxicité de ces 14 molécules, le test MTT, est effectué (Tableau 14). Sur les 14 molécules, 11 ont pu être testées à ce jour pour leur activité cytotoxique. Les IC₅₀ de quatre molécules testées n'ont pu être déterminés car aucune mort cellulaire n'a été observée avec la gamme de concentrations étudiée. Trois molécules ont présenté une IC₅₀ inférieure ou égale à 10 µM. Les résultats montrent également que les molécules ont une très faible toxicité sur les cellules contrôles dans les conditions utilisées.

<u>Molécule</u>	<u>IC₅₀ (μM)</u>	
	NCI-H69 (MRP1-)	H69AR (MRP1+)
Vérapamil S	>100 μM	5
Vérapamil R/S	>100 μM	15
25	>100 μM	>100 μM
26	>100 μM	24
27	>100 μM	33
28	>100 μM	11
29	>100 μM	26
34	>100 μM	51
37	>100 μM	>100 μM
38	>100 μM	78
40	>100 μM	>100 μM
41	>100 μM	54
42	>100 μM	>100 μM
43	nt	nt
44	nt	nt
46	nt	nt

Tableau 14. Tableau récapitulatif des IC₅₀ des molécules provoquant une activité d'efflux de GSH supérieure ou égale à 40 %. Sont indiquées les molécules non testées (nt en blanc), les molécules testées (rose clair) avec la molécule la plus efficace (rose foncé).

IV.2.3.3. Relations structure-activité des dérivés de xanthone

Egalement sur la base de travaux antérieurs concernant l'activité anticancéreuse des xanthonés (Pedro 2002, Matsumoto 2003) et sur leur interaction avec la P-gp (Boumendjel, 2002), nous nous sommes intéressés à leur possible effet sur l'efflux de glutathion sur des cellules cancéreuses surexprimant MRP1.

Activité sur l'efflux de glutathion intracellulaire

L'hydroxylation en position C-1 et C-3 joue un rôle crucial, ce qui laisse supposer que les groupements OH en C-1 et C-3 sont plus susceptibles d'être impliqués dans une liaison hydrogène. Un groupement méthoxyle en position C-6 est bénéfique pour l'activité (composé **28** vs **27**). Son remplacement par un groupement hydroxyle conduit à une perte substantielle de l'activité (xanthone **34**). De manière surprenante, le remplacement du groupe méthoxyle en

position C-6 par un groupe amino (NH₂, composé **42**) ou un groupe trifluoroacétamide (composé **41**) conduit à des dérivés actifs très proches du vérapamil, mais un peu moins actif que le composé **28**. Le déplacement du groupement méthoxyle en position C-5 conduit à une diminution de l'activité (composé **28** vs **26**). La mise en place d'un groupe *O*-prényle en C-1 et C-3 a été effectuée sur la base de l'étude précédente issue de notre laboratoire liée à l'interaction des xanthones avec la P-gp, indiquant une contribution positive des groupements prényles. Dans cette étude, comme indiqué par l'activité des composés **35** et **36**, la *O*-prénylation est néfaste pour l'activité. Cette faible activité peut être attribuée à différents paramètres : paramètre stérique (taille importante des groupements prényles) et lipophilie des molécules (ClogP = 5,29 et 6,46 pour les composés **35** et **36**, respectivement, contre 3,01 pour le composé **28**).

Le remplacement de l'oxygène intracyclique par un groupement isostère NH conduit à des molécules peu actives. De la même manière, le remplacement du groupement carbonyle avec un thiocarbonyle ou sa réduction en alcool (résultat non présenté) conduit à la perte complète de l'activité.

Mesure de cytotoxicité par le test MTT

Nous avons étudié la cytotoxicité des composés qui induisent plus de 40% de l'efflux de GSH net) mais nous avons inclus la xanthone la moins active (composé **20**) à des fins de comparaison. Tous les composés testés affichent une très faible cytotoxicité sur les cellules NCI-H69 sensibles, avec des valeurs d'IC₅₀ supérieures à 100 µM. Les données ont révélé une nette cytotoxicité induite par le composé **28** sur les cellules cancéreuses surexprimant MRP1, du même ordre de grandeur que celle induite par le vérapamil racémique dans les mêmes conditions (IC₅₀ = 11 et 15 µM pour le composé **28** et le (±)-vérapamil, respectivement). Le groupement méthoxyle en position C-6 est bénéfique, voir essentiel (composé **28** vs **26** et **27**), ce qui concorde avec l'effet observé sur l'efflux de GSH. Le remplacement du groupement méthoxyle en C-6 par un méthyle (**29**), hydroxyle (**34**), trifluoroacétamide (**41**) ou amino (**42**) a été défavorable pour l'activité par rapport au composé **28**. Un groupement hydroxyle en position C-3 (composé **26**) est absolument nécessaire pour induire l'apoptose des cellules cancéreuses résistantes MRP1.

IV.2.4. Synthèse, activité biologique et relation structure-activité des dérivés de vérapamil

IV.2.4.1. Synthèse des dérivés de vérapamil

Comme nous l'avons souligné précédemment, les analogues du vérapamil retenus sont des dérivés qui sont dépourvus des groupements cyano et isopropyle, car ces derniers fragments jouent un rôle important dans la cardiotoxicité. Il a été aussi envisagé de maintenir les deux fragments diméthoxyphényles et une trialkylamine (amine tertiaire) qui sont importants pour l'activité d'efflux du GSH séparés par bras espaceur (*linker*) de nature variable.

Afin de pouvoir obtenir les dérivés désirés nous avons adopté la méthode décrite dans le schéma 11 ci-après (Nadler 1998). La réaction de la 3,4-diméthoxyaniline avec différents chlorures d'acide halogénés sur le carbone terminal a permis d'obtenir les amides correspondants. Les amides obtenus sont ensuite mis en réaction avec la *N*-méthyl-2-(3,4-diméthoxyphényl)éthylamine en présence de la triéthylamine. La dernière étape consiste en la réduction de la fonction amide au moyen de LiAlH_4 , dans le THF.

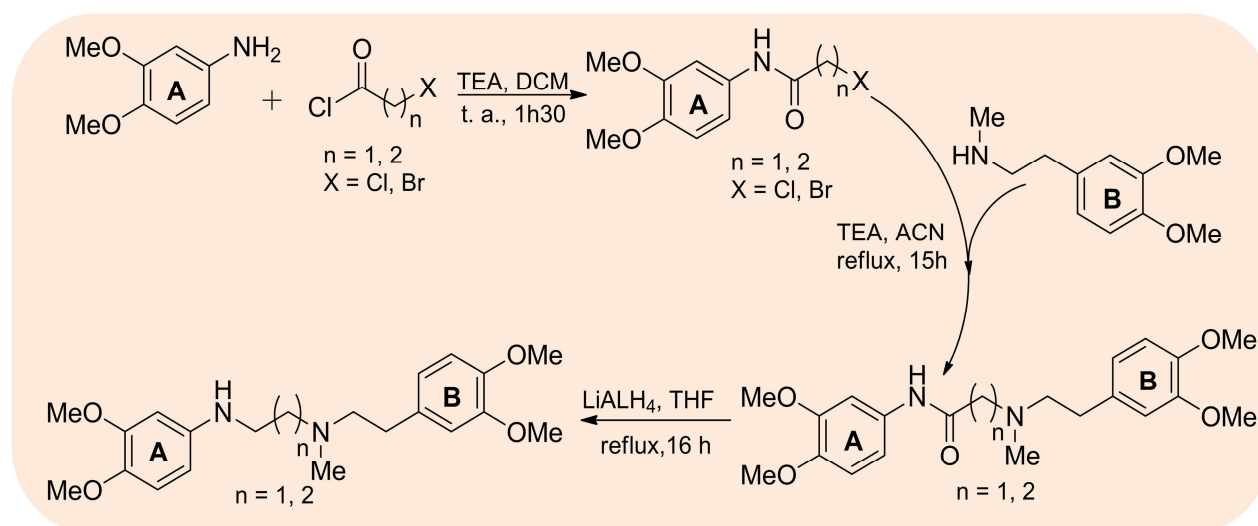


Schéma 11. Schéma de synthèse de dérivés de vérapamil.

Cette méthode a permis d'obtenir quatre dérivés (Figure 29).

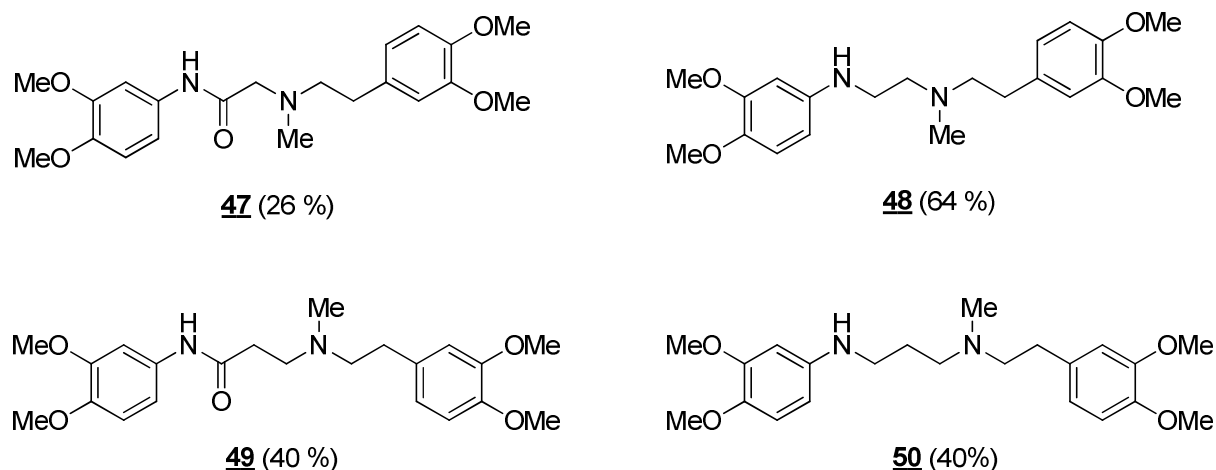


Figure 29. Structures des dérivés obtenus selon la première méthode de synthèse.

Afin d'améliorer les rendements de notre schéma de synthèse, nous avons inversé l'ordre des deux premières étapes. Il s'agit de coupler le *N*-méthyl-2-(3,4-dimethoxyphenyl)éthylamine en premier avec le chlorure d'acide suivi d'une réaction avec la diméthoxyaniline (Schéma 12). Deux chlorures d'acide ont été utilisés, le chlorure de 2-chloroacétique et le chlorure de 3-chloropropanoïque. La réaction des deux chlorures d'acide avec la *N*-méthyl-2-(3,4-dimethoxyphenyl)éthylamine a donné les amides attendus (amide **A** et amide **B**) avec des rendements corrects. Les réactions des amides avec la diméthoxyaniline a donné des résultats, plutôt décevants. En effet, la réaction de l'amide **A** avec la diméthoxyaniline a donné le produit attendu mais avec seulement 15% de rendement. En revanche, la réaction de l'amide **B** avec la même amine a conduit au produit d'élimination, le vinylamide (Schéma 12). Malgré les différentes tentatives, le produit attendu n'a pu être obtenu.

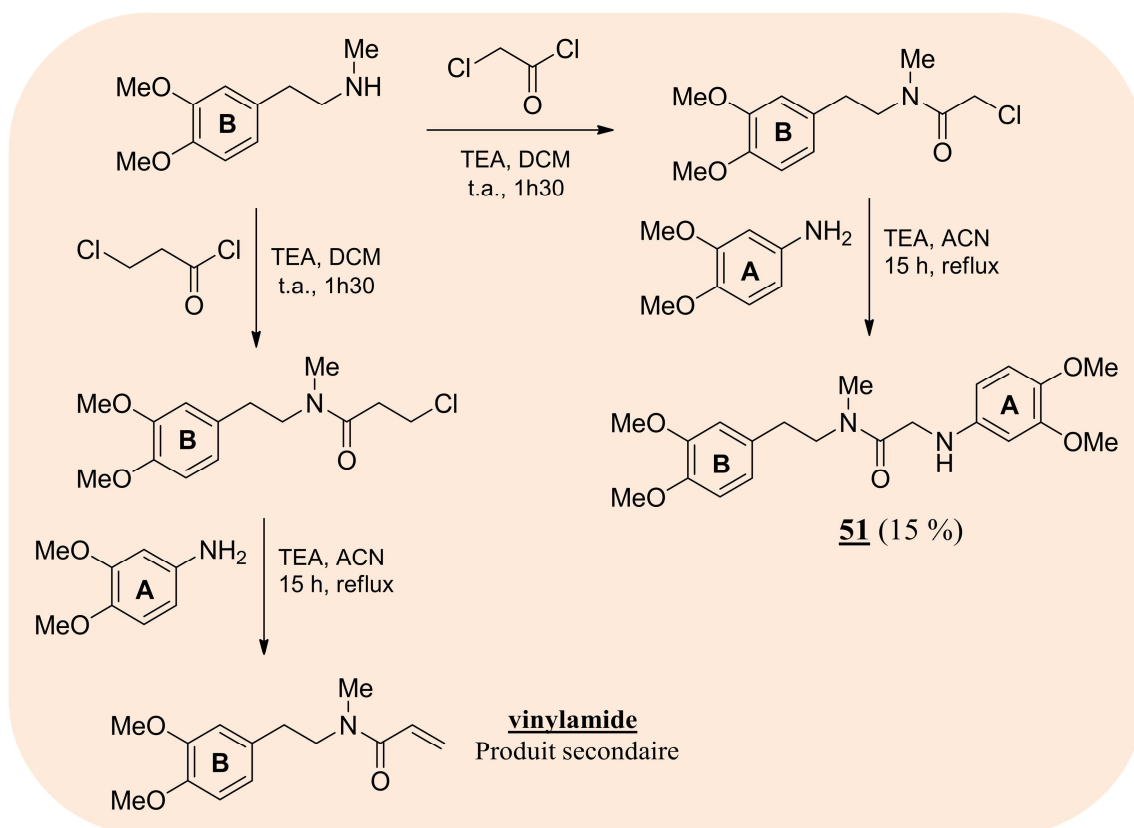


Schéma 12. Synthèse de dérivés de vérapamil.

Dans la même démarche de conception, nous avons voulu introduire une structure plus rigide au niveau de l'espaceur (Figure 30).

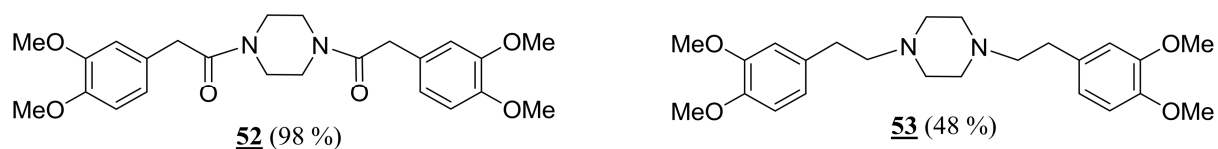


Figure 30. Structure des dérivés de vérapamil symétriques ciblés.

Le dérivé **52** a été obtenu en deux étapes : d'abord par couplage de la 1,4-pipérazine avec le chlorure d'acide 3-diméthoxyphénylpropanoïque, qui a fourni le dérivé **53** intermédiaire, ensuite par réduction du diamide obtenu par LiAlH_4 (Schéma 13).

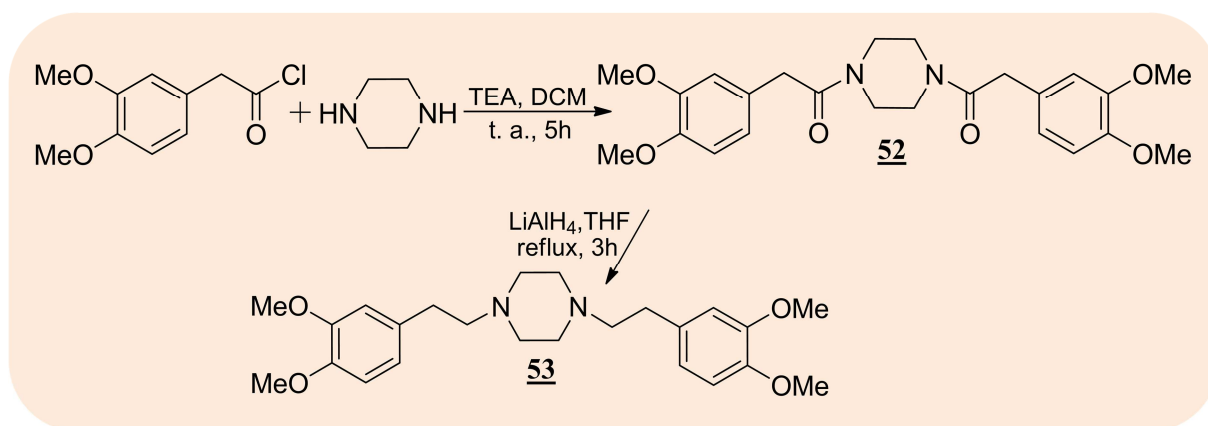


Schéma 13. Schéma de synthèse des dérivés de vérapamil symétriques ciblés.

Pour pouvoir comparer l'influence de la nature et de la longueur de l'espaceur sur l'activité biologique, nous avons synthétisé deux autres produits issus du couplage de la *N*-méthyl-2-(3,4-diméthoxyphényl)éthylamine avec des espaceurs à deux et trois carbones (Schéma 14). Ainsi le dérivé **54** est obtenu par couplage entre l'amine et le 1,3-dibromopropane. Le dérivé **55** a été obtenu par couplage entre l'amine et le 1,2-dichloro-oxalyle et le dérivé **56** est le produit de la réduction de **55** par du LiAlH_4 .

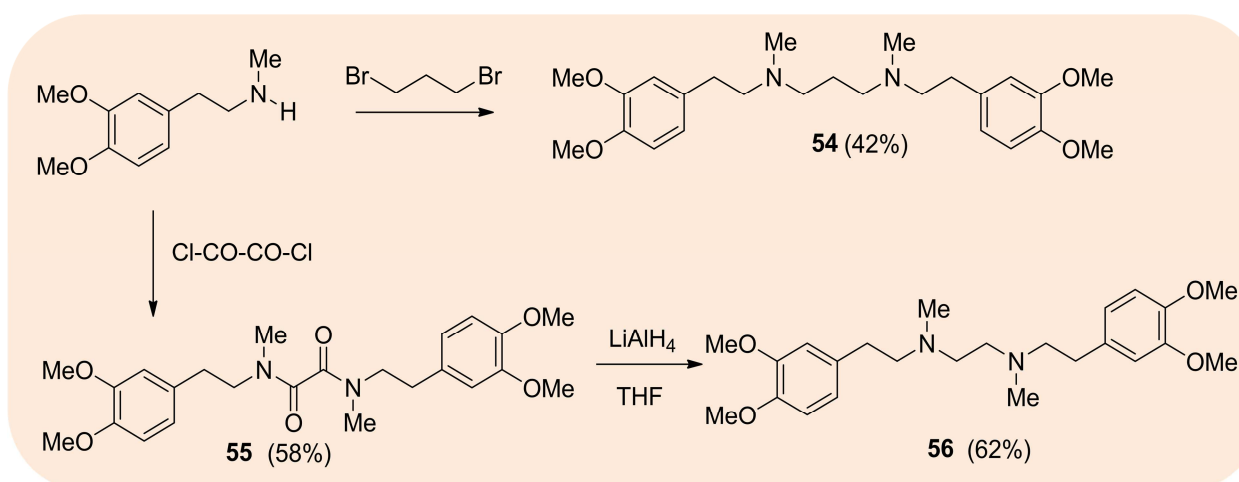


Schéma 14. Schéma de synthèse des dérivés de vérapamil symétriques ciblés.

IV.2.4.1. Evaluation biologique des dérivés de vérapamil

Le tableau 15 ci-dessous dresse le bilan des structures des 10 dérivés testés. Le diagramme suivant (Figure 31) illustre le bilan des mesures de l'activité d'efflux net de GSH de toutes ces molécules testées à 20 μM .

Molécule	Structure	% Efflux net GSH	Molécule	Structure	% Efflux net GSH
47		25	48		35
49		1	50		5
51		54	52		28
53		22	54		39
55		11	56		22

Tableau 15. Bilan des dérivés de vérapamil testés et pourcentage d'efflux net de glutathion.

Efflux net de GSH des dérivés de vérapamil

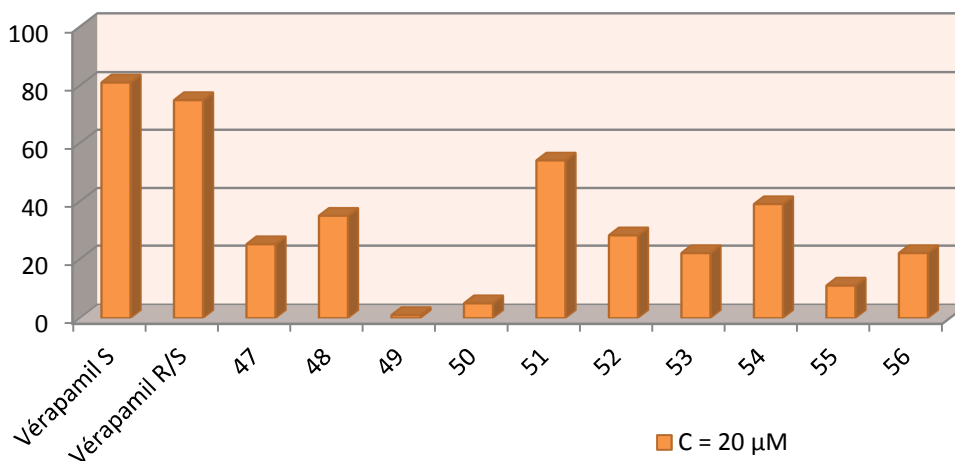


Figure 31. Bilan des dosages d'efflux net de GSH des dérivés de vérapamil testés à 20 μ M. Les résultats sont en % efflux net GSH / quantité de protéine. Le pourcentage d'efflux net de GSH est la différence entre le pourcentage d'efflux dans les cellules BHK-21 WT (sensibles) et le pourcentage d'efflux dans les cellules BHK-21 surexprimant MRP1 (résistantes).

Sur ces 10 dérivés de vérapamil testés à 20 μM , seule la molécule **51** a une activité d'efflux de GSH supérieure à 40 %. L'évaluation de sa cytotoxicité a été effectuée mais aucune IC_{50} n'a pu être obtenue à la gamme de concentrations étudiée.

IV.2.4.3. Relations structure-activité des dérivés de vérapamil

L'efflux de glutathion induit par les composés synthétisés a été évalué et s'est révélé faible pour toute la série et au vu des résultats, peu de relations structure activité peuvent être mises en évidence. Nous constatons tout de même que la présence d'un carbonyle est favorable (composé **51** vs **50**) ainsi que celle de l'azote basique lié au noyau phényle plutôt qu'un amide (composé **51** vs **47**).

Ces résultats illustrent aussi l'importance du carbone quaternaire central du vérapamil pour l'activité. Malheureusement, c'est ce même motif qui semble être responsable de la cardiotoxicité du vérapamil.

IV.2.5. Bilan global sur la totalité des molécules étudiées comme activateurs de MRP1

Nos résultats indiquent que les composés les plus actifs en tant qu'inducteurs d'apoptose sur les cellules cancéreuses surexprimant MRP1, sont les composés **1**, **4** et **10** pour les dérivés de flavone et le composé **28** pour les dérivés de xanthone (Figure 32).

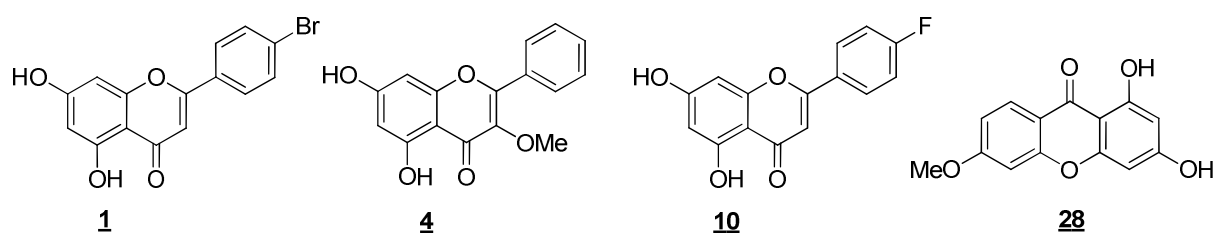


Figure 32. Structures des dérivés les plus actifs

On peut supposer que, par l'épuisement de GSH, ces dérivés sont activateurs de MRP1 ce qui a conduit à la privation des cellules du GSH nécessaire pour leur équilibre redox, élément essentiel à leur survie. Les résultats soulignent également l'importance de mesurer de façon concomitante l'efflux du GSH et la mort cellulaire. En effet, il est intéressant de mentionner

que le déclenchement de la mort cellulaire ne dépend pas seulement de l'efflux de GSH, comme le montrent la galangine et les xanthones **6**, **18**, **21** et **23** qui ont provoqué plus de 50% d'efflux de GSH mais sans mort cellulaire concomitante. Ainsi, la cytotoxicité sélective des flavones **1**, **4** et **10** et de la xanthone **28** est plus probablement liée à une activation de MRP1, qui conduit à l'apoptose par accélération de l'efflux de GSH du compartiment intracellulaire.

IV.3. Inhibiteurs d'ABCG2 comme agents chimiosensibilisants des traitements chimiothérapeutiques

IV.3.1 Etat des lieux au début de ce projet

Dans ce cadre, notre objectif était d'obtenir des inhibiteurs puissants et sélectifs d'ABCG2. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur de récents travaux émanant de notre équipe et également sur les structures d'inhibiteurs sélectifs récemment décrits dans la littérature.

L'élacridar (GF120918) a été initialement développé comme un inhibiteur de P-gp puis largement étudié comme un inhibiteur puissant d'ABCG2. Le GF120918 a été utilisé comme « lead » pour concevoir d'autres dérivés comme le tariquidar (XR9576). Comme pour le GF120918, le XR9576 manque de sélectivité vis-à-vis d'ABCG2 car il inhibe également P-gp. Très récemment (Kühnle 2009), des dérivés du XR9576 (composés 5 et 6 dans la figure 33) ont été rapportés. Ces derniers sont d'excellents inhibiteurs d'ABCG2 avec une certaine sélectivité pour ce dernier, néanmoins sans indication quant à leur toxicité.

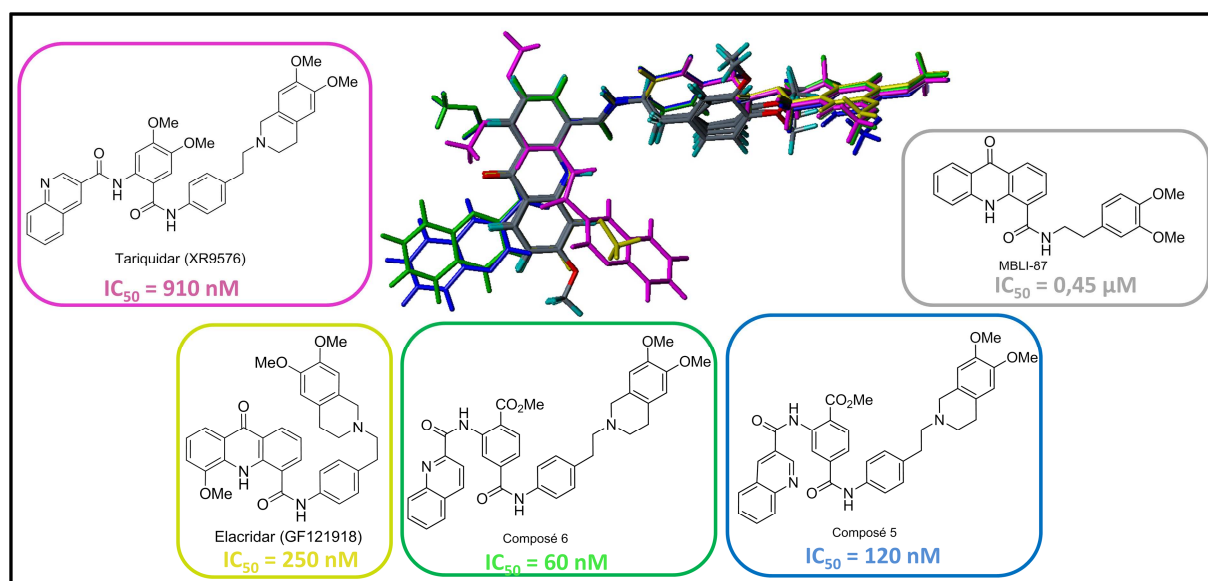


Figure 33. Inhibiteurs d'ABCG2.

Au sein de notre équipe, les structures du GF120918 et du XR9576 ont servi de modèles pour concevoir des dérivés actifs et sélectifs d'ABCG2. Ainsi, le composé appelé MBLI-87, mis au point au laboratoire, a montré une très bonne sélectivité pour ABCG2 (Boumendjel 2007). Ce composé a fait l'objet d'étude *in vivo* sur des souris xénogreffes porteuses de tumeurs

surexprimant ABCG2 et les résultats ont été concluants, car le composé induit un effet de potentialisation de l'irinotécan (Figure 34) (Arnaud 2011). Néanmoins, ce composé présente un handicap de taille, lié à sa propre toxicité qui a empêché l'administration de doses élevées en association avec l'irinotécan. A notre connaissance, notre étude est la première montrant l'activité *in vivo* d'un pur inhibiteur d'ABCG2. Encouragés par ces résultats, nous avons poursuivi ce travail avec comme objectif, de concevoir de nouveaux dérivés plus actifs que le MBLI-87, moins toxiques tout en maintenant la sélectivité pour ABCG2.

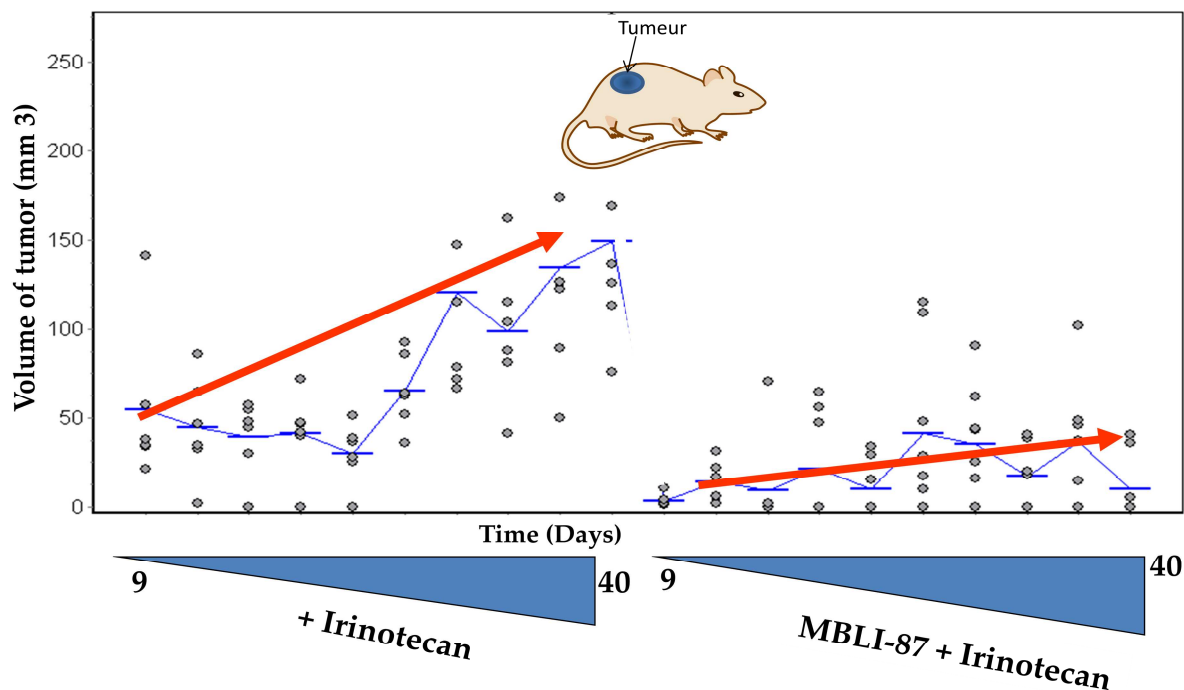


Figure 34. Potentialisation de l'effet de l'irinotecan par MBLI-87

IV.3.2. Choix et conception des molécules

Le choix et la conception de nos molécules cibles se sont appuyés sur deux éléments. D'une part, l'alignement des 5 inhibiteurs représentés ci-dessous (Figure 35) a révélé qu'il y a un recouvrement partiel entre le MBLI-87 et les inhibiteurs les plus actifs (molécules 5 et 6). Un recouvrement quasi-parfait peut être atteint par le branchement de motifs de type phényle substitué sur la position 7 de l'acridone.

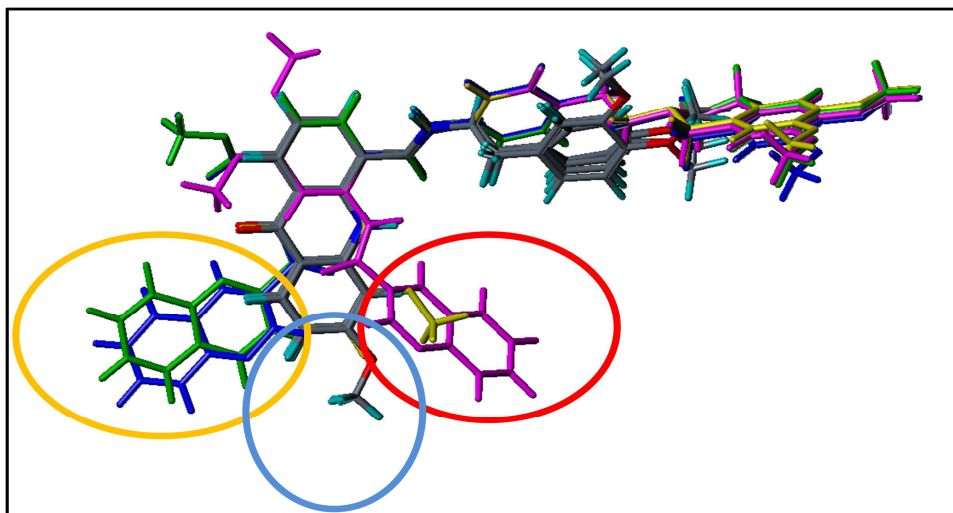


Figure 35. Alignement des inhibiteurs : Le tariquidar est représenté en rose, l'élacridar en jaune, le composé n°5 en bleu, le composé n°6 en vert, et les dérivés de MBLI-87 en gris.

Par ailleurs, la structure de MBLI-87 comme celle de l'élacridar renferme une structure acridone, qui est connue pour être un toxophore agissant comme un intercalant avec l'ADN. Pour s'affranchir de cette cytotoxicité, nous avons voulu remplacer le noyau acridone par un noyau chromone. Ce dernier ne présente pas de toxicité notable et peut être fonctionnalisé de façon à introduire les motifs requis pour l'inhibition d'ABCG2.

Sur la base de ces éléments, nous nous sommes intéressés à la conception de composés à squelette chromone qui intègrent les motifs permettant un alignement avec les molécules (5 et 6) ayant une haute affinité pour ABCG2 (Figure 36).

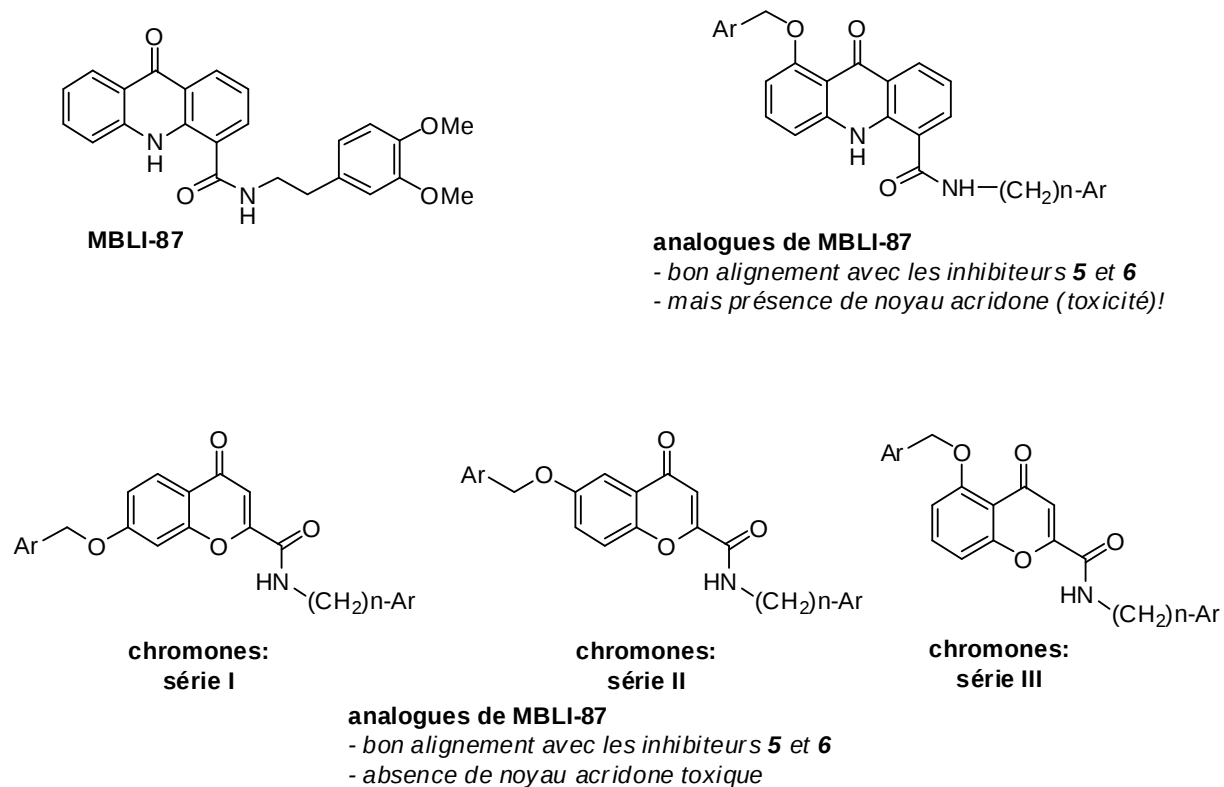


Figure 36. Structures des molécules ciblées

A ce jour, nous avons concentré nos efforts sur l'étude de dérivés de chromones de type : série II et série III.

Pour le design de l'ensemble de nos molécules, nous nous sommes inspirés de fragments d'inhibiteurs connus d'ABCG2 dans le choix des substituants. On peut retrouver des fragments de MBLI, de tariquidar, d'élacridar, des molécules 5 et 6.

Sur les chromones de type série III, nous avons sélectionné les structures ci-dessous (Figure 37).

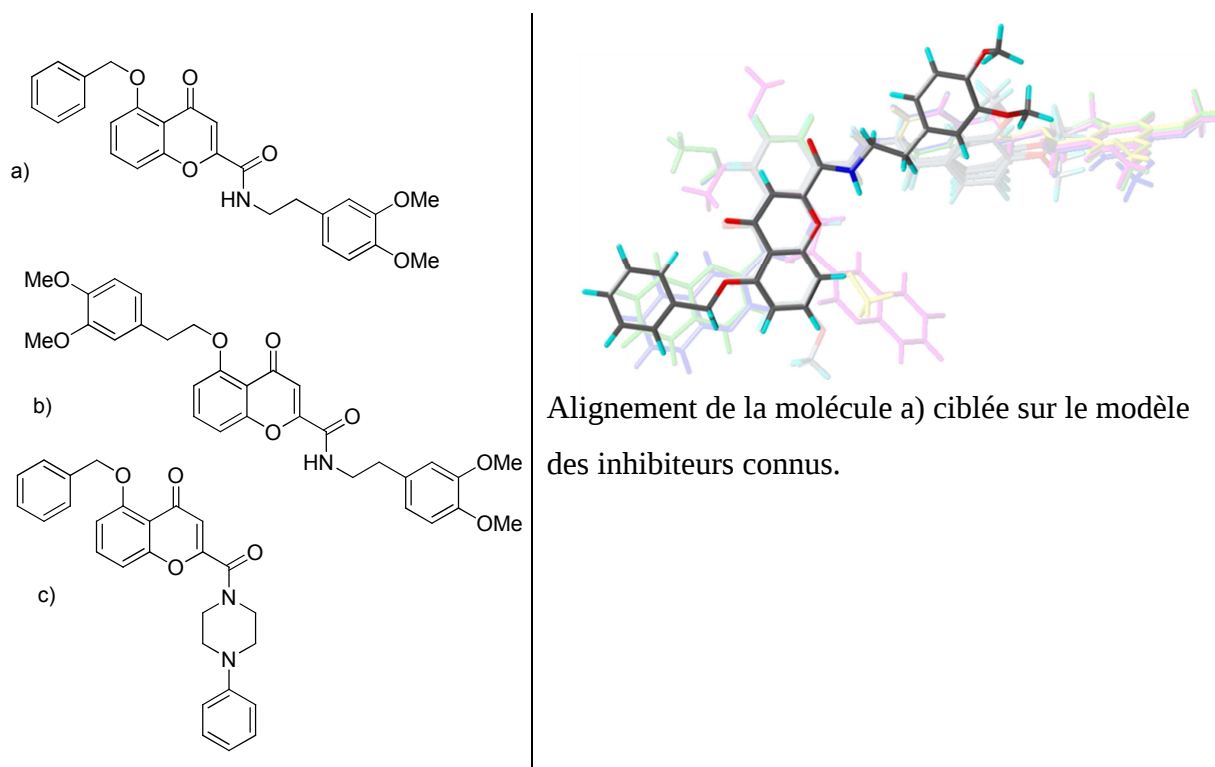


Figure 37. Structures de 3 composés ciblés. A droite, l'alignement du composé a) avec les dérivés de l'élacridar.

Les résultats relatifs à la synthèse et à l'évaluation biologique des chromones de type série II (Figure 38) ne sont pas présentés dans ce manuscrit pour cause de confidentialité (étude de brevetabilité en cours).

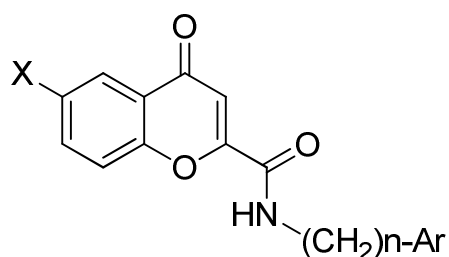


Figure 38 Structure générale des dérivés de chromone ciblés brevetés.

IV.3.3. Synthèse et activité biologique

IV.3.3.1. Synthèse des chromones de série III

La voie rétrosynthétique pour accéder aux composés cibles implique la préparation d'un dérivé de chromone carboxylé en position 2 (**A**). Ce dernier peut être obtenu par réaction d'un

dérivé d'acétophénone (**B**) avec l'oxalate d'éthyle suivie d'une hydrolyse. Le dérivé d'acétophénone est obtenu par O-alkylation de la 2',6'-dihydroxyacétophénone (**C**) (Schéma 14).

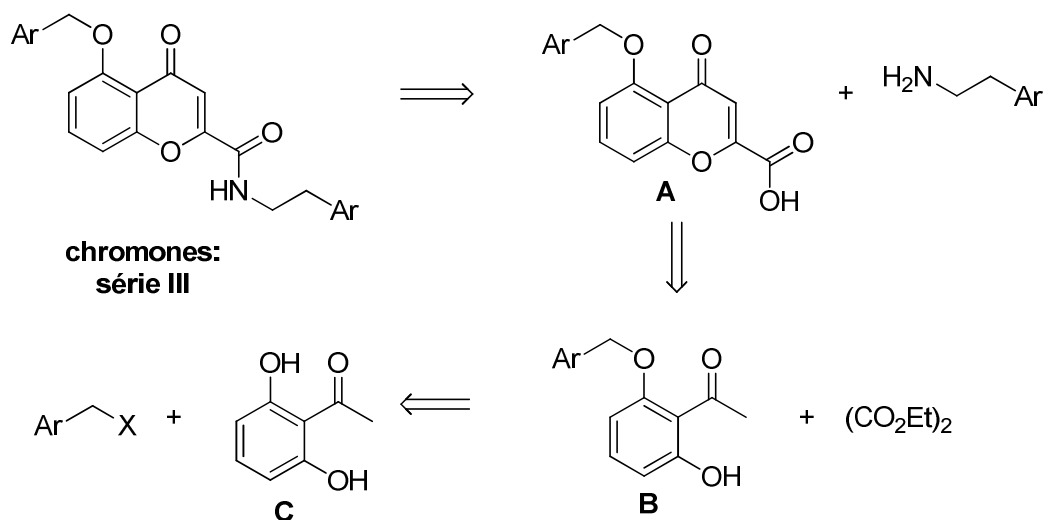


Schéma 14. Schéma de rétrosynthèse des dérivés de chromones ciblés.

La première étape est une mono O-alkylation de la 2',6'-dihydroxyacétophénone par un bromure d'alkylaryle ou de l'iodométhane pour une méthylation en présence d'une base, ici le carbonate de potassium dans l'acétone (Lau 1987) (Schéma 15). La condensation du dérivé d'acétophénone obtenu avec le diéthylloxalate en présence d'éthanolate de sodium a fourni la chromone ester (Bantick 1976, Ellis 1972). Il est à noter que l'éthanolate de sodium peut être remplacé par le méthanolate de sodium pour donner l'ester méthylique correspondant et ce sans impact sur le rendement de la réaction.

L'ester obtenu est hydrolysé en acide correspondant après traitement par NaHCO_3 à $80\text{ }^\circ\text{C}$. Afin de faciliter la réaction de couplage, l'acide carboxylique est converti en chlorure d'acide après traitement par le chlorure d'oxalyle. Le couplage entre le chlorure d'acide et l'amine s'effectue alors en dernière étape en présence d'une base, la triéthylamine dans le THF. Ainsi se sont 8 composés qui ont été obtenus avec cette méthode (Tableau 16).

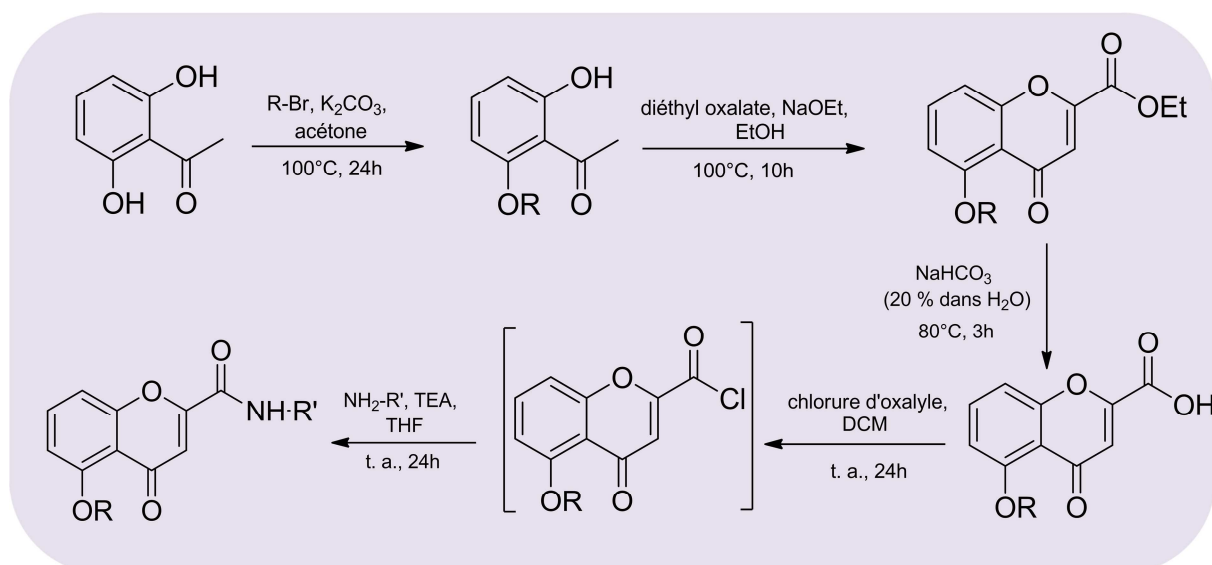
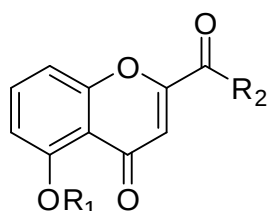


Schéma 15. Schéma réactionnel de la préparation des chromones ciblées.



N°	R ₁	R ₂	Rendement final %
<u>57</u>	Me	OEt	23
<u>58</u>	H	OMe	24
<u>59</u>	H	OH	88
<u>62</u>		OH	14
<u>63</u>			34
<u>64</u>		OEt	27
<u>65</u>			10
<u>66</u>			5

Tableau 16. Structure et rendements des dérivés synthétisés.

IV.3.3.1. Activité biologique

Les molécules synthétisées sont testées par nos partenaires biologistes au laboratoire de l'IBCP (Institut de Biologie et Chimie des Protéines) dans l'équipe « Mécanisme et modulation de la résistance aux drogues » du Dr. Attilio DI PIETRO.

Afin d'évaluer l'efficacité de réversion du phénotype MDR induit par ABCG2 des composés synthétisés, plusieurs tests biologiques sont mis en œuvre. Tous les tests sont réalisés sur une lignée cellulaire de cellules embryonnaires humaines de rein (HEK 293) surexprimant ABCG2 par transfection du gène.

Un premier test permet d'apprécier l'impact des molécules sur la fonction d'export d'ABCG2. Cette méthode consiste à quantifier l'efflux de la mitoxantrone, un anticancéreux qui est aussi un bon substrat d'ABCG2 (Figure 39). La mitoxantrone présente l'avantage d'être fluorescente ce qui permet de la doser et la quantifier dans les cellules.

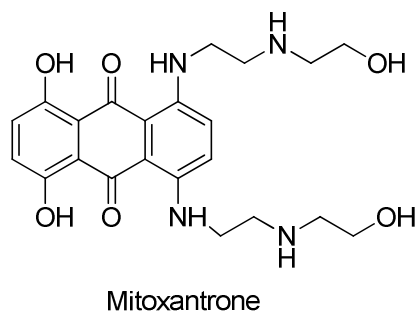


Figure 39. Structure de la mitoxantrone, substrat fluorescent d'ABCG2.

Dans ce test, deux phases sont nécessaires :

- la phase d'incubation ou d'accumulation intracellulaire du substrat fluorescent : elle consiste à incuber les cellules avec le substrat. Le substrat fluorescent est ajouté pendant 30 minutes à 37°C en présence de concentrations variables du candidat inhibiteur à tester. Le témoin étant les cellules incubées du substrat fluorescent et d'un inhibiteur de référence, ici l'élacridar (GF 120918).
- La phase d'efflux : elle consiste à enlever le substrat par lavage au tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline) puis à incuber les cellules pendant 1 heure à 37 °C en absence de substrat et en présence d'inhibiteur. Après le traitement des cellules par la trypsine, on quantifie par cytométrie en flux le substrat non efflué.

Un deuxième test permet de déterminer la cytotoxicité des molécules synthétisées les plus actives, par l'étude de la croissance cellulaire *via* le test MTT (voir principe précédemment décrit dans la partie des résultats biologiques de MRP1). Pour l'obtention de bons candidats inhibiteurs d'ABCG2, la toxicité doit être faible.

Enfin un troisième test est réalisé afin d'évaluer la capacité des molécules à rétablir la chimiosensibilisation à la mitoxantrone. Il s'agit de quantifier la survie cellulaire par le test MTT en présence de l'anticancéreux et de l'inhibiteur (le plus actif et le moins toxique).

IV.3.3.2. Bilan des résultats biologiques des dérivés de chromone

La figure 41 ci-dessous dresse le bilan des structures des 9 dérivés testés. En plus des dérivés ciblés (les composés **63**, **65** et **66**), nous avons inclus des intermédiaires afin d'enrichir les études de relation structure-activité.

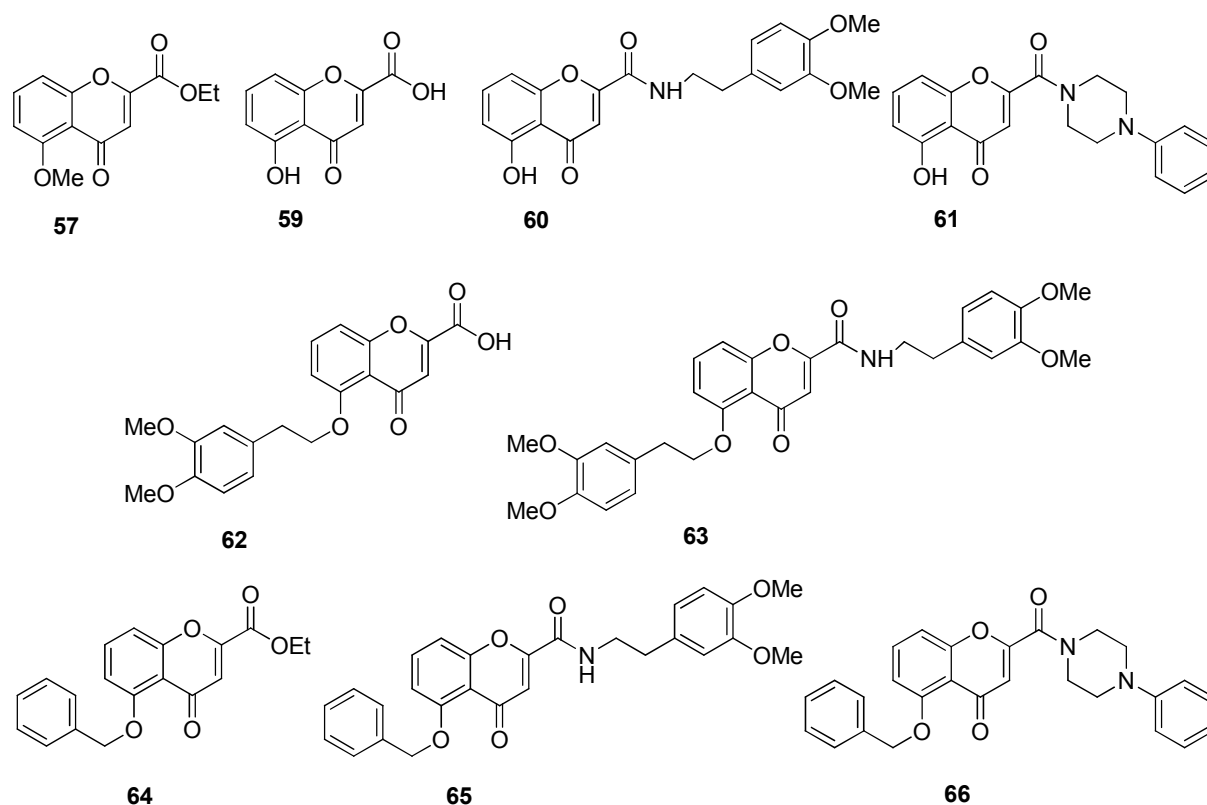


Figure 41. Structures des dérivés synthétisés et testés comme inhibiteurs d'ABCG2.

Le test permettant de mesurer l'accumulation de la mitoxantrone induite par la molécule testée a été réalisé à deux concentrations (1 et 5 μM). Le diagramme suivant (Figure 42)

illustre les résultats obtenus. Sur les 9 composés testés, 4 composés ont montré un effet notoire (composés **60**, **63**, **65** et **66**). A 5 μM , les composés **63** et **65** ont induit une accumulation de mitoxantrone comparable à celle induite par l'inhibiteur de référence, l'élacridar.

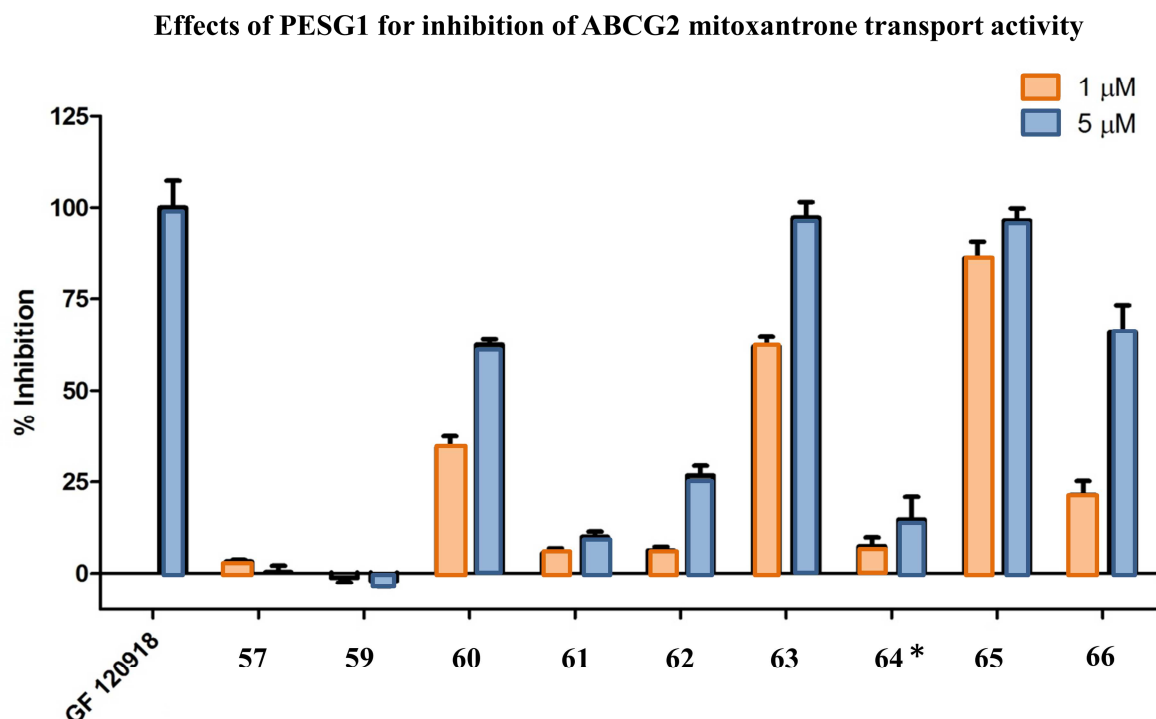


Figure 42. Diagramme représentant le pourcentage d'inhibition d'efflux de la mitoxantrone sur des cellules HEK293 surexprimant ABCG2 à 1 μM et 5 μM . Le pourcentage d'inhibition du GF120918 à 5 μM étant la référence. *Le composé **64** a été testé impur

Pour les composés les plus actifs, à savoir les composés **60**, **63**, **65**, les valeurs des IC_{50} d'inhibition ont été déterminées à partir des courbes d'accumulation intracellulaire de mitoxantrone en fonction de la concentration en inhibiteur (Figure 43). L'élacridar est utilisé comme référence ($\text{IC}_{50} = 0,3 \mu\text{M}$).

Comme le montre la figure 43, les trois composés testés ont une $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$. Le plus actif est le composé **65** ($\text{IC}_{50} = 0,17 \mu\text{M}$).

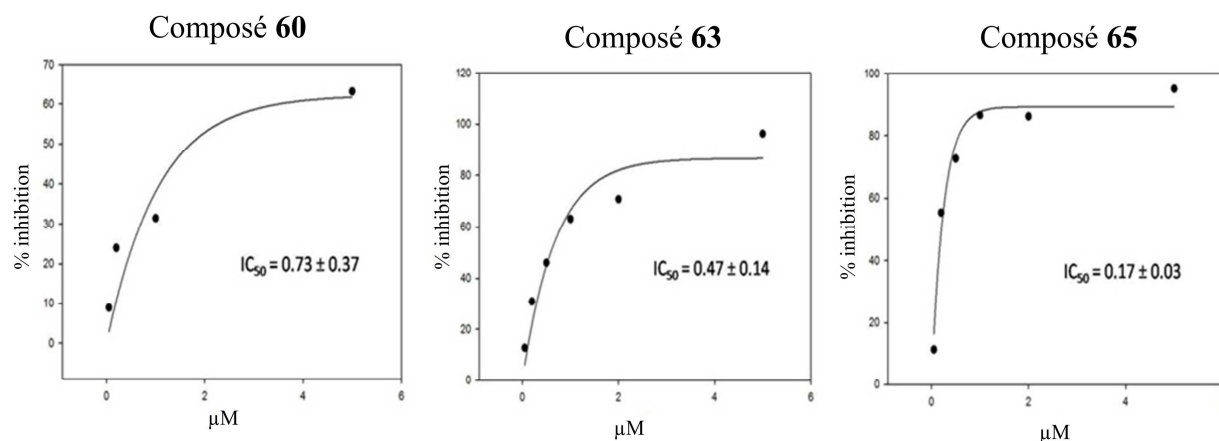


Figure 43. Courbes d'accumulation intracellulaire de mitoxantrone en fonction de la concentration en inhibiteur sur des cellules HEK293 surexprimant ABCG2.

L'évaluation de la toxicité du composé **65** a été réalisée sur deux lignées cellulaires : HEK293 sauvage et HEK293 surexprimant ABCG2.

Comme le montrent les courbes de survie cellulaire (Figure 44), la molécule est faiblement cytotoxique ($\text{IC}_{50} \sim 40$ μM).

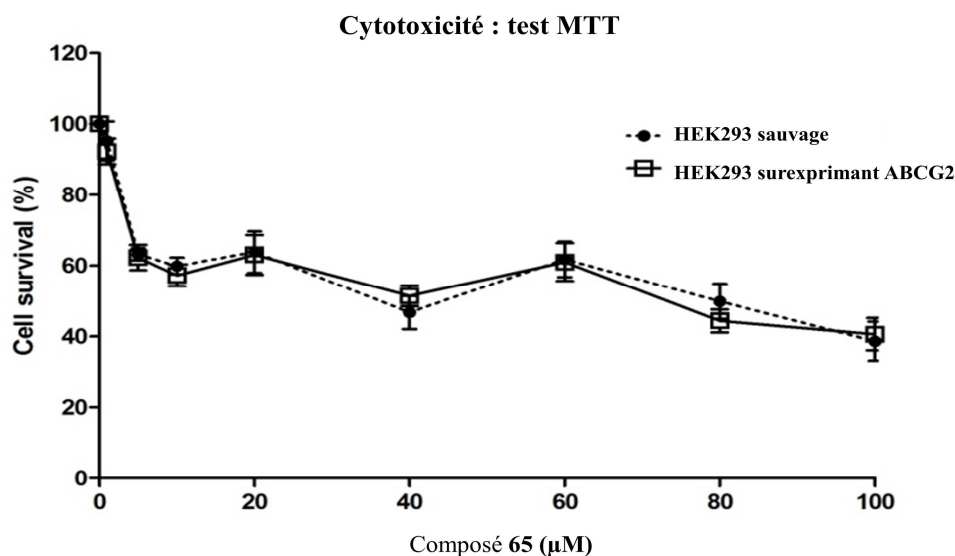


Figure 44. Evaluation de la cytotoxicité du composé **65** par le test MTT sur deux lignées cellulaires : HEK293 sauvage et HEK293 surexprimant ABCG2.

Ainsi, notre premier objectif est atteint dans la mesure où le composé **65** inhibe ABCG2 ($\text{IC}_{50} = 0,17$ μM vs $0,3$ μM pour le GF120918) avec un bon index thérapeutique, correspondant au rapport inhibition sur toxicité.

IV.3.4. Sélectivité vis-à-vis de P-gp et de MRP1

Afin d'étudier la sélectivité des composés **60**, **63**, **65** pour ABCG2, relativement à P-gp et MRP1, nous avons évalué leur effet sur deux lignées cellulaires :

- une lignée HEK-293 transfectée par ABCB1 (P-gp) en mesurant l'accumulation de la mitoxantrone, qui est aussi substrat de P-gp.
- une lignée (HEK293) transfectée par ABCC1 (MRP1) en mesurant l'accumulation de la calcéine, un substrat de MRP1.

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 45 et 46 suivantes. Les trois composés n'ont aucun effet d'inhibition sur MRP1, car aucune accumulation de la calcéine en présence des composés testés n'est observée. Sur P-gp, le composé **63** induit une inhibition modérée : 40% d'inhibition à 5 μ M vs 100% pour le GF120918 alors que les composés **60** et **65** n'ont montré aucune inhibition, ils semblent même induire une stimulation de P-gp.

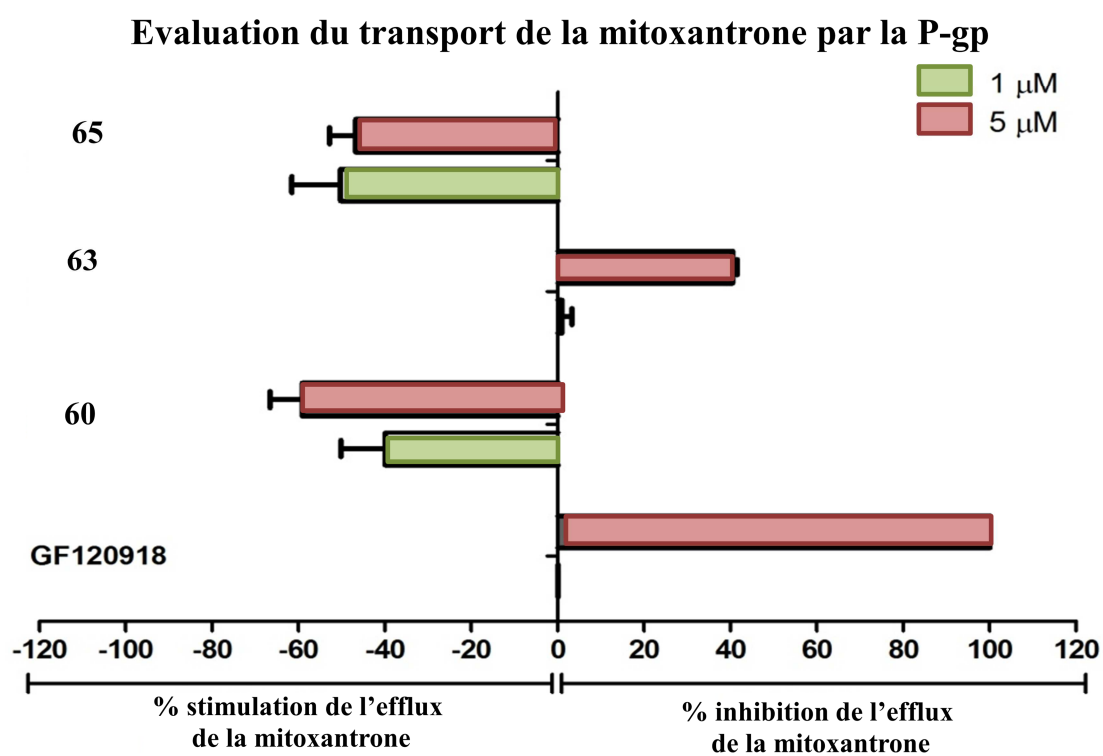


Figure 45. Evaluation du transport (% inhibition et % stimulation) de la mitoxantrone en présence des inhibiteurs à 1 μ M et 5 μ M sur des cellules cancéreuses surexprimant la P-gp.

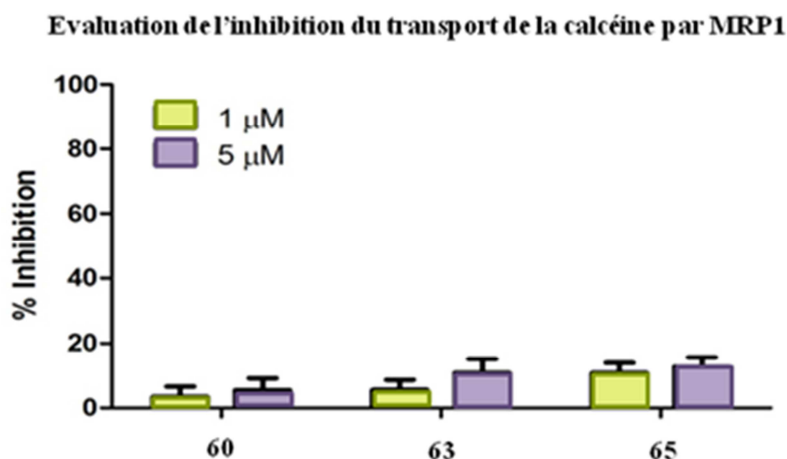
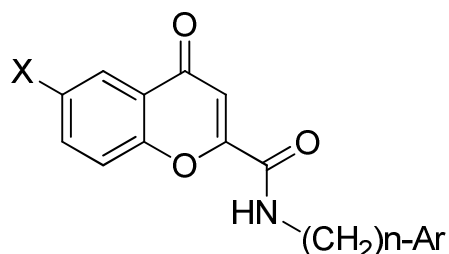


Figure 46. Evaluation du pourcentage d'inhibition du transport de la calcéine en présence des inhibiteurs à 1 μ M et 5 μ M sur des cellules HEK293 surexprimant MRP1.

IV.3.5. Bilan

La stratégie de conception d'inhibiteurs d'ABCG2 s'est révélée particulièrement efficace. Ainsi une nouvelle génération d'inhibiteurs a été identifiée et qui renferme à la fois des inhibiteurs puissants, sélectifs et avec un très bon index thérapeutique (efficacité vs toxicité). Il est encore trop tôt de dresser une relation structure-activité, vu le nombre de molécules synthétisés et testées.

Une autre famille de molécules de structures appartenant à la formule générale ci-dessous a été mise au point. Certains de ces composés sont encore plus efficaces et moins cytotoxiques. Ces composés font actuellement l'objet d'étude de brevetabilité. Pour se conformer aux consignes de nos tutelles, les structures de ces molécules et leur effet biologique ne seront pas présentés dans ce manuscrit.



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

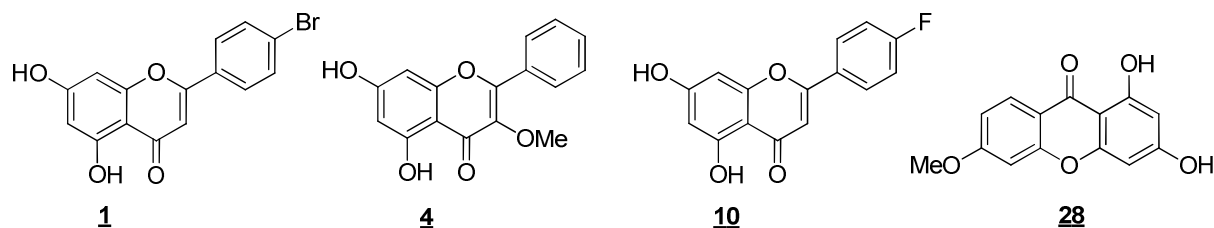
MRP1 et ABCG2 sont des transporteurs « multidrug » de la famille des protéines ABC, que l'on a associé à la chimiorésistance chez l'Homme. Leur rôle initial de détoxification de l'organisme a été détourné par les cellules tumorales pour se protéger contre les traitements chimiothérapeutiques. Il en résulte une chimiorésistance des cancers qui représente un des principaux échecs des traitements anti-cancéreux. L'étude des protéines ABC, tel que MRP1 et ABCG2, qui sont impliquées dans ce phénomène représente alors un enjeu médical majeur.

L'objectif de cette thèse était double :

- Mettre au point des inducteurs d'apoptose sélectifs des cellules tumorales résistantes surexprimant MRP1.
- Mettre au point des inhibiteurs d'ABCG2 et les utiliser comme molécules en association avec des médicaments anticancéreux pour potentialiser l'effet de ces derniers.

La première partie de ce travail concernait la conception d'activateurs de MRP1 induisant l'apoptose des cellules cancéreuses. Nous avons effectué la pharmacomodulation de trois classes de dérivés : dérivés de flavone, xanthone et vérapamil. Nous avons réalisé la synthèse de 19 dérivés de flavone, 27 dérivés de xanthone et 10 dérivés de vérapamil. L'activité biologique de ces dérivés ainsi que 23 dérivés de flavones obtenus antérieurement comme inducteurs d'apoptose dans des cellules surexprimant MRP1 a été déterminé.

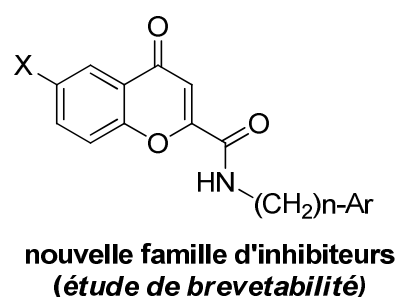
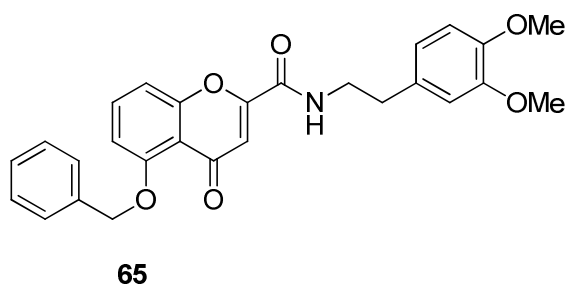
Les différentes études biologiques menées ont permis d'identifier trois flavones (composés **1**, **4** et **10**) et une xanthone (composé **28**) comme de bons candidats activateurs de MRP1 induisant l'apoptose. Cette étude nous a permis d'observer que le déclenchement de la mort cellulaire ne dépend pas systématiquement de l'efflux de GSH puisque certains composés testés induisent un efflux de glutathion sans déclenchement de l'apoptose.



Dans la suite du travail de conception, la pharmacomodulation pourrait s'appuyer, d'une part sur les éléments structuraux identifiés et d'autre part sur des études de relations structure-

activité quantitatives 3D (3D-QSAR) ou sur du HQSAR (hologramme QSAR) (HQSAR), une technique QSAR récente, reliant l'activité biologique à des fragments de la structure de la molécule. Dans ce contexte, les efforts de l'équipe devraient se concentrer sur les xanthones, qui sont particulièrement prometteuses.

La deuxième partie de ce travail de thèse consistait en la conception d'inhibiteurs sélectifs d'ABCG2. La stratégie de conception d'inhibiteurs d'ABCG2 s'est révélée particulièrement profitable. Les essais biologiques *in vitro* ont permis l'identification de deux familles de molécules dérivées de chromone, qui se sont révélées être des inhibiteurs efficaces et sélectifs d'ABCG2, mais également dépourvus de toxicité (Figure ci-dessous).



Des dérivés de ces deux familles de composés sont en cours de synthèse et leur évaluation biologique s'effectuera ultérieurement.

Cette étude devra rapidement permettre la sélection d'un candidat pour l'évaluation *in vivo*. Ce travail pourra s'initier rapidement en collaboration avec le Dr. Léa PAYEN de l'Institut des Sciences Pharmacie et Biologiques (ISPB) de l'Université de Lyon et le Dr. Attilio DI PIETRO de l'IBCP (Lyon). Les activités antérieures de l'équipe avec ces deux laboratoires ont permis de lever les verrous techniques relatifs à l'expérimentation animale.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemical section

Tools, reagents and solvents

Reactions: were performed using oven dried glassware under an atmosphere of dry nitrogen. Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using commercial aluminium-backed silica gel plates. TLC spots were viewed under ultraviolet light at 254 and 366 nm.

Solvents and reagents: All reagent-grade chemicals and solvents were obtained from commercial suppliers and were used as received.

Purifications: were performed by gravity column chromatography using silica Gel 60 (40-60 mesh) or by using preparative TLC.

Melting points (mp): were obtained on a Büchi melting point B540.

¹H NMR spectra: were recorded on a Bruker Advance400 spectrometer (400 MHz). Chemical shifts are given in ppm (δ) and were referenced to the internal solvent signal or to TMS used as an internal standard. Multiplicities are reported as follows: *s* (singlet), *br s* (broad singlet), *d* (doublet), *t* (triplet), *q* (quadruplet), *dd* (doublet of doublet), *ddd* (doublet of doublet of doublet), *dt* (doublet or triplet), *dq* (doublet of quadruplet), *m* (multiplet), Coupling constants *J* are given in Hertz.

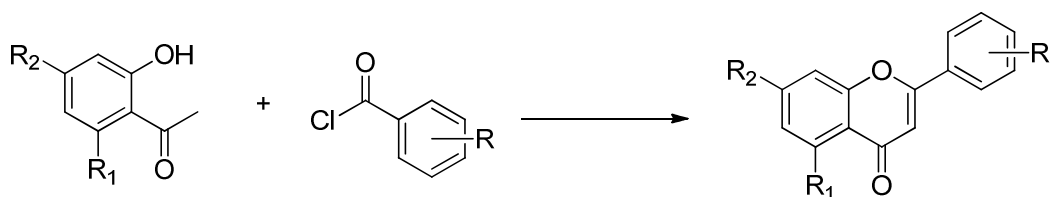
Low Resolution Mass Spectra (LRMS) : were recorded at the service de spectrométrie de masse du Département de Chimie Moléculaire de l'Université de Grenoble.

Elemental Analysis : were performed at the service d'Analyse Élémentaire du département de Chimie Moléculaire de l'Université de Grenoble.

Synthesis of Flavones derivatives

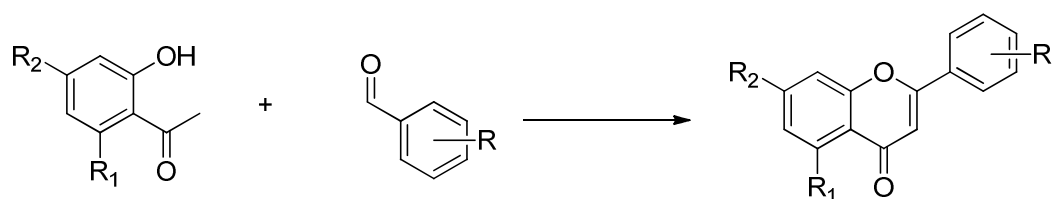
General procedures for the synthesis of flavones derivatives:

Procedure 1:



- a). 2'-Hydroxyacetophenone derivative was dissolved in pyridine (10 mL/mmol) and treated with a benzoyl chloride derivative (1.6 equiv.). The mixture was stirred at 100 °C for 1 hour. The reaction mixture was cooled to room temperature, a solution of EtOH/H₂O (1:1) was added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with HCl (2N), dried over sodium sulfate and evaporated.
- b). The previous residue was dissolved in pyridine (10 mL) and crushed KOH (2 equiv.) was added. The mixture was stirred at 100 °C for 1 hour. After cooling to room temperature, glacial acetic acid (15 mL) was added and the mixture was diluted with a solution of EtOH/H₂O (1:1), and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with HCl (2N), dried over sodium sulfate and evaporated.
- c). The previous residue was dissolved in a solution of glacial acetic acid/ sulfuric acid (10:2) and stirred at 100°C for 1 hour. After cooling to room temperature, H₂O was added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was washed with water, dried over sodium sulfate and evaporated.

Procedure 2:

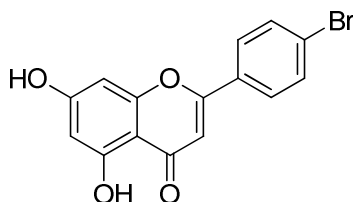


- a) 2'-Hydroxyacetophenone derivatives (1 equiv.) was dissolved in a solution of 1:1 of EtOH/KOH (8 % in H₂O), benzaldehyde derivative (1.5 equiv.) was added and the mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The reaction mixture was cooled to room temperature and acidified with HCl (2N). The precipitate formed is filtered and washed with water.
- b) The previously obtained crude product was dissolved in DMSO and I₂ (0.05 equiv.) was added. The mixture was stirred and refluxed for 24 hours. After cooling to room temperature, the reaction mixture was poured onto crushed ice. If we get a precipitate that is filtered and washed with diethyl ether and if not, the mixture is extracted with diethyl ether, washed with water, dried over sodium sulfate and evaporated.

Demethylation of methoxylated flavones

The compound to be demethylated was treated with BBr_3 (5 eq. per methoxy group) in CH_2Cl_2 at room temperature for 24 hours. At the end of the reaction, the mixture was poured onto crushed ice and the mixture is extracted with CH_2Cl_2 , washed with water, dried over sodium sulfate and evaporated to yield pure demethylated product

2-(4-Bromophenyl)-5,7-dihydroxy-4*H*-chromen-4-one (1)



The compound was obtained following the procedure 1 starting from 2',4',6'-trihydroxyacetophenone and 4-bromobenzoylchloride and was demethylated as described before.

Yield: 12% .

Aspect: Orange powder.

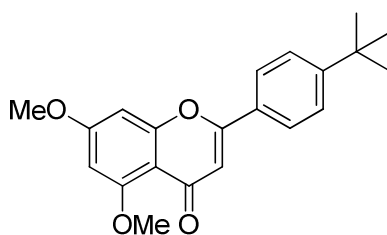
rf: 0.35 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

mp: 269°C.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 6.20 (d, $J = 1.7$ Hz, 1 H), 6.49 (d, $J = 1.7$ Hz, 1 H), 6.99 (s, 1 H), 7.75 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 7.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 10.91 (s, 1 H).

EI-MS: m/z 334 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-(4-*tert*-Butyl)phenyl)-5,7-dimethoxy-4*H*-chromen-4-one (2)



The compound was obtained following the procedure 1 starting from 2',4',6'-trihydroxyacetophenone and 4-isopropylbenzoylchloride.

Yield: 19%.

Aspect : Pale pink powder.

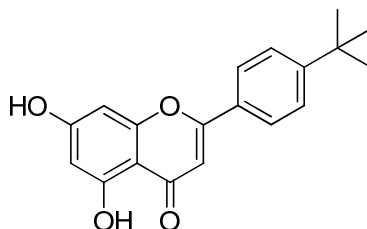
rf: 0.42 (ethyl acetate).

mp: 199°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.37 (s, 9 H), 3.93 (s, 3 H), 3.97 (s, 3 H), 6.39 (s, 1 H), 6.58 (s, 1 H), 6.68 (s, 1 H), 7.52 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.82 (d, *J* = 7.6 Hz, 2 H).

EI-MS: *m/z* 338 [M+H]⁺.

2-(4-*tert*-Butyl)phenyl)-5,7-dihydroxy-4*H*-chromen-4-one (3)



This compound was obtained by demethylation of compound **2** as described above.

Yield: 4%.

Aspect: Yellow powder.

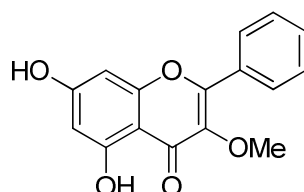
rf: 0.43 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

mp: > 325°C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.29 (s, 9 H), 6.20 (s, 1 H), 6.49 (s, 1 H), 6.90 (1, H), 7.56 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H), 7.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H), 10.89 (s, 1 H), 12.84 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 311 [M+H]⁺.

5,7-Dihydroxy-3-methoxy-2-phenyl-4*H*-chromen-4-one (4)



Phloroglucinol (2.65 g, 21 mmol), methoxyacetonitrile (2.7 mL, 36 mmol) and zinc chloride (3 g, 22 mmol) were dissolved in diethyl ether. The mixture was saturated with gaseous HCl and stirred at 0 °C for 20 min and the operation was repeated. The precipitate formed was filtered and washed with diethyl ether. The precipitate was dissolved in water and stirred under H₂O reflux for 2 hours. After the reaction mixture was cooled in ice, the precipitate formed was filtered and washed with water to provide a white powder. The powder was dissolved in acetone, benzoyl chloride (5.28 mL, 45 mmol) was added and the mixture was refluxed overnight. The solvent was evaporated and a solution of KOH (50% in methanol) was added, the mixture was stirred and refluxed for 4 hours. The solvent was evaporated and the residue is washed with petroleum ether and EtOAc to give pure product

Yield: 4%.

Aspect: Orange powder.

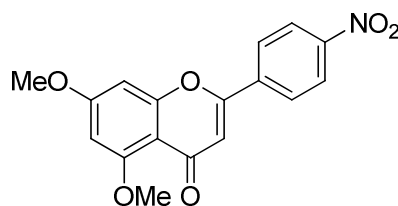
rf: 0.38 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

mp: 296°C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.78 (s, 3 H), 6.20 (s, 1 H), 6.44 (s, 1 H), 7.56 (m, 1 H), 7.98 (m, 1 H), 10.91 (s, 1 H), 12.55 (s, 1 H).

EI-MS: m/z 285 [M+H]⁺.

2-(4-Nitrophenyl)-5,7-dimethoxy-4*H*-chromen-4-one (5)



The compound was obtained following the procedure 2 starting from 2',4',6'-trihydroxyacetophenone and 4-nitrobenzaldehyde.

Yield: 85 %.

Aspect: Yellow powder.

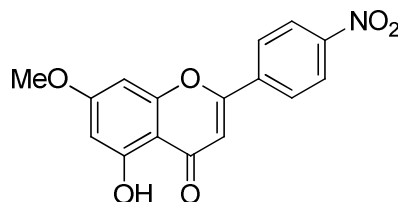
rf: 0.7 (cyclohexane : ethyl acetate, 3 : 7).

mp: 280°C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.88 (s, 3 H), 3.91 (s, 3 H), 6.36 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H), 6.69 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H), 6.82 (s, 1 H), 8.13 (d, *J* = 8.9 Hz, 2 H), 8.27 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H).

EI-MS: m/z 350 [M+Na]⁺.

5-Hydroxy-7methoxy-2-(4-nitrophenyl)-4*H*-chromen-4-one (6)



The compound **6** was demethylated by demethylation of compound (**5**) as described before.

Yield: 41%.

Aspect: Brown powder.

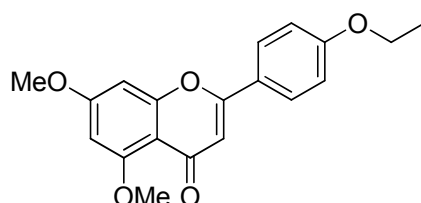
rf: 0.57 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

mp: > 310 °C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 3.90 (s, 3 H), 6.15 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 6.48 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H), 6.74 (s, 1 H), 8.10 (d, *J* = 8.9 Hz, 2 H), 8.29 (d, *J* = 8.9 Hz, 2 H).

EI-MS: *m/z* 311 [M-H]⁻.

2-(4-Ethoxyphenyl)-5,7-dimethoxy-4*H*-chromen-4-one (7)



The compound was obtained following the procedure 2 of flavones using 2',4',6'-trihydroxyacetophenone and 4-ethoxybenzaldehyde.

Yield: 85 %.

Aspect: Yellow powder.

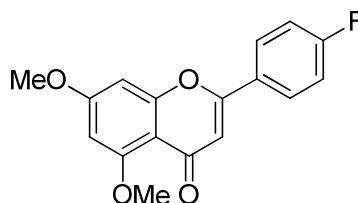
rf: 0.28 (ethyl acetate).

mp: 156°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.46 (t, *J* = 7.0 Hz, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 3.97 (s, 3 H), 4.12 (q, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 6.38 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H), 6.57 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H), 6.61 (s, 1 H), 6.99 (d, *J* = 8.9 Hz, 2 H), 7.77-7.87 (m, 2 H);.

EI-MS: *m/z* 349 [M+Na]⁺.

2-(4-Fluorophenyl)-5,7-dimethoxy-4*H*-chromen-4-one (8)



The compound was obtained following the procedure 2 of flavones using 2',4',6'-trihydroxyacetophenone and 4-fluorobenzaldehyde.

Yield: 35 %.

Aspect: Orange powder.

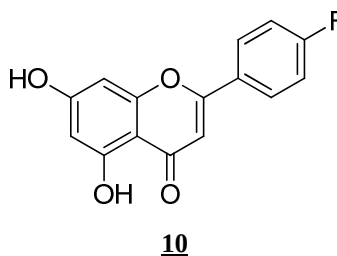
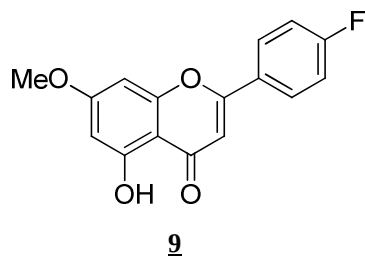
rf: 0.39 (ethyl acetate).

mp °C: 188 °C.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 3.75 (s, 3 H), 3.87 (s, 3 H), 6.48 (d, J = 2 Hz, 1 H), 6.74 (s, 1 H), 6.84 (d, J = 2.1 Hz, 1 H), 7.38 (dd, J = 15.8 Hz, 7.0 Hz, 2 H), 8.08 (dd, J = 8.7, 5.4 Hz, 2 H).

EI-MS: m/z 323 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2-(4-Fluorophenyl)-5-hydroxy-7-methoxy-4*H*-chromen-4-one (9) and 2-(4-fluorophenyl)-5,7-dihydroxy -4*H*-chromen-4-one (10).



The compound **7** was demethylated as described before. The residue was purified on preparative TLC with AcOEt (100%).

2-(4-Fluorophenyl)-5-hydroxy-7-methoxy-4*H*-chromen-4-one (9)

Yield: 2%.

Aspect: Yellow powder.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 3.94 (s, 3 H), 5.98 (s, 1 H), 6.12 (s, 1 H), 6.92 (s, 1 H), 7.14 (s, 1 H), 7.25 (s, 1 H), 7.80 (s, 2 H), 14.42 (s, 1 H).

EI-MS: m/z 287 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-(4-Fluorophenyl)-5,7-dihydroxy -4*H*-chromen-4-one 10:

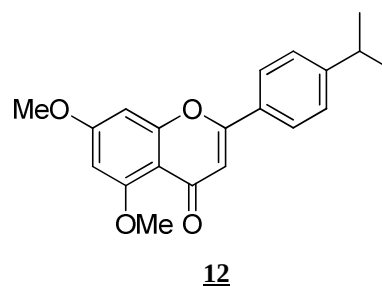
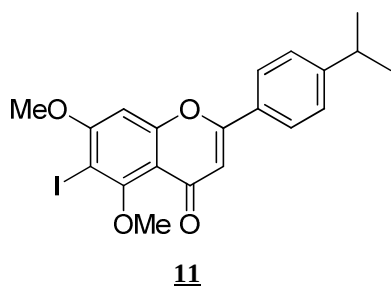
Yield: 3%.

Aspect: Yellow powder.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ 6.20 (s, 1 H), 6.49 (s, 1 H), 6.90 (s, 1 H), 7.56 (d, J = 8.3 Hz, 2 H), 7.96 (d, J = 8.3 Hz, 2 H), 10.89 (s, 1 H), 12.84 (s, 1 H).

EI-MS: m/z 270 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

6-Iodo-2-(4-isopropylphenyl)-5,7-dimethoxy-4H-chromen-4-one (11) and 2-(4-isopropylphenyl)-5,7-dimethoxy-4H-chromen-4-one (12)



The compound was obtained following the procedure 2 of flavones using 2',4',6'-trihydroxyacetophenone and 4-isopropylbenzaldehyde. The residue was purified by column chromatography eluting with a gradient that starts at cyclohexane (100%) and finally MeOH (100%) to provide compound **10** and compound **11**.

6-Iodo-2-(4-isopropylphenyl)-5,7-dimethoxy-4H-chromen-4-one (11)

Yield: 10% .

Aspect: Orange crystals.

rf: 0.24 (ethyl acetate).

mp: 186°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.29 (s, 3 H), 1.31 (s, 3 H), 2.93-3.06 (m, 1 H), 3.93 (s, 3 H), 3.97 (s, 3 H), 6.39 (d, J = 2.2 Hz, 1 H), 6.58 (d, J = 2.3 Hz, 1 H), 6.67 (s, 1H), 7.36 (d, J = 8.5 Hz, 2 H), 7.81 (d, J = 8.3 Hz, 2 H).

EI-MS: m/z 451[M+H]⁺.

2-(4-Isopropylphenyl)-5,7-dimethoxy-4H-chromen-4-one (12)

Yield: 10 %.

Aspect: Red crystals.

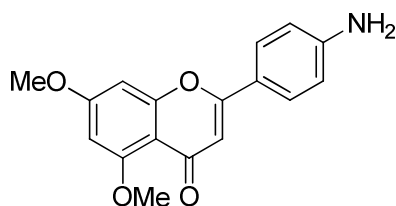
rf: 0.36 (ethyl acetate).

mp: 158°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.26 (s, 3 H), 1.28 (s, 3 H), 2.96-3.03 (m, 1 H), 3.95 (s, 3 H), 4.06 (s, 3 H), 6.63 (s, 1 H), 6.74 (s, 1 H), 7.45 (d, J = 8.4 Hz, 2 H), 8.10 (d, J = 8.5 Hz, 2 H).

EI-MS: m/z 347 [M+Na]⁺.

2-(4-Aminophenyl)-5,7-dimethoxy-4H-chromen-4-one (13).



A solution of compound **5** (3 g, 9.2 mmol) in HCl (12N) was treated with Tin(II) chloride (6.21 g, 28 mmol). The mixture was stirred at 100°C for 3 hours and the reaction mixture was cooled to room temperature, basified by NaHCO₃ pH ~ 14, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, dried over sodium sulfate, and evaporated.

Yield: 50%.

Aspect: Orange powder.

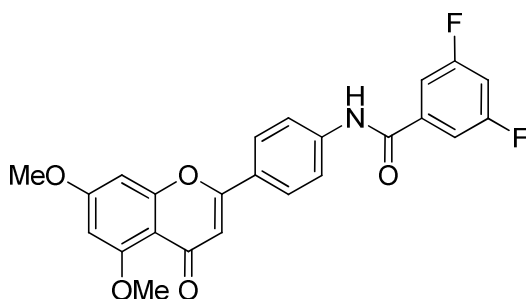
rf: 0.35 (cyclohexane : ethyl acetate, 3 : 7).

mp: 216°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.89 (s, 3 H), 3.93 (s, 3 H), 5.30 (s, 2 H), 6.26 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 6.53-6.54 (m, 2 H), 6.69-6.77 (m, 2 H), 7.63-7.71 (m, 2 H).

EI-MS: *m/z* 298 [M+H]⁺.

***N*-(4-(5,7-Dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)phenyl)-3,5-difluorobenzamide (14).**



A mixture of **13** (1 equiv.), 3,5-difluorobenzoyl chloride (1 equiv.) and triethylamine (1 equiv.) in CH₂Cl₂ was stirred at room temperature for 15 hours. The mixture was extracted with CH₂Cl₂ and washed successively with HCl (2 N), saturated solution of NaHCO₃ and water. The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated. The residue was dissolved in diethylether:MeOH (99.9 : 0.1) and the precipitate was filtered to give compound **14**.

Yield: 78 %.

Aspect: Yellow powder.

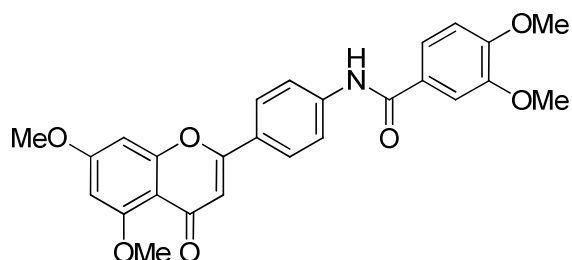
rf: 0.56 (cyclohexane : ethyl acetate, 3 : 7).

mp: 267°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.94 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 6.15 (s, 1 H), 6.42 (s, 1 H), 6.77 (s, 1 H), 7.06 (m, 1 H), 7.43 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H), 7.62 (d, *J* = 5.6 Hz, 1 H), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H).

EI-MS: *m/z* 438 [M+H]⁺.

***N*-(4-(5,7-Dimethoxy-4-oxo-4*H*-chromen-2-yl)phenyl)-3,4-dimethoxybenzamide (15)**



The compound was obtained by the same procedure as for the compound **14** with 3,4-dimethoxybenzoyl chloride.

Yield: 71%.

Aspect: Yellow powder.

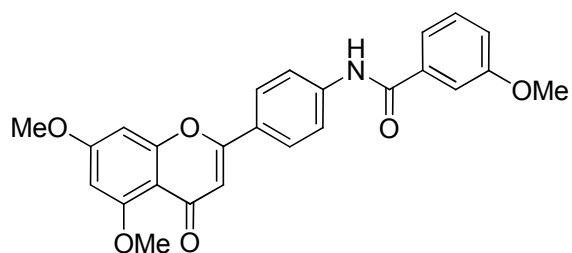
rf: 0.26 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

mp: 152°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.95 (m, 12 H), 6.14 (d, *J* = 1.5 Hz, 1 H), 6.42 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H), 6.77 (s, 1 H), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.43 (dd, *J* = 8.3, 1.7 Hz, 1 H), 7.53 (d, *J* = 1.7 Hz, 1 H), 7.75 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 7.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 8.00 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 462 [M+H]⁺.

***N*-(4-(5,7-Dimethoxy-4-oxo-4*H*-chromen-2-yl)phenyl)-3-methoxybenzamide (16)**



The compound was obtained by the same procedure as for the compound **14** with 3-methoxybenzoyl chloride.

Yield: 65%.

Aspect: Yellow powder.

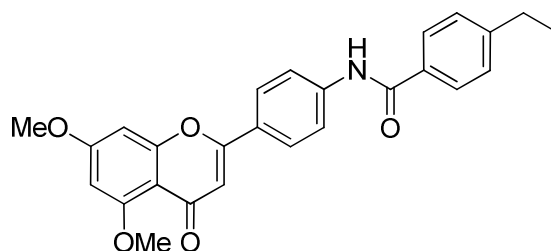
rf: 0.7 (ethyl acetate).

mp: 227°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.90 (s, 3 H), 3.94 (s, 3 H), 3.97 (s, 3 H), 6.16 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H), 6.43 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H), 6.78 (s, 1 H), 7.09-7.15 (m, 1 H), 7.42-7.43 (m, 2 H), 7.47 (d, *J* = 1.1 Hz, 1 H), 7.74-7.77 (m, 2 H), 7.90-7.94 (m, 3 H).

EI-MS: *m/z* 454 [M+Na]⁺.

***N*-(4-(5,7-Dimethoxy-4-oxo-4*H*-chromen-2-yl)phenyl)-4-ethylbenzamide (17)**



The compound was obtained by the same procedure as for the compound **14** with 4-ethylbenzoyl chloride.

Yield: 52%.

Aspect: Yellow powder.

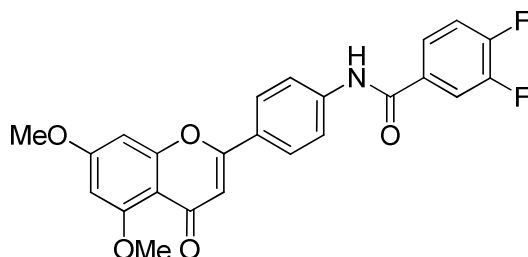
rf: 0.73 (ethyl acetate).

mp: 219°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.29 (m, 3 H), 2.74 (q, *J* = 7.6 Hz, 2 H), 3.94 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 6.15 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H), 6.42 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H), 6.77 (s, 1 H), 7.31-7.40 (m, 2 H), 7.74-7.78 (m, 2 H), 7.82-7.84 (m, 2 H), 7.90-7.88 (s, 2 H), 7.98 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 452 [M+Na]⁺.

***N*-(4-(5,7-Dimethoxy-4-oxo-4*H*-chromen-2-yl)phenyl)-3,4-difluorobenzamide (18)**



The compound was obtained by the same procedure as for the compound **14** with 3,4-difluorobenzoyl chloride.

Yield: 51%.

Aspect: Yellow powder.

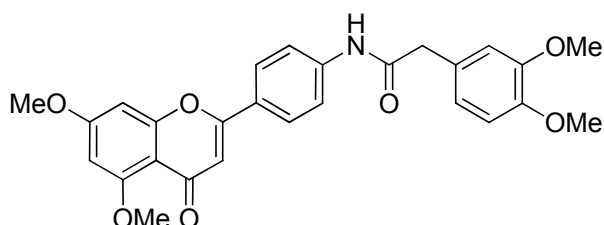
rf: 0.73 (ethyl acetate).

mp: 283°C.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.94 (s, 3 H), 3.97 (s, 3 H), 6.16 (d, J = 1.5 Hz, 1 H), 6.43 (d, J = 1.5 Hz, 1 H), 6.77 (s, 1 H), 7.76-7.83 (m, 5 H), 7.88-7.94 (m, 3 H).

EI-MS: m/z 540 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

***N*-(4-(5,7-Dimethoxy-4-oxo-4*H*-chromen-2-yl)phenyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide (19)**



The compound was obtained by the same procedure as for the compound **14** with (3,4-dimethoxyphenyl)acetyl chloride.

Yield: 65%.

Aspect: Yellow powder.

rf: 0.59 (ethyl acetate).

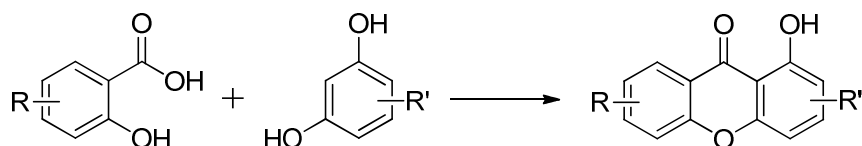
mp: 212°C.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 3.72 (s, 2 H), 3.90-3.93 (m, 12 H), 6.13 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 6.30 (d, J = 1.6 Hz, 1 H), 6.72 (s, 1 H), 6.86-6.90 (m, 3 H), 7.46 (s, 1 H), 7.50-7.60 (m, 2 H), 7.80 (d, J = 8.6 Hz, 2 H).

EI-MS: m/z 498 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Synthesis of Xanthone Derivatives

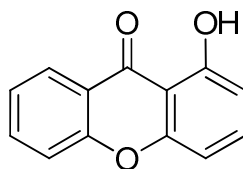
General procedure for the synthesis of xanthone derivatives:



Phosphorus pentoxide (1.6 equiv.) was dissolved in methanesulfonic acid (15 equiv.) and the mixture was stirred at 100 °C for 30 min. Phloroglucinol or resorcinol derivatives (1 equiv.) and 2-hydroxybenzoic acid derivatives (1 equiv.) were added and the mixture was maintained at 100 °C for 15 min. After cooling to room temperature, the reaction mixture was poured

onto crushed ice. After complete precipitation, the precipitate was filtered, washed with water and dried to obtain xanthone derivative.

1-Hydroxy-9H-xanthen-9-one (20)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using 2-hydroxybenzoic acid and resorcinol.

Yield: 45 %

Aspect: Yellow powder

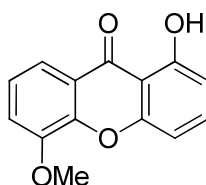
mp: 146 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 6.82 (dd, *J* = 8.4 and 0.8 Hz, 1 H), 6.95 (dd, *J* = 8.4 and 1.2 Hz, 1 H), 7.40-7.44 (m, 1 H), 7.48-7.51 (m, 1 H), 7.59-7.64 (m, 1 H) 7.76-7.80 (m, 1 H), 8.30 (dd, *J* = 8.0 and 1.6 Hz, 1 H).

EI-MS: *m/z* 212 [M]⁺.

Anal. Calc. for C₁₃H₈O₃: C, 73.58; H, 3.80. Found: C, 73.46; H, 3.53.

1-Hydroxy-5-methoxy-9H-xanthen-9-one (21)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using 2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid and resorcinol.

Yield: 50 %.

Aspect: Yellow needles.

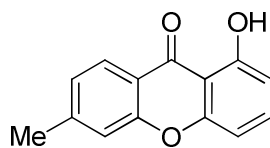
mp: 210 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 4.05 (s, 3 H), 6.83 (dd, *J* = 8.3 and 0.9 Hz, 1 H), 7.07 (dd, *J* = 8.4 and 0.9 Hz, 1 H), 7.24-7.54 (m, 2 H), 7.62 (t, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.85 (dd, *J* = 7.9 and 1.7 Hz, 1H), 12.65 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 242 [M]⁺.

Anal. Calc. for C₁₄H₁₀O₄: C, 69.42; H, 4.16. Found: C, 69.12; H, 3.96.

1-Hydroxy-6-methyl-9H-xanthen-9-one (22)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using 2-hydroxy-4-methylbenzoic acid and resorcinol.

Yield: 47 %

Aspect: Yellow powder

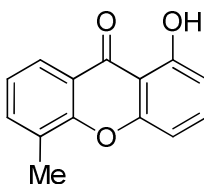
mp: 178 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 2.54 (s, 3 H), 6.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 6.93 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.22-7.25 (m, 2 H), 7.59 (t, 1 H), 8.16 (d, *J* = 8 Hz, 1 H), 12.74 (s, 1H).

EI-MS: *m/z* 226 [M]⁺.

Anal. Calc. for C₁₄H₁₀O₃: C, 74.33; H, 4.46 Found: C, 74.11; H, 4.14.

1-Hydroxy-5-methyl-9H-xanthen-9-one (23)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using 2-hydroxy-3-methylbenzoic acid and resorcinol.

Yield: 40 %.

Aspect: Yellow powder.

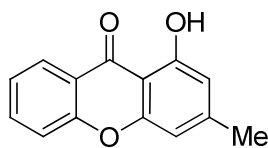
mp: 146 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 2.56 (s, 3 H), 6.81 (dd, *J* = 8.2 and 0.9 Hz, 1 H), 6.98 (dd, *J* = 8.4 and 0.9 Hz, 1H), 6.99-7.30 (m, 1 H), 7.56-7.73 (m, 2 H), 8.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 12.72 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 226 [M]⁺.

Anal. Calc. for C₁₄H₁₀O₃: C, 74.33; H, 4.46. Found: C, 74.02; H, 3.96.

1-Hydroxy-3-methyl-9H-xanthen-9-one (24)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using 2-hydroxybenzoic acid and 5-methylresorcinol.

Yield: 28 %.

Aspect: Yellow powder.

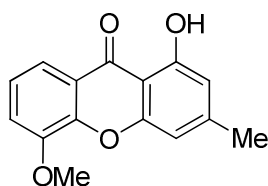
mp: 142 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 2.45 (s, 3 H), 6.61-6.72 (m, 1 H), 6.73-6.89 (m, 1 H), 7.35- 7.65 (m, 2 H), 7.39-7.75 (m, 1 H), 8.27 (dd, *J* = 8.0 and 1.7 Hz, 1 H), 12.58 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 226 [M]⁺.

Anal. Calc. for C₁₄H₁₀O₃: C, 74.33; H, 4.46. Found: C, 74.13; H, 4.18.

1-Hydroxy-5-methoxy-3-methyl -9H-xanthen-9-one (25)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using 2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid and 5-methylresorcinol.

Yield: 10 %.

Aspect: Yellow powder.

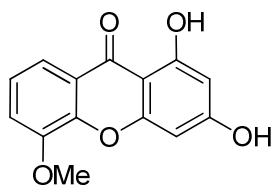
mp: 192°C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 2.44 (s, 3 H), 4.04 (s, 3 H), 6.64-6.66 (m, 1 H), 6.88-6.91(m, 1 H), 7.24-7.32 (m, 2 H), 7.81-7.83 (m, 1 H), 13.55 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 256 [M]⁺.

Anal. Calc. for C₁₄H₁₀O₄: C, 69.42; H, 4.16. Found: C, 69.21; H, 4.07.

1,3-Dihydroxy-5-methoxy-9H-xanthen-9-one (26)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using 2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid and phloroglucinol.

Yield: 40 %.

Aspect: Yellow powder.

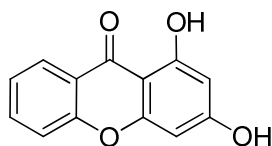
mp: 248°C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 2.50 (s, 3 H), 3.97 (s, 1 H), 6.22 (s, 1 H), 6.41 (s, 1 H), 7.39 (s, 1 H), 7.49 (s, 1 H), 7.65 (s, 1 H), 11.11 (s, 1 H), 12.81 (s, 1 H).

EI-MS: m/z 258 [M]⁺.

Anal. Calc. for C₁₄H₁₀O₅: C, 65.12; H, 3.90. Found: C, 65.0; H, 3.77.

1,3-Dihydroxy-9H-xanthen-9-one (27)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using phloroglucinol and salicylic acid.

Yield: 66%.

Aspect: White powder.

rf: 0.43 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

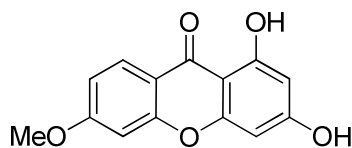
mp: 242°C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 6.20 (d, J = 2.0 Hz, 1 H), 6.39 (d, J = 2.0 Hz, 1 H), 7.46 (dd, J = 14.2 and 6.8 Hz, 1 H), 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 8.02-7.77 (m, 1 H), 8.11 (dd, J = 7.9 and 1.4 Hz, 1 H), 11.10 (s, 1 H), 12.80 (s, 1 H).

EI-MS: m/z 228 [M]⁺.

Anal. Calc. for C₁₃H₈O₄: C, 68.42; H, 3.53. Found: C, 68.21; H, 3.37.

1,3-Dihydroxy-6-methoxy-9H-xanthen-9-one (28)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using phloroglucinol and 2-hydroxy-4-methoxybenzoic acid.

Yield: 95%.

Aspect: Orange powder.

rf: 0.75 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

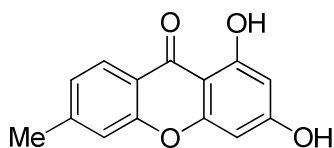
mp: 268°C.

¹H NMR (Acetone-*d*₆): δ 3.96 (s, 3 H), 6.22 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.04-6.95 (m, 2 H), 8.10-8.02 (m, 1 H).

EI-MS: *m/z* 258 [M]⁺.

Anal. Calc. for C₁₄H₁₀O₅: C, 65.12; H, 3.90. Found: C, 64.98; H, 3.81.

1,3-Dihydroxy-6-methyl-9H-xanthen-9-one (29)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using phloroglucinol and 2-hydroxy-4-methylbenzoic acid.

Yield: 25%.

Aspect: Beige powder.

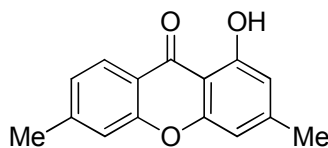
mp: 306°C.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 2.48 (s, 3 H), 6.19 (s, 1 H), 6.36 (s, 1 H), 7.26 (d, *J* = 4.7 Hz, 1 H), 7.37 (s, 1 H), 7.97 (d, *J* = 4.2 Hz, 1 H), 11.05 (s, 1 H), 12.87 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 242 [M]⁺.

Anal. Calc. for C₁₄H₁₀O₄: C, 69.42; H, 4.16. Found: C, 69.22; H, 3.99.

1-Hydroxy-3,6-dimethyl-9H-xanthen-9-one (30)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using 5-methylresorcinol and 2-hydroxy-4-methylbenzoic acid.

Yield: 22%.

Aspect: Yellow powder.

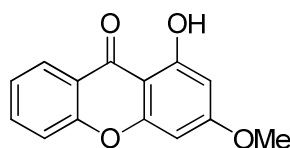
mp: 147°C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 2.44 (s, 3 H), 2.52 (s, 3 H), 6.62-6.63 (m, 1 H), 6.73-6.74 (m, 1 H), 7.18-7.25 (m, 2 H), 8.14 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 12.65 (s, 1 H).

EI-MS: m/z 240 [M]⁺.

Anal. Calc. for C₁₅H₁₂O₃: C, 74.99; H, 5.03. Found: C, 74.83; H, 4.81.

1-Hydroxy-3-methoxy-9H-xanthen-9-one (31)



A mixture of **27** (0.5 g, 2.19 mmol) and dimethyl sulfate (0.207 mL, 2.19 mmol) was treated with potassium carbonate in acetone and stirred at 100 °C for 24 h. The reaction mixture was cooled to room temperature, solvent was evaporated, water was added and the resulting precipitate was filtered, washed with water and dried over sodium sulfate to give **31**.

Yield: 53%.

Aspect: Brown powder.

rf: 0.63 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

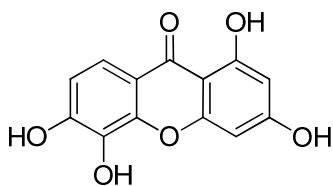
mp: 143°C.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3.91 (s, 3 H), 6.37 (d, J = 2.0 Hz, 1 H), 6.45 (d, J = 2.0 Hz, 1 H), 7.56-7.32 (m, 2 H), 7.73 (t, 1 H), 8.26 (d, J = 7.9 Hz, 1 H), 12.89 (s, 1H).

ESI-MS: m/z 243 [M+H]⁺.

Anal. Calc. for C₁₄H₁₀O₄: C, 69.42; H, 4.16. Found: C, 69.17; H, 3.86.

1,3,5,6-Tetrahydroxy-9H-xanthen-9-one (32)



The compound was obtained following the general procedure of xanthone using phloroglucinol and 2,3,4-trihydroxybenzoic acid.

Yield: 98%.

Aspect: Orange powder.

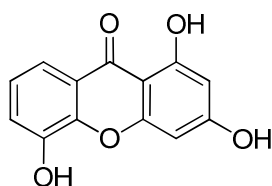
rf: 0.24 (cyclohexane : ethyl acetate, 3 : 7).

mp: 303°C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 6.13 (s, 1 H), 6.37 (s, 1 H), 6.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.45 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 9.63 (s, 1 H).

ESI-MS: *m/z* 261 [M+H]⁺.

1,3,5-Trihydroxy-9H-xanthen-9-one (33)



A mixture of **26** (0.05 g, 0.19 mmol) and BBr₃ (0.326 mL, 1.9 mmol) in dichloromethane was stirred at room temperature for 24 h. The reaction mixture was poured onto crushed ice, and then extracted with dichloromethane. The resulting organic layer was washed with water, dried over sodium sulfate and the solvent was evaporated to yield the desired product.

Yield: 56%.

Aspect: Dark beige powder.

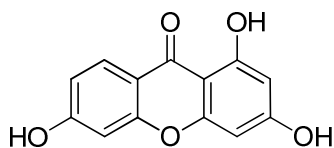
rf: 0.73 (ethyl acetate).

mp: 302°C.

¹H NMR (CD₃OD): δ 4.59 (s, 1 H), 4.83 (s, 1 H), 5.75-5.49 (m, 2 H), 6.00 (d, *J* = 7.4 Hz, 1 H), 8.49 (s, 1 H), 9.01 (s, 1 H), 11.23 (s, 1 H).

ESI-MS: *m/z* 245 [M+H]⁺.

1,3,6-Trihydroxy-9H-xanthen-9-one (34)



The compound was obtained following the same procedure applied for the synthesis of **33**.

Yield: 24%.

Aspect: Dark beige powder.

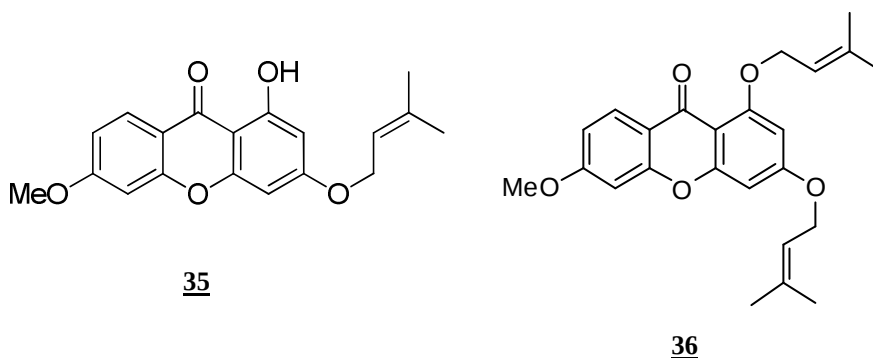
rf: 0.77 (ethyl acetate).

mp: 301°C.

¹H NMR (CD₃OD): δ 6.14 (s, 1 H), 6.29 (s, 1 H), 6.75 (s, 1 H), 6.83 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.99 (d, J = 8 Hz, 1 H).

ESI-MS: m/z 244 [M+H]⁺.

1-Hydroxy-6-methoxy-3-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-9H-xanthen-9-one (35) and 6-methoxy-1,3-bis((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-9H-xanthen-9-one (36)



A mixture of **28** (0.2 g, 0.78 mmol) and 3,3-dimethyl allyl bromide (0.207 mL, 2.19 mmol) was treated with potassium carbonate (0.409 g, 2.9 mmol) in acetone and stirred at 100 °C for 24 h. The reaction mixture was cooled to room temperature and the solvent was evaporated. The residue was purified by column chromatography eluted with a gradient of cyclohexane/CH₂Cl₂ (5 : 5) to CH₂Cl₂ to give compound **35** followed by compound **36**.

1-Hydroxy-6-methoxy-3-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-9H-xanthen-9-one (35)

Yield: 11%.

Aspect: Amorphous yellow solid.

rf: 0.63 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

mp: 104 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.78 (s, 3 H), 1.83 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 4.59 (d, *J* = 6.7 Hz, 2 H), 5.48-5.51 (m, 1 H), 6.33 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.38 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.91 (dd, *J* = 8.9 and 2.3 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H).

ESI-MS: *m/z* 327 [M+H]⁺.

6-Methoxy-1,3-bis((3methylbut-2-en-1-yl)oxy)-9H-xanthen-9-one (36)

Yield: 31 %.

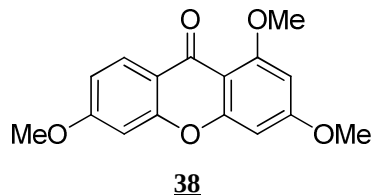
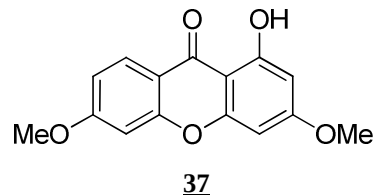
Aspect: Yellow oil.

rf: 0.37 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 :3).

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.75-1.83 (m, 12 H), 3.88 (s, 3 H), 4.58 (d, *J* = 6.7 Hz, 2 H), 4.65 (d, *J* = 6.3 Hz, 2 H), 5.49-5.53 (m, 1 H), 5.62-5.65 (m, 1 H), 6.34 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H), 6.44 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.75 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H), 6.86 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1 H), 8.18 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H).

ESI-MS: *m/z* 395 [M+H]⁺.

1-Hydroxy-3,6-dimethoxy-9H-xanthen-9-one (37) and 1,3,6-trimethoxy-9H-xanthen-9-one (38)



A mixture of **28** (0.30 g, 1.2 mmol) and dimethyl sulfate (0.113 mL, 1.2 mmol) and potassium carbonate (0.48 g, 3.5 mmol) in acetone was stirred at 55 °C for 18 h. After the reaction mixture was cooled to room temperature, solvent was evaporated, water was added and the resulting precipitate was filtered, washed with water and dried. The residue was purified by column chromatography eluting with CH₂Cl₂ to provide compound **37** and compound **38**.

1-Hydroxy-3,6-dimethoxy-9H-xanthen-9-one (37)

Yield: 19%.

Aspect: Orange powder.

rf: 0.80 (DCM).

mp: 88°C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.89 (s, 3 H), 3.94 (s, 3 H), 6.35 (s, 1 H), 6.41 (s, 1 H), 6.84 (s, 1 H), 6.94 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H), 8.15 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 12.96 (s, 1H).

ESI-MS: *m/z* 273 [M + H]⁺.

Anal. Calc. for C₁₅H₁₂O₅: C, 66.18; H, 4.45. Found: C, 66.24; H, 4.42.

1,3,6-Trimethoxy-9H-xanthen-9-one (38)

Yield: 31 %

Aspect: Beige powder

rf: 0.20 (DCM).

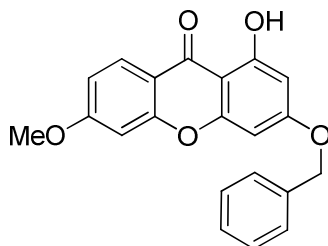
mp: 181 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.88 (s, 6 H), 3.97 (s, 3 H), 6.33 (s, 1 H), 6.46 (s, 1 H), 6.77 (s, 1 H), 6.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H), 8.19 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H).

ESI-MS: *m/z* 287 [M+H]⁺.

Anal. Calc. for C₁₆H₁₄O₅ :1.5 H₂O: C, 61.34; H, 4.50. Found: C, 61.83; H, 5.47.

3-Benzyloxy-1-hydroxy-6-methoxy-9H-xanthen-9-one (39)



A mixture of **28** (0.500 g, 1.9 mmol) and benzyl bromide (0.226 mL, 1.9 mmol) and potassium carbonate (0.802 g, 5.8 mmol) in acetone was stirred at 100 °C for 24 hours. After the reaction mixture was cooled to room temperature, solvent was evaporated, water was added and the solution was extracted with dichloromethane. The resulting organic layer was washed with water, dried over sodium sulfate, and the solvent was evaporated to provide xanthone **39**.

Yield: 17 %.

Aspect: Orange powder.

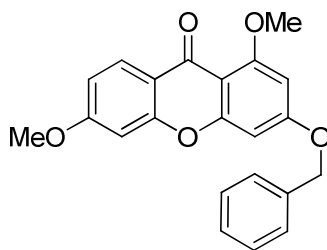
rf: 0.13 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

mp: 160 °C.

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.93 (s, 3H), 5.15 (s, 2 H), 6.43 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H), 6.47 (d, *J* = 2,3 Hz, 1 H), 6.83 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H), 6.94 (dd, *J* = 8.9 and 2.4 Hz, 1H), 7.33-7.51 (m, 6 H), 8.15 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H), 13.00 (s, 1 H).

ESI-MS: m/z 349 $[M+H]^+$.

3-Benzoyloxy-1,6-dimethoxy-9H-xanthen-9-one (40)



A mixture of **39** (0.4 g, 1.1 mmol) and dimethyl sulfate (0.104 mL, 1.1 mmol) and potassium carbonate (0.476 g, 3.4 mmol) in acetone was stirred at reflux for 24 hours. After the reaction mixture was cooled to room temperature, solvent was evaporated, water was added and the solution was extracted with dichloromethane. The resulting organic layer was washed with water, dried over sodium sulfate, and the solvent was evaporated to give derivative **40**.

Yield: 85 %.

Aspect: Orange powder.

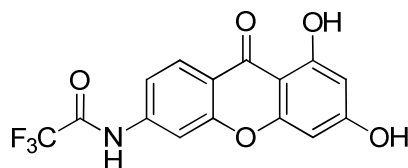
mp: 149 °C.

^1H NMR (CDCl_3): δ 3.88 (s, 3 H), 3.95 (s, 3 H), 5.13 (s, 2 H), 6.41 (d, J = 2.2 Hz, 1 H), 6.54-6.49 (m, 1 H), 6.74 (d, J = 2.3 Hz, 1 H), 6.84-6.91 (m, 1 H), 7.33-7.49 (m, 6 H), 8.19 (d, J = 8.9 Hz, 1 H).

ESI-MS: m/z 363 $[M+H]^+$.

Anal. Calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_5$: C, 72.92; H, 5.01. Found: C, 71.03; H, 5.07.

N-(6,8-Dihydroxy-9-oxo-9H-xanthen-3-yl)-2,2,2-trifluoroacetamide (41)



The compound was obtained following the general procedure of xanthenes using phloroglucinol and 2-hydroxy-4-(2,2,2-trifluoroacetamido)benzoic acid. The later was obtained by condensation between the trifluoroacetic anhydride and the anthranilic acid. The product was further purified by column chromatography eluting with $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (3:7) to give compound **41**.

Yield: 35 %.

Aspect: Yellow powder.

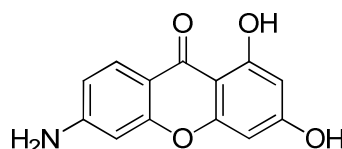
rf: 0.89 (DCM : ethyl acetate, 1 : 9).

mp: 307°C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 6.17 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H), 6.37 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.64 (dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz, 1 H), 7.93 (d, *J* = 1.7 Hz, 1 H), 8.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H), 12.75 (s, 1 H).

ESI-MS: *m/z* 340 [M+H]⁺.

6-Amino-1,3-dihydroxy-9H-xanthen-9-one (42)



A mixture of **41** (0.400 g, 1.2 mmol), and potassium carbonate (0.168 g, 1.2 mmol) in MeOH was stirred at room temperature for 15 hours. The solvent was evaporated, water was added, the solution was neutralized and extracted with EtOAc. The resulting organic layer was washed with water, dried over sodium sulfate, and the solvent was evaporated to give compound **42**.

Yield: 57 %.

Aspect: Light yellow powder

rf: 0.78 (DCM : ethyl acetate, 1 : 9).

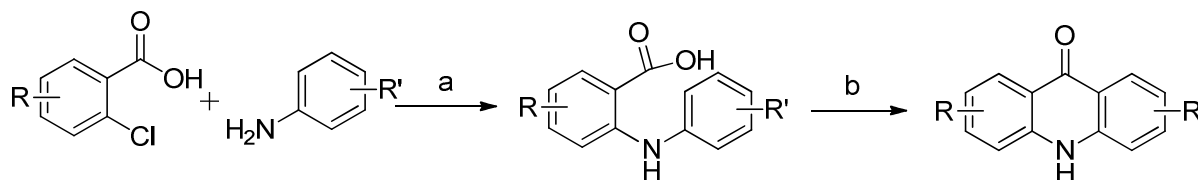
mp: 318°C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 6.08 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 6.25 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 6.42 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 6.48-6.71 (m, 2 H), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H), 10.74 (s, 2 H), 13.34 (s, 1 H).

ESI-MS: *m/z* 244 [M+H]⁺.

Synthesis of acridones (azaxanthenes) derivatives

General procedure

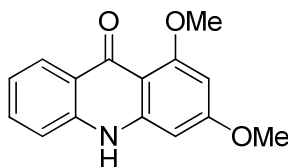


- a) A mixture of 2-chlorobenzoic acid derivative (1 equiv.), aniline derivative (1 equiv.) and potassium carbonate (1 equiv.) in isoamyl alcohol (9 equiv.) was stirred at 160°C for 10 hours. The solvent was evaporated and the residue is taken up with hot water and acidified by HCl

(12N). The precipitate is filtered and washed with hot water and dissolved in EtOAc. The organic layer is dried over sodium sulfate and filtered on a column of silica to fade. The intermediate was obtained and used without further purification.

- b) Phosphorus pentoxide (4 equiv.) was dissolved in phosphoric acid (9 equiv.) and stirred under nitrogen at 110 °C for 1 hour. The intermediate (1 equiv.) obtained was added and the mixture was maintained at 110 °C for 3 hours. After cooling to room temperature, the reaction mixture was poured onto crushed ice and basified with sodium hydroxide 3N. The precipitate is filtered and washed with water and recrystallized with a mixture of water/methanol.

1,3-Dimethoxy-9(10*H*)-acridone (43)



The compound was obtained following the general procedure of acridones using 2-chlorobenzoic acid derivatives and 3,5-dimethoxyaniline.

Yield: 53 %.

Aspect: Beige powder.

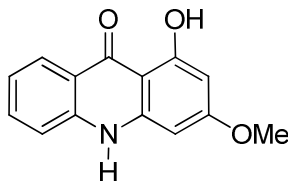
mp: 260°C; mp (H₂O:CH₃OH) 259-261 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3,82 (s, 3 H), 3,86 (s, 3 H), 6,24 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 6,45 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7,16 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7,37 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7,60 (t, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 8,08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 11,36 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 255 [M]⁺.

Anal. Calc for C₁₅H₁₃NO₃: C, 70.58 ; H, 5.13 ; N, 5.49. Found: C, 70.49; H, 5.01; N, 5.39.

1-Hydroxy-3-methoxy-9(10*H*)-acridone (44)



A mixture of (43) (0.45 g, 1.76 mmol) and boron tribromide (4.50 mL, 26.4 mmol) in dichloromethane was stirred at room temperature for 24 h. The reaction mixture was poured onto crushed ice, and then extracted with dichloromethane. The resulting organic layer was washed with water, dried over sodium sulfate, and the solvent was evaporated.

Yield: 50 %.

Aspect: Yellow powder.

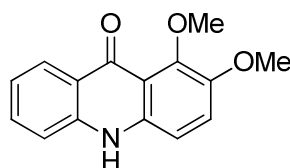
mp: 233-235 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.85 (s, 3 H), 6.16 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 6.38 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 7.29 (dt, *J* = 7.2 and 0.8 Hz, 1 H), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.74 (dt, *J* = 7.2 and 1.6 Hz, 1 H), 8.17 (dd, *J* = 8.0 and 1.2 Hz, 1 H), 11.97 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 241 [M]⁺.

Anal. Calc for C₁₄H₁₁NO₃: C, 69.70; H, 4.60; N, 5.81. Found: C, 69.66; H, 4.52; N, 5.77.

1,2-Dimethoxy-9(10*H*)-acridone (45)



The compound was obtained following the general procedure of acridones using 2-chlorobenzoic acid derivatives and 3,4-dimethoxyaniline.

Yield: 40%.

Aspect: yellow powder.

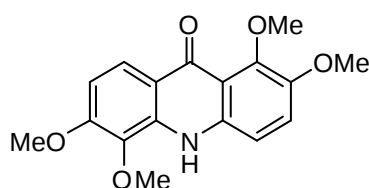
mp: > 270 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 3.85 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 6.97 (s, 1 H), 7.21 (t, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.57 (s, 1 H), 7.66 (t, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 8.20 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H).

EI-MS: *m/z* 255 [M]⁺.

Anal. Calc for C₁₅H₁₃NO₃: C, 70.58; H, 5.13; N, 5.49. Found: C, 70.56; H, 5.07; N, 5.42.

1,2-Dimethoxy-9(10*H*)-acridone (46)



The compound was obtained following the general procedure of acridones using 2-chloro-3,4-dimethoxybenzoic acid derivatives and 3,4-dimethoxyaniline.

Yield: 40%

Aspect: Yellow-green powder

mp: > 270 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ

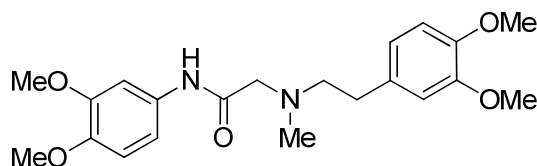
EI-MS: *m/z* 316 [M+H]⁺.

Synthesis of verapamil derivatives

General procedure for the synthesis of verapamil derivatives

- a) 3,4-Dimethoxyaniline or 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-*N*-methylethanamine (1 equiv) was dissolved in CH₂Cl₂ cooled in ice, then chloroacetyl chloride (1.35 equiv.) and triethylamine (1.1 equiv.) were added. The mixture was stirred at room temperature for 1.5 hour. The reaction mixture was extracted with CH₂Cl₂, washed successively with HCl (0.5N), saturated NaHCO₃ and water. The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated.
- b) The obtained residue was dissolved in acetonitrile and 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-*N*-methylethanamine or 3,4-dimethoxyaniline (1 equiv.) and triethylamine (1.1 equiv) were added. The mixture was stirred at reflux for 15 hours. The solvent was evaporated and the residue was dissolved in water, pH is adjusted to 7, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, dried over sodium sulfate and evaporated.

2-((3,4-Dimethoxyphenethyl)(methyl)amino)-*N*-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide (47)



The compound was obtained following the procedure of verapamil derivatives using in a) 3,4-dimethoxyaniline and chloroacetyl chloride and in b) 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-*N*-methylethanamine.

Yield: 26%.

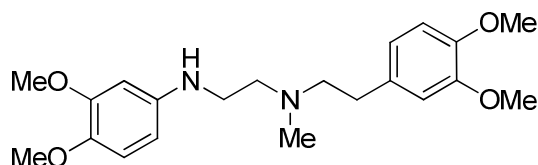
Aspect: Yellow oil.

rf: 0.53 (ethyl acetate).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.44 (s, 3 H), 2.79-2.78 (m, 4 H), 3.16 (s, 2 H), 3.81 (s, 3 H), 3.84 (s, 3 H), 3.86 (s, 3 H), 3.88 (s, 3 H), 6.62 (dd, *J* = 2.4, 8.6 Hz, 1 H), 6.72-6.78 (m, 4 H), 7.27-7.28 (m, 1 H), 8.71 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 388 [M+H].

***N*¹-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-*N*²-(3,4-dimethoxyphenyl)-*N*¹-methylethane-1,2-diamine (48)**



A mixture of compound (47) (0.65 g, 1.7 mmol) in anhydrous THF and LiAlH₄ (0.193g, 5.1 mmol) was stirred at reflux for 16 hours. After cooling, the reaction mixture was mixed with ice and a solution of NaOH (10 N) was added until slightly basic pH . The mixture was extracted with diethyl ether. The organic layer was washed with water, filtered over celite, dried over sodium sulfate and evaporated.

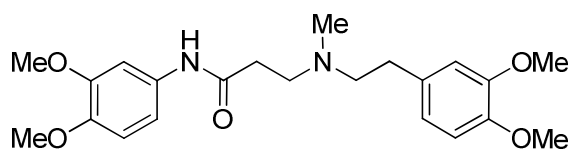
Yield: 64%.

Aspect: Yellow oil.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.33 (s, 3 H), 2.55 (t, *J* = 6.7 Hz, 1 H), 2.60-2.64 (m, 2 H), 2.73-2.77 (m, 2 H), 3.13 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H), 3.79 (s, 3 H), 3.83 (s, 6 H), 3.85 (s, 3 H), 6.11 (dd, *J* = 2.4, 8.5 Hz, 1 H), 6.21 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H), 6.66-6.84 (m, 4 H).

EI-MS: *m/z* 375 [M+H].

3-((3,4-Dimethoxyphenethyl)(methyl)amino)-*N*-(3,4-dimethoxyphenyl)propanamide (49)



The compound was obtained following the procedure of verapamil derivatives using in a) 3,4-dimethoxyaniline and 3-chloropropionyl chloride and in b) 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-*N*-methylethanamine. The obtain residue was purified by column chromatography eluted with a gradient of 100 % EtOAc to EtOAc/MeOH (7:3) to give compound 49

Yield: 40%.

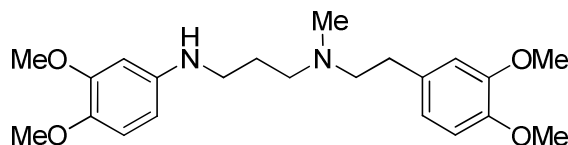
Aspect: Yellow oil.

rf: 0,43 (ethyl acetate : methanol : H₂O, 80 : 15 : 5).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.37 (s, 3 H), 2.44-2.47 (m, 2 H), 2.70-2.78 (m, 6 H), 3.69-3.95 (m, 12 H), 6.44 (dd, *J* = 2.1, 8.6 Hz, 1 H), 6.64-6.75 (m, 4 H), 7.36 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H), 10.42 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 403 [M+H].

***N*¹-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-*N*³-(3,4-dimethoxyphenyl)-*N*¹-methylpropane-1,3-diamine (50).**



The compound was obtained by the same procedure as for the compound (48) from compound (49). The obtain residue was purified by column chromatography eluted with a gradient of 100 % EtOAc to EtOAc/MeOH (7 : 3) to give compound (50).

Yield: 40 %.

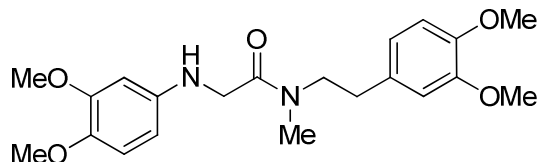
Aspect: Brown oil.

rf: 0,5 (ethyl acetate : methanol, 95 : 5).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.31 (s, 3 H), 2.65-2.69 (m, 4 H), 2.73-2.77 (m, 2 H), 3.09 (t, *J* = 5,7 Hz, 2 H), 3.80-3.88 (m, 14 H), 6,10 (dd, *J* = 2,5, 8,5 Hz, 1 H), 6,19 (d, *J* = 2,4 Hz, 1 H), 6,73-6.80 (m, 4 H).

EI-MS: *m/z* 389 [M+H].

***N*-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-2-((3,4-dimethoxyphenyl)amino)-*N*-methylacetamide (51)**



The compound was obtained following the procedure of verapamil derivatives using in a) 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-*N*-methylethanamine and chloroacetyl chloride and in b) 3,4-dimethoxyaniline.

Yield: 15 %.

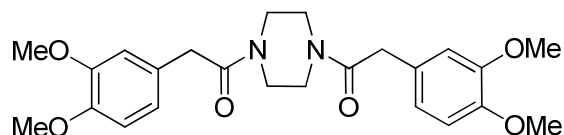
Aspect: Brown crystal.

rf: 0.48 (ethyl acetate).

mp: 89 °C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.80-2.85 (m, 2 H), 2.87-3.13 (m, 3 H), 3.50 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 3.64 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 3.78-3.88 (m, 13 H), 5.93-6.10 (m, 1 H), 6.27 (dd, *J* = , 2.39, 27.97Hz, 1 H), 6.66-6.84 (m, 4 H).

EI-MS: *m/z* 411 [M+Na].

1,1'-(Piperazine-1,4-diyl)bis(2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethanone) (52)

A mixture of (3,4-dimethoxyphenyl)acetyl chloride (0.5 g, 2.3 mmol), 1,4-piperazine (0.099 g, 1.15 mmol) in in CH₂Cl₂ cooled in ice. Triethylamine (0.325 mL, 2.3 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5 hours. The reaction mixture was washed with water and with HCl (0.5N), and saturated solution of NaHCO₃, and still water. The organic layer was dried over sodium sulfate and evaporated.

Yield: 98%.

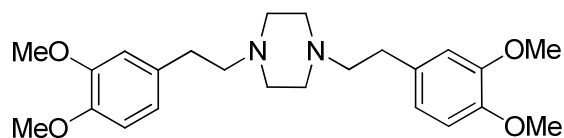
Aspect: White powder.

rf: 0.33 (ethyl acetate).

mp: 150 °C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3.23 (s, 2 H), 3.44 (s, 5 H), 3.56-3.76 (m, 5 H), 3.87-3.88 (m, 12 H), 6.56-7.00 (m, 6 H).

EI-MS: m/z 465 [M+Na].

1,4-Bis(3,4-dimethoxyphenethyl)piperazine (53)

The compound was obtained by the same procedure as for the compound (48) from compound 52.

Yield: 48 %.

Aspect: White powder.

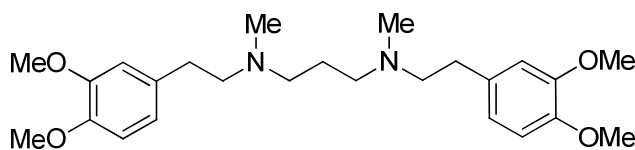
rf: 0,16 (ethyl acetate : methanol, 95 : 5).

mp: 117 °C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.51-2.55 (m, 11 H), 2.67-2.71 (m, 5 H), 3.76 (s, 6 H), 3.79 (s, 6 H), 6.89-6.42 (m, 6 H).

EI-MS: m/z 415 [M+H].

***N*¹,*N*³-Bis(3,4-dimethoxyphenethyl)-*N*¹,*N*³-dimethylpropane-1,3-diamine (54)**



A mixture of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-*N*-methylethanamine (1 g, 5 mmol), 1,3-dibromopropane (0.5 g, 2.5 mmol) in acetonitrile was stirred at reflux for 72 hours. The reaction mixture was cooled to room temperature, solvent was evaporated, water was added, and pH is adjusted to 7. The reaction mixture was extracted with EtOAc, washed with water, dried over sodium sulfate and evaporated.

Yield: 42 %.

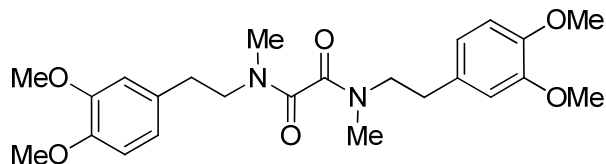
Aspect: Yellow oil.

rf: 0,16 (ACE : methanol : H₂O, 80 : 15 : 5)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.65-1.73 (m, 2 H), 2.30 (s, 6 H), 2.40-2.44 (m, 4 H), 2.57-2.60 (m, 4 H), 2.70-2.74 (m, 4 H), 3.83 (s, 6 H), 3.86 (s, 6 H), 6.58-6.95 (m, 6 H).

EI-MS: m/z 431 [M+H].

***N*¹,*N*²-Bis(3,4-dimethoxyphenethyl)-*N*¹,*N*²-dimethyloxalamide (55)**



A mixture of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-*N*-methylethanamine (2 g, 10 mmol), 1,2-dichloro-oxalyle (0.634 g, 5 mmol) in CH₂Cl₂ cooled in ice. Pyridine (0.97 mL, 12 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 20 hours. The reaction mixture was washed with water, and the organic layer was dried over sodium sulfate, and evaporated. The obtain residue was purified by column chromatography eluted with a gradient of cyclohexane/EtOAc (5 : 5) to 100 % EtOAc to give compound 55.

Yield: 58 %.

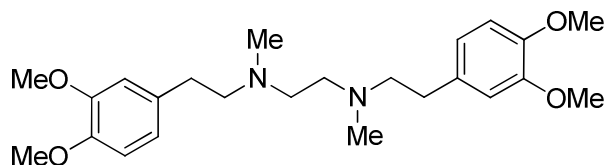
Aspect: transparent oil.

rf: 0,49 (ethyl acetate).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.54-2.55 (m, 3 H), 2.80-2.63 (m, 4 H), 2.80-2.839 (m, 3 H), 3.04 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 3.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 3.42-3.58 (m, 2 H), 3.72 (dd, *J* = 15.4, 8.8 Hz, 12 H), 6.35-6.88 (m, 6 H).

EI-MS: m/z 467 [M+H].

***N*¹,*N*²-bis(3,4-Dimethoxyphenethyl)-*N*¹,*N*²-dimethylethane-1,2-diamine (56)**



The compound was obtained by the same procedure as for the compound (48) from compound (55).

Yield: 62%.

Aspect: Yellow oil.

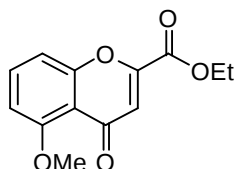
rf: 0,24 (ethyl acetate : methanol, 95 : 5)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.54-2.55 (m, 3 H), 2.80-2.63 (m, 4 H), 2.80-2.839 (m, 3 H), 3.04 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H), 3.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 3.42-3.58 (m, 2 H), 3.72 (dd, *J* = 15.4, 8.8 Hz, 12 H), 6.35-6.88 (m, 6 H).

EI-MS: *m/z* 467 [M+Na].

Synthesis of ABCG2 inhibitors

Ethyl 5-methoxy-4-oxo-4*H*-chromene-2-carboxylate (57)



2'-Hydroxy-6'-methoxyacetophenone was dissolved in anhydrous ethanol then added to a freshly prepared sodium ethoxide (6 equiv.), then diethyl oxalate (6 equiv.) was added. The mixture was stirred at 100°C for 10 hours, after which, the mixture was cooled to room temperature, ethanol was evaporated and water was added. The solution was acidified with HCl (2N) and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated. The resulting residue was dissolved in ethanol and heated at 100°C for one hour. At the end, the ethanol was evaporated.

The crude material was purified by column chromatography eluting with a gradient that starts with 3:7 (cyclohexane:CH₂Cl₂) and finally CH₂Cl₂ 100 % to provide the compound 56.

Yield: 23%.

Aspect: Amorphous orange solid.

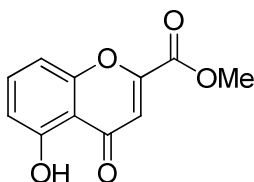
rf: 0.15 (cyclohexane : ethyl acetate, 3 : 7).

mp: 126°C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3 H), 3.88 (s, 3 H), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H), 6.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.51 (t, *J* = 8.4 Hz, 1 H).

EI-MS: *m/z* 249 [M+H]⁺.

Methyl 5-hydroxy-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylate (58)



The compound was obtained following the general procedure for the preparation of compound (57), using sodium methoxide in MeOH. The residue was purified by column chromatography eluting with CH₂Cl₂ 100 %.

Yield: 24 %.

Aspect: Yellow powder.

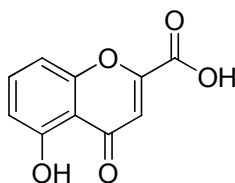
rf: 0.54 (ethyl acetate).

mp: 108°C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 4.02 (s, 3 H), 6.85 (dd, *J* = 8.3, 0.4 Hz, 1H), 7.04 (dd, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 2 H), 7.61 (t, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 12.12 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 221 [M+H]⁺.

5-Hydroxy-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (59)



Ester (57) was dissolved in a solution of NaHCO₃ (20 % in H₂O) and heated at 80 °C for 3 hours. After cooling, the solution was acidified with concentrated HCl and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, dried over Na₂SO₄, and evaporated to provide pure (59)

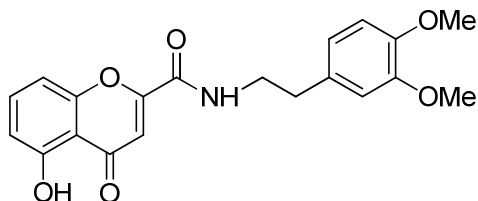
Yield: 88 %.

Aspect: Yellow powder.

mp: 263°C.

¹H RMN (400 MHz, Acetone-*d*6): δ 6.81 (dd, $J = 8.3, 0.7$ Hz, 1 H), 6.94 (s, 1 H), 7.07 (dd, $J = 8.5, 0.8$ Hz, 1 H), 7.70 (t, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 12.24 (s, 1 H).

***N*-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-5-hydroxy-4-oxo-4*H*-chromene-2-carboxamide (60)**



Carboxylic acid (**59**) was dissolved in CH₂Cl₂ was mixed with oxalyle chloride (2 equiv.) and stirred at room temperature for 24 hours. At the end, the solvent was evaporated and the residue was used without purification. The acid chloride was dissolved in THF, triethylamine (1 equiv.) was added followed by the addition of 2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethanamine (1 equiv.). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours. The solvent was evaporated and the residue was extracted with EtOAc, washed with water, dried over Na₂SO₄, and concentrated.

Yield: 30 %.

Aspect: Yellow powder.

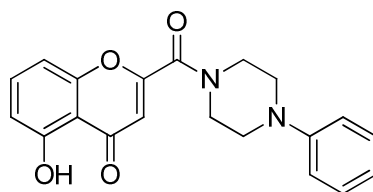
rf: 0.69 (ethyl acetate).

mp: 192°C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.90 (dd, $J = 12.9, 5.9$ Hz, 2 H), 3.73 (dd, $J = 13.2, 6.9$ Hz, 2 H), 3.87 (s, 3 H), 3.88 (s, 3 H), 6.75-6.88 (m, 4 H), 6.97 (s, 1 H), 7.09 (s, 1 H), 7.57 (t, $J = 8.4$ Hz, 1 H), 12.25 (s, 1 H).

EI-MS: m/z 292 [M+Na]⁺.

5-Hydroxy-2-(4-phenylpiperazine-1-carbonyl)-4*H*-chromen-4-one (61)



The compound was obtained following the general procedure as for the synthesis of compound **60** using 1-phenylpiperazine.

Yield: 33 %.

Aspect: Amorphous orange solid.

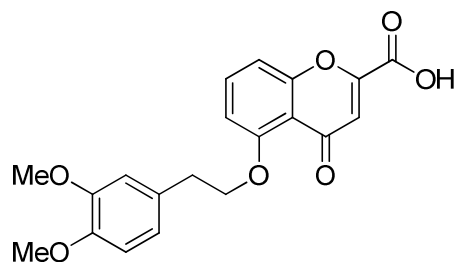
rf: 0.30 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

mp: 172°C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3.24-3.29 (m, 4 H), 3.72 (s, 2 H), 3.93 (s, 2 H), 6.52 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H), 6.85 (dd, *J* = 8.3, 0.7 Hz, 1 H), 6.89-7.00 (m, 4 H), 7.28-7.32 (m, 2 H), 7.58 (td, *J* = 8.4, 2.3 Hz, 1 H), 12.21 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 351 [M+H]⁺.

5-(3,4-Dimethoxyphenethoxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (62)



2,6-Dihydroxyacetophenone dissolved in acetone with K₂CO₃ (1 equiv.) and 4-(2-bromoethyl)-1,2-dimethoxybenzene (1 equiv.). The mixture was stirred at 100°C for 24 hours. After the reaction mixture was cooled to room temperature, solvent was evaporated, water was added and the solution was extracted with dichloromethane. The resulting organic layer was washed with water, dried over sodium sulfate, and the solvent was evaporated. The residue was treated following the same procedure as compound **57** to give an ester and then the same procedure as compound **59** to give an acid. After purification by column chromatography eluting with CH₂Cl₂ 100 %, the compound **62** was obtained.

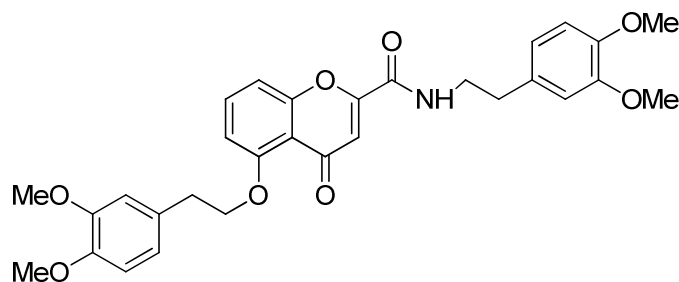
Yield: 14 %.

Aspect: Orange oil.

rf: 0.24 (cyclohexane : ethyl acetate, 3 : 7).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3.16 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H), 3.88 (s, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 4.43 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H), 6.47 (dd, *J* = 8.3, 0.7 Hz, 1 H), 6.70 (dd, *J* = 8.5, 0.9, 1 H), 6.73-6.89 (m, 4 H), 7.38 (t, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 12.16 (s, 1 H).

5-(3,4-Dimethoxyphenethoxy)-*N*-(3,4-dimethoxyphenethyl)-4-oxo-4*H*-chromene-2-carboxamide (63)



The compound was obtained starting from (62) following the same procedure applied for the synthesis of (60). The compound was obtained after a purification on preparative TLC with CH₂Cl₂ as the mobile phase.

Yield: 34 %.

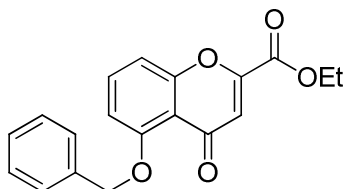
Aspect: Amorphous yellow solid.

rf: 0.19 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

mp: 96°C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.71 (t, J = 7.0 Hz, 2 H), 2.83 (t, J = 6.8 Hz, 2 H), 3.52 (dd, J = 13.1, 6.8 Hz, 2 H), 3.82 (s, 3 H), 3.85 (s, 6 H), 3.87 (s, 3 H), 4.24 (t, J = 6.8 Hz, 2 H), 6.38 (d, J = 8.3 Hz, 1 H), 6.58-6.88 (m, 8 H), 7.19-7.30 (m, 1 H), 8.24 (t, J = 5.2 Hz, 1 H).

Ethyl 5-(benzyloxy)-4-oxo-4*H*-chromene-2-carboxylate (64)



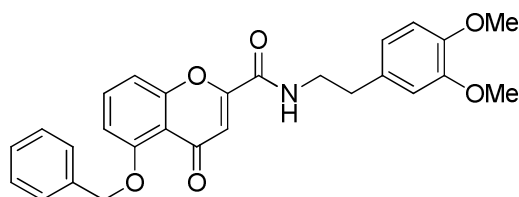
The compound was obtained following the same procedure as compound 57 using benzylbromide. The product was not purified and used as is for the next step. NMR and mass spectrometry analysis showed satisfactory purity.

rf: 0.35 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.44 (t, J = 7.1 Hz, 3 H), 4.46 (q, J = 7.1 Hz, 2 H), 5.28 (s, 2 H), 6.88 (d, J = 8.3 Hz, 1 H), 7.01 (s, 1 H), 7.17 (dd, J = 8.5, 0.8 Hz, 1 H), 7.34-7.45 (m, 4 H), 7.53-7.64 (m, 2 H).

EI-MS: m/z 325 [M + H]⁺.

5-(benzyloxy)-*N*-(3,4-dimethoxyphenethyl)-4-oxo-4*H*-chromene-2-carboxamide (65)



The compound was obtained from compound **(64)** following the same procedure applied for the synthesis of **(60)**. The compound was obtained, after purification by column chromatography eluting with a gradient from CH₂Cl₂ 100 % to MeOH 100 %.

Yield: 10 %.

Aspect: Brown crystals.

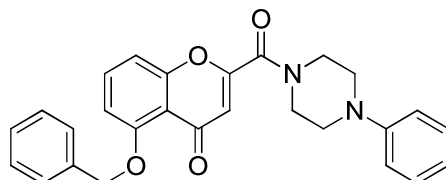
rf: 0.59 (ethyl acetate).

mp: 188°C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.67 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 3.33 (dd, *J* = 12.5, 6.2 Hz, 2 H), 3.80 (s, 3 H), 3.81 (s, 3 H), 5.10 (s, 2 H), 5.15 (s, 2 H)*, 6.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 6.61 (s, 1 H), 6.73 (dd, *J* = 14.1, 8.2 Hz, 2 H), 6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 1 H), 7.45 -7.28 (m, 6 H), 7.66 (s, 1 H).

EI-MS: *m/z* 412 [M-CO + H]⁺.

5-(Benzyloxy)-2-(4-phenylpiperazine-1-carbonyl)-4*H*-chromen-4-one (66)



The compound was obtained from compound **(64)** following the procedure used for the preparation of compound **(60)**. The residue was obtain without further purification.

Yield: 5 %.

Aspect: Yellow needles.

rf: 0.22 (cyclohexane : ethyl acetate, 7 : 3).

mp: 174°C.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3.00 (s, 4 H), 3.27 (s, 4 H), 5.15 (s, 2 H), 5.68 (s, 2 H) *, 6.78 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H), 6.83-6.94 (m, 2 H), 7.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 1 H), 7.20-7.30 (m, 4 H), 7.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.39-7.47 (m, 3 H).

* This singlet corresponds to CH₂ of benzyl in another direction as the singlet signal at 5.15

EI-MS: *m/z* 412 [M-CO + H]⁺.

Biological section

Biological evaluation of MRP1 activators

Cell lines. BHK-21 cells stably transfected with wild type MRP1 have been described previously (Mosmann 1983). Cells were grown at 37°C in 5% CO₂ in culture medium DMEM High Glucose with L-Glutamine (PAA Laboratories GmbH, Passching, Austria) containing 1% penicillin-streptomycin and 5% heat-inactivated fetal bovine serum, in the presence of 200 µM methotrexate for transfected cells. The small cell lung cancer cell lines NCI-H69 and H69AR (from ATCC number HTB-119 and CRL-1135 respectively) have been described previously (Mirski 1987). Cells were routinely cultured at 37°C in 5% CO₂ in RPMI 1640 medium with HEPES (PAA) supplemented with 1% penicillin-streptomycin, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate.

Cell proliferation determined by MTT. The MTT colorimetric assay, as described previously (Mosmann 1983), was used to assess the sensitivity of control cells NCI-H69 and MRP1-surexpressing H69AR cells to xanthenes. Briefly, growth inhibition (IC₅₀ values) assays were performed by plating cells at density 1.0×10^4 cells/well in 96 well plates. Cells were cultured for 17 h before addition of xanthenes diluted in complete culture medium, DMSO concentration was fixed at 0.5%. The cells were then incubated for 72 h in a humidified tissue-culture chamber (37°C, 5% CO₂). Surviving cells were detected by the bromo-3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay. The MTT solution was added to a final concentration of 0.5 mg/ ml and cells were then incubated for 4 h at 37 °C. Thereafter, 96 well plates were centrifuged at 700 g for 10 min to pull down NCI-H69 floating cells, the MTT dyed was carefully aspirated and 200 µl of 50 % ethanol/50 % DMSO mixing solution was added to each well to solubilize the reduced formazan dye under shaking. The formazan levels were determined by spectrophotometry at 570 nm. The effect of drugs on the growth of cells was determined from differences in absorbance between drug-treated cells versus untreated or solvent control. IC₅₀ values were calculated from dose response curves obtained from triplicate independent experiments.

Total cellular glutathione determination. The total cellular glutathione content (GSH + oxidized glutathione) was measured using the enzymatic method described by Tietze and modified by Anderson to the microtiter plate (Tietze 1969, Anderson 1985). Cells were seeded into 96 well plates at density 1.0×10^5 cells/well and cultured for 17 h before the

addition of 20 μ M xanthenes or DMSO concentration at (0.5%). After a 3 h incubation time, cells were twice washed with 100 μ l cold PBS, and then lysed by 100 μ l PBS supplemented with 0.1 % Triton X-100. After homogenization, the lysis was performed by incubation at 1h at 4°C under strong shaking prior to freezing. Then 25 μ l of lysate was transferred to a new plate for GSH titration, and 10 μ l to another plate for protein quantitation. GSH determination was performed by adding 100 μ l of reaction buffer containing 266.6 μ M NADPH, 555 μ M DTNB, 10 U/mL GSH reductase and PBS-Triton 0.1 %. The plate was then placed in a microplate reader, and the absorbance read at 412 nm every 30 sec. for 2 min. The content of total cellular glutathione was quantified by comparison with known glutathione standards. The slope was determined for each sample, and allowed the determination of GSH contents. Protein titration was performed on the remaining 10 μ l by the bicinchoninic acid method assay. The measured total glutathione was expressed in nmol per mg protein, and the results were obtained from triplicates.

Biological evaluation for ABCG2 inhibitors

Evaluation of mitoxantrone accumulation by flow cytometry. HEK-293 cells, transfected by either *ABCG2* or the empty vector (control cells), were incubated with 5 μ mol/L mitoxantrone for 30 min at 37 °C in the presence or absence of various concentrations of inhibitors added as DMSO solutions (0.5% final concentration), washed in PBS, and incubated in substrate-free medium with the same inhibitor concentration for 1 h. Intracellular drug fluorescence was monitored with a FACscan flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA). The maximal fluorescence (100%) was the difference between mean fluorescence of control cells and *ABCG2*-transfected cells, incubated with substrate but without inhibitor. The highest inhibitor concentration tested did not significantly modify the fluorescence of control cells. Cells without drug were included as an autofluorescence control. To evaluate the selectivity of inhibitors for ABCG2 compared with P-gp and MRP1, the same protocol is performed with:

- HEK-293 cells, transfected by either *ABCB1* or the empty vector (control cells), were incubated with mitoxantrone (resistant cells).
- HEK-293 cells, transfected by either *ABCC1* or the empty vector (control cells), were incubated with calcein (resistant cells).

BIBLIOGRAPHIE

A

Allan J, Robinson R. CCXC.- An accessible derivative of chromonol. *J. Chem. Soc. Trans.* 1924;125:2192.

Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 1998;58(23):5337-5339.

Anderson ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Meth. Enzymol.* 1985;113:548-555.

Arnaud O, Boumendjel A, Gèze A, Honorat M, Matera EL, Guitton J, Stein WD, Bates SE, Falson P, Dumontet C, Di Pietro A, Payen L. The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan. *Eur. J. Cancer.* 2011;47(4):640-648.

B

Bantick JR, Cairns H, Chambers A, Hazard R, King J, Lee TB, Minshull R. Benzodipyran derivatives with antiallergic activity. *J. Med. Chem.* 1976;19(6):817-821.

Barattin R, Perrotton T, Trompier D, Lorendeau D, Di Pietro A, du Moulinet d'Hardemare A, Baubichon-Cortay H. Iodination of verapamil for a stronger induction of death, through GSH efflux, of cancer cells overexpressing MRP1. *Bioorg. Med. Chem.* 2010;18(17):6265-6274.

Basu A. The potential of protein kinase C as A target for anticancer treatment. *Pharmacol. Ther.* 1993;59(3):257-280.

Bates SE, Lee JS, Dickstein B, Spolyar M, Fojo AT. Differential modulation of P-glycoprotein transport by protein kinase inhibition. *Biochemistry.* 1993;32(35):9156-9164.

Bauer BE, Wolfger H, Kuchler K. Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembranes.* 1999;1461(2):217-236.

Bennardi DO, Ruiz DM, Romanelli GP, Baronetti GT, Thomas HJ, Autino JC. ChemInform Abstract: Efficient Microwave Solvent-Free Synthesis of Flavones, Chromones, Coumarins and Dihydrocoumarins. *ChemInform.* 2009;40(15):607-615.

Bokesch HR, Cartner LK, Fuller RW, Wilson JA, Henrich CJ, Kelley JA, Gustafson KR, McMahon JB, McKee TC. Inhibition of ABCG2-mediated drug efflux by naphthopyrones from marine crinoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010;20(13):3848-3850.

Boumendjel A. *ABC transporters and multidrug resistance*. Hoboken N.J.: John Wiley & Sons; 2009.

Boumendjel A, Di Pietro A, Dumontet C, Barron D. Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cancer

cell multidrug resistance. *Med. Res. Rev.* 2002;22(5):512-529.

Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Tromprier D, Perrotton T, Di Pietro A. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: Recent advances in the discovery of reversal agents. *Med. Res. Rev.* 2005;25(4):453-472.

(b)Boumendjel A, Nicolle E, Moraux T, Gerby B, Blanc M, Ronot X, Boutonnat J. Piperazinobenzopyranones and Phenalkylaminobenzopyranones: Potent Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2). *J. Med. Chem.* 2005;48(23):7275-7281.

Boumendjel A, Macalou S, Ahmed-Belkacem A, Blanc M, Di Pietro A. Acridone derivatives: design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. *Bioorg. Med. Chem.* 2007;15(8):2892-2897.

Brechbuhl HM, Gould N, Kachadourian R, Riekhof WR, Voelker DR, Day BJ. Glutathione transport is a unique function of the ATP-binding cassette protein ABCG2. *J. Biol. Chem.* 2010;285(22):16582-16587.

C

Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL, Quijcho FA. A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol. Cell.* 2003;12(3):651-661.

Cholody WM, Martelli S, Konopa J. 8-Substituted 5-[(aminoalkyl)amino]-6H-v-triazolo[4,5,1-de]acridin-6-ones as potential antineoplastic agents. Synthesis and biological activity. *J. Med. Chem.* 1990;33(10):2852-2856.

Cole S, Bhardwaj G, Gerlach J, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science.* 1992;258(5088):1650-1654.

Cole SPC, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG. Pharmacological Characterization of Multidrug Resistant MRP-transfected Human Tumor Cells. *Cancer Res.* 1994;54(22):5902-5910.

Cole SP, Deeley RG. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *Bioessays.* 1998;20(11):931-940.

D

Dahlen K, Wallen EAA, Groetli M, Luthman K. Synthesis of 2,3,6,8-Tetrasubstituted Chromone Scaffolds. *ChemInform.* 2007;38(1):6863-6871.

Davey RA, Longhurst TJ, Davey MW, Belov L, Harvie RM, Hancox D, Wheeler H. Drug resistance mechanisms and MRP expression in response to epirubicin treatment in a human leukaemia cell line. *Leuk. Res.* 1995;19(4):275-282.

Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid. Res.* 2001;42(7):1007-1017.

de Bruin M, Miyake K, Litman T, Robey R, Bates SE. Reversal of resistance by GF120918 in

cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett.* 1999;146(2):117-126.

E

Ellis GP, Shaw D. Benzopyrones. 7. Synthesis and antiallergic activity of some 2-(5-tetrazolyl)chromones. *J. Med. Chem.* 1972;15(8):865-867.

F

FitzGerald DJ, Willingham MC, Cardarelli CO, Hamada H, Tsuruo T, Gottesman MM, Pastan I. A monoclonal antibody-Pseudomonas toxin conjugate that specifically kills multidrug-resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987;84(12):4288-4292.

Florin A, Boutonnat J, Boumendjel A. Overcoming BCRP-mediated multidrug resistance. *Drugs Fut.* 2008;33(6):533.

G

Gottesman MM, Hrycina CA, Schoenlein PV, Germann UA, Pastan I. Genetic Analysis of the Multidrug Transporter. *Annu. Rev. Genet.* 1995;29(1):607-649.

Gottesman M, Ambudkar S. Overview: ABC Transporters and Human Disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2001;33(6):453-458.

Grech KV, Davey RA, Davey MW. The Relationship Between Modulation of MDR and Glutathione in MRP-Overexpressing Human Leukemia Cells. *Biochem. Pharmacol.* 1998;55(8):1283-1289.

Greene T. *Protective groups in organic synthesis*. 3 éd. New York: Wiley; 1999.

H

Henrich CJ, Robey RW, Takada K, Bokesch HR, Bates SE, Shukla S, Ambudkar SV, McMahon JB, Gustafson KR. Botryllamides: Natural Product Inhibitors of ABCG2. *ACS Chem. Biol.* 2009;4(8):637-647.

Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct. Mol. Biol.* 2004;11(10):918-926.

I

Imai Y, Tsukahara S, Asada S, Sugimoto Y. Phytoestrogens/Flavonoids Reverse Breast Cancer Resistance Protein/ABCG2-Mediated Multidrug Resistance. *Cancer Res.* 2004;64(12):4346-4352.

J

Jones PM, George AM. Mechanism of ABC transporters: A molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002;99(20):12639-12644.

Juliano R, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Biomembranes.* 1976;455(1):152-162.

K

Kachadourian R, Day BJ. Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment. *Free Radic. Biol. Med.* 2006;41(1):65-76.

Katayama K, Masuyama K, Yoshioka S, Hasegawa H, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. Flavonoids inhibit breast cancer resistance protein-mediated drug resistance: transporter specificity and structure–activity relationship. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007;60(6):789-797.

Kühnle M, Egger M, Müller C, Mahringer A, Bernhardt G, Fricker G, König B, Buschauer A. Potent and Selective Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) Derived from the p-Glycoprotein (ABCB1) Modulator Tariquidar. *J. Med. Chem.* 2009;52(4):1190-1197.

L

Laberge R, Karwatsky J, Lincoln MC, Leimanis ML, Georges E. Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 2007;73(11):1727-1737.

Lau CK, Belanger PC, Dufresne C, Scheigetz J. Novel cyclization of S-(o-acetylaryl) dimethylthiocarbamates. A new synthesis of 3-hydroxybenzothiophenes and 2-hydroxythiochromones. *J. Org. Chem.* 1987;52(9):1670-1673.

Lemieux P, Page M. Sensitivity of multidrug-resistant MCF-7 cells to a transferrin-doxorubicin conjugates. *Anticancer Res.* 1994;14(2A):397-403.

Leslie EM, Deeley RG, Cole SPC. Bioflavonoid Stimulation of Glutathione Transport by the 190-kDa Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1). *Drug Metab. Dispos.* 2003;31(1):11-15.

Linton KJ. Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology.* 2007;22(2):122-130.

Linton KJ, Higgins CF. The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol.* 1998;28(1):5-13.

Locher KP, Lee AT, Rees DC. The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science.* 2002;296(5570):1091-1098.

Loe DW, Deeley RG, Cole SPC. Verapamil Stimulates Glutathione Transport by the 190-kDa Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000;293(2):530-538.

(b) Loe DW, Oleschuk CJ, Deeley RG, Cole SPC. Structure-Activity Studies of Verapamil Analogs That Modulate Transport of Leukotriene C4 and Reduced Glutathione by Multidrug Resistance Protein MRP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;275(3):795-803.

Looker JH, McMechan JH, Mader JW. An amine solvent modification of the Kostanecki-Robinson reaction. Application to the synthesis of flavonols. *J. Org. Chem.* 1978;43(12):2344-2347.

M

Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ohguchi K, Ito T, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y.

Induction of Apoptosis by Xanthenes from Mangosteen in Human Leukemia Cell Lines. *J. Nat. Prod.* 2003;66(8):1124-1127.

Mickisch GH, Pai LH, Gottesman MM, Pastan I. Monoclonal antibody MRK16 reverses the multidrug resistance of multidrug-resistant transgenic mice. *Cancer Res.* 1992;52(16):4427-4432.

Mirski SEL, Gerlach JH, Cole SPC. Multidrug Resistance in a Human Small Cell Lung Cancer Cell Line Selected in Adriamycin. *Cancer Res.* 1987;47(10):2594-2598.

Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE.. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* 1999;59(1):8-13.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983;65:55-63.

N

Nadler G, Faivre JF, Forest MC, Cheval B, Martin M, Souchet M, Gout B, Bril A. Synthesis, electrophysiological properties and analysis of structural requirements of a novel class of antiarrhythmic agents with potassium and calcium channel blocking properties. *Bioorg. Med. Chem.* 1998;6(11):1993-2011.

Naito M, Tsuruo T. Competitive Inhibition by Verapamil of ATP-dependent High Affinity Vincristine Binding to the Plasma Membrane of Multidrug-resistant K562 Cells without Calcium Ion Involvement. *Cancer Res.* 1989;49(6):1452-1455.

Nguyen H, Zhang S, Morris ME. Effect of flavonoids on MRP1-mediated transport in Panc-1 cells. *J. Pharm. Sci.* 2003;92(2):250-257.

Nies A, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP, Keppler D. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience.* 2004;129(2):349-360.

Noungoué Tchamo DN, Dijoux-Franca MG, Mariotte AM, Tsamo E, Daskiewicz JB, Bayet C, Barron D, Conseil G, Di Pietro A. Prenylated xanthenes as potential P-glycoprotein modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000;10(12):1343-1345.

P

Pedro M, Cerqueira F, Sousa ME, Nascimento MSJ, Pinto M. Xanthenes as inhibitors of growth of human cancer cell lines and Their effects on the proliferation of human lymphocytes In Vitro. *Bioorg. Med. Chem.* 2002;10(12):3725-3730.

Perrotton T, Trompier D, Chang X, Di Pietro A, Baubichon-Cortay H. (R)- and (S)-verapamil differentially modulate the multidrug-resistant protein MRP1. *J. Biol. Chem.* 2007;282(43):31542-31548.

(b)Perrotton T. Etude du transporteur de multiples drogues MRP1 : caractérisation des NBD, et étude de modulateurs conduisant à la mort des cellules surexprimant le transporteur. *Thèse de l'Université Claude Bernard (Lyon I)*, 2007.

Pick A, Klinkhammer W, Wiese M. Specific Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP). *Chem. Med. Chem.* 2010;5(9):1498-1505.

R

Rothnie A, Conseil G, Lau AYT, Deeley RG, Cole SPC. Mechanistic differences between GSH transport by multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) and GSH modulation of MRP1-mediated transport. *Mol. Pharmacol.* 2008;74(6):1630-1640.

S

Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ, Hunt JF. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell.* 2002;10(1):139-149.

Stenham DR, Campbell JD, Sansom MSP, Higgins CF, Kerr ID, Linton KJ. An atomic detail model for the human ATP binding cassette transporter P-glycoprotein derived from disulfide cross-linking and homology modeling. *FASEB J.* 2003;17(15):2287-2289.

T

Tércio J, Ferreira B, Catani V, Comasseto JV. Synthesis of 2,2-Dimethyl-2H-thiochromenes, the Sulfur Analogs of Precocenes. *Synthesis.* 1987;1987(02):149,153.

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 1969;27(3):502-522.

Trompier D, Chang X, Barattin R, du Moulinet d'Hardemare A, Di Pietro A, Baubichon-Cortay H. Verapamil and Its Derivative Trigger Apoptosis through Glutathione Extrusion by Multidrug Resistance Protein MRP1. *Cancer Res.* 2004;64(14):4950-4956.

V

Versantvoort CH, Broxterman HJ, Lankelma J, feller N, Pinedo HM. Competitive inhibition by genistein and ATP dependence of daunorubicin transport in intact MRP overexpressing human small cell lung cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 1994;48(6):1129-1136.

W

Wahala K, Hase TA. Expedient synthesis of polyhydroxyisoflavones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* 1991;(12):3005-3008.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1982;1(8):945-951.

Y

Yang CJ, Horton JK, Cowan KH, Schneider E. Cross-Resistance to Camptothecin Analogues

in a Mitoxantrone-resistant Human Breast Carcinoma Cell Line Is Not Due to DNA Topoisomerase I Alterations. *Cancer Res.* 1995;55(18):4004-4009.

Yao N, Song A, Wang X, Dixon S, Lam KS. Synthesis of Flavonoid Analogues as Scaffolds for Natural Product-Based Combinatorial Libraries. *J. Comb. Chem.* 2007;9(4):668-676.

Z

Zaitseva J, Jenewein S, Jumpertz T, Holland IB, Schmitt L. H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J.* 2005;24(11):1901-1910.

Zembower DE, Zhang H. Total Synthesis of Robustaflavone, a Potential Anti-Hepatitis B Agent. *J. Org. Chem.* 1998;63(25):9300-9305.

Zhang S, Yang X, Morris ME. Flavonoids Are Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Transport. *Mol. Pharmacol.* 2004;65(5):1208-1216.