



HAL
open science

Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Guidage et de Vectorisation pour la Cancérologie

Elisabeth Garanger

► **To cite this version:**

Elisabeth Garanger. Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Guidage et de Vectorisation pour la Cancérologie. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00009834

HAL Id: tel-00009834

<https://theses.hal.science/tel-00009834>

Submitted on 26 Jul 2005

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.

Université Joseph Fourier
Grenoble I – Sciences, Technologie, Santé

THÈSE

Présentée par

Élisabeth GARANGER

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Spécialité : Chimie-Biologie

Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Guidage et de Vectorisation pour la Cancérologie

Soutenue publiquement le lundi 27 juin 2005, devant le jury composé de :

Dr. Anne-Catherine PRATS, INSERM U589, Toulouse
Pr. Jean MARTINEZ, CNRS UMR 5810, Montpellier
Pr. Yannick Vallée, Université Grenoble I
Pr. Marie-Christine FAVROT, INSERM U578, Grenoble
Pr. Pascal DUMY, CNRS UMR 5616, Grenoble

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Co-directeur de thèse
Co-directeur de thèse

Université Joseph Fourier
Grenoble I – Sciences, Technologie, Santé

THÈSE

Présentée par

Élisabeth GARANGER

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Spécialité : Chimie-Biologie

Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Guidage et de Vectorisation pour la Cancérologie

Soutenue publiquement le lundi 27 juin 2005, devant le jury composé de :

Dr. Anne-Catherine PRATS, INSERM U589, Toulouse
Pr. Jean MARTINEZ, CNRS UMR 5810, Montpellier
Pr. Yannick Vallée, Université Grenoble I
Pr. Marie-Christine FAVROT, INSERM U578, Grenoble
Pr. Pascal DUMY, CNRS UMR 5616, Grenoble

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Co-directeur de thèse
Co-directeur de thèse

Je remercie,

Le Professeur Pascal Dumy, directeur du LEDSS, responsable de l'équipe d'Ingénierie Moléculaire et de Chimie des Composés Bio-organiques et co-directeur de cette thèse, pour avoir considéré mon souhait de rejoindre son équipe, soutenu mes demandes de financement et m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je lui exprime toute ma gratitude pour avoir dirigé mon travail, m'avoir fait bénéficier de ses conseils et de sa grande curiosité scientifique.

Le Professeur Marie-Christine Favrot, responsable de l'équipe de Thérapie du Cancer du Poumon du GRCP et co-directrice de ce travail, qui m'a fait profiter de ses connaissances et a soutenu mon projet bien au delà du cadre du laboratoire. J'admire son immense engagement pour l'expansion et le dynamisme de la Recherche à Grenoble et suis fière d'avoir assisté à sa décoration au titre de Chevalier de la Légion d'Honneur au cours de ma troisième année de thèse. Je n'oublierai pas, à l'avenir, de me rappeler la ténacité dont elle fait preuve pour défendre ses idées et ses valeurs.

Je les remercie également tous deux pour m'avoir permis de participer à de nombreux congrès.

Le Professeur Christian Brambilla, directeur du GRCP, pour m'avoir accueillie au sein de son unité INSERM.

La Ligue Nationale Contre le Cancer, pour m'avoir attribuée successivement trois bourses de recherche. Ce soutien financier m'a permis de mener sereinement mon travail de thèse.

Le Professeur Jean Martinez et **Le Docteur Anne-Catherine Prats** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux, ainsi que **Le Professeur Yannick Vallée** de participer à mon jury. Leurs critiques et leur jugement ont été pour moi d'un grand intérêt.

Didier Boturyn et **Jean-Luc Coll**, sans qui la réalisation de ce travail n'aurait pas eu de commune mesure. Je remercie Didier de m'avoir enseigné les subtilités de la synthèse peptidique et de son encadrement quotidien au laboratoire. Sa disponibilité m'a été très agréable. Je remercie Jean-Luc de m'avoir... appris la biologie ! Sa patience et sa disponibilité m'ont permis d'être rapidement à l'aise dans cette nouvelle discipline. Son enthousiasme (« la manip du siècle ») et ses encouragements (« quel virus cette chimiste ») ont soutenu régulièrement mes efforts !

Alexeï Grichine, pour m'avoir familiarisée avec la microscopie confocale et les techniques de FRAP.

Karine Sadoul, pour nos premiers essais avec le CIPHERGEN.

Tous les membres du GRCP et particulièrement ceux qui ont participé à ma formation dans « mes débuts » : **Dominique**, pour la culture cellulaire, **Corine**, pour l'immunohistochimie et l'apprivoisement des souris Nude, **Céline**, pour la récupération de la lamelle de verre à la pince à épiler, **Amandine**, pour les réglages du FACS (entre autres...). Je remercie **Sylvie G.**, **Béatrice**, **Sylvie F.**, **Carole**, **Pascal**, **Véronique**, **Norbert**, **Camille**, **David**, **Caroline**, pour leur extrême serviabilité, leur gentillesse et leur bonne humeur quotidiennes qui permettent d'arriver toujours au labo avec le sourire. Je remercie également **Zhaohui** pour sa participation fructueuse à ce projet.

William Monetta et **Cécile Jamin**, pour la réalisation des spectres de masse et particulièrement **Cécile** pour nos essais de MS-MS, ainsi que **Julian Garcia**, pour les spectres et les rappels de RMN.

Tous les membres du LEDSS 5 pour leur serviabilité et leur bonne humeur et notamment **Olivier**, qui m'a légué sa paillasse et son bureau sans rancœur, **Martine**, qui a corrigé régulièrement mes fautes d'anglais, **Elizabeth** et **Régine**, pour leur efficacité et leurs nombreux services rendus toujours avec le sourire. Merci à tous les colocataires du « bureau des étudiants » qui m'ont supportée, moi et mon « caractère exceptionnel » !

Sabine, à qui je me permets de réserver une place particulière... Collègue la journée, relectrice pointilleuse et critique de ce manuscrit, bourreau dans les coups de flemme (!), « reine des quiches » dans les périodes de disette, amie tous les jours et chaleureuse confidente dans les « coups de moins bien »... Pour tout ça et tout le reste, merci !

Mes amis qui ont suivi l'histoire des « RAFTs », des vaisseaux et des souris sacrifiées : **Marie-Line**, **Caroline M.** (ex H.), **Rebha**, **Valérie**, **Rozenn**, **Caroline T.**, **Sophie**, **Delphine**, **Rachel**, **Vincent**, **Sébastien**, **Jérôme**, **Nordine**, **Julien**... et tous les autres... Leur amitié, leur présence rassurante, leur joie et leurs taquineries me sont chères. Je veux ici leur témoigner, à mon tour, ma sincère et profonde amitié.

Ma famille. **Claudine** et **Jacques**, mes parents, pour leur amour et leur soutien. **Hélène**, ma sœur inconditionnellement préférée (!), **Laurent B.** et leurs trois chenapans : **Pierre** et ses engins de travaux terribles, **Marie** et ses « cezal », **Louis** et ses « mamie » coquins. **Jean-Michel**, **Laurent H.**, **Catherine**, mes cousins copains (!) . Mes grand-parents, **Marcelle**, **Annette** et **André** qui ont tenu jusqu'au bout... Je leur témoigne à tous tout mon amour.

À mes parents,

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr. Pascal Dumy et du Pr. Marie-Christine Favrot en collaboration au sein de leur laboratoire :

- le Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Chimie des Composés Bio-organiques, CNRS UMR5616, LEDSS, Université Joseph Fourier, Grenoble
- l'Équipe de Thérapie Génique du Cancer, du Groupe de Recherche sur le Cancer du Poumon, INSERM U578, Institut Albert Bonniot, Grenoble.

Il a donné lieu aux publications suivantes :

Articles dans des revues internationales à comité de lecture

D. Boturyn, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot, P. Dumy ; "Template Assembled Cyclopeptides as Multimeric System for Integrin Targeting and Endocytosis" ; *J. Am. Chem. Soc.* ; **2004** ; Vol. 126 (18) ; 5730-5739

E. Garanger, D. Boturyn, Z. Jin, P. Dumy, M.-C. Favrot, J.-L. Coll ; "New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging and therapy of tumors" ; *Mol. Therapy* ; **2005** ; In Press

Communications à des congrès

P. Dumy, D. Boturyn, E. Garanger, J.-L. Coll, M.-C. Favrot ; "Nouveaux systèmes de ciblage cellulaire : synthèses et applications" ; *17^{èmes} Journées Scientifiques du Groupe Thématique de Recherche sur les Vecteurs* ; 12-13 décembre **2002** ; Paris

D. Boturyn, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot, P. Dumy ; "Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Guidage et de Vectorisation vers les Cellules Endothéliales" ; *17^{èmes} Journées Scientifiques du GTRV* ; 12-13 décembre **2002** ; Paris

E. Garanger, D. Boturyn, J.-L. Coll, M.-C. Favrot, P. Dumy ; "Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Guidage et de Vectorisation pour la Cancérologie" ; *13^{ième} Réunion du Groupe Français des Peptides et des Protéines* ; 19-23 octobre **2003** ; Anglet-Biarritz

D. Boturyn, E. Garanger, J.-L. Coll, M.-C. Favrot, P. Dumy ; "Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Vectorisation vers les Cellules Endothéliales" ; *13^{ième} Réunion du GFPP* ; 19-23 octobre **2003** ; Anglet-Biarritz

E. Garanger, D. Boturyn, P. Dumy, M.-C. Favrot, J.-L. Coll ; “Synthesis and characterization of a new multivalent RGD-based vector for *in vivo* drug delivery to tumours and for medical imaging” ; *European Society of Gene Therapy* ; 14-17 novembre **2003** ; Edinburgh (U.K.)

E. Garanger, D. Boturyn, J.-L. Coll, M.-C. Favrot, P. Dumy ; “Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Guidage et de Vectorisation pour la Cancérologie” ; *10^{èmes} Rencontres de Chimie Organique Biologique*, 22-25 mars **2004** ; Aussois

E. Garanger, D. Boturyn, P. Dumy, M.-C. Favrot, J.-L. Coll ; “Transfert ciblé non-viral de molécules anti-angiogéniques dans le cancer du poumon : efficacité thérapeutique et imagerie moléculaire” ; *8^{ème} Colloque National d’Angiogenèse* ; 6-7 mai **2004** ; Annecy

E. Garanger, D. Boturyn, J.-L. Coll, M.-C. Favrot, P. Dumy ; “Non-viral delivery of anti-angiogenic molecules for cancer imaging and treatment” ; *9^{ème} Symposium de l’ICSN - CANCER : Targets, Molecules and Therapies* ; 10-11 juin **2004** ; Gif-sur-Yvette

D. Boturyn, E. Garanger, L. Sancey, V. Ardisson, J.-L. Coll, M.-C. Favrot, J.-P. Vuillez, D. Fagret, P. Dumy ; “Nouveaux Systèmes de Vectorisation vers les Cellules Endothéliales” ; *19^{èmes} Journées Scientifiques du GTRV* ; 16-17 décembre **2004** ; Paris

D. Boturyn, E. Garanger, J.-L. Coll, M.-C. Favrot, L. Sancey, J.-P. Vuillez, D. Fagret, P. Dumy ; “Imagerie de la néo-angiogenèse par des ligands de l’intégrine $\alpha_v\beta_3$ ” ; *14^{ème} Réunion du GFPP* ; 10-14 janvier **2005** ; Aussois

E. Garanger, D. Boturyn, J.-L. Coll, M.-C. Favrot, P. Dumy ; “Non-Viral Molecular Conjugate Vector : A Case Study for the Targeting and Imaging of Tumour-Induced Neo-Angiogenesis” ; *1st International Symposium on Biomolecules and Related Compounds* ; 20-25 mars **2005** ; Montpellier

E. Garanger, D. Boturyn, J.-L. Coll, M.-C. Favrot, P. Dumy ; “Non-Viral Molecular Conjugate Vector : A Case Study for the Targeting and Imaging of Tumour-Induced Neo-Angiogenesis” ; *COST Meeting - Functional Molecular Materials* ; 8-10 avril **2005** ; Newcastle (U.K.)

Résumés de congrès soumis à comité de lecture

I. Texier, V. Josserand, E. Garanger, J. Razkin, Z. Jin, P. Dumy, M. Favrot, D. Boturyn, J.L. Coll ; “Luminescent probes for optical *in vivo* imaging” ; *Proceedings of SPIE : “Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications III”* D.J. Bornhop, S. Achilefu, R. Raghavachari, A. P. Savitsky Eds. ; **2005** ; Vol. 5704 ; 16-23

TABLE DES MATIÈRES

Abréviations.	13
Liste des acides aminés naturels.	14
INTRODUCTION	15
Préambule.	17
I. Le Cancer : Situation Actuelle.	19
<i>I.1. Données épidémiologiques.</i>	19
<i>I.2. Les méthodes traditionnelles employées pour le diagnostic et le traitement des cancers.</i>	21
<i>I.3. Mécanisme de la cancérogenèse.</i>	26
<i>I.4. Les nouvelles thérapies ciblées.</i>	32
II. Caractéristiques de la Néo-angiogenèse Tumorale et Stratégie de Ciblage via l'Intégrine $\alpha_V\beta_3$.	34
<i>II.1. La néo-angiogenèse tumorale.</i>	34
<i>II.2. Stratégies anti-tumorales anti-angiogéniques.</i>	39
<i>II.3. L'intégrine $\alpha_V\beta_3$.</i>	42
<i>II.4. Le pentapeptide cyclique c[-RGDf(N-Me)V-] : ligand spécifique de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.</i>	49
III. Systèmes de Ciblage et de Vectorisation. Description d'un Nouvel Outil Chimique, le Gabarit RAFT.	57
<i>III.1. Les grandes familles de vecteurs.</i>	58
<i>III.2. Les outils synthétiques permettant l'association de fonctions de ciblage et de vectorisation.</i>	64
<i>III.3. Les gabarits « RAFTs ».</i>	69
IV. Définition du Projet de Recherche.	75
<i>IV.1. Description du vecteur développé.</i>	75
<i>IV.2. Démarche expérimentale.</i>	77

RÉSULTATS ET DISCUSSION	79
SYNTHÈSES CHIMIQUES	81
A. Synthèse des ligands multivalents RAFT(c[-RGDfK-])_n.	81
A.1. Objectif des travaux.	81
A.2. Intérêt des conjugaisons chimiosélectives – Choix du lien éther d'oxime.	81
A.3. Design des ligands et stratégie de synthèse.	87
A.4. Synthèse des différents précurseurs.	90
A.5. Synthèse des ligands multivalents RAFT(c[-RGDfK-]) _n .	95
▶ Bilan des synthèses et études biologiques entreprises.	101
B. Conjugaison de molécules de détection au ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄.	102
B.1. Objectif des travaux.	102
B.2. Choix des molécules de détection.	102
B.3. Stratégie de synthèse.	104
B.4. Synthèse des conjugués (marqueur) _n RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ .	106
▶ Bilan des synthèses et études biologiques entreprises.	116
C. Conjugaison de molécules cytotoxiques au vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄.	117
C.1. Objectif des travaux.	117
C.2. Intérêt des liaisons disulfures pour la conjugaison de drogues au vecteur RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ .	117
C.3. Choix des molécules cytotoxiques à vectoriser.	119
C.4. Stratégie « double oxime » : synthèse du conjugué (KLA) ₂ RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 91 et de son homologue -RβAD- contrôle 92 .	124
C.5. Stratégie « double lien chimiosélectif » : synthèse des conjugués (ss-KLA)RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 94 , (Dox)RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 96 et (Ricine-Chaîne A)RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 97 .	129
▶ Bilan des synthèses et études biologiques entreprises.	150

ÉTUDES BIOLOGIQUES	151
D. Évaluation <i>in vitro</i> des ligands -RGD- multivalents supportés sur gabarit RAFT - Caractérisation de l'activité biologique du ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄.	151
<i>D.1. Objectif des travaux.</i>	151
<i>D.2. Choix des modèles cellulaires pour les études in vitro.</i>	151
<i>D.3. Mise en évidence de la fonctionnalité du motif c[-RGDfK-] conjugué au gabarit RAFT.</i>	154
<i>D.4. Inhibition de l'adhésion et induction de l'apoptose des cellules endothéliales primaires par le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄.</i>	161
<i>D.5. Localisation cellulaire du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄.</i>	163
<i>D.6. Colocalisation du ligand multivalent avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.</i>	168
<i>D.7. Étude de la diffusion membranaire et de la mobilité des intégrines $\alpha_v\beta_3$ après fixation du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄.</i>	176
<i>D.8. Conclusion.</i>	180
E. Étude du ciblage des tumeurs <i>in vivo</i> et évaluation de l'activité anti-tumorale du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄.	182
<i>E.1. Objectif des travaux.</i>	182
<i>E.2. Choix des modèles cellulaires pour les études in vivo.</i>	182
<i>E.3. Étude préliminaire : activité anti-tumorale du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ administré en intra-tumoral.</i>	183
<i>E.4. Étude du ciblage des tumeurs in vivo par imagerie de fluorescence.</i>	185
<i>E.5. Étude de l'élimination urinaire du conjugué (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄.</i>	192
<i>E.6. Étude de l'activité anti-tumorale du ligand multivalent administré par voie systémique.</i>	194
<i>E.7. Conclusion.</i>	194
F. Étude préliminaire de la cytotoxicité des vecteurs de drogues.	196
<i>F.1. Objectif des travaux.</i>	196
<i>F.2. Évaluation de la toxicité du conjugué (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ <u>91</u> sur des cellules HEK293(β_3).</i>	196

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	199
PARTIE EXPÉRIMENTALE	207
<i>Protocoles de synthèse.</i>	209
<i>Protocoles des tests biologiques.</i>	256
BIBLIOGRAPHIE	267
ANNEXES	281

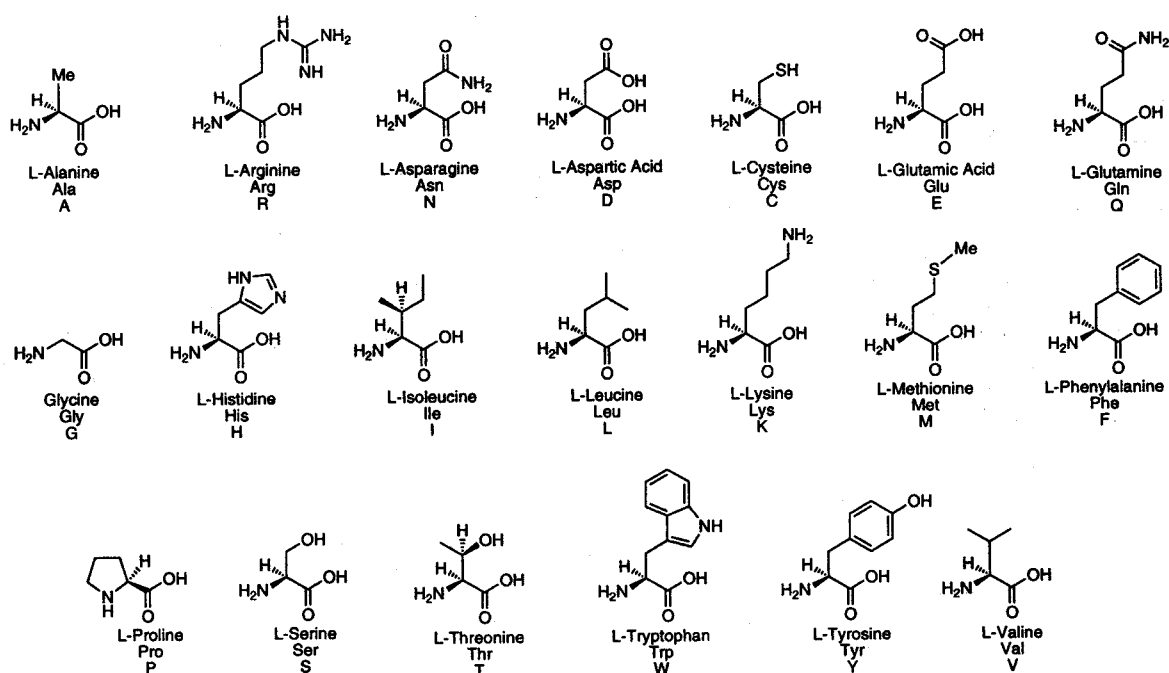
ABRÉVIATIONS

Ac	Acétyl
Acm	Acétamidométhyl
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
AcONa	Acétate de sodium
AcONH₄	Acétate d'ammonium
Alloc	Allyloxy-carbonyl
Bn	Phénylméthyl (ou benzyl)
Boc	<i>Tertio</i> -butyloxy-carbonyl
BSA	Bovine Serum Albumine
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
DCI	Desorption Chemical Ionisation
DCM	Dichlorométhane
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
ε	Epsilon
EDT	Éthanedithiol
EGTA	Acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther) <i>N,N,N',N'</i> -tétraacétique
eq.	Équivalent molaire
ESI	Electrospray Ionisation
Et₂O	Éther diéthylique
EtOH	Éthanol
FACS	Fluorescence Assisted Cell Sorting
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
Fmoc	9-Fluorénylméthoxy-carbonyl
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
i.p.	Intrapéritonéale
i.v.	Intraveineuse
λ	Longueur d'onde
(m, μ)g	(milli, micro) gramme
(m, μ)L	(milli, micro) litre
(m, μ)mol	(milli, micro) mole
(m, μ)M	(milli, micro) molaire
MeOH	Méthanol
min	Minute
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide
nm	Nanomètre
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
Nps	2-Nitrophénylsulfényl
Pbf	2,2,4,6,7-Pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	Phosphate Buffer Saline
pNZ	<i>Para</i> -nitrobenzyloxy-carbonyl
ppm	Partie par million
PyBOP[®]	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
Pyr	2-Pyridinesulfényl
RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
r.t.	Room temperature

SASRIN	Super Acid Sensitive Resin
s.c.	Sous-cutanée
Scm	Méthoxy-carbonylsulfényl
SM	Spectrométrie de masse
SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
SPR	Surface Plasmon Resonance
Succ	Succinimide
t.a.	Température ambiante
TASP	Template Assembled Synthetic Protein
<i>t</i>Bu	<i>Tertio</i> -butyl
TFA	Acide trifluoroacétique
TIS	Triisopropylsilane
Tmob	Triméthoxybenzyl
TNBS	Acide trinitrobenzènesulfonique
t_R	Temps de rétention
Trt	Triphénylméthyl (ou trityl)

LISTE DES ACIDES AMINÉS NATURELS

Structures et codes à une et trois lettres



Source : Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. Editor : C.W. Rees, CRC Press , Boca Raton, New York, **1997**.

(Le code à une lettre utilise une lettre majuscule pour les acides aminés de configuration L et une lettre minuscule pour ceux de configuration D)

INTRODUCTION

Préambule.

Le cancer est un problème majeur de santé publique en France ; il est la première cause de mortalité chez les hommes et la seconde chez les femmes après les maladies cardiovasculaires. Les moyens de diagnostic disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas, dans un trop grand nombre de cas, de dépister précocement l'apparition des tumeurs. Sur le plan thérapeutique, les traitements conventionnels, cytostatiques et cytotoxiques, n'ont qu'une sélectivité imparfaite vis-à-vis des cellules tumorales. Ils entraînent alors des effets secondaires, parfois sévères, qui limitent les doses auxquelles ils peuvent être administrés. Les progrès en cancérologie clinique réclament donc le développement conjoint de nouvelles méthodes diagnostiques, plus sensibles et plus performantes, ainsi que de nouvelles thérapeutiques plus efficaces, mais aussi mieux tolérées.

La possibilité d'agir sur la néo-angiogenèse tumorale constitue une stratégie prometteuse pour circonscrire les foyers tumoraux, limiter l'extension de la tumeur et prévenir la formation de métastases à distance du foyer primitif. Les néo-vaisseaux tumoraux se distinguent structurellement et fonctionnellement de la vascularisation quiescente : en particulier, les cellules endothéliales des vaisseaux en croissance sur-expriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, présente par ailleurs sur de nombreuses lignées tumorales humaines. Ce récepteur constitue une cible potentielle pour des agents anti-angiogéniques et anti-métastatiques. Dans cette optique, les peptides cycliques contenant le motif tripeptidique -RGD- (-Arg-Gly-Asp-) dans une conformation contrainte apparaissent comme de bons candidats. L'utilisation de ligands synthétiques -RGD- associés à un système de vectorisation d'agents thérapeutiques est aujourd'hui exploitée pour cibler et repérer spécifiquement les zones de néo-angiogenèse, concentrer l'action de la drogue vectorisée dans la tumeur, et limiter l'extension et l'invasion tumorale.

Dans ce contexte, nous avons consacré nos travaux à la conception de vecteurs synthétiques dirigés spécifiquement contre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le squelette du vecteur est constitué d'un châssis décapeptidique cyclique qui présente deux faces d'adressage indépendantes permettant de séparer les deux fonctions du vecteur. Sur la face supérieure, la fonction de ciblage est assurée par la présentation multivalente de ligands cyclopentapeptidiques *cyclo*[-RGDfK-]. Le domaine inférieur du vecteur supporte lui les

molécules d'intérêt à vectoriser : agents cytotoxiques (drogues de chimiothérapie, peptides ou protéines apoptogènes...) pour la destruction du foyer malin, ou traceurs biologiques pour l'imagerie médicale.

Cette thèse a fait l'objet d'une collaboration entre le Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Chimie des Composés Bio-organiques (UJF-CNRS UMR 5616 ; Pr. P. Dumy) et le Groupe de Recherche sur le Cancer du Poumon (INSERM U578 ; Pr. M.-C. Favrot). Mes travaux ont concerné d'une part la synthèse de ces molécules vectrices et d'autre part l'étude de leurs propriétés biologiques.

I. Le Cancer : Situation Actuelle.

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anormale des cellules d'un tissu ou d'un organe, par leur pouvoir d'envahissement local et leur capacité à métastaser à distance du foyer primitif. La cancérologie est aujourd'hui face à un double enjeu : le diagnostic précoce des tumeurs et le développement de nouveaux traitements ciblés. Au plan diagnostique, le développement d'outils permettant de détecter les étapes précoces des cancers favorisera le repérage des lésions tumorales à des stades où les différents traitements à la disposition des cliniciens, chirurgicaux, chimiothérapiques ou radiothérapiques, offrent une plus grande efficacité et des chances de guérison plus grandes. Au plan du traitement des tumeurs, la mise au point d'agents anti-cancéreux ciblés, agissant spécifiquement sur les mécanismes de la cancérogenèse, permettra d'en améliorer l'efficacité thérapeutique ainsi que la tolérance.

I.1. Données épidémiologiques.

Dans le monde, le cancer touche environ 10 millions de personnes. Les néoplasies les plus fréquentes chez les hommes sont en tout premier les cancers du poumon, dont l'incidence dépasse 900 000 nouveaux cas par an, suivis rapidement de ceux de la prostate, de l'estomac, du colon et du rectum, du foie, de l'œsophage puis de la vessie, dont les incidences sont supérieures à 200 000 nouveaux cas par an.¹ Chez les femmes, les cancers du sein arrivent largement en tête avec plus d'un million de nouveaux cas diagnostiqués chaque année, suivis de ceux du col utérin, du colon et du rectum, du poumon et de l'estomac, dont les incidences sont supérieures à 200 000 nouveaux cas par an.¹ (cf. Figure 1)

¹ Ferlay, J.; Bray, F.; Pisani, P.; Parkin, D. M. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, GLOBOCAN 2002. *IARC Cancer Base, IARC Press Lyon 2004, N°5 version 2.0* (<http://www-depdb.iarc.fr>).

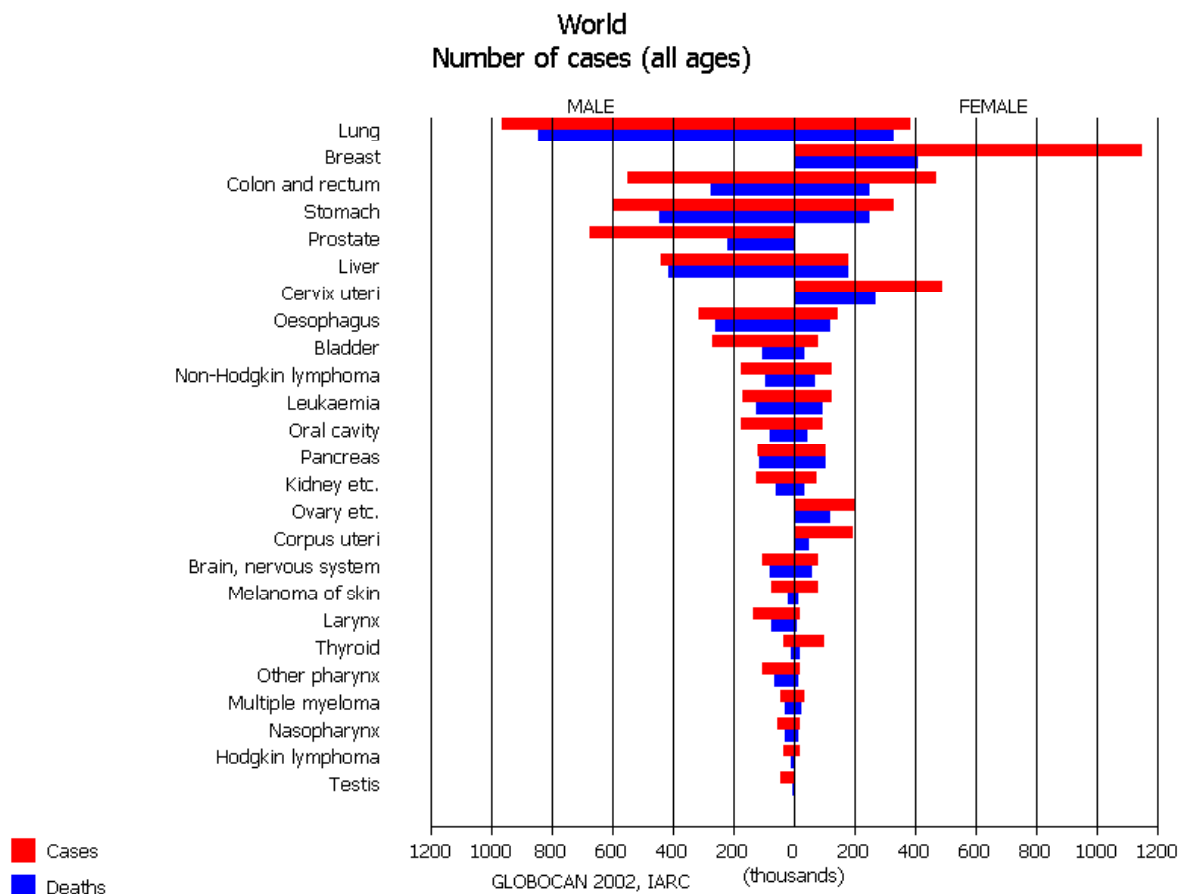


Figure 1 : Graphique de l'incidence (milliers de nouveaux cas/an) et de la mortalité (milliers de morts/an) par type de cancer dans le monde en 2002.

Source : <http://www-depdb.iarc.fr/>, GLOBOCAN 2002

En France, en 2000, les nouveaux cas de cancer ont été estimés à 278 253 et les décès par cancer à 150 045.² (cf. Annexe 2) De fait, le cancer apparaît comme la deuxième cause de mortalité chez les femmes, après les maladies cardio-vasculaires, et la première chez les hommes (en 2000, 33% des décès chez les hommes ont été liés au cancer, 23% chez les femmes).³ Chez les hommes, si le cancer de la prostate arrive largement en tête des cancers dépistés (40 209 nouveaux cas en 2000),⁴ c'est le cancer du poumon le plus létal avec 22 649 décès en 2000.^{2,3,4,5} Chez les femmes, le cancer du sein est au premier rang à la fois en termes d'incidence (41 845 nouveaux cas en 2000)⁴ et de mortalité (11 637 décès en 2000).^{2,3,4,5} Si le cancer du poumon occupe la quatrième place en termes d'incidence (hommes et femmes

² Rapport de la commission d'orientation sur le cancer 2003.

³ INSERM CépiDC (<http://sc8.vesinet.inserm.fr:1080>).

⁴ Réseau FRANCIM : Réseau Français des Registres de Cancer 2000.

⁵ International Agency for Research on Cancer (IARC). <http://www.iarc.fr>.

confondus), son mauvais pronostic lui confère en revanche la première place en termes de mortalité.

Véritable fléau sanitaire, le cancer est un problème majeur de santé publique en France. La lutte contre le cancer a été désignée comme l'une des priorités du secteur santé et fait l'objet du Plan Cancer 2003-2007.

I.2. Les méthodes traditionnelles employées pour le diagnostic et le traitement des cancers.

I.2.1 – Diagnostic des cancers.

Les examens complémentaires utilisés à l'heure actuelle pour le diagnostic des cancers relèvent essentiellement des techniques d'imagerie traditionnelles et de l'analyse des prélèvements réalisés sur le patient. Le diagnostic d'une tumeur est toujours confirmé par un examen anatomo-pathologique.

Les méthodes d'imagerie comprennent :

- La radiographie :

Les radiographies standards utilisant les rayons X permettent de visualiser des anomalies au niveau des os, du crâne et des poumons. L'absorption d'un produit opaque aux rayons X (iode) permet d'améliorer le contraste des images obtenues et d'étendre l'observation aux organes creux. La tomographie permet d'étudier des images en coupe (épaisseur de l'ordre du cm) et d'obtenir le détail d'un organe ou de la tumeur. Le scanner (ou tomodensitométrie), qui correspond à la réalisation d'images selon différents plans pour chaque coupe (épaisseur des coupes comprises entre 1 et 10 mm), permet de caractériser parfaitement la situation et les dimensions de la tumeur ainsi que de visualiser des extensions ganglionnaires ou métastatiques.

- L'échographie :

La réflexion des ultrasons (phénomène d'écho) est utilisée pour l'exploration des organes profonds. Non transmis par l'air et les os, ils ne conviennent pas à l'analyse des organes creux, des os ou du système nerveux.

- L'IRM :

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet d'explorer les organes mous riches en eau, comme le cerveau, la moelle épinière ou la moelle osseuse. Elles permettent ainsi d'observer des tumeurs dans des zones difficilement accessibles (tumeurs primitives du cerveau et des os, métastases cérébrales, de la colonne vertébrale et de la moelle épinière).

- Les techniques nucléaires :

La scintigraphie permet la visualisation des zones d'hypo- ou d'hyperfixation des substances radioactives préalablement injectées au patient (agent de contraste très souvent le ^{99m}Tc). Elle est surtout utilisée pour les os, la thyroïde, le rein, les poumons et le cerveau. On distingue la tomo-scintigraphie, qui permet d'obtenir plusieurs images selon un niveau de coupe, et l'immuno-scintigraphie, qui utilise un anticorps couplé à un agent de contraste. La technique plus récente de PETscan (tomographie par émission de positons) permet de réaliser de l'imagerie fonctionnelle grâce à l'utilisation de métabolites radioactifs, comme le ^{18}F -2-fluoro-2-desoxyglucose (FDG), rendant compte de l'activité métabolique d'un organe et s'accumulant préférentiellement dans les tumeurs.

- L'endoscopie :

Elle permet essentiellement la visualisation de lésions sur des organes creux (coloscopie, fibroscopie bronchique) et de réaliser des prélèvements d'échantillons de tissus sur des zones suspectes (biopsie).

Les prélèvements réalisés sur les patients comprennent les prélèvements sanguins, urinaires et tissulaires (biopsies ou pièces opératoires).

Sur les prélèvements biologiques sanguins ou urinaires, il est possible, pour certains types de cancers, de procéder à la recherche de marqueurs tumoraux circulants. Ces substances, absentes ou présentes à de faibles taux chez le sujet sain, atteignent un niveau anormalement élevé dans le cas de certains cancers du fait de leur sécrétion par les cellules tumorales. Elles ne présentent pas de spécificité absolue, mais permettent de suspecter la présence d'un cancer. L'élévation de ces marqueurs tumoraux constitue un argument permettant d'orienter le diagnostic. Certains tests de dépistage reposent sur ce principe, comme par exemple le dosage des PSA (*Prostate Specific Antigen*) pour le dépistage du cancer de la prostate. Les principaux marqueurs sont :⁶

⁶ <http://www.oncoprof.net/Generale2000>.

✎ des protéines onco-fœtales, comme l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) et l'alpha-foeto-protéine (AFP),

✎ des hormones, comme l'hormone gonadotrophique placentaire (HCG), la thyrocalcitonine, la corticostimuline (ACTH), la calcitonine et la vasopressine (ADH),

✎ des enzymes, comme les phosphatases acides prostatiques, la phosphatase alcaline, la lactico-deshydrogenase (LDH) ou l'énolase neurone spécifique (NSE),

✎ les antigènes associés aux tumeurs, comme les CA 125 (non spécifique du type de tumeur), CA 15-3 (adénocarcinomes du sein, de l'ovaire et du poumon), CA 19-9 (cancers du pancréas, du colon, du rectum et de l'estomac) et PSA (lésions prostatiques).

Une fois la tumeur localisée, l'exérèse d'un fragment d'organe ou le prélèvement localisé de tissu permet l'étude histologique de la tumeur, étape indispensable à l'affirmation du diagnostic. L'examen histologique associé à l'imagerie permettent le diagnostic d'extension et la réalisation du bilan pré-thérapeutique précédant le choix du protocole thérapeutique le plus adapté.

Précisons que la détection tardive de certains marqueurs tumoraux circulants, au stade de maladie avancée, limite leur intérêt en termes de dépistage. Ces molécules, non suffisamment sensibles ou spécifiques quant à leur valeur diagnostique, n'ont d'intérêt que dans le cadre des suivis thérapeutiques. En ce qui concerne les techniques d'imagerie traditionnelles, elles permettent aujourd'hui aux cliniciens de diagnostiquer et de surveiller une tumeur, mais ne sont souvent réalisées qu'à un stade déjà avancé de la maladie : de nombreux cancers ne sont pas décelés avant la survenue des métastases. Les progrès dans l'amélioration du diagnostic des cancers attendent beaucoup du développement de sondes capables de détecter les stades précoces de la progression tumorale et de visualiser des micro-métastases. Ces recherches sont au cœur d'une thématique en plein essor : l'imagerie moléculaire. Elle a pour but la conception de sondes moléculaires reconnaissant des phénomènes biologiques spécifiques des cancers et permettant de les imager au moyen des techniques d'imagerie médicale.

I.2.2 – Principaux traitements des cancers.

Malgré les progrès récents des autres moyens de traitement, il est important de préciser que la chirurgie demeure, à ce jour, la thérapeutique pivot du traitement de la majorité des affections tumorales (en dehors des cancers immuno-hématologiques). Les médecins tentent

toutefois de l'intégrer dans des plans thérapeutiques comprenant des actes complémentaires adjuvants comme la radio- et la chimiothérapie. Ces deux techniques constituent à ce jour les deux moyens essentiels de la thérapie anti-cancéreuse.

a) La radiothérapie.

Les rayonnements ionisants, provoquant des lésions sur l'ADN et induisant l'apoptose des cellules, sont utilisés pour détruire les cellules cancéreuses. Dans le cas de la radiothérapie externe, la source de rayonnement est située à distance du patient et le champ d'irradiation est adapté après repérage de la tumeur par le radiothérapeute. La curiethérapie suggère une source de rayonnement implantée dans la tumeur après absorption de molécules radioactives libérant un rayonnement à petite distance. Elle est surtout utilisée dans le cas de petites tumeurs et dans les cancers gynécologiques, les cancers du sein, de la bouche et de la peau. A la différence de la radiothérapie externe, le rayonnement photonique utilisé traverse d'abord la tumeur, où il s'atténue rapidement, ce qui permet de limiter l'irradiation des tissus sains adjacents. Elle présente alors l'avantage de pouvoir délivrer une dose importante de rayonnement dans un volume étroit avec, en principe, une dose satellite réduite.

La radiothérapie est aujourd'hui utilisée pour traiter un malade cancéreux sur deux en France.

b) La chimiothérapie.

Les drogues de chimiothérapie anti-cancéreuse classique sont des molécules capables de tuer les cellules en prolifération et donc d'atteindre la cellule cancéreuse au moment où elle se divise, en perturbant le mécanisme de la division cellulaire. Les grandes classes d'agents de chimiothérapie comprennent :

• Les anti-métabolites.

Ils inhibent la biosynthèse des acides nucléiques. Inhibiteur de la dihydrofolate réductase, le méthotrexate empêche la synthèse de l'acide folinique, indispensable pour la synthèse de l'uridine et de la thymidine. Cette catégorie comprend également les substances leurres, de structure chimique semblable à celles des composants métaboliques intermédiaires, et notamment les anti-pyrimidiques (leurres de la cytosine, de la thymine ou de l'uracile), dont le 5-fluoro-uracile (5-FU) ou la cytosine arabinoside, et les anti-puriques (leurres de l'adénine ou de la guanine), dont la 6-mercapto-purine ou la thio-guanine. Se rapproche de

cette famille la L-asparaginase qui détruit le pool de L-asparagine circulante et prive les cellules cancéreuses de cet acide aminé essentiel.

- Les agents alkylants.

Ces substances forment un lien covalent avec les acides nucléiques. Empêchant le dédoublement des deux brins d'ADN, ils inhibent la transcription et bloquent la division cellulaire. On distingue les alkylants mono-fonctionnels, comme le cyclophosphamide (EndoxanTM), et les agents bi-fonctionnels pontant les deux bras d'ADN, comme le cisplatine (CisplatylTM). Appartiennent également à cette classe de molécules les nitrosourées, comme la carmustine (BICNUTM) et la mitomycine (AmétycineTM).

- Les inhibiteurs de topo-isomérase.

Les topo-isomérase sont des enzymes indispensables pour dérouler la double hélice d'ADN avant les étapes de transcription et de réplication. On peut distinguer les inhibiteurs de topo-isomérase de type I comme l'irinotécan (CamptoTM) ou le topotécan (HycamtinTM), qui empêchent la reconstitution du brin d'ADN après la coupure, et les inhibiteurs de topo-isomérase de type II comme le VP-16/etoposide (VepesideTM), qui empêche la soudure du double brin d'ADN.

- Les agents intercalants.

Les chefs de file de ces composés appartiennent à la famille des anthracyclines : doxorubicine (AdriamycineTM), daunorubicine (CerubidineTM), epirubicine (FarmorubicineTM), et mitoxantrone (NovantroneTM). De structure plane, leur mode d'action supposé initialement était une intercalation entre les brins de l'ADN. Plus récemment, un mécanisme de compétition avec les topo-isomérase a également été proposé.

- Les molécules induisant des coupures de brin.

La bléomycine (BléomycineTM) semble être le seul médicament ayant une action destructive directe de l'ADN.

- Les poisons du fuseau cellulaire.

Ils empêchent la formation du fuseau mitotique et inhibent la séparation et la migration vers les pôles des chromosomes dédoublés. Les principaux médicaments en tête de cette liste sont la vincalécoblastine (VelbéTM), la vincristine (OncovinTM), la vindésine (EldésineTM) et la vinorelbine (NavelbineTM).

- Les taxanes.

S'associant à la tubuline, ces molécules ont la particularité de stabiliser les microtubules au détriment de la tubuline soluble et d'interrompre la division cellulaire dans la

transition G2-M. Paclitaxel (TaxolTM) et docétaxel (TaxotèreTM) sont les deux drogues de cette famille à la disposition des cliniciens.

Les protocoles actuels de chimiothérapie associent, le plus souvent, des molécules ayant des mécanismes d'action différents (polychimiothérapie), permettant l'additivité de leurs effets, voire parfois une synergie entre des familles thérapeutiques. (e.g. doxorubicine/cyclophosphamide/docétaxel dans le traitement du cancer du sein ou paclitaxel/cisplatine pour les cancers de l'ovaire)⁷

L'inconvénient majeur de ces traitements est leur manque de sélectivité pour les cellules malignes. Les effets secondaires, observés sur les tissus sains actifs, sont dus à l'absorption des drogues par les cellules qui se multiplient rapidement, notamment les cellules sanguines, les cellules de la moelle osseuse, des cheveux, de la peau, des muqueuses et de la bouche. Ils empêchent l'utilisation de posologies suffisamment élevées pour éliminer toutes les cellules tumorales de l'organisme. Par ailleurs, les phénomènes de résistance, spontanée ou acquise, de certaines tumeurs aux drogues de chimiothérapie limitent leur efficacité thérapeutique. Il apparaît donc incontournable de développer de nouvelles méthodes plus efficaces et de mettre au point des agents anti-cancéreux ciblés, adaptés au phénotype tumoral, de façon à réduire les effets perniciose des chimiothérapies sur les organes sains, tout en les concentrant sur les tissus à détruire. Par ailleurs, l'agressivité des cancers provenant essentiellement de leur potentiel à métastaser à distance, la conception de drogues toxiques ciblées, capables de s'opposer à la formation des métastases, est une piste qu'il est important d'explorer.

Pour comprendre les fondements de ces nouvelles stratégies, nous exposons d'abord les mécanismes de la cancérogenèse.

I.3. Mécanisme de la cancérogenèse.

Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules de l'organisme, qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de

⁷ National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/>.

leur prolifération, et acquièrent des propriétés de migration leur permettant d'envahir tout l'organisme. Le développement et l'évolution d'un cancer comporte trois grandes phases :

- ◆ la transformation maligne d'une cellule normale d'un tissu ou d'un organe en cellule cancéreuse (tumorigenèse ou carcinogénèse) et sa prolifération incontrôlée (désordre monoclonal),
- ◆ l'angiogénèse et l'extension locale de la tumeur,
- ◆ l'invasion ganglionnaire (invasion régionale) puis métastatique (invasion à distance).

Il est aujourd'hui bien établi que le cancer est une maladie liée à des changements dynamiques dans le génome et que la tumorigenèse est un processus multi-étape mettant en jeu plusieurs altérations géniques successives. Celles-ci affectent principalement les gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, dans les phénomènes d'adhérence cellulaire, ainsi que dans les processus de réparation des lésions de l'ADN. Les gènes impliqués dans la carcinogénèse sont habituellement classés en deux familles :

➤ Les oncogènes :

Stimulés lors de la transformation maligne, ils codent pour des facteurs qui entraînent la perte du contrôle de la croissance cellulaire. Leur expression est dominante, la présence d'un seul exemplaire de l'oncogène suffit à l'expression du phénotype altéré de son produit. Ces oncogènes comprennent, entre autres, les oncogènes qui codent pour des facteurs de croissance ou leur récepteur (e.g. sis, erbb), des protéines kinases cytoplasmiques (e.g. src, raf), des facteurs de transcription (e.g. myc), des protéines inductrices de l'apoptose (e.g. bcl-2) ou encore les protéines impliquées dans les processus de réparation de l'ADN.

➤ Les gènes suppresseurs de tumeurs :

Ces gènes sont à l'inverse réprimés lors de la transformation maligne. Leur expression étant récessive, les deux exemplaires du gène normal doivent alors être perdus ou mutés pour que disparaisse le rôle protecteur. Le plus connu de ces gènes est le suppresseur de tumeur p53 qui est altéré dans 50% des cancers. Une dizaine d'autres gènes de cette famille sont aujourd'hui connus ou fortement présumés : APC, DCC, NF1, NF2, RB, RET, VHL, WT-1, BRCA-1, BRCA-2.

Les modifications de l'expression de ces gènes ou de l'activité de leur produit peuvent résulter de modifications génétiques, à savoir d'une lésion directe du gène considéré suite à une mutation, une translocation, un réarrangement chromosomique, une délétion, une

amplification génique ou une perte ou un gain de chromosome entier. Elles peuvent également provenir de mécanismes épigénétiques, tels que les modifications de la chromatine (e.g. acétylation des histones) ou la méthylation des promoteurs (inhibition de la transcription).

Hanahan & Weinberg ont décrit six propriétés essentielles acquises par les cellules cancéreuses et responsables du caractère malin des tumeurs :⁸ (cf. Figure 2)

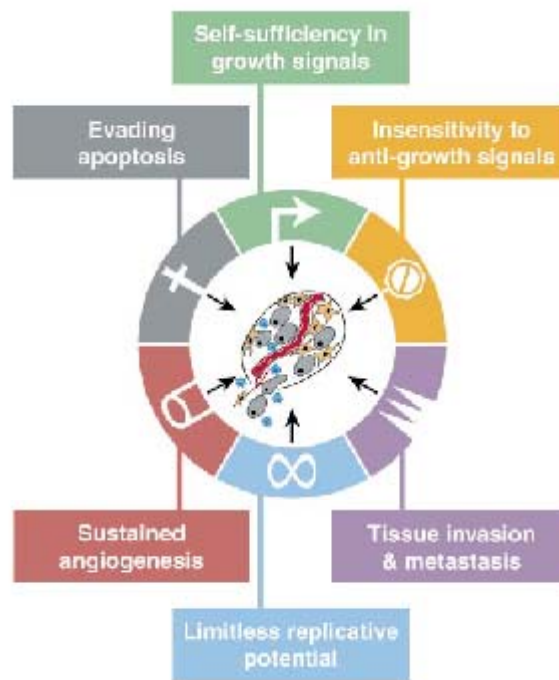


Figure 2 : Illustration des six principales propriétés acquises par les cellules cancéreuses et responsables du caractère malin des tumeurs.

Source : Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70

- Leur autosuffisance en signaux qui stimulent la croissance cellulaire.

Les mécanismes par lesquels la cellule cancéreuse acquiert une capacité de croissance exagérée et une entière autonomie sont nombreux et concernent aussi bien les signaux de croissance extracellulaire, les transducteurs cellulaires, que les circuits intracellulaires. Dans le cas des cellules normales, le passage de l'état quiescent à l'état actif de prolifération est gouverné par un ensemble de signaux de croissance mitogènes solubles provenant

⁸ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.

essentiellement de voies de signalisation hétérotypiques (signaux paracrines ou endocrines). La cellule maligne développe, elle, une propre boucle de stimulation autocrine conduisant à la génération de ses propres signaux de croissance (e.g. TGF α dans les sarcomes ; PDGF dans les glioblastomes). Ceci n'exclut pas les stimulations hétérotypiques induisant la production de ces facteurs notamment par le stroma tumoral. Par ailleurs, la surexpression des récepteurs de facteurs de croissance ainsi que leur mutation et activation constitutionnelle rendent la cellule cancéreuse hypersensible à des taux faibles en facteurs de croissance et induisent une signalisation souvent indépendante de la présence ou non du ligand (e.g. EGFR/erbB dans les tumeurs de l'estomac, du sein et du cerveau ; HER2/neu dans les carcinomes mammaires et gastriques). Les mécanismes les plus complexes conduisant à l'autonomie des cellules tumorales concernent toutefois l'aval des circuits de signalisation, notamment l'altération de certains maillons des chaînes de transduction (e.g. mutation du gène Ras dont le produit est impliqué dans la cascade de signalisation SOS-Ras-Raf-MAP kinase).

- Leur insensibilité aux inhibiteurs physiologiques de la croissance cellulaire.

La perte du contrôle de la prolifération cellulaire peut mettre en jeu l'inactivation des mécanismes de contrôle physiologique du cycle cellulaire (e.g. p53, Rb, p16 et autres inhibiteurs de cdk) ainsi que l'inactivation du récepteur ou de la chaîne de transduction de signaux anti-prolifératifs, comme dans le cas du TGF β . Elle peut encore intervenir par l'échappement à la différenciation cellulaire finale, notamment par la surexpression de la protéine Myc dont le complexe avec Max stimule la croissance au détriment de la différenciation induite par le complexe Mad-Max.

- Leur résistance à la mort cellulaire programmée.

Les cellules normales disposent de plusieurs systèmes capables de détecter des situations extra- ou intracellulaires anormales et d'émettre des signaux en conséquence dirigés vers les effecteurs de la mort apoptotique. Les situations extracellulaires sont jugées par des couples ligand/récepteur capables d'induire des signaux de survie (e.g. IGF-1, IGF-2/IGF-1R ou IL-3/IL-3R) ou des signaux de mort (e.g. FAS/FASR ou TNF α /TNFR1). Les cellules tumorales échappent à l'apoptose par la sécrétion autocrine de facteurs de survie cellulaire (e.g. IGF-1, IGF-2, IL-3) et l'inactivation des récepteurs des facteurs de mort. A l'intérieur de la cellule normale, les détecteurs sont éveillés par des dérèglements comme les dommages de l'ADN, l'insuffisance de signaux de survie ou l'hypoxie, et activent la voie apoptotique. Les

protéines de la famille de Bcl-2 assurent ce rôle de gardien et comprennent des membres anti-apoptotiques (e.g. Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w) et des membres pro-apoptotiques (e.g. Bax, Bak, Bad, Bid, Bim). Ces protéines sont très souvent dérégulées dans les cellules tumorales.

- Leur capacité de réplication illimitée.

Les cellules tumorales acquièrent une capacité de division illimitée par échappement à la mort par sénescence. L'immortalisation peut provenir de la dérégulation du gène de la télomérase, enzyme impliquée dans l'addition des séquences télomériques, ou de l'activation de mécanismes alternatifs permettant la maintenance des télomères.

- Leur capacité d'induire une néo-angiogenèse.

La néo-angiogenèse est un processus physiopathologique clé de la progression tumorale. Elle intervient à une étape critique de la croissance de la tumeur. En effet, si dans les phases précoces de la croissance de la tumeur (diamètre $\leq 1-2$ mm)⁹ les phénomènes de diffusion permettent l'alimentation de la tumeur en oxygène et nutriments (phases qualifiées d'avasculaires ou de quiescentes), en revanche lorsque la taille de la tumeur dépasse 2 mm, le simple apport en nutriments par diffusion ne suffit plus. La tumeur entre alors dans une phase dite vasculaire ou angiogénique, au cours de laquelle les cellules cancéreuses libèrent des stimuli angiogéniques en direction des vaisseaux sanguins proximaux du tissu hôte. Ces stimuli appellent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et le développement d'un nouveau réseau vasculaire autour de la tumeur.¹⁰ Alors que des cellules normales en prolifération n'ont à priori pas de potentiel angiogénique, les cellules cancéreuses, menacées de nécrose hypoxique, sont capables de déréguler l'équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs de l'angiogenèse en augmentant la production des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ou les FGF-1 et -2 et en diminuant la régulation des inhibiteurs comme la thrombospondine-1 ou l'interféron β (« angiogenic switch »). La formation des ramifications vasculaires rapproche les vaisseaux nourriciers et soutient la croissance de la tumeur. Elle favorise d'autre part le passage des cellules tumorales dans la circulation sanguine et augmente donc les risques de formation de foyers métastatiques secondaires dans des organes éloignés. La densité de vascularisation tumorale a été associée à l'agressivité des tumeurs,

⁹ Griffioen, A. W.; Molema, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 237-268.

¹⁰ Folkman, J. Tumor angiogenesis. In : *The Molecular Basis of Cancer* Editors : Mendelson, J.; Howley, P.M.; Israel, M.A.; Liotta, L.A. Philadelphia Saunders **1995**, 206-232.

mesurée par l'incidence des métastases et la survie des patients. En effet, de nombreuses études cliniques ont montré une corrélation entre la densité des micro-vaisseaux tumoraux, l'apparition de métastases, la rechute et le faible pronostic des patients.^{11,12,13,14}

Indispensable à la progression de la tumeur, la néo-angiogenèse est une cause fondamentale de la malignité des cancers et donc une cible thérapeutique convoitée. Ces considérations sont développées dans le deuxième chapitre de cette introduction.

- Leur capacité d'invasion des tissus et de formation de métastases.

La progression tumorale se poursuit par l'extension ganglionnaire de la tumeur suite à l'envahissement régional des voies du drainage lymphatique par les cellules tumorales, puis par l'extension métastatique suite au passage des cellules malignes dans la circulation sanguine. Ces phénomènes sont dus à la perte ou aux modifications, sur les cellules tumorales, de glycoprotéines de surface assurant dans les phénomènes normaux la reconnaissance des cellules d'un même tissu les unes par rapport aux autres et la constitution des tissus organisés (e.g. les cadhérines). La perte de ces molécules d'adhésion intercellulaires et, dans le même temps, la sur-expression anormale de molécules d'adhésion cellule/tissu interstitiel (e.g. les intégrines) confèrent aux cellules tumorales des propriétés inhabituelles de migration. Libérant par ailleurs des enzymes responsables de la dissolution de la membrane basale (e.g. collagénase, stromélysines, plasmine, cathépsines), les cellules tumorales envahissent peu à peu la membrane basale et pénètrent la membrane des capillaires lymphatiques et sanguins. La présence des cellules tumorales dans la circulation sanguine leur permet alors d'envahir des régions éloignées de l'organisme et d'y établir des foyers tumoraux secondaires (métastases). L'extension métastatique concerne essentiellement les organes de filtration du volume sanguin et les sites de drainage habituels des organes : les poumons, le foie, les os et le cerveau sont les organes de localisation préférentielle des métastases. Le développement des métastases constitue la gravité du processus cancéreux. Contrairement à une tumeur localisée, un cancer diffus et généralisé est souvent au delà de toute possibilité curative.

¹¹ Weidner, N.; Semple, J. P.; Welch, W. R.; Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 1-8.

¹² Zhang, L.; Conejo-Garcia, J. R.; Katsaros, D.; et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 203-213.

¹³ Weidner, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am. J. Pathol.* **1995**, *147*, 9-19.

¹⁴ Takahashi, Y.; Kitadai, Y.; Bucana, C. D.; Cleary, K. R.; Ellis, L. M. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3964-3968.

I.4. Les nouvelles thérapies ciblées.

Les nombreux progrès réalisés au cours des quinze dernières années dans les domaines de la biologie moléculaire et de la génomique ont largement contribué à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui gouvernent la croissance tumorale. Ces progrès se sont traduits par le développement de nouvelles molécules ciblant des anomalies spécifiques des cellules cancéreuses.

Les plus grands succès de ces thérapies ciblées ont majoritairement été obtenus avec des anticorps monoclonaux :

❖ Le trastuzumab (Herceptin™).

Il s'agit d'un anticorps monoclonal murin humanisé IgG1, dirigé contre le récepteur de facteur de croissance HER2/neu surexprimé à la surface des cellules cancéreuses mammaires chez environ 20% des patientes.

❖ Le rituximab (Mabthéra™).

C'est un anticorps chimérique murin humanisé (régions constantes d'une IgG1 humaine et régions variables des chaînes légères et lourdes d'origine murine) dirigé contre l'antigène CD20 présent dans les lymphomes folliculaires de stade III-IV et les lymphomes non-hodgkiniens agressifs à grandes cellules B.

❖ L'alemtuzumab (Mabcampathcetuximab™).

C'est un anticorps monoclonal IgG1κ humanisé spécifique de la glycoprotéine CD52 située à la surface des lymphocytes. Il est indiqué dans le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques.

❖ Le bevacizumab (Avastine™).

Cet anticorps monoclonal humanisé est dirigé contre le VEGF, facteur stimulant la formation des vaisseaux sanguins tumoraux.

Quelques petites molécules, aux modes d'action élégants, ont également été validées :

❖ L'imatinib (Glivec™).

C'est un inhibiteur sélectif très puissant des tyrosine kinases abl produites en grandes quantités dans les leucémies myéloïdes chroniques suite à la fusion de l'oncogène c-abl du chromosome 9 avec des séquences proches de la région bcr du chromosome 22 (chromosome de Philadelphie contenant le gène fusionné bcr-abl). Ce composé a également montré une

activité remarquable sur les tumeurs ayant une activité tyrosine kinase augmentée et surexprimant l'oncogène c-kit, en particulier les sarcomes du stroma gastrointestinal et les cancers bronchiques à petites cellules.

❖ Le gefitinib (Iressa™) et l'erlotinib (Tarceva™).

Ces deux composés, inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'EGF (HER1), sont utilisés pour traiter des cancers du poumon non-à-petites cellules.

D'autres approches sont en cours de développement, comme l'utilisation d'inhibiteurs de farnesyle transférase, d'inhibiteurs des histones acétyl transférase ou des kinases cycline-dépendantes.

L'immunothérapie et le développement de vaccins synthétiques anti-tumoraux est également une piste explorée. Les cellules tumorales sont faiblement antigéniques (quasi-absence de réaction immunitaire au cancer). L'immunothérapie vise à stimuler la réponse immunitaire de l'organisme contre les cellules cancéreuses.

La thérapie génique est encore au stade expérimental et fait l'objet d'essais cliniques. Elle consiste à introduire un gène étranger dans la cellule tumorale pour remplacer un gène défectueux ou introduire un gène suicide. Si les chercheurs disposent aujourd'hui d'un large répertoire de gènes, permettant de s'attaquer en théorie à tous les types de tumeurs, il n'existe pas encore de vecteur à la fois efficace en termes de transfection, spécifique des cellules tumorales, non toxique et non immunogène, pour les véhiculer. Les vecteurs sont au cœur des recherches réalisées aujourd'hui dans le domaine de la thérapie génique.

Parmi ces nouvelles thérapies ciblées, l'approche consistant à inhiber la néo-angiogenèse des tumeurs constitue une voie très prometteuse, applicable à de nombreuses localisations cancéreuses. L'angiogenèse est indispensable à tous les stades de la progression des cancers : priver la tumeur de ses néo-vaisseaux revient à empêcher la croissance de la tumeur et doit limiter la formation des métastases. Cette approche est développée dans le deuxième chapitre de cette introduction.

II. Caractéristiques de la Néo-angiogenèse Tumorale et Stratégie de Ciblage via l'Intégrine $\alpha_V\beta_3$.

L'observation de la vascularisation des tumeurs date de plus d'un siècle (Virchow, 1863, Die Krankhaften Geschwülste). Dans la première moitié du 20^{ième} siècle, Goldman,¹⁵ Warren¹⁶ et Chalkley¹⁷ ont été parmi les premiers à décrire l'angiogenèse tumorale. C'est au tout début des années 1970, après avoir été reconnue comme une étape critique, indispensable au développement des tumeurs, qu'elle a été désignée comme cible thérapeutique pour le traitement du cancer.¹⁸ Un peu plus de 30 ans plus tard, en 2004, le premier médicament inhibiteur de l'angiogenèse pour le traitement du cancer a reçu son autorisation de mise sur le marché par la FDA¹⁹ aux Etats-Unis : l'Avastine[®], anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF (facteur de croissance pro-angiogénique).

II.1. La néo-angiogenèse tumorale.

II.1.1 – Mécanisme de formation des vaisseaux sanguins tumoraux.

Le terme d'angiogenèse désigne le processus de croissance et de réorganisation d'un réseau vasculaire primitif conduisant à la formation d'une architecture complexe de nouveaux vaisseaux. Le mécanisme d'induction de la néo-angiogenèse tumorale le plus souvent avancé est la production de nouvelles ramifications à partir des vaisseaux sanguins existants. Six phénomènes distincts peuvent alors être identifiés lors de ce processus.²⁰ (cf. Figure 3)

¹⁵ Goldman, E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* **1907**, 2, 1236-1240.

¹⁶ Ide, A. G.; Baker, N. H.; Warren, S. L. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma. *Am. J. Radiol.* **1939**, 42, 891-899.

¹⁷ Algire, G. H.; Chalkley, H. W. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* **1945**, 41, 111-124.

¹⁸ Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **1971**, 285, 1182-1186.

¹⁹ Food and Drug Administration.

²⁰ Bamias, A.; Dimopoulos, M. A. Angiogenesis in human cancer : implications in cancer therapy. *Eur. J. Int. Med.* **2003**, 14, 459-469.

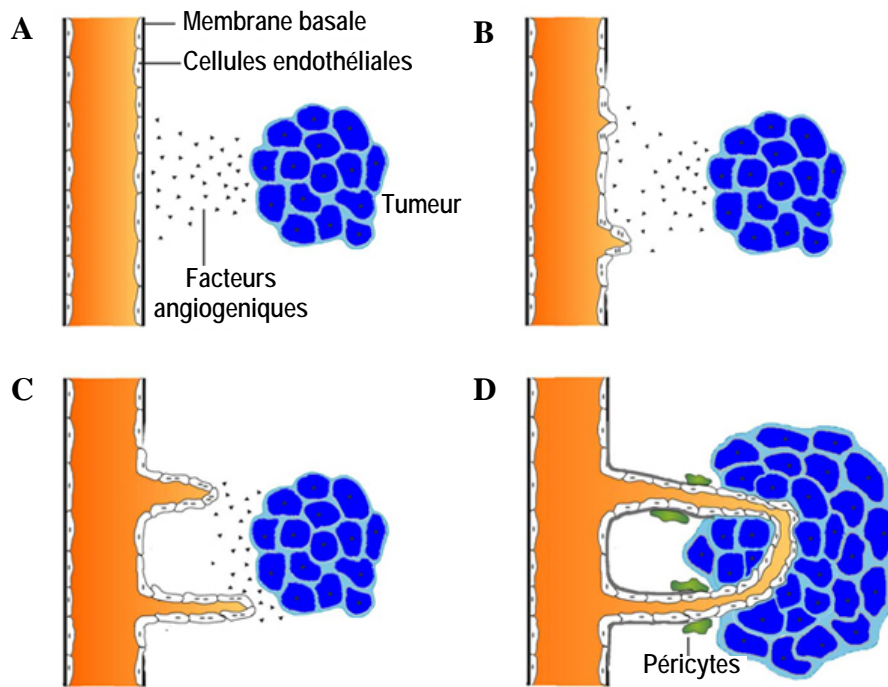


Figure 3 : Illustration des principales étapes de la formation des vaisseaux sanguins tumoraux. A/ Emission des facteurs pro-angiogéniques et activation des cellules endothéliales des vaisseaux proximaux, B/ Dégradation de la membrane basale du vaisseau par les enzymes protéolytiques, C/ Migration orientée et prolifération des cellules endothéliales en direction de la source du stimulus angiogénique, D/ Consolidation des micro-vaisseaux formés par régénération de la membrane basale.

❖ *Dérégulation de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques.*

L'initiation du processus est sous le contrôle de la balance entre les signaux inhibiteurs et inducteurs de l'angiogénèse.²¹ Dans les conditions physiologiques (à l'exception des cas d'angiogénèse physiologique), ainsi que dans les tumeurs dormantes, les facteurs inhibiteurs dominent les activateurs. En réponse aux stimuli angiogéniques, la dérégulation de cette balance, appelé « angiogenic switch », conduit à la situation inverse où les molécules activatrices sont prédominantes et les inhibiteurs réprimés. (cf. Figure 4) Les principaux facteurs à l'origine de ce phénomène sont :

- les stress métaboliques : hypoxie, hypoglycémie,
- le stress mécanique : pression exercée par la prolifération des cellules tumorales,
- les réponses inflammatoires,
- et la dérégulation des gènes contrôlant les facteurs régulateurs de l'angiogénèse.²²

²¹ Bergers, G.; Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 401-410.

²² Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **2000**, 407, 249-257.

THE BALANCE HYPOTHESIS FOR THE ANGIOGENIC SWITCH

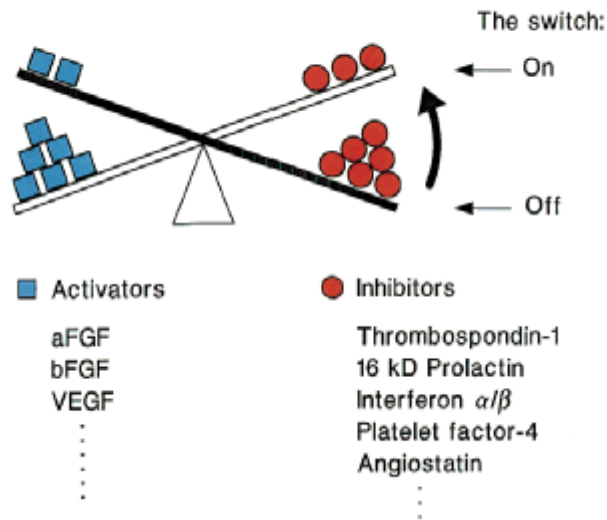


Figure 4 : Illustration de l'hypothèse de l'inversion de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques à l'origine de l'induction de la néo-angiogenèse tumorale.

Source : Hanahan, D.; Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **1996**, 86, 353-364

Les facteurs pro-angiogéniques sont sécrétés par les cellules tumorales, mais proviennent aussi des composants du stroma tumoral (fibroblastes, cellules musculaires lisses), des cellules inflammatoires ou de la matrice extracellulaire.²² Leur nature et leur contribution diffèrent en fonction du type et de la localisation de la tumeur. Toutefois, parmi les facteurs jouant un rôle central dans l'activation de l'angiogenèse, il faut citer principalement le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), les FGF (*fibroblast growth factors*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*) et le TNF α (*tumour necrosis factor α*). Les principaux inhibiteurs endogènes, régulés négativement, sont la thrombospondine-1, les interférons notamment l'IFN α , l'angiostatine, l'endostatine, le facteur plaquettaire-4 et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (TIMPs). (cf. Figure 5)

❖ *Activation des cellules endothéliales.*

Les facteurs pro-angiogéniques induisent l'activation des cellules endothéliales des vaisseaux au voisinage de la tumeur. Cette activation se traduit par la sur-expression de différentes protéines à la surface des cellules endothéliales, notamment les récepteurs des facteurs de croissance (récepteurs du VEGF, du FGF, de l'EGF, du PDGF) et des molécules d'adhésion comme la E-sélectine, l'endogline et les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$. Certaines

cellules endothéliales acquièrent en outre une forme étoilée riche en filopodes et ressemblant à celle des astrocytes. Ces cellules particulières, placées au front de migration, sont appelées « tip cells ».²³

	Stimulators	Inhibitors
Growth Factors	Angiogenin Angiotropin Epidermal growth factor (EGF) Fibroblast growth factor (acidic and basic) (FGF) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) Placental growth factor (PIGF) Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) Transforming growth factor alpha and beta (TGF- α/β) Tumour necrosis factor alpha (TNF- α) Vascular endothelial growth factor/Vascular permeability factor (VEGF/VPF)	Transforming growth factor beta (TGF- β) Tumour necrosis factor alpha (TNF- α)
Proteases and Protease Inhibitors	Cathepsin Gelatinase A,B Stromelysin Urokinase-type plasminogen activator (uPA)	Heparinases Plasminogen activator-inhibitor-1 (PAI-1) Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP-1, TIMP-2)
Endogenous Modulators	Alpha v beta 3 integrin Angiopoietin-1 Endothelin (ETB receptor) Erythropoietin Follistatin Hypoxia Leptin Midkine Nitric oxide synthase (NOS) Platelet-activating factor (PAF) Pleiotropin (PIN) Prostaglandin E Thrombopoietin	Angiopoietin-2 Angiostatin Caveolin-1, caveolin-2 Endostatin Fibronectin fragment Heparin hexasccharide fragment Human chorionic gonadotropin (hCG) Interferon α, β, γ Interferon inducible protein (IP-10) Isoflavones Kringle 5 (plasminogen fragment) 2-Methoxyoestradiol Placental ribonuclease inhibitor Platelet factor-4 Prolactin (16 Kd fragment) Proliferin-released protein (PRP) Retinoids Tetrahydrocortisol-S Thrombospondin Troponin-1 Vasculostatin Vasostatin (calreticulin fragment)
Cytokines	Interleukin-1 Interleukin-6 Interleukin-8	Interleukin-10 Interleukin-12
Signal Transduction Enzymes	Thymidine phosphorylase Farnesyl transferase Geranylgeranyl transferase	
Oncogenes	c-myc, ras, c-srs, v-raf, c-jun	p53, Rb

Figure 5 : Table récapitulative des principaux facteurs responsables de la stimulation et de l'inhibition du processus d'angiogenèse.

Source : Ziche, M.; Donnini, S.; Morbidelli, L. Development of new drugs in angiogenesis. *Curr. Drug Targets* **2004**, *5*, 389-406

²³ Gerhardt, H.; Golding, M.; Fruttiger, M.; Ruhrberg, C.; Lundkvist, A.; Abramsson, A.; Jeltsch, M.; Mitchell, C.; Alitalo, K.; Shima, D.; Betsholtz, C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 1163-1177.

❖ *Libération d'enzymes protéolytiques.*

Les facteurs mitogéniques stimulent la sécrétion d'enzymes protéolytiques, comme l'activateur du plasminogène (u-PA, *urokinase-type plasminogen activator*), les métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMPs), les collagénases, les chymases ou les cathépsines.²⁴ Ces enzymes sont responsables de la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire et de la membrane basale soutenant l'endothélium et permettent l'ouverture du vaisseau devant le foyer angiogénique. Ces enzymes sont également responsables de l'activation ou de la libération de facteurs de croissance (bFGF, VEGF, IGF-1) séquestrés dans la matrice extracellulaire.²⁵

❖ *Migration des cellules endothéliales et morphogénèse des capillaires.*

Le processus se poursuit par la migration orientée des cellules endothéliales vers la source du stimulus angiogénique et conduit au bourgeonnement des ramifications vasculaires. Cette étape fait intervenir des molécules d'adhésion spécialisées comme les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$.

❖ *Multiplification des cellules endothéliales.*

La prolifération rapide des cellules endothéliales permet la formation des micro-vaisseaux.

❖ *Différenciation de la micro-vascularisation.*

La différenciation en structure capillaire est réalisée par la régénération de la lame basale (cellules périvasculaires, comme les cellules musculaires lisses et les péricytes) qui consolide le vaisseau.

Deux autres mécanismes, plus rarement décrits, sont également connus pour conduire à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de la vascularisation existante : l'angiogénèse intussusceptive, caractérisée par l'élargissement et la séparation de vaisseaux déjà formés, et la septation, au cours de laquelle les cellules endothéliales prolifèrent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés. Ces mécanismes interviennent probablement plus

²⁴ Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **2000**, 6, 389-395.

²⁵ Coussens, L. M.; Raymond, W. W.; Bergers, G.; Laig-Webster, M.; Behrendtsen, O.; Werb, Z.; Caughey, G. H.; Hanahan, D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev.* **1999**, 13, 1382-1397.

tardivement, dans la phase d'état suivant la formation de la micro-vascularisation tumorale. Ils conduisent au remodelage de la structure des micro-vaisseaux formés et à leur maturation en macro-vaisseaux (consolidation péricytaire et marqueurs artériels).

II.1.2 – Caractéristiques des vaisseaux formés.

Intervenant dans les conditions aberrantes de la tumorigenèse, l'angiogenèse tumorale défie les règles des processus normaux et conduit à une architecture vasculaire chaotique et fragile (hémorragies fréquentes caractéristiques). Les vaisseaux formés sont structurellement et fonctionnellement différents des vaisseaux normaux.²² Ils sont désorganisés, entremêlés, irrégulièrement dilatés et anormalement ramifiés. Il en résulte une circulation irrégulière (voire à double sens) et un débit sanguin peu irriguant. La micro-vascularisation tumorale est, par ailleurs, exagérément perméable en raison de jonctions inter-endothéliales non-adhérentes et de la présence discontinue de membrane basale.²⁶ Le VEGF a été largement incriminé dans ce phénomène.²⁷ En termes de thérapie, cette caractéristique est un atout considérable pour faciliter l'extravasation de drogues au niveau de la tumeur.

L'endothélium tumoral est également tapissé de façon non-uniforme de molécules d'adhésion et de marqueurs de surface. Ces caractéristiques permettent en partie d'expliquer la faible adhérence des lymphocytes activés au tapis endothélial tumoral.²⁸

II.2. Stratégies anti-tumorales anti-angiogéniques.

La dépendance de la croissance tumorale et de la formation des métastases avec l'angiogenèse étant parfaitement établie, c'est Judah Folkman qui, en 1971, a suggéré l'inhibition de l'angiogenèse comme stratégie anti-tumorale.¹⁸ Une soixantaine de composés inhibiteurs de l'angiogenèse sont aujourd'hui en cours d'évaluation dans des protocoles cliniques de cancérologie. Seuls quelques-uns d'entre eux sont cités ici.

²⁶ Hashizume, H.; Baluk, P.; Morikawa, S.; McLean, J. W.; Thurston, G.; Roberge, S.; Jain, R. K.; McDonald, D. M. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1363-1380.

²⁷ Dvorak, H. F.; Nagy, J. A.; Feng, D.; Brown, L. F.; Dvorak, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**, *237*, 97-132.

²⁸ Jain, R. K.; Koenig, G. C.; Dellian, M.; Fukumura, D.; Munn, L. L.; Melder, R. J. Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Cancer Metastasis Rev.* **1996**, *15*, 195-204.

Comme nous venons de le voir, la formation des vaisseaux sanguins tumoraux est sous le contrôle de l'activation, de la prolifération, de l'adhésion, de la migration et de la différenciation des cellules endothéliales. Chacun de ces phénomènes constitue une cible potentielle pour le développement de molécules anti-angiogéniques.

❖ *Molécules inhibant la prolifération des cellules endothéliales.*

L'un des premiers composés identifiés, présentant une activité anti-proliférative spécifique des cellules endothéliales, est l'*O*-chloroacetylcarbamoyle fumagillol (TNP-470/AGM-1470), analogue synthétique de la fumagilline (antibiotique fongique).²⁹ Le mécanisme d'action de ce composé a été attribué à l'inhibition de l'entrée des cellules endothéliales en phase G₁ du cycle cellulaire.³⁰ L'identification des inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse a également conduit au développement de molécules angiostatiques, comme la thrombospondin-1,³¹ le facteur plaquettaire-4,³² l'angiostatine³³ ou l'endostatine.³⁴ Appartiennent à la même catégorie de molécules, la vasostatine et la restine, protéines endogènes angiostatiques. Toutefois, l'inconvénient majeur de l'utilisation de ces inhibiteurs naturels est leur manque d'efficacité dû à leur dégradation rapide dans l'organisme.

❖ *Molécules inhibant les activateurs de l'angiogénèse.*

L'inhibition de l'angiogénèse peut par ailleurs être induite par la séquestration des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF ou le FGF ou par l'inactivation de leurs récepteurs spécifiques. Appartiennent à cette famille différents types de molécules dont :

➤ le Bevacizumab, anticorps monoclonal humanisé contre le VEGF,

²⁹ Ingber, D.; Fujita, T.; Kishimoto, S.; Sudo, K.; Kanamaru, T.; Brem, H.; Folkman, J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* **1990**, *348*, 555-557.

³⁰ Castronovo, V.; Belotti, D. TNP-470 (AGM-1470): mechanisms of action and early clinical development. *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 2520-2527.

³¹ Good, D. J.; Polverini, P. J.; Rastinejad, F.; Le Beau, M. M.; Lemons, R. S.; Frazier, W. A.; Bouck, N. P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 6624-6628.

³² Gupta, S. K.; Hassel, T.; Singh, J. P. A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 7799-7803.

³³ O'Reilly, M. S.; Holmgren, L.; Shing, Y.; Chen, C.; Rosenthal, R. A.; Moses, M.; Lane, W. S.; Cao, Y.; Sage, E. H.; Folkman, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **1994**, *79*, 315-328.

³⁴ O'Reilly, M. S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W. S.; Flynn, E.; Birkhead, J. R.; Olsen, B. R.; Folkman, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **1997**, *88*, 277-285.

- le SU-5416, inhibiteur spécifique de la phosphorylation du récepteur à activité tyrosine kinase du VEGF (VEGF-R2/Flk-1/KDR),³⁵
- le SU-6668, inhibiteur des récepteurs des VEGF, FGF-2 et PDGF,
- l'Iressa (ZD1839), inhibiteur du récepteur de l'EGF,³⁶ et
- le Thalidomide, dont le mécanisme d'action n'est pas complètement identifié à ce jour (réduction de l'expression du VEGF, du bFGF, du TNF α et de l'IL-10).

Cette approche a été validée et récompensée par l'autorisation de mise sur le marché de l'Avastine[®] (bevacizumab) par la FDA en février 2004. Produit par la firme américaine Genentech, il est destiné à être utilisé en combinaison avec le traitement de chimiothérapie 5-fluorouracil pour le traitement des cancers métastatiques colo-rectaux primitifs (non-préalablement traités).

❖ *Molécules inhibant la dégradation de la matrice extracellulaire.*

L'utilisation d'inhibiteurs, naturels ou synthétiques, spécifiques des protéinases responsables de la dégradation des composants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale périvasculaire (MMP) constitue une autre approche. A cette classe de composés appartiennent les Batimastat, Marimastat, et Prinomastat (AG3340), inhibiteurs synthétiques de la plupart des métalloprotéases. De même, la forme recombinante du PEX (sous-produit naturel de dégradation de la MMP-2) bloque l'angiogenèse et la croissance des tumeurs *in vivo*.³⁷

❖ *Molécules inhibant les interactions des cellules endothéliales et de la matrice.*

Les composés agissant sur les molécules responsables des phénomènes d'adhésion et de migration des cellules endothéliales sur la matrice extracellulaire sont d'importants modulateurs de l'angiogenèse. C'est dans cette optique qu'ont été développés la Vitaxin et le Cilengitide, deux molécules liant le récepteur $\alpha_v\beta_3$. La Vitaxin est un anticorps monoclonal

³⁵ Fong, T. A.; Shawver, L. K.; Sun, L.; Tang, C.; App, H.; Powell, T. J.; Kim, Y. H.; Schreck, R.; Wang, X.; Risau, W.; Ullrich, A.; Hirth, K. P.; McMahon, G. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.* **1999**, 59, 99-106.

³⁶ Ziche, M.; Donnini, S.; Morbidelli, L. Development of new drugs in angiogenesis. *Curr. Drug Targets* **2004**, 5, 389-406.

³⁷ Brooks, P. C.; Silletti, S.; von Schalscha, T. L.; Friedlander, M.; Cheresch, D. A. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* **1998**, 92, 391-400.

humanisé dirigé contre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$,^{38,39} tandis que le Cilengitide (MD121974) est un petit peptide cyclique contenant le motif -RGD-.⁴⁰ Ce dernier, essentiel à nos travaux, est présenté dans la suite de ce chapitre.

❖ *Molécules présentant des mécanismes d'action divers.*

Diverses autres molécules ont montré des activités anti-angiogéniques spécifiques, notamment :

- le CAI (carboxyamidotriazole), inhibiteur du transport calcique transmembranaire,⁴¹
- l'Interleukin-12, activateur de l'expression de l'IFN α et répresseur de l'IL-10,
- le Coxib, inhibiteur de la cyclooxygénase-2.

Remarquons que l'angiogenèse intervenant chez l'adulte au cours de processus normaux (cicatrisation, élaboration de la muqueuse utérine lors du cycle menstruel, formation du placenta), il semble raisonnable de s'interroger sur l'effet de ces thérapies sur l'angiogenèse physiologique. Dans les modèles précliniques ou chez les patients, les anti-angiogéniques semblent n'avoir aucun effet sur la vascularisation quiescente. En revanche, des expériences récentes menées sur des souris gestantes ont montré que l'inhibition du récepteur du VEGF (VEGF-R2) entraîne un dysfonctionnement du corps jaune et provoque l'arrêt du développement embryonnaire.⁴²

II.3. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Il est désormais bien établi que le processus d'angiogenèse requiert la migration et l'adhésion des cellules endothéliales sur la matrice extracellulaire pour la formation des ramifications vasculaires. Ces deux phénomènes sollicitent l'intervention de molécules d'adhésion spécialisées, parmi lesquelles l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle important. Son rôle

³⁸ Brooks, P. C.; Clark, R. A.; Cheresh, D. A. Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science* **1994**, *264*, 569-571.

³⁹ Tucker, G. C. Alpha v integrin inhibitors and cancer therapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2003**, *4*, 722-731.

⁴⁰ Smith, J. W. Cilengitide Merck. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2003**, *4*, 741-745.

⁴¹ Kohn, E. C.; Liotta, L. A. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1856-1862.

⁴² Pauli, S. A.; Tang, H.; Wang, J.; Bohlen, P.; Posser, R.; Hartman, T.; Sauer, M. V.; Kitajewski, J.; Zimmermann, R. C. The VEGF/VEGF Receptor 2 Pathway is Critical for Blood Vessel Survival in Corpora Lutea of Pregnancy in the Rodent. *Endocrinology* **2004**.

exact est, malgré tout, encore incomplètement compris et le mécanisme d'action des molécules ciblant l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ non élucidé. Ces aspects, encore controversés, sont présentés ci-après. L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ est toutefois sur-exprimée par les cellules endothéliales des vaisseaux néo-angiogeniques et a également été mise en évidence sur de nombreuses lignées tumorales humaines. Elle est une cible très attrayante pour le développement d'agents anti-angiogeniques et anti-métastatiques.

II.3.1 – Considérations sur le rôle de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ dans le processus de formation des vaisseaux sanguins tumoraux.

L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ a tout d'abord été identifiée comme un marqueur spécifique des zones d'angiogenèse. Des niveaux d'expression élevés de ce récepteur ont été mis en évidence spécifiquement sur l'endothélium des vaisseaux en formation dans différents modèles d'angiogenèse.³⁸ Les mêmes auteurs ont montré que l'inhibition de l'intégrine par un anticorps bloquant, l'anticorps monoclonal LM609, bloque des processus d'angiogenèse tumorale ou rétinienne induits par différents facteurs angiogeniques (TNF α , bFGF), alors qu'aucun effet n'est observé sur les vaisseaux préétablis quiescents. Ces premiers résultats tendent alors à conférer à l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ des propriétés pro-angiogeniques et un rôle de modulateur critique dans l'angiogenèse des tumeurs. Ils ont par conséquent suscité un vif intérêt pour l'identification et la synthèse de nouvelles molécules susceptibles d'altérer ses fonctions.

Pourtant, l'implication de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, ainsi que celle de sa proche parente $\alpha_V\beta_5$, dans le phénomène d'angiogenèse a été récemment soumise à controverse. En effet, Reynolds et coll. ont observé, chez des animaux génétiquement modifiés dépourvus des sous unités β_3 ou β_5 , une angiogenèse accrue et une croissance tumorale largement favorisée.⁴³ Ces résultats suggèrent alors que les intégrines $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_V\beta_5$ ne sont essentielles ni pour le développement vasculaire, ni pour l'angiogenèse tumorale.

Ces résultats contradictoires ont été largement discutés par R.O. Hynes, qui a suggéré que l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ pourrait avoir un rôle beaucoup plus complexe que celui de seul

⁴³ Reynolds, L. E.; Wyder, L.; Lively, J. C.; Taverna, D.; Robinson, S. D.; Huang, X.; Sheppard, D.; Hynes, R. O.; Hodivala-Dilke, K. M. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking β_3 integrin or β_3 and β_5 integrins. *Nat. Med.* **2002**, 8, 27-34.

inducteur de l'angiogenèse.⁴⁴ (cf. Figure 6) Celle-ci pourrait avoir un rôle pivot et réguler tantôt des activités pro-angiogéniques, tantôt des activités anti-angiogéniques. L'hypothèse d'un rôle de régulateur négatif de l'angiogenèse de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ n'avait jamais été envisagée auparavant. Pourtant, elle est en concordance avec les résultats des expériences génétiques et est confortée par diverses autres observations :

- i) l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ lie des facteurs anti-angiogéniques comme la thrombospondine-1 ou la tumstatine,
- ii) l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ régule négativement le récepteur flk-1 du VEGF (VEGF-R2),
- iii) l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ inhibe d'autres intégrines ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$) exprimées par les cellules endothéliales et impliquées dans les phénomènes d'angiogenèse,
- iv) l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ est impliquée dans la régulation des phénomènes d'apoptose.⁴⁵

Ce nouveau modèle, conférant une activité d'inhibition de l'angiogenèse à l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, suggère alors que les molécules décrites pour leur effet anti-angiogénique et inhibiteur de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, pourraient s'avérer être des agonistes et non des antagonistes de ce récepteur.

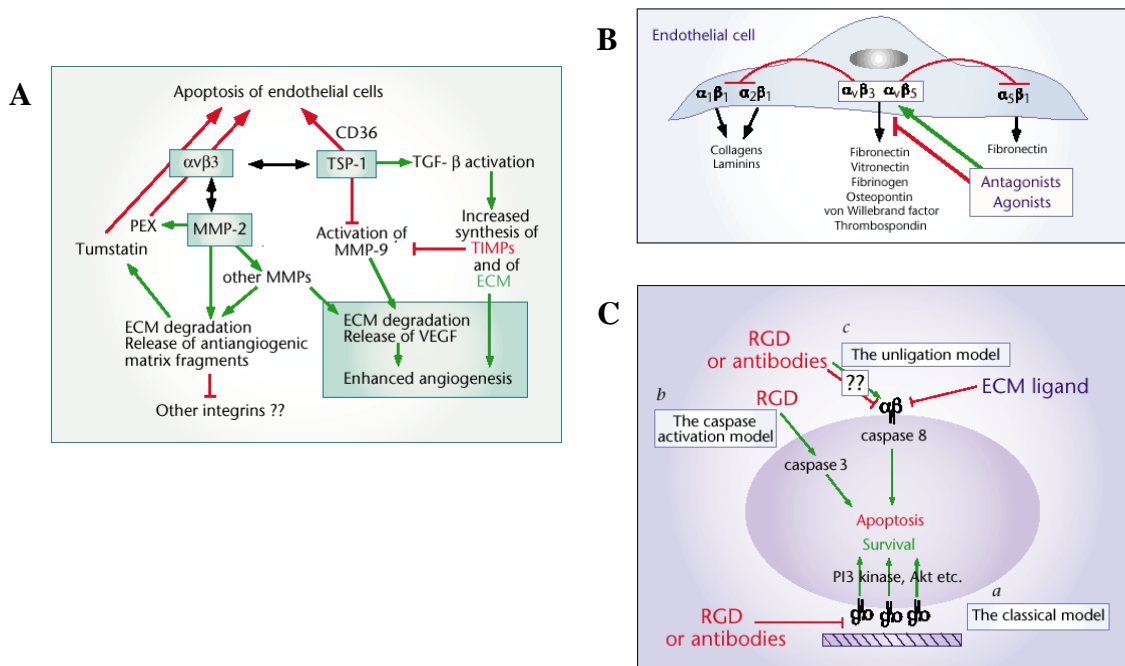


Figure 6 : Les grandes fonctions de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. A/ Modulation d'activités cellulaires inductrices ou inhibitrices de l'angiogenèse, B/ Inhibition d'intégrines pro-angiogéniques, C/ Intervention dans les cascades de signalisation de l'apoptose.

Source : Hynes, R. O. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat. Med.* **2002**, 8, 918-921.

⁴⁴ Hynes, R. O. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat. Med.* **2002**, 8, 918-921.

⁴⁵ Montgomery, A. M.; Reisfeld, R. A.; Cheresch, D. A. Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91, 8856-8860.

Avant de décrire l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, sa structure et ses principaux ligands, nous rappelons brièvement les principales caractéristiques des récepteurs de la famille des intégrines.

II.3.2 – Caractéristiques des récepteurs de la famille des intégrines.

Les intégrines sont une famille importante de récepteurs de la surface cellulaire, responsables des interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Elles sont constituées de deux sous-unités glycoprotéiques transmembranaires, α et β , associées de façon non-covalente. La famille comporte 18 membres de la sous-unité α et 8 de la sous-unité β , pouvant s'associer pour former 24 récepteurs hétérodimériques différents. (cf. Figure 7)

La sous-unité α , contenant environ 1100 résidus, est caractérisée par la présence, dans le domaine extracellulaire à proximité de l'extrémité N terminale, de 3 à 4 régions, contenant entre 12 et 15 résidus, capables de s'associer à des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}).⁴⁶ Celle-ci est également souvent ramifiée au voisinage de la partie transmembranaire par l'établissement d'un pont disulfure. La sous-unité β , plus petite, contient typiquement environ 800 résidus (à l'exception de la chaîne β_4 qui comporte 1750 résidus). Elle présente, à proximité du domaine transmembranaire, 4 domaines, d'environ 40 résidus, hautement conservés et riches en cystéine. La partie N-terminale, exposée vers le milieu extracellulaire, est repliée et forme une large boucle. Les deux chaînes α et β contiennent de courtes parties transmembranaires (environ 20-30 résidus) constituées essentiellement de résidus hydrophobes. Les régions intracellulaires, contenant au plus 20 à 50 résidus, contiennent les extrémités C-terminales des deux chaînes et sont, contrairement aux récepteurs des facteurs de croissance, dépourvues d'activité enzymatique intrinsèque.

Les intégrines jouent un rôle important dans le rattachement des cellules à leur environnement et en particulier au réseau de protéines de la matrice extracellulaire (collagène, laminine, fibronectine, vitronectine...). Elles se lient aux ligands extracellulaires via les domaines N-terminaux de leurs deux sous-unités α et β . Ces interactions intégrine-ligand sont gouvernées essentiellement par quatre facteurs : *i*) la présence ou non d'un domaine α_A sur la

⁴⁶ Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ integrin for a new cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374-1389.

chaîne α du récepteur,⁴⁷ *ii*) la présence sur le ligand de séquences reconnues par un type d'intégrines,⁴⁸ *iii*) la formation de complexes ternaires avec des cations divalents (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}), *iv*) la transition dans une conformation active de l'intégrine.⁴⁹

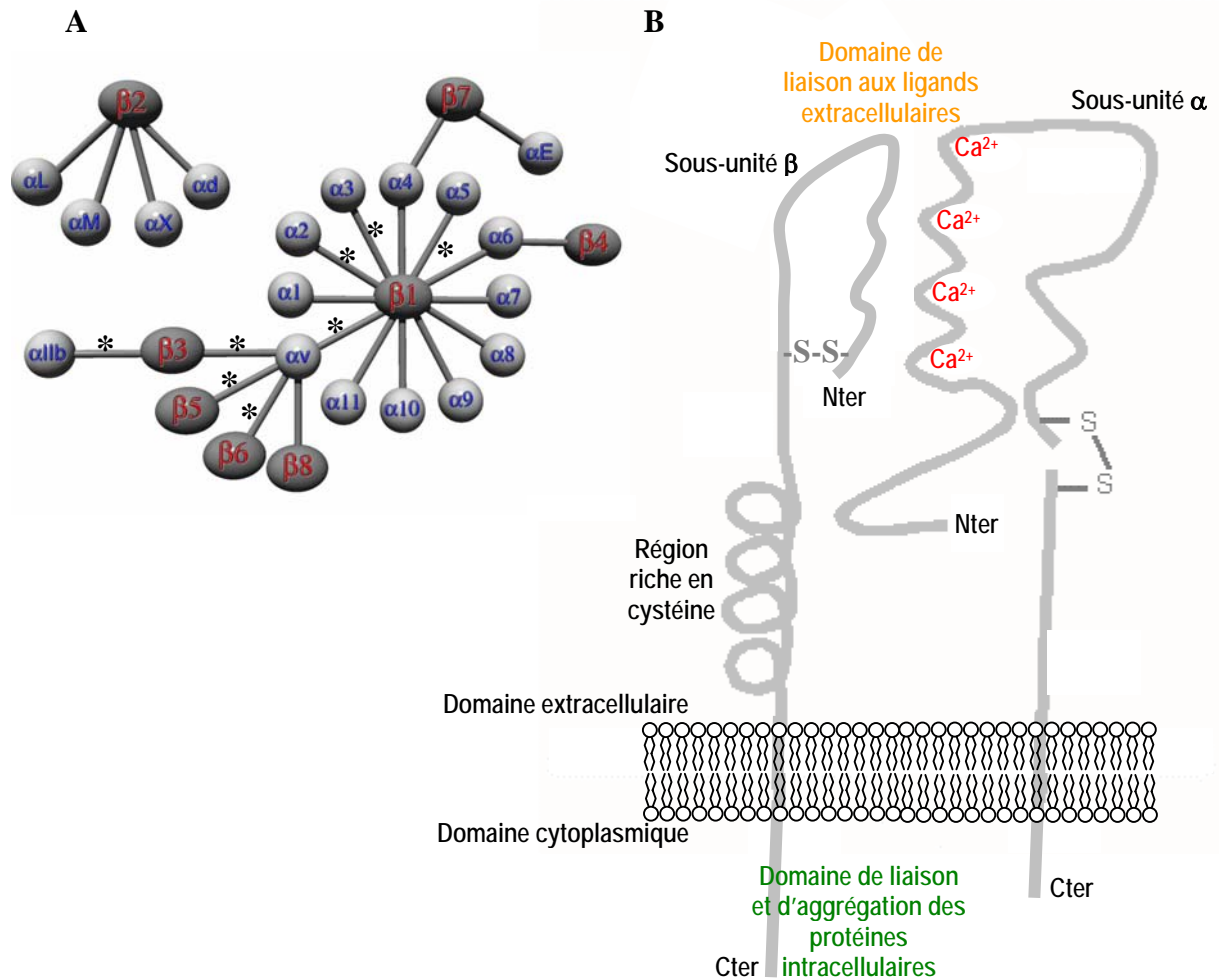


Figure 7 : Récepteurs de la famille des intégrines. A/ Schéma des différentes associations entre les sous-unités α et β pour la formation des hétérodimères. Les intégrines de la famille βA se liant à leur substrat par l'intermédiaire du motif -RGD- sont indiquées par une étoile, B/ Représentation schématique d'une intégrine.

La courte queue cytoplasmique de la sous-unité β , contenant l'extrémité C-terminale, peut s'associer aux filaments d'actine reliant alors le récepteur au cytosquelette. (cf. Figure 7, B) Elle peut également former des complexes focaux avec des protéines adaptatrices

⁴⁷ Humphries, M. J. Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 311-339.

⁴⁸ Plow, E. F.; Haas, T. A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J. W. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 21785-21788.

⁴⁹ Arnaout, M. A.; Goodman, S. L.; Xiong, J. P. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, 14, 641-651.

intracellulaires comme la taline, la vinculine ou l' α -actinine et ainsi établir une connexion avec les kinases cytoplasmiques, en particulier les protéines tyrosine kinases, comme les protéines des familles FAK (*focal adhesion kinase*), Src et Abl, ou les protéines sérine-thréonine kinases, comme les ILK (*integrin-linked kinases*), ainsi qu'avec les récepteurs transmembranaires des facteurs de croissance (e.g. $\alpha_v\beta_3$ avec les récepteurs de l'insuline, du PDGF et du VEGF).⁵⁰ Les intégrines sont d'importants médiateurs de la communication cellulaire, elles participent à la transmission de signaux mécaniques et chimiques de façon bidirectionnelle : leurs interactions avec les ligands extracellulaires sont transmises jusqu'à l'intérieur de la cellule (« outside-in signaling »), tandis que les situations intracellulaires régulent les interfaces de liaison extracellulaires (« inside-out signaling »).

Les voies de signalisation faisant intervenir les intégrines sont impliquées dans la régulation des grandes fonctions cellulaires, notamment la régulation du cycle cellulaire et la migration des cellules.

II.3.3 – Structure et ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

a) Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

En 2001, Xiong et al. ont décrit la structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ grâce à l'étude de la diffraction des rayons X de la partie extracellulaire cristallisée de l'hétérodimère (résolution de la structure cristalline à 3,1Å).⁵¹ (cf. Figure 8) L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comprend 12 domaines, qui se répartissent entre une région supérieure ovoïde (tête) et deux fragments plus allongés (pattes). Elle est recourbée au niveau d'un domaine appelé « Genu ». Cette observation suggère une grande flexibilité conformationnelle du récepteur, probablement à l'origine de ses fonctions de régulation (activation de l'intégrine par changement conformationnel de la structure IV). L'interface principale entre les deux chaînes α_v et β_3 est localisée au niveau de la tête ovoïde entre le domaine Propeller de la sous-unité α_v et le domaine βA de la sous-unité β_3 .

⁵⁰ Giancotti, F. G.; Ruoslahti, E. Integrin signaling. *Science* **1999**, 285, 1028-1032.

⁵¹ Xiong, J. P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D. L.; Joachimiak, A.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$. *Science* **2001**, 294, 339-345.

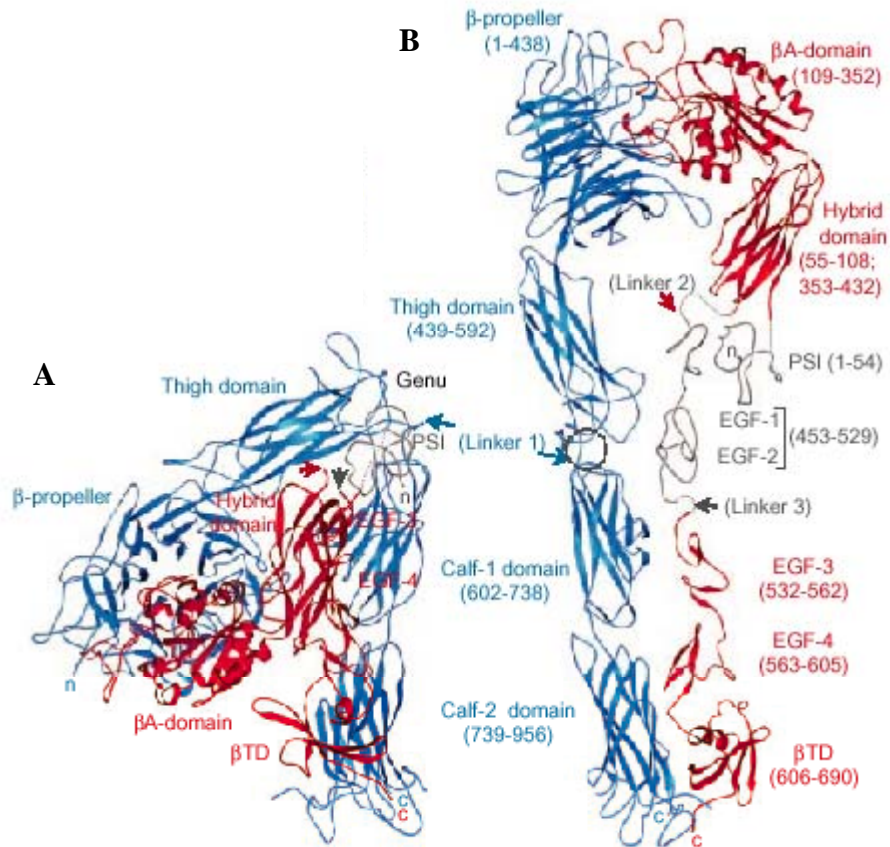


Figure 8 : Représentation en ruban de la partie extracellulaire cristallisée de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (sous-unité α_v en bleu, sous-unité β_3 en rouge). A/ Structure cristalline du récepteur, B/ Modèle du récepteur déployé.
 Source : Xiong, J. P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R. et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$. *Science* **2001**, 294, 339-345

b) Ligands endogènes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

La séquence tripeptidique -RGD- (-Arg-Gly-Asp-) est un motif commun présent sur la plupart des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la vitronectine, l'ostéopontine, la thrombospondine, le facteur Von Willebrandt, ainsi que sur le fibrinogène (protéine sanguine soluble). De nombreuses intégrines (environ la moitié des hétérodimères) reconnaissent et interagissent avec leurs substrats protéiques via la séquence -RGD-. C'est particulièrement le cas des intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, récepteur plaquettaire du fibrinogène, $\alpha_5\beta_1$, récepteur endothélial de la fibronectine, et $\alpha_v\beta_3$, récepteur endothélial de la vitronectine. Toutefois, s'ils ont en commun le motif -RGD-, ces substrats ont néanmoins des affinités différentes pour les différentes intégrines. La spécificité d'une intégrine pour un substrat est attribuée à la conformation du motif -RGD- dans la protéine, ainsi qu'aux séquences de résidus adjacentes.

Ainsi, le ligand endogène privilégié de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ est la vitronectine. Ce récepteur se lie également à d'autres protéines extracellulaires par l'intermédiaire de la séquence -RGD-, notamment la fibronectine, le fibrinogène, le collagène, la thrombospondine, la thrombine, l'ostéopontine et la tenascine.⁴⁶

Ces observations sont à la base du développement des ligands peptidiques synthétiques « -RGD- », spécifiques de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.

II.4. Le pentapeptide cyclique c[-RGDf(N-Me)V-] : ligand spécifique de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.

II.4.1 – Mise au point de la structure du ligand.

Les premiers travaux, initiés dans l'équipe de H. Kessler au début des années 1990, ont porté sur l'incorporation du motif -RGD- au sein de séquences contraintes de penta- et d'hexapeptides cycliques (la conformation cyclique est imposée par l'introduction d'un résidu proline ou d'acides aminés de configuration D dans la séquence primaire des peptides). Les différents cyclopeptides synthétisés ont été évalués d'une part dans des tests d'affinité, mesurant leur affinité pour différentes intégrines (récepteurs purifiés), et d'autre part dans des tests de compétition, mesurant leur capacité à inhiber l'interaction entre une intégrine et son substrat naturel.⁵² Ces études ont conduit à la sélection d'une séquence cyclique de 5 résidus, le cyclopentapeptide c[-RGDfV-], qui s'est avéré être un ligand sélectif de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. Son affinité pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ purifiée (IC_{50} 50 nM), soluble ou immobilisée, est comparable à celle du ligand endogène, la vitronectine (IC_{50} 25 nM).⁵³ Il est en revanche bien moins efficace dans les compétitions avec le fibrinogène ou la fibronectine, réalisées avec les récepteurs immobilisés $\alpha_{IIb}\beta_3$ (IC_{50} 29 μ M) et $\alpha_5\beta_1$ (IC_{50} 6,4 μ M) respectivement. La spécificité de la séquence c[-RGDfV-] pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, par rapport à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, a

⁵² Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Aumailley, M.; Timpl, R. Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911-921. ; Aumailley, M.; Gurrath, M.; Muller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50-54.

⁵³ Pfaff, M.; Tangemann, K.; Muller, B.; Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Timpl, R.; Engel, J. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_V\beta_3$, and $\alpha_5\beta_1$ integrins. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233-20238.

été en partie expliquée par la distance entre les C β des chaînes latérales des résidus aspartyl et arginyl (0,69 nm), plus courte que celle requise pour l'interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (0,75-0,85 nm).

Dechantsreiter et al. se sont ensuite consacrés à l'étude systématique des dérivés N $^\alpha$ -méthylés du cyclopentapeptide. Il est en effet connu que la méthylation N $^\alpha$ conduit à des analogues plus contraints conformationnellement et augmente l'affinité et les propriétés pharmacologiques des ligands. Sur la base de ces considérations, les auteurs ont alors envisagé le remplacement du groupe NH $^\alpha$ par une unité N $^\alpha$ Me dans chacune des liaisons amide du peptide c[-RGDfV-].⁵⁴ Les 5 dérivés mono-méthylés synthétisés ont été évalués pour leur capacité à inhiber la fixation de la vitronectine et du fibrinogène sur les récepteurs purifiés $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$ immobilisés. Le composé méthylé sur le résidu valine s'est avéré être l'antagoniste le plus actif et le plus sélectif pour $\alpha_v\beta_3$. Le ligand c[-RGDf(N-Me)V-] a en effet montré une activité 1500 fois supérieure dans l'inhibition de la fixation de la vitronectine au récepteur $\alpha_v\beta_3$ (IC₅₀ 0,58 nM) que dans l'inhibition de la fixation du fibrinogène à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (IC₅₀ 860 nM). Une IC₅₀ relativement faible de 37 nM a également été mesurée dans la compétition avec la vitronectine sur l'intégrine endothéliale $\alpha_v\beta_5$.⁵⁵ L'activité accrue du composé méthylé c[-RGDf(N-Me)V-], par rapport à son analogue non modifié c[-RGDfV-], a été expliquée par une répulsion stérique plus importante des liaisons -D-f- et -V-R lorsque le résidu Valine est méthylé sur l'atome N $^\alpha$. Le ligand adopte alors une conformation plus appropriée pour l'interaction avec le récepteur.

Le composé c[-RGDf(N-Me)V-] est aujourd'hui développé par la société Merck KGaA sous le nom de Cilengitide (cf. Figure 9) et est engagé dans des protocoles d'essais cliniques comme agent anti-angiogénique.

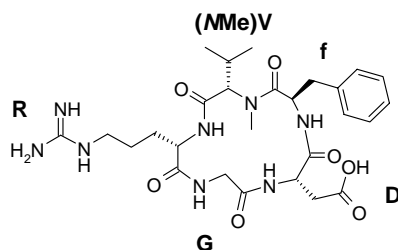


Figure 9 : Structure du Cilengitide.

⁵⁴ Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Matha, B.; Lohof, E.; Holzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonists. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.

⁵⁵ Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Sulyok, G. A.; Kessler, H. Nanomolar small molecule inhibitors for $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_5$, and $\alpha_v\beta_3$ integrins. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045-1051.

II.4.2 – Bases structurales de l'interaction du cyclopentapeptide avec le récepteur $\alpha_V\beta_3$.

J-P. Xiong et al. ont caractérisé l'interaction du motif -RGD- dans le ligand cyclopentapeptidique avec le récepteur $\alpha_V\beta_3$. L'étude a été réalisée sur la structure cristalline du complexe ternaire (noté $\alpha_V\beta_3$ -RGD- Mn^{2+}) formé par le domaine extracellulaire de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ en interaction avec le ligand c[-RGDf(N-Me)V-] en présence de cations divalents manganèse.⁵⁶ La structure cristalline a été comparée à celle de l'intégrine en l'absence de ligand et en présence de cations de façon à appréhender les principaux changements dans les structures III et IV du récepteur provoqués par l'approche du ligand.

Rappelons que les intégrines se répartissent en deux catégories en fonction de la nature du domaine extracellulaire impliqué dans la reconnaissance des ligands. La première catégorie regroupe les intégrines α_A (9 membres) pour lesquelles la liaison avec les ligands extracellulaires requiert un domaine extracellulaire de type A (environ 180 résidus) porté par la chaîne α . Cette liaison requiert la coordination d'un cation métallique par un motif conservé de cinq résidus du domaine α_A (MIDAS, *metal ion-dependent adhesion site*) et par un résidu acide glutamique du ligand. La seconde catégorie, à laquelle appartient l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, est constituée des intégrines β_A (15 membres), dépourvues de domaine α_A . Elles reconnaissent des ligands porteurs d'un résidu acide aspartique via un domaine β_A (α_A -like) localisé sur la chaîne β .

L'interaction entre le récepteur $\alpha_V\beta_3$ et le ligand c[-RGDf(N-Me)V-] requiert huit cations Mn^{2+} tandis que l'intégrine seule s'entoure de seulement six cations. Dans le complexe, les deux cations supplémentaires sont coordonnés à l'interface de liaison avec le ligand avec deux sites du domaine β_A :

- un des cations interagit avec le motif MIDAS du domaine β_A et permet une liaison directe entre la chaîne β_3 de l'intégrine et le résidu acide aspartique du motif -RGD- du ligand,

⁵⁶ Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_V\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **2002**, 296, 151-155.

- l'autre cation est engagé dans l'interaction avec le site LIMBS (*ligand-associated metal binding site*) du domaine βA et apporte une stabilité conformationnelle à la surface d'interaction ligand/récepteur.

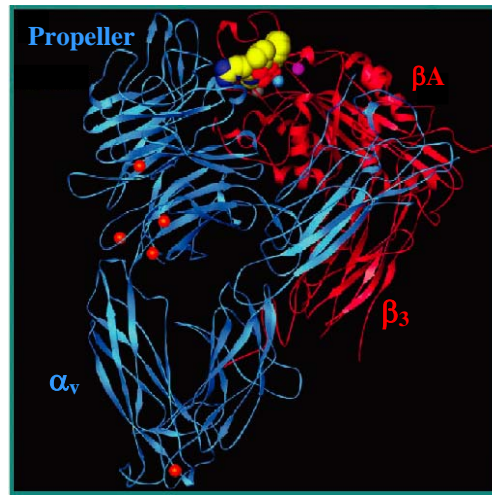


Figure 10 : Représentation de la structure du complexe ternaire $\alpha_v\beta_3$ -RGD- Mn^{2+} . Les positions des cations Mn^{2+} des sites MIDAS, LIMBS et ADMIDAS (adjacent au site MIDAS) sont précisées par les boules bleue, grise et violette respectivement, celles des cinq autres cations par des boules oranges. Le cyclopentapeptide est représenté par une structure en boules.

Source : Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **2002**, 296, 151-155

Le motif -RGD- du ligand s'associe au récepteur à l'interface des 2 chaînes α_v et β_3 et établit des contacts de part et d'autre des 2 sous-unités : (cf. Figures 10 et 11)

✎ Le résidu arginine est orienté vers la chaîne α_v . Sa chaîne latérale s'insère dans un sillon étroit à la tête du domaine Propeller, le groupement guanidinium pouvant y établir des ponts salins avec deux résidus acides aspartiques, Asp¹⁵⁰ et Asp²¹⁸. (cf. Figure 11, C)

✎ Le résidu acide aspartique s'expose vers la chaîne β_3 et se niche dans une crevasse du domaine βA . Le groupement carboxylate de sa chaîne latérale est au centre d'un réseau étendu d'interactions polaires. L'un des oxygènes du groupement coordine le cation Mn^{2+} ponté par le résidu Glu²²⁰ du site MIDAS du domaine βA . Le deuxième atome oxygène établit des liaisons hydrogènes avec le squelette amide (groupements carbonyle) des résidus Tyr¹²² et Asn²¹⁵ et établit un contact avec la chaîne aliphatique du résidu Arg²¹⁴. Le groupement méthylène hydrophobe interagit avec le carbone β du résidu Asn²¹⁵. (cf. Figure 11, E)

✎ Le résidu glycine intermédiaire se situe lui à l'interface entre les deux sous-unités α_v et β_3 et établit essentiellement des contacts hydrophobes avec la sous-unité β_3 (Arg²¹⁶). (cf. Figure 11, D)

Les deux résidus complétant la structure du ligand, -f(NMe)V-, sont eux exposés vers l'extérieur de l'interface d'interaction ligand/intégrine et n'établissent aucun contact avec le récepteur. (cf. Figure 11, B)

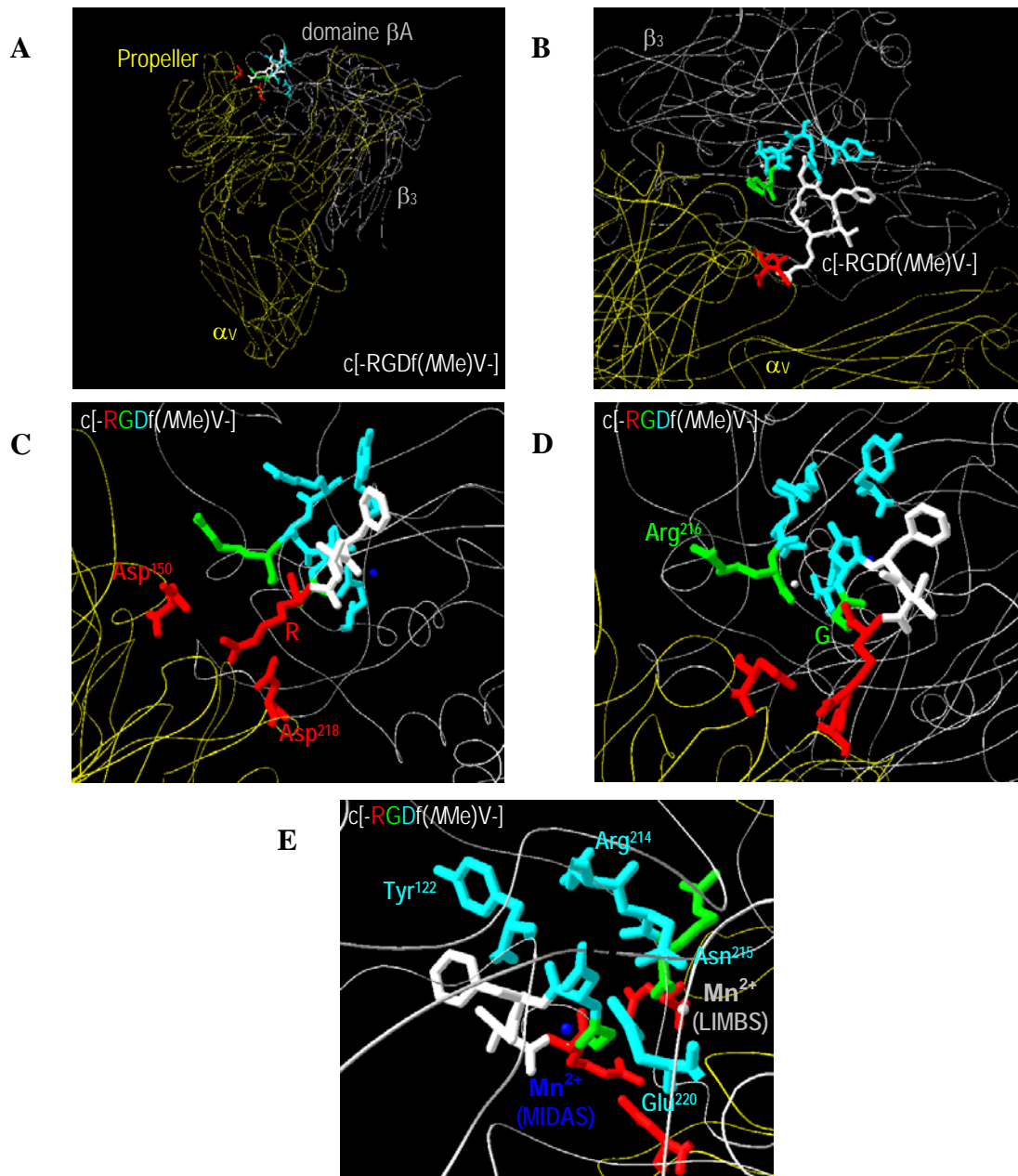


Figure 11 : Visualisation des interactions entre le ligand c[-RGDf(NMe)V-] et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Les chaînes α_v et β_3 du récepteur sont respectivement représentées par des rubans jaune et gris. Le cyclopentapeptide est représenté en mode bâton (blanc pour les images A et B et en couleur pour les vues C, D et E). A/ Vue d'ensemble du récepteur $\alpha_v\beta_3$ en interaction avec le ligand, B/ Insertion du ligand dans une poche à l'interface des deux chaînes de l'intégrine, C/ Interactions entre le résidu arginine du ligand (R) et les résidus Asp¹⁵⁰ et Asp²¹⁸ de la chaîne α_v , D/ Interaction entre le résidu glycine du ligand (G) et le résidu Arg²¹⁶ de la chaîne β_3 , E/ Interactions entre le résidu acide aspartique (D) et les résidus Tyr¹²², Arg²¹⁴, Asn²¹⁵ et Glu²²⁰ de la chaîne β_3 .

Ainsi, l'approche du ligand provoque essentiellement des modifications dans la structure III du domaine βA de la sous-unité β_3 de l'intégrine mais induit peu de changements dans la structure IV du récepteur : seule une légère modification de l'orientation relative du domaine βA par rapport au domaine Propeller de la chaîne α_V est observée. Du côté du ligand, les simulations de dynamique moléculaire montrent que le contact établi avec le récepteur $\alpha_V\beta_3$ provoque une légère distorsion du squelette pentapeptidique mais ne modifie pas les distances de liaison du squelette peptidique.

II.4.3 – Caractérisation de l'activité anti-angiogénique *in vivo* dans des modèles animaux.

Le cyclopeptide c[-RGDfV-], testé dans le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de poulet (CAM, *chicken choriollantoic membrane*), s'est avéré être un inhibiteur efficace des phénomènes de néo-angiogénèse. Une dose unique du composé c[-RGDfV-] (300 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) a été administrée par voie intraveineuse à des embryons de poulets (10 jours) 24 h après l'implantation de cellules de mélanomes de statut α_V négatif (M21-L). Le traitement a provoqué l'interruption du développement de la néo-vascularisation induite par la tumeur alors qu'aucun effet n'a été observé avec les molécules contrôles (observation deux jours après l'administration du traitement). Un résultat identique accompagné d'une diminution de la taille de la tumeur a été obtenu en utilisant l'anticorps monoclonal bloquant de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (MAb LM609).^{38,57}

Chez un modèle murin de souris Nude, inoculées par le même modèle cellulaire (M21-L), Mitjans et al. ont observé l'inhibition de la croissance des tumeurs ainsi qu'une stabilisation voire une régression de la taille de tumeurs préétablies.⁵⁸ Ces résultats ont alors permis d'attester l'activité anti-angiogénique et anti-tumorale du ligand indépendamment de l'expression de l'intégrine par les cellules tumorales.

⁵⁷ Brooks, P. C.; Montgomery, A. M.; Rosenfeld, M.; Reisfeld, R. A.; Hu, T.; Klier, G.; Cheresch, D. A. Integrin $\alpha_V\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **1994**, *79*, 1157-1164.

⁵⁸ Mitjans, F.; Meyer, T.; Fittschen, C.; Goodman, S.; Jonczyk, A.; Marshall, J. F.; Reyes, G.; Piulats, J. In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of α_V integrins. *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 716-723.

Dans les modèles précliniques murins, les doses efficaces du Cilengitide typiquement décrites dans la littérature sont de 100-200 µg/souris/j.^{58,59}

Enfin, une étude publiée par Burke et al. a montré l'intérêt de la combinaison du Cilengitide avec un protocole de radioimmunothérapie.⁶⁰ L'étude a été menée sur des souris Nude préalablement inoculées par un modèle de tumeur du sein (cellules HBT3477 de statut Bcl2 positif et présentant un gène p53 muté). Les auteurs ont alors étudiés les effets d'un traitement au Cilengitide en combinaison avec une radioimmunothérapie (RIT) de type ⁹⁰Y-DOTA-peptide ChL6 (anticorps chimérique souris/humain monoclonal reconnaissant une glycoprotéine membranaire surexprimée dans les cancers du sein). Les réponses anti-tumorales ont été comparées entre différents groupes de souris : *i*) les animaux non traités (n=24), *ii*) les animaux traités par le Cilengitide seul (n=18), *iii*) les animaux traités avec l'agent de radioimmunothérapie seul (n=46) et *iv*) les animaux traités avec la combinaison des deux molécules, dont six doses différentes de Cilengitide (n=41). Les résultats des régressions tumorales montrent une synergie des deux traitements, sans toxicité supérieure sur les animaux. Les analyses histologiques des coupes de tumeurs récupérées ont montré une augmentation de la proportion des cellules tumorales et endothéliales en apoptose, 5 jours après la RIT, dans les derniers groupes (*iv*) par rapport aux animaux traités par la RIT seule (*iii*).

II.4.4 – Études en phase clinique.

A ce jour, le Cilengitide a fait l'objet de trois études cliniques en phase I. La première a été initiée par Merck KGaA sous la conduite du NCI⁷ en décembre 1999 pour le traitement de patients atteints de tumeurs solides, de sarcomes de Kaposi ou de tumeurs cérébrales.⁶¹ Le Cilengitide a été administré par voie intraveineuse chez 37 patients atteints de tumeurs solides métastatiques. Des doses comprises entre 30 et 1600 mg/m²/infusion ont été étudiées, la dose

⁵⁹ Taga, T.; Suzuki, A.; Gonzalez-Gomez, I.; Gilles, F. H.; Stins, M.; Shimada, H.; Barsky, L.; Weinberg, K. I.; Laug, W. E. α_v -Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 690-697.

⁶⁰ Burke, P. A.; DeNardo, S. J.; Miers, L. A.; Lamborn, K. R.; Matzku, S.; DeNardo, G. L. Cilengitide targeting of $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4263-4272.

⁶¹ Eskens, F. A.; Dumez, H.; Hoekstra, R.; Perschl, A.; Brindley, C.; Bottcher, S.; Wynendaele, W.; Drevs, J.; Verweij, J.; van Oosterom, A. T. Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ in patients with advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 917-926.

optimale pour inhiber la croissance tumorale dans les modèles pré-cliniques ayant été préalablement estimée à 120 mg/m². Les résultats de cette étude ont permis d'identifier une élimination principalement rénale du produit et n'ont pas montré de toxicité hématologique. La demi-vie plasmatique est de 3 à 5 h et le taux plasmatique suffisant pour l'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est d'environ 200 mg/m². Une bonne tolérance du produit au delà de 1200 mg/m² a été observée, les principaux effets secondaires ont été des nausées, une fatigue, des vomissements et des éruptions cutanées. Une stabilisation de la maladie a été observée chez deux patients, l'un atteint d'un carcinome rénal, l'autre d'un carcinome colorectal. En avril 2000, le Cilengitide a été engagé dans la deuxième étude en phase I sur des patients atteints de cancers avancés ou métastatiques. La troisième de ces études a commencé en février 2002 sur des patients atteints de glioblastomes.

Trois principales études en phase II ont été réalisées, l'une sur des tumeurs cérébrales (Etats Unis), l'autre sur des cancers du poumon non-à-petites cellules (Europe de l'ouest) et la dernière sur des cancers pancréatiques (Europe de l'ouest). Le Cilengitide a également été engagé par Merck KGaA en Allemagne dans des études comprenant des patients atteints de tumeurs mammaires, colorectales, de sarcomes de Kaposi ou encore de mélanomes. Les résultats de ces études n'ont pas encore été publiés à ce jour.

Les résultats obtenus avec ce petit peptide cyclique ont considérablement stimulé l'exploration de la voie des ligands peptidiques -RGD- spécifiques de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à des fins anti-angiogéniques. Des efforts se sont vus portés dans trois axes :

- dans la recherche de molécules présentant une affinité accrue pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et des propriétés anti-angiogéniques et anti-tumorales optimales (développement de ligands multivalents),
- dans l'exploitation de ces ligands pour améliorer les propriétés de pharmacoguidage de systèmes de vectorisation et permettre le transport ciblé d'agents thérapeutiques,
- dans la conjugaison des ligands avec des outils d'imagerie pour la détection de la néo-angiogénèse tumorale.

Ces trois aspects sont au cœur de nos travaux.

III. Systèmes de Ciblage et de Vectorisation. Description d'un Nouvel Outil Chimique, le Gabarit RAFT.

La vectorisation de molécules thérapeutiques vers les tumeurs est un défi majeur pour le traitement du cancer. L'objectif du développement d'outils de vectorisation est double :

- concentrer l'action des drogues de chimiothérapie actuelles dans les tumeurs, pour augmenter leur efficacité et diminuer leurs effets secondaires,
- et permettre l'utilisation de nouvelles classes de molécules thérapeutiques, agissant spécifiquement au niveau des cibles dérégulées dans la transformation maligne.

De nombreux principes actifs présentent des caractéristiques physico-chimiques (hydrophilie, poids moléculaire...) peu favorables au passage des barrières biologiques qui séparent leur site d'administration de leur site d'action. D'autres molécules se heurtent aux barrières enzymatiques, qui entraînent leur dégradation et métabolisation rapides. Les barrières à franchir sont des systèmes complexes faisant intervenir plusieurs éléments, comme l'épithélium, l'endothélium, et les membranes cellulaires, ainsi que plusieurs composantes, comme les barrières mécaniques et physico-chimiques et les barrières enzymatiques. L'obtention de concentrations efficaces au niveau du site d'action ne peut alors souvent se faire qu'au détriment d'une importante déperdition de la molécule active dans d'autres tissus ou cellules, occasionnant des effets toxiques importants, parfois rédhibitoires (abandon du traitement en dépit de son efficacité).

La compréhension des mécanismes de la cancérogenèse a par ailleurs permis d'identifier des cibles moléculaires spécifiques des cellules cancéreuses, impliquées dans l'apparition et la progression des tumeurs (gènes altérés dans la carcinogenèse ou leurs produits d'expression). En parallèle, le développement des biotechnologies a donné accès à des protéines recombinantes et à des gènes clonés, et les progrès en synthèse organique sur support ont permis de fournir des peptides et des oligonucléotides en grandes quantités. Ces molécules, très sélectives quant à leur mécanisme d'action, représentent des outils très prometteurs en termes de thérapeutique. Néanmoins, leurs propriétés physico-chimiques et biomimétiques diminuent leur efficacité. Mal absorbées au niveau tissulaire et cellulaire, elles sont souvent dégradées et métabolisées avant d'atteindre leur cible. C'est aujourd'hui l'une des principales limites de leur utilisation comme médicaments.

Pour ces raisons, le développement des vecteurs de médicaments a pris un essor considérable au cours des dernières années. Le terme de vecteur regroupe, selon la définition du GTRV⁶², « toutes les structures capables de véhiculer une molécule d'intérêt biologique en modifiant sa distribution tissulaire et/ou cellulaire, ou son interaction avec les cibles, tant *in vivo* qu'*ex vivo* ». Les molécules d'intérêt biologique, en termes de thérapie anti-cancéreuse, concernent essentiellement les gènes (thérapie génique), les protéines (thérapie protéique), les acides nucléiques (oligonucléotides anti-sens et siRNA) et les drogues de chimiothérapie. De nombreuses méthodes ont été déployées pour réaliser leur transfert ciblé, des concepts nouveaux ont été développés. Nous présentons tout d'abord les grandes catégories de vecteurs actuellement étudiés, et particulièrement les systèmes non-viraux, leurs caractéristiques et leurs limites, et dans un second temps, les outils synthétiques développés par les chimistes pour associer ciblage et vectorisation.

III.1. Les grandes familles de vecteurs.

III.1.1 – Les vecteurs viraux.

Pour véhiculer efficacement du matériel génétique dans les cellules, les biologistes se sont d'abord tournés vers ce que la nature a créé de mieux en la matière : les virus. Les virus sont des vecteurs naturels, hautement évolués, ayant une efficacité redoutable pour pénétrer les cellules hôtes, transférer leur matériel génétique et exploiter la machinerie cellulaire pour leur réplication.

Pour permettre son utilisation en thérapie génique, le système viral ne doit pas être pathogène. Les séquences nécessaires à sa réplication sont ôtées de son génome et remplacées par les séquences géniques dont on souhaite obtenir l'expression dans la cellule cible. Le virus déficient, contenant la séquence thérapeutique, est produit *in vitro* par infection de lignées cellulaires (cellules d'encapsulation), qui permettent la réplication du virus. Les particules de virus recombinant produites sont purifiées et titrées. Les principaux vecteurs viraux employés pour la thérapie génique comprennent *i*) les oncorétrovirus, *ii*) les lentivirus, *iii*) les adénovirus, *iv*) les virus associés aux adénovirus, *v*) les herpes-virus.

⁶² Groupe Thématique de Recherche sur les Vecteurs. <http://www.gtrv.org/>.

Un des obstacles à l'utilisation des virus comme vecteurs est leur manque de sélectivité pour les tumeurs. Plusieurs stratégies ont vu le jour pour tenter de dépasser cette limite.

Pour améliorer la spécificité d'infection cellulaire des vecteurs viraux, une stratégie consiste à coupler des agents de ciblage à la surface du virus.⁶³ Ces agents sont le plus souvent des anticorps bi-fonctionnels qui reconnaissent d'une part une protéine de l'enveloppe du virus, et d'autre part un récepteur des cellules cibles. Cette stratégie a par exemple été employée dans le cas des adénovirus. (cf. Figure 12, B) Le domaine Knob des fibres de la capsid virale (domaine responsable de la liaison du virus à son récepteur cellulaire cible CAR (*Coxsackievirus-adenovirus receptor*)) a été employé comme site de fixation de l'anticorps. Un agent bifonctionnel constitué d'un fragment Fab d'un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine Knob et lié au ligand FGF-2 a alors été couplé à l'adénovirus. Le vecteur obtenu a permis d'augmenter l'effet thérapeutique dans un modèle murin de carcinome ovarien surexprimant le récepteur au FGF.⁶⁴ Ce virus est aujourd'hui testé dans des essais cliniques de phase I.

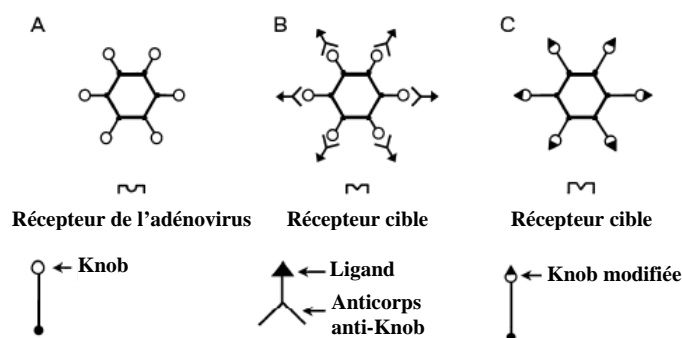


Figure 12 : Stratégies de ciblage des adénovirus. A/ Adénovirus non modifié : le virus pénètre les cellules via son récepteur naturel (CAR) ; B/ Adénovirus modifié par un anticorps bifonctionnel reconnaissant à la fois le domaine Knob des fibres virales et un récepteur cible choisi : le virus infecte les cellules exprimant le récepteur du motif ligand porté par l'anticorps ; C/ Adénovirus présente un domaine Knob modifié par un motif ligand reconnaissant un récepteur cible choisi.

Source : Galanis, E.; Vile, R.; Russell, S. J. Delivery systems intended for in vivo gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2001**, 38, 177-192.

⁶³ Galanis, E.; Vile, R.; Russell, S. J. Delivery systems intended for in vivo gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2001**, 38, 177-192.

⁶⁴ Rancourt, C.; Rogers, B. E.; Sosnowski, B. A.; Wang, M.; Piche, A.; Pierce, G. F.; Alvarez, R. D.; Siegal, G. P.; Douglas, J. T.; Curiel, D. T. Basic fibroblast growth factor enhancement of adenovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene results in augmented therapeutic benefit in a murine model of ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **1998**, 4, 2455-2461.

Le ciblage de l'adénovirus peut également être introduit par modification des fibres virales. (cf. Figure 12, C) Cette stratégie a en particulier été employée pour incorporer le motif -RGD- (ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$) et un motif polylysine (K₇) (liaison aux héparanes sulfates).⁶⁵

Précisons que du fait de leur efficacité naturelle de transfection, et en dépit de leurs inconvénients majeurs liés à leur toxicité et à leur immunogénicité, les vecteurs viraux représentent aujourd'hui deux tiers des protocoles cliniques de thérapie génique.

III.1.2 – Les liposomes et nanoparticules.

La recherche galénique, s'appuyant sur de nouveaux concepts physico-chimiques ainsi que sur le développement de nouveaux matériaux, a permis de développer des systèmes sub-microniques d'administration, capables de protéger les molécules actives de la dégradation et d'en contrôler la libération dans le temps et dans l'espace : les liposomes et les nanoparticules.

Les liposomes sont des systèmes colloïdaux vésiculaires (biocompatibles et biodégradables), composés d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides organisés en phase lamellaire. Les principes actifs hydrophiles sont encapsulés dans les cavités aqueuses, les molécules lipophiles dans les bicouches. Les nanoparticules sont elles constituées de polymères.

L'inconvénient majeur de ces vecteurs de première génération provient de leur accumulation principalement hépatique, due au phénomène d'opsonisation. En effet, les opsonines (protéines plasmatiques) s'adsorbent par des interactions hydrophobes à la surface des vésicules et entraînent leur prise en charge par les macrophages présentant des récepteurs spécifiques aux opsonines. Pour contourner le problème, les vecteurs ont été recouverts par des polymères hydrophiles (e.g. polyéthylène glycol (PEG), polysaccharides) empêchant ces protéines de s'adsorber (répulsion stérique) sur les vésicules. Les liposomes « peggylés » se caractérisent par un temps de demi-vie plasmatique prolongé et une capture hépatique réduite. La rémanence vasculaire prolongée de ces vecteurs de deuxième génération augmente leur probabilité de traverser l'endothélium vasculaire tumoral, caractérisé par une perméabilité

⁶⁵ Wu, H.; Seki, T.; Dmitriev, I.; Uil, T.; Kashentseva, E.; Han, T.; Curiel, D. T. Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum. Gene Ther.* **2002**, *13*, 1647-1653.

accrue. L'encapsulation de la doxorubicine dans ce type de liposomes a montré expérimentalement, chez des souris porteuses de tumeurs lymphoïdes ascitiques, une augmentation significative de l'efficacité de la drogue et une diminution importante de sa toxicité létale.⁶⁶ Ces résultats ont abouti à la mise sur le marché du Doxil (liposomes péggylés chargés en doxorubicine), aujourd'hui employé pour le traitement de certains carcinomes ovariens métastatiques.

Pour diriger les liposomes de manière sélective vers les cellules tumorales, les vecteurs de deuxième génération ont été décorés de ligands (anticorps, peptides, sucres, acide folique...). Le ligand est introduit à l'extrémité de certaines chaînes de PEG. Cette stratégie a notamment été employée pour coupler le fragment Fab' d'un anticorps dirigé contre le proto-oncogène HER2 (rhuMAb-HER2, anticorps monoclonal anti-p185^{HER2}) à l'extrémité des chaînes PEG de liposomes chargés en doxorubicine.⁶⁷ Les vecteurs obtenus, administrés à des souris greffées par des tumeurs mammaires humaines, sur-exprimant l'antigène HER2, ont montré une efficacité anti-tumorale remarquable.

III.1.3 – Les anticorps monoclonaux.

Les anticorps monoclonaux représentent une classe importante d'agents de vectorisation.⁶⁸ En thérapie anti-cancéreuse, les anticorps monoclonaux ont largement démontré leur efficacité pour cibler les antigènes tumoraux (e.g. HER2, Herceptin) ou séquestrer des facteurs de croissance (e.g. VEGF, Bevacizumab). Les anticorps peuvent également être utilisés pour transporter des drogues, des toxines, ou des isotopes radioactifs. Parmi les approches validées dans ce domaine, on peut citer :

➤ le Mylotarg : anticorps monoclonal recombinant humanisé, dirigé contre l'antigène CD33 et conjugué à la calicheamicine. Il est utilisé pour traiter certaines formes de leucémies myéloïdes chroniques.

⁶⁶ Gabizon, A. A. Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. *Cancer Res.* **1992**, 52, 891-896.

⁶⁷ Park, J. W.; Hong, K.; Carter, P.; Asgari, H.; Guo, L. Y.; Keller, G. A.; Wirth, C.; Shalaby, R.; Kotts, C.; Wood, W. I.; et al. Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1995**, 92, 1327-1331.

⁶⁸ Milenic, D. E. Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, 8, 1749-1764.

➤ le Zevalin : anticorps monoclonal recombinant, dirigé contre l'antigène CD20 et radiomarqué à l'Yttrium 90 (⁹⁰Y). Il est employé pour la radio-immunothérapie de lymphomes B non-hodgkiniens.

Bien qu'ils aient largement démontré leur efficacité en tant qu'agents de ciblage des tumeurs, les anticorps monoclonaux ont malgré tout les inconvénients d'avoir une faible capacité de pénétration intracellulaire (du fait de leur taille) ainsi qu'une importante toxicité sur le foie et la moelle osseuse. Les chercheurs tentent aujourd'hui de les remplacer par des peptides.⁶⁹

III.1.4 – Les peptides de translocation.

Aux méthodes non-virales de vectorisation, il faut également ajouter celle basée sur l'utilisation des peptides et des protéines « navettes », qui se situe à la frontière entre la thérapie génique et la thérapie protéique. Les « navettes » sont des peptides, des polypeptides ou des petites protéines, ayant la propriété de traverser la membrane cytoplasmique et de pénétrer à l'intérieur des cellules (CPPs, *Cell Penetrating Peptides*, ou PTD, *Protein Transduction Domain*).⁷⁰ Elles peuvent être fusionnées à une grande variété de biomolécules comme des peptides, des oligonucléotides anti-sens ou des protéines. Comportant souvent moins d'une trentaine de résidus, la propriété de pénétration leur est conférée par une courte séquence protéique riche en acides aminés basiques (typiquement des résidus arginines et lysines). Parmi elles, les plus connues sont la Pénétratine (Antennapedia), le fragment Tat (48-60) (HIV-1) ou VP22 (HSV-1), dont les séquences sont dérivées de protéines naturelles, et les peptides synthétiques ou chimériques artificiels, comme le Transportan, les peptides amphiphiles, les poly-arginines (Arg₉). (cf. Figure 13)

⁶⁹ Mori, T. Cancer-specific ligands identified from screening of peptide-display libraries. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 2335-2343.

⁷⁰ Langel, U. Cell-penetrating peptides - Processes and Applications. Editor : M.A. Hollinger, CRC Press, Pharmacology & Toxicology Series, Boca Raton, Florida, **2002**.

CPP	Séquence d'acides aminés
Pénétratine	RQIKIWFQNRRMKWKK
Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQC
VP22	DAATATRGRSAASRPTEPRAPARSASRPRRPVE
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL
Peptide amphiphile	KALKLALKALKAALKLA
Arg₉	RRRRRRRRR

Figure 13 : Séquences d'acides aminés des peptides de translocation les plus connus.

Leur mécanisme d'internalisation n'est pas complètement élucidé à ce jour.⁷¹ Initialement, l'internalisation de Tat, d'Antp ou du Transportan était décrite pour être non récepteur-dépendante et pour intervenir à 37°C et à 4°C, excluant la possibilité d'un mécanisme d'endocytose.⁷² Des données plus récentes suggèrent l'intervention de différents mécanismes en fonction du type de molécule vectorisée par la navette. En effet, le transport intracellulaire de nanoparticules ou de grosses molécules par Tat intervient par un processus de macropinocytose énergie-dépendant, suivi d'une translocation de l'endosome vers le cytoplasme.⁷³ A l'inverse, l'internalisation des CPPs seuls ou conjugués à de petites molécules semble intervenir suite à des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes avec la membrane cytoplasmique et selon un processus non énergie-dépendant.⁷⁴ Dans tous les cas, un contact direct entre la séquence de translocation et la membrane cellulaire ou les protéoglycane de la membrane est requis pour assurer l'entrée efficace des particules dans les cellules. Bien que les mécanismes d'internalisation soient encore soumis à controverse, l'efficacité de transfection de ces navettes a été démontrée *in vitro*. En revanche, les résultats obtenus *in vivo* sont hétérogènes et parfois ambigus.⁷²

⁷¹ Gupta, B.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 637-651.

⁷² Vives, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010-16017. ; Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444-10450. ; Pooga, M.; Hallbrink, M.; Zorko, M.; Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* **1998**, *12*, 67-77.

⁷³ Wadia, J. S.; Stan, R. V.; Dowdy, S. F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 310-315.

⁷⁴ Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Lewis, R. S.; Murray, B. A.; Wender, P. A. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9506-9507. ; Shen, H.; Mai, J. C.; Qiu, L.; Cao, S.; Robbins, P. D.; Cheng, T. Evaluation of peptide-mediated transduction in human CD34+ cells. *Hum. Gene Ther.* **2004**, *15*, 415-419.

Au plan synthétique, la vectorisation des médicaments a également stimulé le développement de supports chimiques qui permettent d'associer des propriétés de ciblage aux propriétés de vectorisation. Ces supports (aussi appelés gabarits, châssis moléculaires, ou « *templates* ») ont une structure polyfonctionnelle : ils présentent des points d'accroche pour les ligands assurant le ciblage du vecteur et pour les molécules à vectoriser. Pour optimiser l'efficacité du ciblage, les structures ont été conçues pour présenter plusieurs copies du ligand. Cette stratégie est inspirée de l'observation des interactions biologiques naturelles et consiste à favoriser des contacts multiples entre le vecteur et sa cible (concept désigné par le terme de « multivalence »).^{75,76}

III.2. Les outils synthétiques permettant l'association de fonctions de ciblage et de vectorisation.

Les gabarits (*templates*), développés par les chimistes, comprennent principalement les MAP (*Multiple-Antigenic Peptide*), les cyclodextrines et calixarènes, les polymères et dendrimères, et les squelettes protéiques. Nous illustrons ceux qui ont été dérivés pour présenter de façon multivalente des motifs peptidiques -RGD- à des fins anti-angiogéniques.

◆ Les MAP.

Les systèmes MAP ont été développés par J.P. Tam pour la présentation de plusieurs copies d'un motif antigénique pour la conception de vaccins synthétiques.⁷⁷ Ces structures sont basées sur un squelette polylysine branché : les fonctions amines des résidus lysines ($^{\alpha}\text{NH}_2$ et $^{\epsilon}\text{NH}_2$) constituent des points d'accroche pour les multiples copies des épitopes antigéniques. En fonction du nombre de résidus lysines, il est possible d'accéder à des systèmes multivalents comportant différents indices de valence (2, 4, 8, 16...). (cf. Figure 14)

⁷⁵ Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M. Polyvalent interactions in biological systems : implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.

⁷⁶ Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.

⁷⁷ Tam, J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 5409-5413. ; Posnett, D. N.; McGrath, H.; Tam, J. P. A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor beta-chain. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1719-1725.

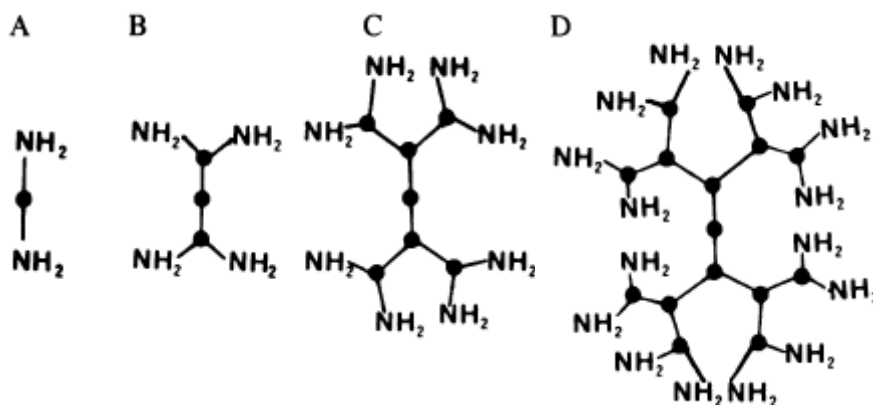


Figure 14 : Représentation schématique de différents squelettes MAPs. Les squelettes peptidiques des résidus lysines sont figurés par des sphères noires.

La possibilité d'utiliser des groupements protecteurs orthogonaux pour les fonctions amines permet en outre d'introduire plusieurs fonctionnalités et de conjuguer différentes catégories de molécules. Cette stratégie a été employée par le groupe de C. Leclerc pour combiner la présentation d'épitopes tumoraux (antigène Tn) et de séquences peptidiques capables d'activer les lymphocytes T auxiliaires (épitope peptidique du polyovirus). Les glycoconjugués ainsi assemblés sur MAP sont désignés par l'acronyme MAG (*Multiple Antigen Glycopeptide*).⁷⁸

Les MAPs ont également été utilisés très récemment au sein du groupe de H. Kessler, inventeur du Cilengitide, pour synthétiser des versions multivalentes du cyclopentapeptide.⁷⁹ Les structures synthétisées comportent deux ou quatre copies du peptide cyclique c[-RGDfE-], rattachées au squelette polylysine par l'intermédiaire de bras espaceurs, de type polyéthylène glycol ou acide aminohexanoïque, pour assurer une bonne accessibilité des ligands. Le squelette MAP a en outre été fonctionnalisé à l'extrémité opposée par un dérivé aromatique (p-triméthylstannylnbenzaldéhyde) destiné à un radiomarquage à l'iode en vue de l'évaluation des structures radiomarquées *in vivo*. (cf. Figure 15)

⁷⁸ Lo-Man, R.; Bay, S.; Vichier-Guerre, S.; Deriaud, E.; Cantacuzene, D.; Leclerc, C. A fully synthetic immunogen carrying a carcinoma-associated carbohydrate for active specific immunotherapy. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1520-1524.

⁷⁹ Thumshirn, G.; Hersel, U.; Goodman, S. L.; Kessler, H. Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chemistry* **2003**, *9*, 2717-2725.

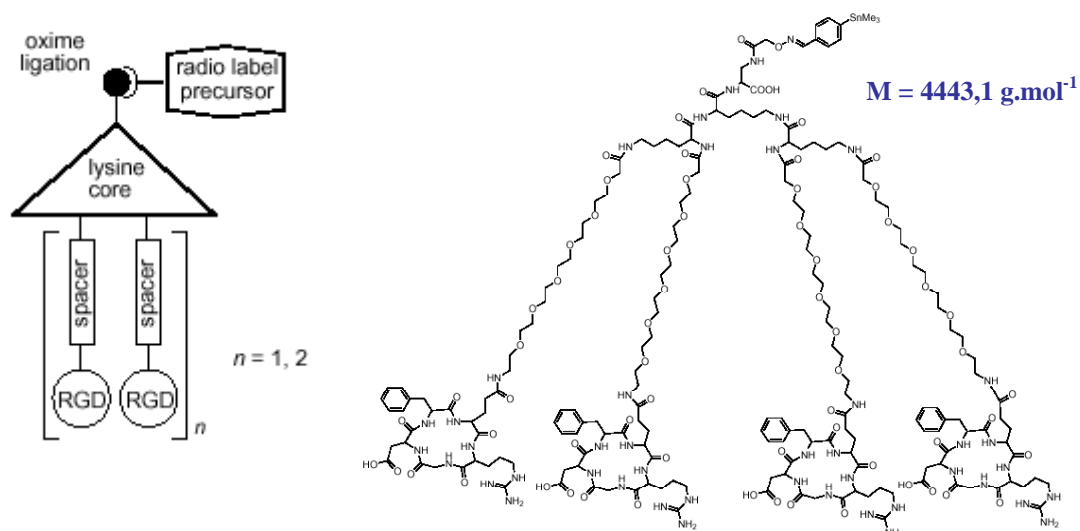


Figure 15 : Structure multivalente de motifs c[-RGDFE-] supportée sur MAP.

La synthèse de ce type de composé étant versatile, la molécule peut aussi bien être conjuguée à des marqueurs fluorescents ou des drogues cytotoxiques. Par ailleurs, les résidus lysines, à la base du squelette MAP, peuvent être protégés orthogonalement et permettre ainsi l'accès à des multimères chimériques combinant d'autres ligands au ligand -RGD-.

La synthèse de ces ligands di- et tétravalents constitue un progrès notable dans le design d'architectures multivalentes chimiquement contrôlées (à la fois en termes de composition et de structure) de ligands spécifiques de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. En effet, les structures polyvalentes de motifs -RGD- décrites jusqu'alors dans la littérature étaient essentiellement des structures polymériques ou protéiques. (cf. ci-après)

◆ Les polymères.

Contrairement à la méthode précédente, les techniques de polymérisation conduisent à des ligands multivalents de très grande taille, dans lesquels les motifs sont distribués le long d'un polymère linéaire. Les réactions de polymérisation étant difficiles à contrôler, la taille du ligand obtenu est imprécise et l'indice de valence de la structure indéterminé.

Cette technique a notamment été employée par R.H. Grubbs et coll. pour la synthèse d'homo- et copolymères polynorbornènes substitués par des séquences pentapeptidiques -PHSRN- et -GRGDS- (séquences de la fibronectine).⁸⁰ (cf. Figure 16)

⁸⁰ Maynard, H. D.; Okada, S. Y.; Grubbs, R. H. Inhibition of cell adhesion to fibronectin by oligopeptide-substituted polynorbornenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1275-1279.

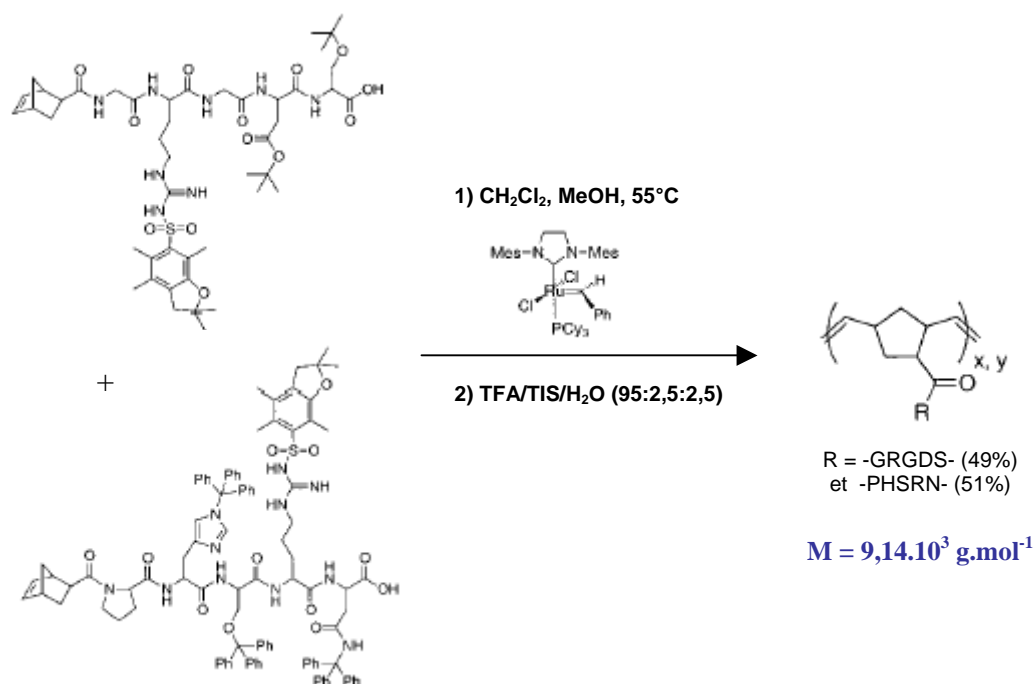


Figure 16 : Schéma d'obtention du copolymère -GRGDS-/PHSRN- par la méthode de ROMP (Ring Opening Metathesis Polymerization).⁷⁸

◆ Les protéines.

Les squelettes protéiques peuvent également constituer des supports pour la présentation de plusieurs copies d'un ligand. Les ligands sont typiquement introduits sur les fonctions nucléophiles de la protéine (résidus lysines, histidines, cystéines ou extrémité N-terminale) par l'intermédiaire d'un linker fonctionnel.

Dans le cas des ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, cette stratégie a été explorée par le groupe de G. Molema qui a développé un dérivé multivalent du peptide cyclique c[-RGDfK-] sur un squelette protéique inerte de type IgG. La structure protéique a été au préalable fonctionnalisée par des groupements iodoacétyle par acylation des résidus lysines par l'iodoacétate de *N*-succinimydyle (SIA). Les cyclopentapeptides, fonctionnalisés sur le résidu lysine par une fonction thioacétate (c[-RGDfK(CO-CH₂-S-CO-CH₃)-]), ont été déprotégés *in situ* par l'hydroxylamine et conjugués à la protéine.⁸¹ (cf. Figure 17)

⁸¹ Kok, R. J.; Schraa, A. J.; Bos, E. J.; Moorlag, H. E.; Asgeirsdottir, S. A.; Everts, M.; Meijer, D. K.; Molema, G. Preparation and functional evaluation of RGD-modified proteins as $\alpha_v\beta_3$ integrin directed therapeutics. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 128-135.

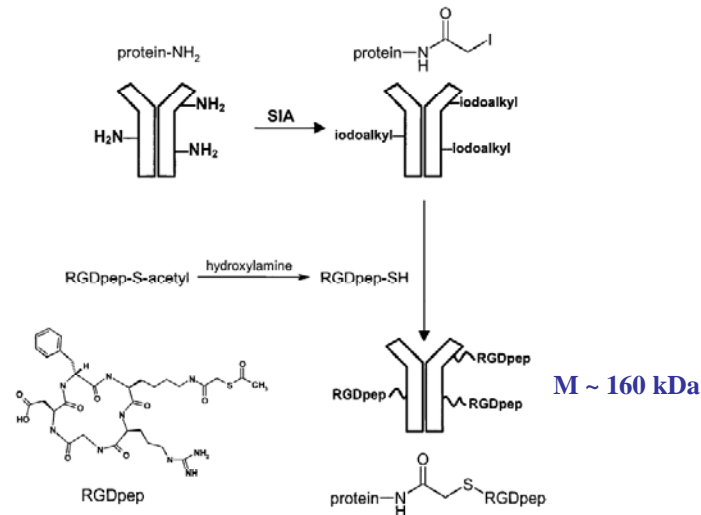


Figure 17 : Schéma d'obtention des conjugués multivalents c[-RGDfK-] supportés sur un squelette protéique.

Les conjugués obtenus ont une distribution moyenne de 23 ligands par structure. Ce groupe a montré que ces structures multivalentes ont une affinité pour des cellules HUVEC, exprimant le récepteur $\alpha_V\beta_3$, nettement supérieure à celle du ligand monovalent de référence c[-RGDfV-] : IC_{50} de 0,6 nM et 158 nM respectivement. Ces conjugués -RGD-/protéine, marqués à l'iode 125, sont par ailleurs internalisés par ces cellules et dégradés selon un processus qui est inhibé par les inhibiteurs de la dégradation lysosomale (chloroquine et chlorure d'ammonium).⁸² Enfin, l'administration de ces ligands radiomarqués à des souris porteuses de tumeurs B16F10 a permis de détecter leur accumulation spécifique dans l'endothélium tumoral.⁸³

L'utilisation de tels conjugués -RGD-/protéine peut permettre d'envisager des applications pour la vectorisation : le squelette IgG peut être remplacé ou fusionné à une protéine d'intérêt thérapeutique (e.g. tTF, TNF- α , IL-2). Il est toutefois important de souligner que cette approche conduit à une structure de composition chimique non définie avec un indice de valence imprécis.

⁸² Schraa, A. J.; Kok, R. J.; Berendsen, A. D.; Moorlag, H. E.; Bos, E. J.; Meijer, D. K.; de Leij, L. F.; Molema, G. Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *J. Control. Release* **2002**, *83*, 241-251.

⁸³ Schraa, A. J.; Kok, R. J.; Moorlag, H. E.; Bos, E. J.; Proost, J. H.; Meijer, D. K.; de Leij, L. F.; Molema, G. Targeting of RGD-modified proteins to tumor vasculature: a pharmacokinetic and cellular distribution study. *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 469-475.

Aux outils synthétiques qui permettent d'associer des fonctions de ciblage et de vectorisation, il faut ajouter les cyclodécapeptides auxquels nous accordons une place privilégiée puisqu'ils sont à la base de nos travaux. Ces peptides cycliques permettent d'accéder à des architectures multivalentes de composition chimique parfaitement définie et de taille modeste. Leur avantage majeur, sur toutes les autres méthodes décrites précédemment, réside dans leur présentation de deux faces indépendantes, qui peuvent permettre d'associer les modules de ciblage et les effecteurs biologiques sans qu'ils puissent interférer.

III.3. Les gabarits « RAFTs ».

III.3.1 – Origine du concept des RAFTs.

L'origine des cyclodécapeptides dénommés « RAFTs » (*Regioselectively Addressable Functionalized Templates*) date de la fin des années 1980. Cet outil a été introduit par M. Mutter qui s'intéressait alors à la construction de molécules d'architecture réduite capables de mimer les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines (protein de novo design⁸⁴). L'activité d'une protéine (e.g. activité catalytique d'une enzyme, reconnaissance et fixation d'un anticorps sur son épitope) est principalement contrôlée par sa structure tridimensionnelle. L'enchaînement des motifs structuraux comme les hélices α , les coudes ou les feuillets β , définit les structures tertiaire et quaternaire de la protéine et lui confère une conformation responsable de son activité. Une des principales difficultés dans la conception de petites structures minimisées mimant les protéines est de conserver la conformation des motifs impliqués dans les interactions. Dans ce contexte, M. Mutter a développé un nouveau concept désigné par l'acronyme TASP (*Template Assembled Synthetic Protein*), utilisant une matrice sur laquelle ces éléments sont greffés et peuvent se stabiliser mutuellement.⁸⁵ Dans cette approche, les motifs structuraux ne sont plus reliés linéairement comme dans la structure primaire de la protéine parente, mais se trouvent rapprochés dans l'espace artificiellement une fois fixés sur la matrice. La stabilisation entre les différents motifs, obtenue par coopération

⁸⁴ Tuchscherer, G.; Dumy, P.; Mutter, M. Protein de Novo Design. *Chimia* **1996**, *50*, 644-648. ; Dumy, P. Cyclic peptides as topological templates in biomimetic chemistry. *Chimia* **1996**, *50*, 640-641.

⁸⁵ Mutter, M.; Vuilleumier, S. A chemical approach to protein design. Template Assembled Synthetic Protein (TASP). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 535-554.

intramoléculaire sur le gabarit, permet alors de s'affranchir en partie des problèmes liés au repliement des protéines. (cf. Figure 18)

La démarche consiste ainsi dans un premier temps à identifier, grâce à l'étude de la structure cristalline de la protéine, les motifs structuraux essentiels à son activité. Les différentes séquences polypeptidiques sont ensuite synthétisées indépendamment les unes des autres, puis assemblées à tour de rôle sur une matrice fonctionnalisée dérivable régiosélectivement - RAFT (*Regioselectively Addressable Functionalized Template*) -, pour conduire à un mime synthétique de la protéine. Le RAFT constitue l'intermédiaire clé de la stratégie de synthèse.

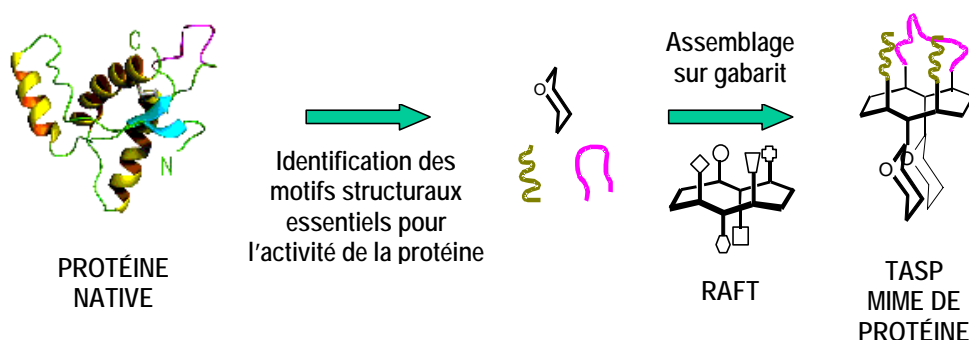


Figure 18 : Schéma rétrosynthétique de la construction d'un mime de protéine TASP.

III.3.2 – Description des RAFTs.

Le squelette des RAFTs est un décapeptide cyclique constitué par l'enchaînement de deux séquences identiques -Pro-Gly-Lys-Lys-Lys-⁸⁶ (cf. Figure 19) Cette structure est inspirée de celle de la Gramicidine S, un antibiotique de structure cyclodécapeptidique symétrique : c[-Val-Orn-Leu-DPhe-Pro-]₂.

⁸⁶ Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. A convenient synthesis of cyclic peptides as Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1255-1258.

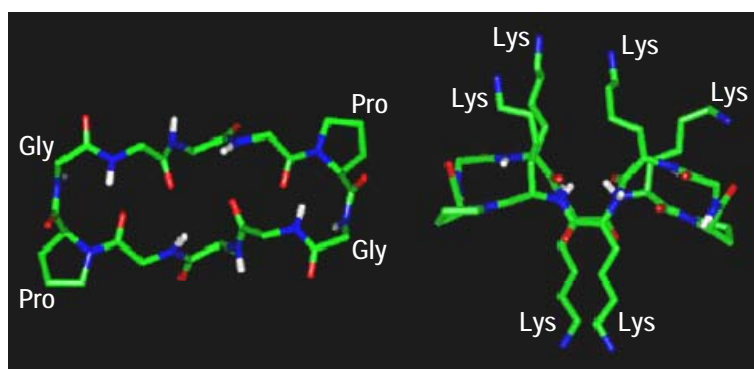


Figure 19 : Structure tridimensionnelle d'un RAFT.

Des études RMN ($^1\text{H} - 2\text{D}$), soutenues par des structures cristallines aux rayons X, ont montré que le RAFT est composé de deux feuillets β antiparallèles, reliés par deux coudes -Pro-Gly- de série L (coudes β de type II), stabilisant la conformation du cyclodécapeptide en solution.^{87,88} Outre la rigidité structurale et la stabilité conformationnelle en solution, la structure cyclique des matrices est par ailleurs susceptible de leur conférer une plus grande résistance aux enzymes protéolytiques dans le cadre d'une utilisation *in vivo*. Les études de diffraction des rayons X, réalisées sur une matrice du type $c[-p\text{-G-F}(p\text{-NO}_2)\text{-A-F}(p\text{-NO}_2)\text{-}]_2$, ont en outre permis d'accéder aux paramètres de taille du gabarit ($L \sim 10 \text{ \AA}$ et $l \sim 5\text{-}6 \text{ \AA}$) et aux distances qui séparent les atomes des chaînes latérales des résidus centraux.⁸⁸ (cf. Figure 20)

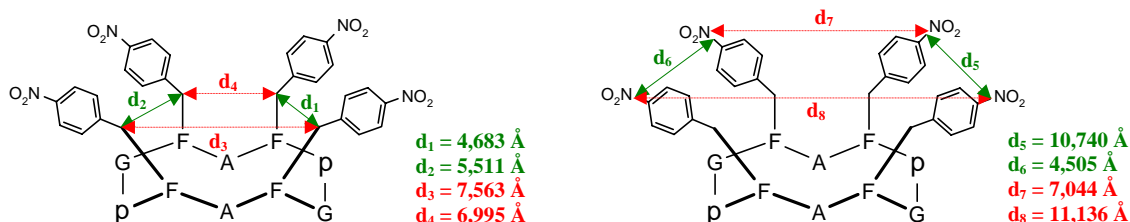


Figure 20 : Détermination des principaux paramètres de taille d'un gabarit $c[-p\text{-G-F}(p\text{NO}_2)\text{-A-F}(p\text{NO}_2)\text{-}]_2$.⁸⁹

⁸⁷ Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: an NMR and restrained molecular dynamics investigation. *Biopolymers* **1996**, *39*, 297-308.

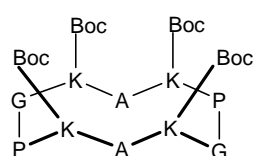
⁸⁸ Peluso, S.; Ruckle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M. Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design. *ChemBiochem* **2001**, *2*, 432-437.

⁸⁹ Exceptionnellement dans ce schéma par rapport à toutes les autres représentations des RAFTs dans la suite de ce manuscrit, les chaînes latérales des résidus phénylalanines sont indiquées pour pouvoir préciser les distances mesurées.

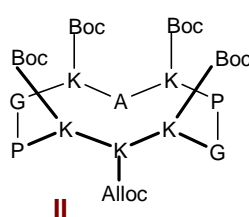
Les chaînes latérales des six résidus lysines de la partie centrale se trouvent orientées de part et d'autre du plan moyen du cycle. Les quatre résidus lysines encadrant les deux coudes -Pro-Gly- ont leur chaîne latérale qui pointe du même côté du cycle (par convention appelé face supérieure du RAFT), tandis que les deux résidus lysines centraux ont leur chaîne latérale qui pointe vers le côté opposé (face inférieure). (cf. Figure 19) Les RAFTs présentent donc deux faces d'adressage et six sites d'ancrage de motifs structuraux (ϵNH_2 des chaînes latérales des six résidus lysines). Ces sites sont facilement différenciables au moyen de groupes protecteurs orthogonaux, permettant l'accrochage de différents motifs et assurant l'indépendance des deux faces du gabarit. La combinaison des groupes protecteurs permet ainsi de distinguer 5 grands types de RAFTs : (cf. Figure 21)

RAFTs à un domaine

RAFTs à deux domaines



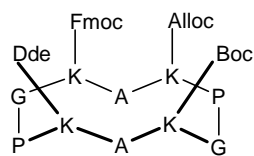
I



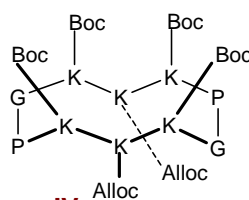
II

Face supérieure :
domaine de "reconnaissance"

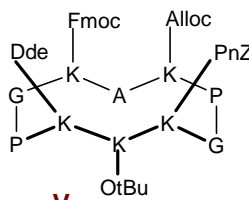
Face inférieure :
domaine "effecteur"



III



IV



V

Figure 21 : Représentation des différents types de RAFTs I à V se différenciant par le jeu des groupements protecteurs orthogonaux.

↘ Les RAFTs à un domaine :

Ils sont constitués de quatre résidus lysines dont les chaînes latérales sont orientées du même côté du cycle, les résidus centraux étant remplacés par des résidus alanines. Ceci conduit à l'obtention d'une matrice ne présentant qu'une seule face d'adressage (face supérieure).

Les chaînes latérales des résidus lysines peuvent être protégées par un seul type de groupe protecteur conduisant alors à un intermédiaire adéquat pour l'attachement de plusieurs éléments identiques (RAFT de type I) ou bien par des groupements orthogonaux pour le greffage de 2 à 4 motifs différents (RAFT de type III). Ces derniers ont été notamment utilisés pour l'assemblage de boucles peptidiques sur une matrice pour la construction de mimes de récepteurs ou de métalloprotéines.⁹⁰

↘ Les RAFTs à deux domaines :

L'utilisation de deux types de groupes protecteurs orthogonaux sur chacune des deux faces permet l'assemblage de deux modules fonctionnels différents. (RAFTs de types II ou IV) Ce type de RAFT a notamment été utilisé pour le design de biosenseurs : un domaine est utilisé pour présenter quatre copies d'un même antigène, l'autre pour adsorber la molécule sur une surface d'or pour des études SPR.⁹¹

Au sein du laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et de Chimie des Composés Bio-organiques, les RAFTs sont notamment développés pour construire diverses architectures multivalentes. Ils ont été employés pour présenter plusieurs copies de motifs saccharidiques impliqués dans les phénomènes de reconnaissance biologique (motifs galactoses, mannoses ou encore *N*-acetylgalactosamines).⁹² La capacité de reconnaissance de ces glycoconjugués par des lectines a été validée. Les RAFTs ont également été utilisés pour conjuguer des

⁹⁰ Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, G.; Tuchscherer, G. Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 11482-11485. ; Peluso, S.; Dumy, P.; Nkubana, C.; Yokokawa, y.; Mutter, M. Solid-Phase Strategies for the Assembly of Template-based Protein Mimetics. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7114-7120.

⁹¹ Scheibler, L.; Dumy, P.; Stamou, D.; Duschl, C.; Vogel, H.; Mutter, M. Fonctionnalisation of Gold Surfaces via Topological Templates. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3725-3734. ; Scheibler, L.; Dumy, P.; Boncheva, M.; Leufgen, K.; Mathieu, H. J.; Mutter, M.; Vogel, H. Fonctionnal Thin Films : Topological Templates for the Chemoselective Ligation Antigenic peptides to Self-Assembled Monolayers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 696-699.

⁹² Renaudet, O.; Dumy, P. Chemoselectively template-assembled glycoconjugates as mimics for multivalent presentation of carbohydrates. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243-246.

épitopes saccharidiques tumoraux (épitopes Tn et Tf) avec un peptide antigénique pour la conception de vaccins synthétiques anti-tumoraux.⁹³

Dans nos travaux, les RAFTs ont été dérivés pour construire une architecture multivalente de cyclopentapeptides -RGD- et concevoir un système de vectorisation non-viral ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

⁹³ Grigalvicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccine. *Bioconjug. Chem.* **2005**, In press.

IV. Définition du Projet de Recherche.

La conception de molécules capables de reconnaître et de se concentrer spécifiquement dans les foyers tumoraux primitifs et métastatiques est primordiale pour le développement d'agents anti-tumoraux plus efficaces et mieux tolérés. Ceci exige d'une part l'identification de molécules de surface spécifiquement exprimées par les tumeurs, la conception de ligands spécifiques de ces récepteurs, ainsi que l'utilisation d'outils de vectorisation adéquats.

Dans ce contexte, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, sur-exprimée à la surface des cellules endothéliales des néo-vaisseaux tumoraux et présente sur de nombreuses lignées tumorales humaines, constitue une cible judicieuse pour atteindre spécifiquement les zones de néo-angiogenèse tumorale. A ces fins, nos travaux ont été consacrés à la conception de vecteurs synthétiques, fondés sur la technologie des RAFTs et ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques contre le cancer.

IV.1. Description du vecteur développé.

Notre démarche a consisté à utiliser un châssis cyclodécapeptidique RAFT pour présenter, de façon clusterisée, plusieurs copies d'un ligand spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ contenant la séquence tripeptidique -RGD-.

Le pentapeptide cyclique *cyclo*[-RGDfV-], initialement développé par le groupe de H. Kessler, a été largement étudié. Son affinité et sa spécificité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été bien caractérisées et ses effets biologiques *in vitro* et *in vivo* mesurés. La découverte de ce ligand a initié de nombreux travaux dans le développement de stratégies anti-angiogéniques ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ce ligand est par conséquent un excellent outil pour le développement et l'évaluation de nos architectures multivalentes.

Des travaux récents ont montré l'intérêt d'architectures multivalentes du motif -RGD-. Ces structures se sont avérées plus efficaces que les ligands monovalents pour le ciblage des zones de néo-angiogenèse tumorale ainsi que pour leur effet anti-tumoral. Les ligands -RGD-

multivalents présentent une meilleure affinité pour le récepteur $\alpha_v\beta_3$ et ont en outre un temps de circulation plus long dans l'organisme.

Les gabarits RAFT, étudiés au sein de notre laboratoire, constituent un excellent outil pour la construction d'une architecture multivalente de motifs -RGD-. Ils présentent l'avantage, par rapport aux autres structures décrites, de contrôler parfaitement la densité des ligands présentés et d'obtenir une distribution homogène de ces ligands à la surface du gabarit. Par ailleurs, la taille du gabarit permet la construction d'un ligand multivalent comportant une densité locale importante en motifs -RGD- (cluster de ligands).

Les gabarits RAFT présentent par ailleurs deux domaines adressables séparés dans l'espace. Ils autorisent ainsi l'assemblage indépendant de différents modules fonctionnels, ainsi que leur présentation dans des orientations spatiales distinctes et parfaitement contrôlées. Cette caractéristique nous a permis d'envisager l'utilisation des architectures multivalentes RAFT(c[-RGDfK-])₄ comme outil de ciblage et de vectorisation de molécules d'intérêt biologique vers les foyers tumoraux angiogeniques. (cf. Figure 22)

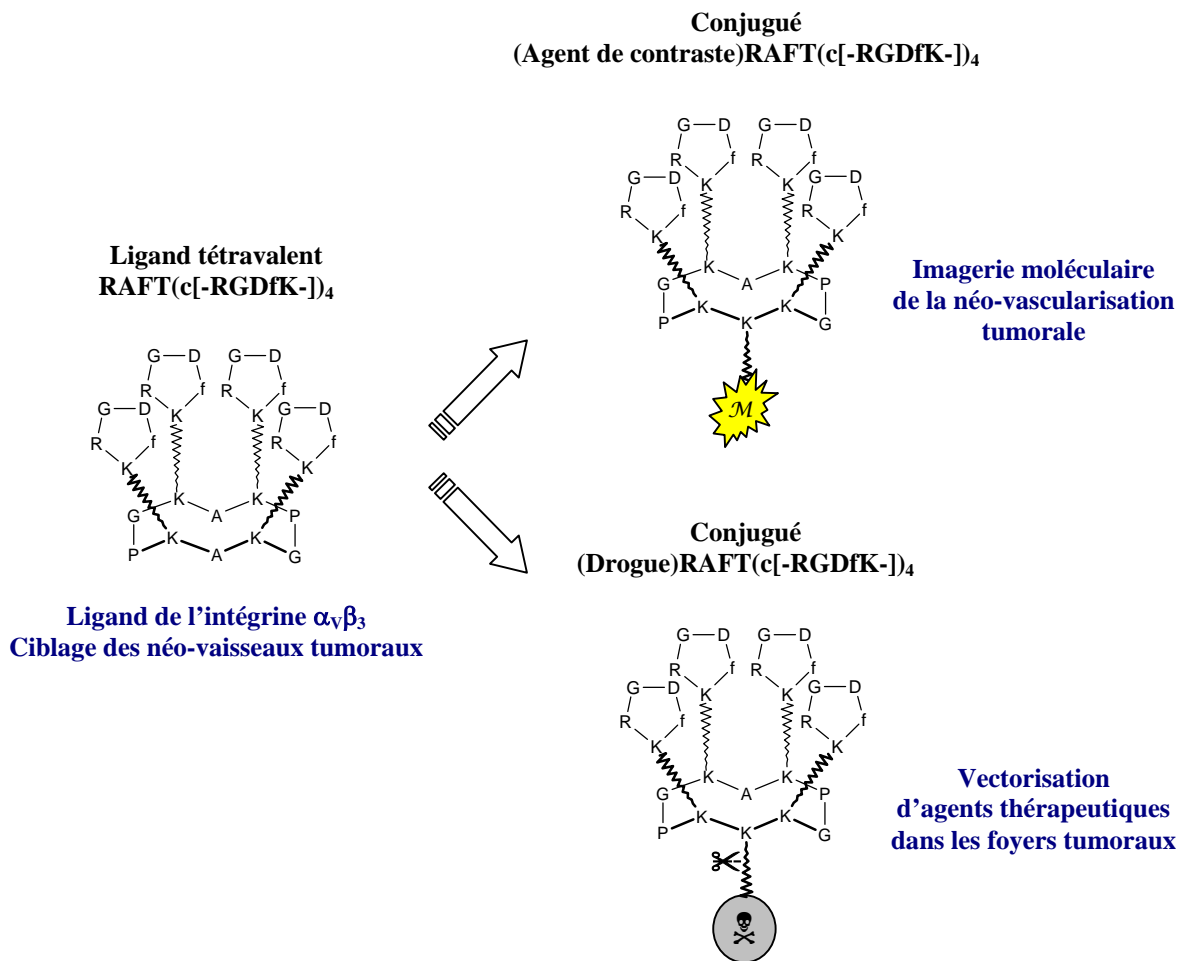


Figure 22 : Nouveaux systèmes de ciblage et de vectorisation pour la cancérologie.

IV.2. Démarche expérimentale.

IV.2.1 - Assemblage multivalent de motifs c[-RGDfK-] sur un gabarit RAFT.

Notre approche a consisté, dans un premier temps, à synthétiser des ligands multivalents RAFT(c[-RGDfK-])_n dans lequel le gabarit RAFT est fonctionnalisé sur sa face supérieure (face de reconnaissance) par un nombre variable de copies du motif cyclopentapeptidique c[-RGDfK-]. (PARTIE **A**) Les différentes structures multivalentes ont été testées dans des études biologiques *in vitro* de façon à mesurer et comparer leur affinité pour le récepteur cellulaire $\alpha_v\beta_3$. (PARTIE **D**) La structure RAFT(c[-RGDfK-])₄ a été retenue pour la conception de notre outil de vectorisation.

IV.2.2 – Étude du vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄.

La déclinaison de la face inférieure du RAFT par des molécules de détection (e.g. biotine, fluorescéine, cyanine 5) (PARTIE **B**) nous a permis de réaliser une étude biologique approfondie de notre vecteur. Nous avons cherché à comprendre le mode d'interaction et l'activité du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ avec les cellules cibles et à comparer ses propriétés à celles du ligand monovalent connu. (PARTIE **D**)

IV.2.3 - Conception d'une sonde moléculaire de la néo-vascularisation tumorale pour l'imagerie des tumeurs.

La conjugaison des ligands multivalents RAFT(c[-RGDfK-])₄ avec des agents de contraste nous a permis d'envisager l'utilisation de ces vecteurs pour l'imagerie non-invasive des tumeurs. Nos choix se sont essentiellement portés sur deux techniques d'imagerie :

- la scintigraphie, largement employée aujourd'hui par les cliniciens pour la détection des cancers. La structure RAFT(c[-RGDfK-])₄ a pour cela été conjuguée à un radiotracer, la tyrosine marquée par un isotope radioactif (¹²⁵I). (PARTIE **B**) Leur évaluation est en cours au sein du laboratoire des radiopharmaceutiques biocliniques (INSERM E0340, Pr. D. Fagret).

- l'imagerie optique, au moyen de sondes possédant des propriétés de fluorescence dans le proche infra-rouge (NIRF). Cette technique constitue une alternative très intéressante aux autres méthodes d'imagerie traditionnelles et est actuellement en plein essor dans le cadre des nouvelles méthodes d'imagerie moléculaire. Nous avons alors couplé le ligand RAFT(c[-

RGDfK-)]₄ à de nouveaux fluorophores indocyanines (PARTIE **B**) et évalué les vecteurs obtenus à l'atelier d'imagerie du petit animal (INSERM U378, Dr. J.L. Coll) (PARTIE **E**).

IV.2.4 – Conception de vecteurs de drogues pour la thérapie anti-tumorale.

La vectorisation d'agents thérapeutiques au sein des tissus malins est un enjeu de la recherche de nouvelles thérapies anti-tumorales. En concentrant l'action des drogues sur les tissus pathologiques ciblés et en limitant leurs effets secondaires sur les organes sains, le développement de tels vecteurs doit permettre d'augmenter l'efficacité et la tolérance des chimiothérapies anti-cancéreuses.

La structure RAFT(c[-RGDfK-])₄, tout à fait appropriée à ces applications, a donc été conjuguée à des drogues de différentes familles : *i*) au peptide pro-apoptotique (KLAKLAK)₂, *ii*) à la doxorubicine, *iii*) à la sous-unité A de la ricine.

Ces drogues ont été rattachées au vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄, soit par un lien covalent stable de type éther d'oxime, soit par un lien disulfure labile, permettant la libération intracellulaire de la drogue. (PARTIE **C**) Les vecteurs synthétisés ont été engagés dans des tests biologiques préliminaires permettant d'évaluer leur cytotoxicité. (PARTIE **F**)

La partie « Résultats et Discussion » de ce manuscrit est articulée en deux volets permettant de distinguer les travaux de synthèse (PARTIES **A**, **B** et **C**) des études biologiques (PARTIES **D**, **E** et **F**) et d'en faciliter la lecture par les scientifiques de ces deux domaines.

RÉSULTATS

ET

DISCUSSION

SYNTHÈSES CHIMIQUES

A. SYNTHÈSE DES LIGANDS MULTIVALENTS RAFT(c[-RGDfK-])_n.

A.1. Objectif des travaux.

La première partie des travaux de synthèse consiste en la préparation de ligands -RGD- multivalents à partir de gabarits RAFTs. Le RAFT est fonctionnalisé, de manière contrôlée sur sa face supérieure, par des motifs c[-RGDfK-] de façon à obtenir des architectures avec différents indices de valence, compris entre 1 et 16. Cinq versions de ligands sont ainsi synthétisées : RAFT(c[-RGDfK-])₁, RAFT(c[-RGDfK-])₂, RAFT(c[-RGDfK-])₃, RAFT(c[-RGDfK-])₄ et RAFT(c[-RGDfK-])₁₆. Les unités RAFT et c[-RGDfK-] sont assemblées par établissement de liens chimiosélectifs éthers d'oxime permettant une conjugaison efficace des deux partenaires peptidiques.

Avant d'exposer les synthèses de ces ligands, nous rappelons les principales méthodes chimiosélectives décrites dans la littérature et justifions notre préférence pour la liaison éther d'oxime.

A.2. Intérêt des conjugaisons chimiosélectives – Choix du lien éther d'oxime.

Les méthodes chimiosélectives offrent une alternative particulièrement intéressante aux synthèses traditionnelles pour la conjugaison de biomolécules de différentes familles et la construction de conjugués complexes de hauts poids moléculaires. Elles reposent sur l'assemblage convergent de deux fragments polyfonctionnels déprotégés de différentes natures (peptides, protéines, saccharides, glycopeptides, acides nucléiques...) portant l'un et l'autre des fonctions chimiques présentant une réactivité réciproque unique et spécifique (fonctions électrophile et nucléophile « complémentaires »). La formation de la liaison chimiosélective se déroule au moyen des deux synthons complètement déprotégés, sans réactif de couplage et en milieu aqueux. Ceci permet souvent de contourner les problèmes de

solubilité et de purification rencontrés lors des synthèses classiques et de simplifier considérablement les stratégies de synthèse. Les différents types de liaisons chimiosélectives comprennent principalement les liaisons disulfures, les liaisons thioesters, les liaisons hydrazones, les liaisons éthers d'oxime, les liaisons thiosemicarbazones, les liaisons pseudoprolines et les liaisons chimiques natives. (cf. Figure 1)

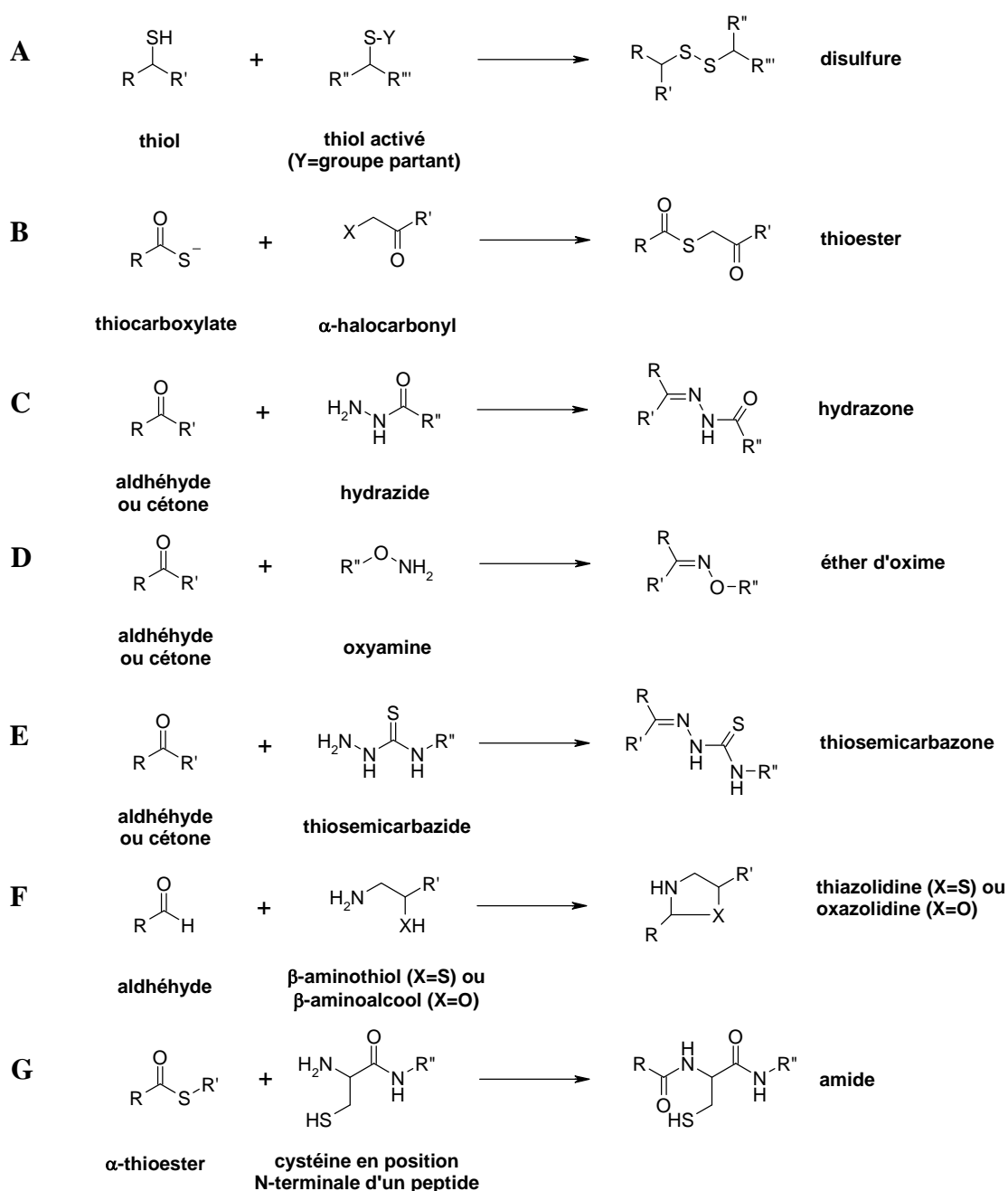


Figure 1 : Différents types de liaisons chimiosélectives.

- Les liaisons disulfures.

(cf. Figure 1, A)

Les méthodes chimiosélectives basées sur la formation de ponts disulfures ont été largement développées dans le cadre des synthèses de peptides naturels contenant des liens disulfures intramoléculaires. Trois principales approches synthétiques ont émergé :¹

- l'oxydation à l'air de fonctions thiols libres, déprotégées (principalement dans le cas de la formation de disulfures intramoléculaires ou de couplages homodimériques),

- la déprotection et l'oxydation simultanées à l'iode de fonctions thiols protégées par des groupements du type Trt, AcM ou Tmob (cas des disulfures intramoléculaires ou homodimériques),

- l'attaque nucléophile d'une fonction thiol libre sur une fonction thiol activée, porteuse d'un groupe partant du type ScM, Nps ou Pyr (réaction de déplacement du disulfure, cas de la formation de disulfures intermoléculaires hétérodimériques).

La combinaison de ces stratégies a notamment permis une synthèse élégante et judicieuse de l'insuline par le groupe de Ciba-Geigy.² La troisième approche a par ailleurs conduit à l'utilisation des groupements pyridinesulfényles, comme le groupement NPys (3-nitro-2-pyridinesulfényl), qui ont permis d'améliorer considérablement l'efficacité de la formation des disulfures. L'intérêt majeur du groupement NPys réside dans la dualité de son caractère à la fois protecteur et activateur de la fonction thiol.³ Cette stratégie est discutée dans le troisième volet de ce chapitre (PARTIE C).

- Les liaisons thioesters.

(cf. Figure 1, B)

Ces liaisons constituent véritablement les premières approches chimiosélectives décrites dans la littérature. Elles ont été utilisées par S.B.H. Kent pour la synthèse de protéines afin de résoudre les problèmes de solubilité et de taille liés aux méthodes de condensation conventionnelles.⁴ La démarche synthétique est alors considérablement simplifiée. La

¹ Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. Editor : C.W. Rees, CRC Press, Boca Raton, New York, **1997**.

² Sieber, P.; Kamber, B.; Eisler, K.; Hartmann, A.; Riniker, B.; Rittel, W. Synthesis of human insulin. II. preparation of the A(1-13) fragment. *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1489-1497. ; Kamber, B.; Riniker, B.; Sieber, P.; Rittel, W. Synthesis of human insulin. III. Preparation of the A(14-21) - B(17-30) fragment. *Helv. Chim. Acta* **1976**, 2830-2840.

³ Mezö, G.; Mihala, N.; Andreu, D.; Hudecz, F. Conjugation of epitope peptides with SH group to branched chain polymeric polypeptides via Cys(Npys). *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 484-491.

⁴ Schnölzer, M.; Kent, S. B. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease. *Science* **1992**, *256*, 221-225.

macromolécule cible, une protéase de HIV-1, est divisée en fragments peptidiques de plus petites tailles, facilement accessibles par SPPS, et portant des fonctions chimiques réactives adéquates : fonction thioacide à l'extrémité C-terminale ou groupe α -bromoacétyle à l'extrémité N-terminale. La réaction de thioestérification chimiosélective entre les deux fragments est effectuée en milieu aqueux tamponné (pH 5-6). La présence des chaînes latérales déprotégées et potentiellement réactives des autres résidus acides aminés sur chacun des fragments, en particulier celle des résidus cystéines, n'influe pas sur l'efficacité de la réaction en raison de la différence de pKa entre les fonctions thioacide (pKa \approx 3) et thiol (pKa \approx 8). Au pH où se déroule la réaction, l'anion thiocarboxylate plus nucléophile réagit plus rapidement avec le dérivé α -bromé et limite les risques de réactions parasites avec les cystéines. L'efficacité de cette méthode est tout à fait remarquable : la protéase obtenue possède une activité catalytique similaire à celle de l'enzyme native.

- Les liaisons hydrazones, éthers d'oxime ou thiosemicarbazones.

(cf. Figure 1, C, D et E)

Les aldéhydes et les cétones sont des fonctions chimiques électrophiles particulièrement appropriées pour les approches chimiosélectives. Ils réagissent sélectivement dans un tampon aqueux (pH 4-6) avec des composés nucléophiles comme les hydrazides, les thiosemicarbazides ou les oxyamines pour former respectivement des liaisons hydrazones, thiosemicarbazones ou éthers d'oxime. Contrairement aux stratégies qui requièrent la présence d'un résidu cystéine en position N-terminale (e.g. liaisons amides natives ou pseudoprolines), la formation de ce type de liaison peut s'effectuer à n'importe quel endroit de la séquence peptidique, à partir de fragments convenablement fonctionnalisés. K. Rose a montré leur efficacité pour la synthèse de protéines artificielles (polypeptides branchés de près de 200 résidus).⁵ L'assemblage de dendrimères contenant plusieurs copies d'un peptide de 20 résidus (peptide VA20 dérivé de la protéine de surface du virus d'immunodéficience des félins) autour d'un cœur polylysine a également été développé par J.P. Tam selon le même principe.⁶

Ces trois types de liaison présentent l'énorme avantage de limiter les risques de réactions secondaires puisque les différents partenaires sont parfaitement chimiosélectifs : les

⁵ Rose, K. Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.

⁶ Shao, J.; Tam, J. P. Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone and thiazolidine linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893-3899.

groupes nucléophiles des chaînes latérales des acides aminés (comme les thiols ou les amines) protonés dans les conditions du couplage ne réagissent pas avec la cétone ou l'aldéhyde.

- Les liaisons pseudoprolines.

(cf. Figure 1, F)

Les protéines peuvent également être assemblées par conjugaison entre un aldéhyde et des fonctions β -aminthiol ou β -aminoalcool (e.g. cystéine, sérine ou thréonine en position N-terminale) pour former respectivement des liens thiazolidines ou oxazolidines. J.P. Tam a utilisé ce type de réaction pour condenser un peptide fonctionnalisé par un aldéhyde sur son extrémité C-terminale et un second fragment présentant une cystéine, une sérine ou une thréonine en position N-terminale.⁷ La réaction conduit à la formation d'une imine instable qui se cyclise spontanément avec la fonction thiol ou alcool pour conduire à un intermédiaire thiazo- ou oxazolidine.

- Les liaisons chimiques natives.

(cf. Figure 1, G)

Les perturbations sur le repliement et l'activité biologique de la protéine, pouvant être causées par l'introduction d'une liaison artificielle, ont conduit S.B.H. Kent et J.P. Tam à développer une méthode biomimétique. Celle-ci permet de reproduire le lien amide natif au niveau du site de liaison entre les fragments peptidiques, de façon similaire au processus naturel autocatalytique du splicing des protéines.^{8,9} Elle requiert un fragment peptidique contenant un résidu cystéine sur son extrémité N-terminale et un second fragment portant un groupe α -thioester sur son extrémité C-terminale. La formation de la liaison amide native entre les deux fragments s'effectue à la suite d'une trans-thioestérification suivie d'un réarrangement spontané par migration du groupement acyle de l'atome de soufre vers l'atome d'azote. (cf. Figure 2) Cette approche convergente a permis de réaliser la synthèse de protéines natives de plus d'une centaine de résidus, impossibles à obtenir par les techniques de SPPS.

⁷ Tam, J. P.; Yu, Q.; Miao, Z. Orthogonal ligation strategies for peptide and protein. *Biopolymers* **1999**, *51*, 311-332.

⁸ Tam, J. P.; Lu, Y. A.; Liu, C. F.; Shao, J. Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 12485-12489. ; Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **1994**, *266*, 776-779. ; Dawson, P. E.; Kent, S. B. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923-960.

⁹ Cooper, A. A.; Stevens, T. H. Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 351-356. ; Shao, Y.; Kent, S. B. Protein splicing: occurrence, mechanisms and related phenomena. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 187-194.

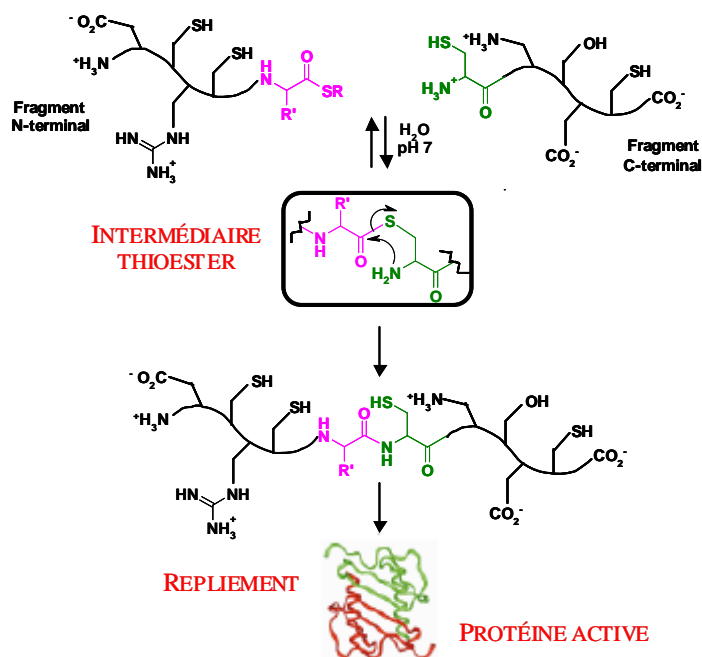


Figure 2 : Mécanisme de formation des liaisons chimiques natives.

Source : Dawson, P. E.; Kent, S. B. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923-960.

Parmi toutes ces méthodes, la liaison éther d'oxime nous a semblé être tout à fait appropriée à la synthèse de nos ligands pour la conjugaison des cyclopentapeptides c[-RGDfK-] au gabarit RAFT. Couramment employée dans la littérature et au sein de notre laboratoire, elle offre une excellente chimiosélectivité et une flexibilité intéressante. Elle a permis la synthèse de bioconjugués complexes comprenant des unités peptidiques, saccharidiques ou oligonucléotidiques, difficiles à obtenir par synthèse classique.^{5,6,10} Par ailleurs, cette méthode a été préférée aux autres méthodes chimiosélectives du fait de la stabilité du lien éther d'oxime *in vitro* et *in vivo*.^{6,11}

¹⁰ Renaudet, O.; Dumy, P. Chemoselectively template-assembled glycoconjugates as mimics for multivalent presentation of carbohydrates. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243-246. ; Canne, L. E.; Botti, P.; Simon, R. J.; Chen, Y.; Dennis, E. A.; Kent, S. B. H. Chemical Protein Synthesis by Solid Phase Ligation of Unprotected Peptide Segments. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8720-8727. ; Neuner, P.; Gallo, P.; Orsatti, L.; Fontana, L.; Monaci, P. An efficient and versatile synthesis of bisPNA-peptide conjugates based on chemoselective oxime formation. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 276-281. ; Rodriguez, E. C.; Winans, K. A.; King, D. S.; Bertozzi, C. R. A Strategy for the Chemoselective Synthesis of O-Linked Glycopeptides with Native Sugar-Peptide Linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9905-9906. ; Cervigny, S. E.; Dumy, P.; Mutter, M. Synthesis of glycopeptides and lipopeptides by chemoselective ligation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1230-1232. ; Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chemistry* **2001**, *7*, 3976-3984. ; Chen, J.; Zeng, W.; Offord, R.; Rose, K. A novel method for the rational construction of well-defined immunogens: the use of oximation to conjugate cholera toxin B subunit to a peptide-polyoxime complex. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 614-618.

¹¹ Nardin, E. H.; Calvo-Calle, J. M.; Oliveira, G. A.; Clavijo, P.; Nussenzweig, R.; Simon, R.; Zeng, W.; Rose, K. Plasmodium falciparum polyoximes: highly immunogenic synthetic vaccines constructed by chemoselective ligation of repeat B-cell epitopes and a universal T-cell epitope of CS protein. *Vaccine* **1998**, *16*, 590-600.

A.3. Design des ligands et stratégie de synthèse.

Les motifs c[-RGDfK-] sont assemblés sur la matrice RAFT par des liens chimiosélectifs éthers d'oxime permettant une conjugaison efficace des deux partenaires peptidiques non protégés et fonctionnalisés convenablement.¹² La flexibilité de cette méthode nous a permis d'envisager deux orientations du lien oxime : tantôt le RAFT est modifié par des fonctions électrophiles aldéhydes glyoxyliques et le monomère c[-RGDfK-] par la fonction oxyamine nucléophile, tantôt l'inverse.

Les architectures multivalentes sont conçues à partir du monomère de structure c[-RGDfK-], Kessler et al. ayant montré que le remplacement du résidu valine par un résidu lysine dans la séquence primaire du cyclopentapeptide original c[-RGDfV-] n'entraînait pas de modification importante de l'activité biologique du ligand.^{13,14} Cette observation a été confortée par l'étude de la structure cristalline du ligand en interaction avec le récepteur $\alpha_V\beta_3$, attestant que les deux résidus encadrant le motif -RGD- sont exposés vers l'extérieur de l'interface d'interaction -RGD-/ $\alpha_V\beta_3$ et n'entrent pas directement en jeu dans l'interaction.¹⁵ L'introduction d'un résidu lysine dans la séquence du peptide permet alors d'envisager une fonctionnalisation de la chaîne latérale de ce résidu sur le groupement amino ($^{\epsilon}\text{NH}_2$) en vue de l'accrochage ultérieur des monomères sur le RAFT. Le cyclopentapeptide c[-RGDfK-] est alors fonctionnalisé soit par la fonction nucléophile oxyamine (**40**), soit par la fonction électrophile aldéhyde glyoxylique (**38**) pour permettre d'envisager les deux stratégies de conjugaison sur le RAFT.¹⁶ (cf. Figure 3)

Notons que le remplacement du résidu glycine par un résidu β -alanine dans la séquence du tripeptide -RGD- (ajout d'un groupement méthylène dans le squelette amide du

¹² Des travaux antérieurs au laboratoire ont montré qu'il est difficile de conjuguer plusieurs motifs c[-R(Pmc)GD(OtBu)fK(CO-(CH₂)₂-COOH-)] sur les résidus lysines de la même face du RAFT par couplage peptidique.

¹³ Haubner, R.; Gratias, R.; Diefenbach, B.; Goodman, S.; Jonczyk, A.; Kessler, H. Structural and Functional Aspects of RGD-Containing Cyclic Pentapeptides as Highly Potent and Selective Integrin $\alpha_V\beta_3$ Antagonists. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461-7472.

¹⁴ Kessler, H.; Diefenbach, B.; Finsinger, D.; Geyer, A.; Gurrath, M.; Goodman, S.; Hölzemann, G.; Haubner, R.; Jonczyk, A.; Muller, G.; Graf von Roedern, E.; Wermuth, J. Design of superactive and selective integrin receptor antagonists containing the RGD sequence. *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *2*, 155-160.

¹⁵ Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_V\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **2002**, *296*, 151-155.

¹⁶ Boturnyn, D.; Dumy, P. A convenient access to $\alpha_V\beta_3/\alpha_V\beta_5$ integrin ligand conjugates : regioselective solid-phase functionalisation of an RGD based peptide. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2787-2790.

motif) suffit à abolir intégralement l'affinité du motif pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.¹⁷ Cette observation nous a conduit à utiliser des motifs c[-R β ADfK-] en remplacement des motifs c[-RGDfK-] pour l'obtention de molécules contrôles nécessaires lors des études biologiques.

La synthèse des ligands multivalents RAFT(c[-RGDfK-])_n requiert l'utilisation d'un précurseur RAFT commun (**2**), à un domaine (RAFT de type I), dont les sites d'adressage (^εNH₂ de la chaîne latérale des 4 résidus lysines) pointent dans la même direction (conventionnellement la face supérieure du RAFT). Les résidus lysines déprotégés sont fonctionnalisés soit par des résidus sérines, équivalents masqués d'aldéhydes, pour la préparation de la matrice électrophile RAFT(CO-CHO)₄ **6**, soit par des fonctions oxyamines pour la préparation de la matrice nucléophile RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄ **8**, permettant les deux stratégies de synthèse du ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄.¹⁸ (cf. Figure 3)

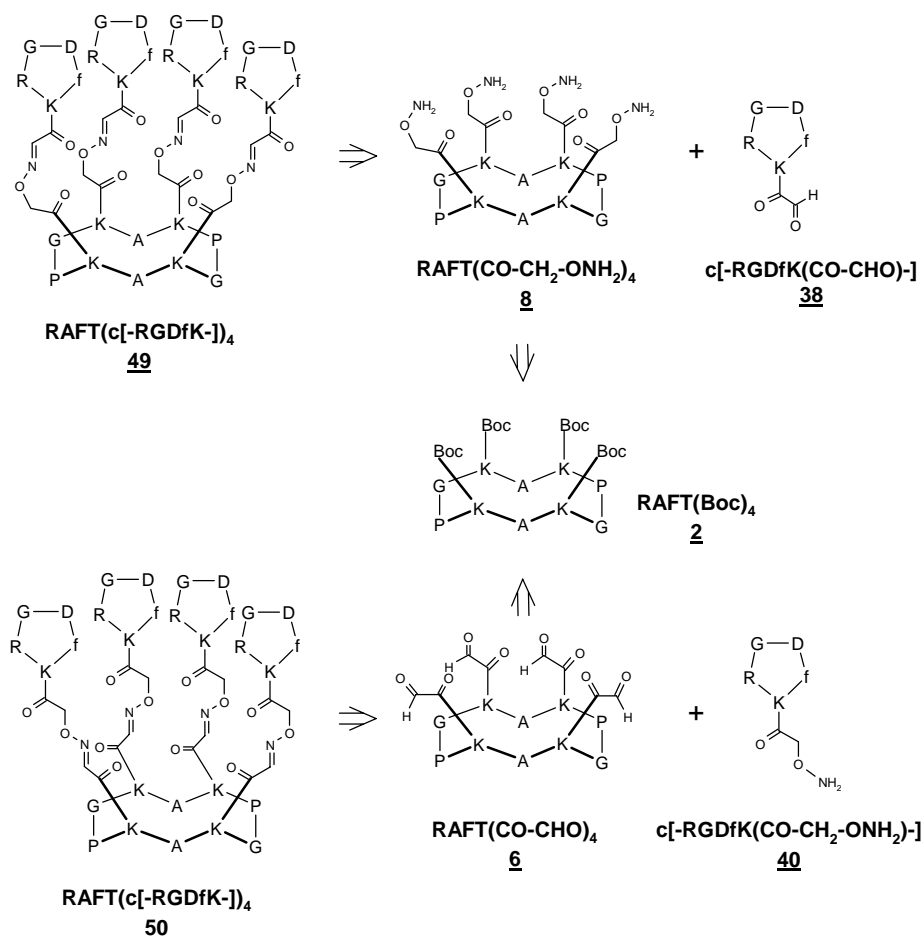


Figure 3 : Schémas rétrosynthétiques des deux stratégies de synthèse du ligand tétravalent RAFT(c[-RGDfK-])₄.

¹⁷ Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha_V\beta_3$ integrin for a new cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374-1389.

¹⁸ Nous avons choisi conventionnellement de noter entre parenthèse, à droite de l'acronyme RAFT, les substituants de la face supérieure du gabarit.

La fonctionnalisation de la chaîne latérale des résidus lysines (indistinctement des cyclopentapeptides ou du RAFT) par la fonction nucléophile oxyamine est réalisée par réaction d'acylation du ϵNH_2 au moyen d'un ester activé *N*-Boc-aminooxysuccinimide. L'introduction d'une fonction électrophile aldéhyde peut elle être judicieusement réalisée par l'incorporation d'un résidu sérine, équivalent masqué d'aldéhyde selon la méthode décrite par J.G. Stroh.¹⁹ La coupure oxydante de la fonction 1,2-aminoéthanol de la sérine par le périodate de sodium forme un aldéhyde glyoxylique extrêmement réactif en présence d'une fonction oxyamine et conduit à la formation d'une liaison éther d'oxime glyoxylique particulièrement stable.

La synthèse de l'architecture multivalente RAFT(c[-RGDfK-])₁₆ **55** requiert l'utilisation d'un bras polylysine. (cf. Figure 4) Celui-ci est assemblé sur le RAFT avant la liaison chimiosélective des motifs cyclopentapeptidiques. Le bras polylysine **99** est synthétisé de façon à présenter une fonction oxyamine à sa base (ϵNH_2 du premier résidu lysine), permettant son accrochage sur la matrice RAFT électrophile, RAFT(CO-CHO)₄ **6**, et quatre résidus sérines à son extrémité, qui après oxydation au périodate, fournit les fonctions aldéhydes glyoxyliques prompts à l'accrochage des motifs -RGD- oxyamines **40**.

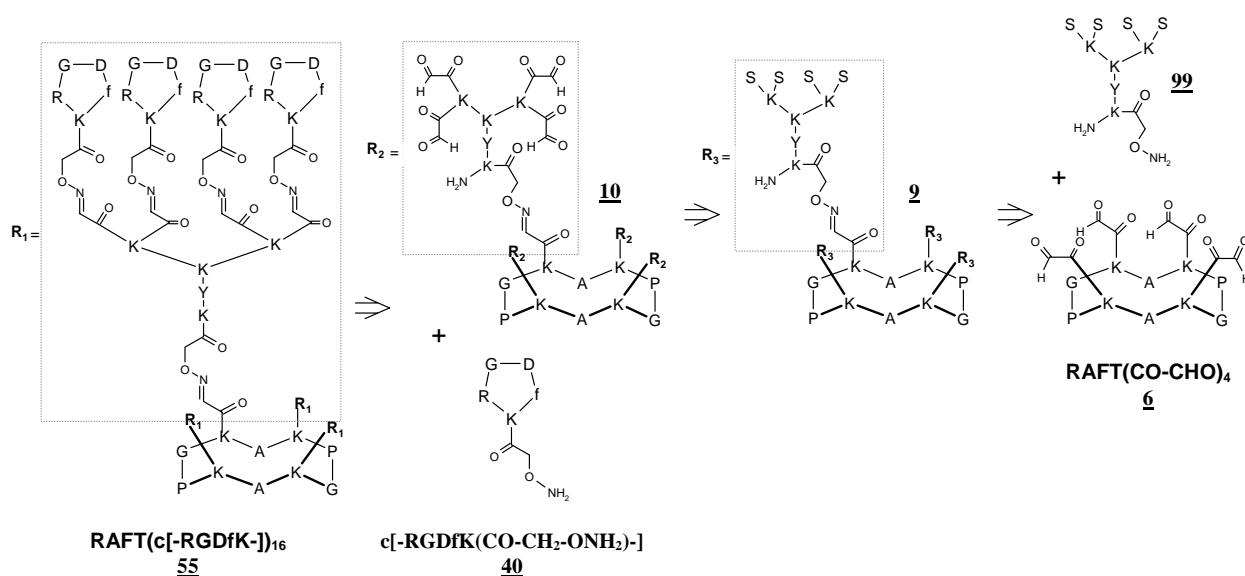


Figure 4 : Schéma rétrosynthétique de la préparation du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₁₆.

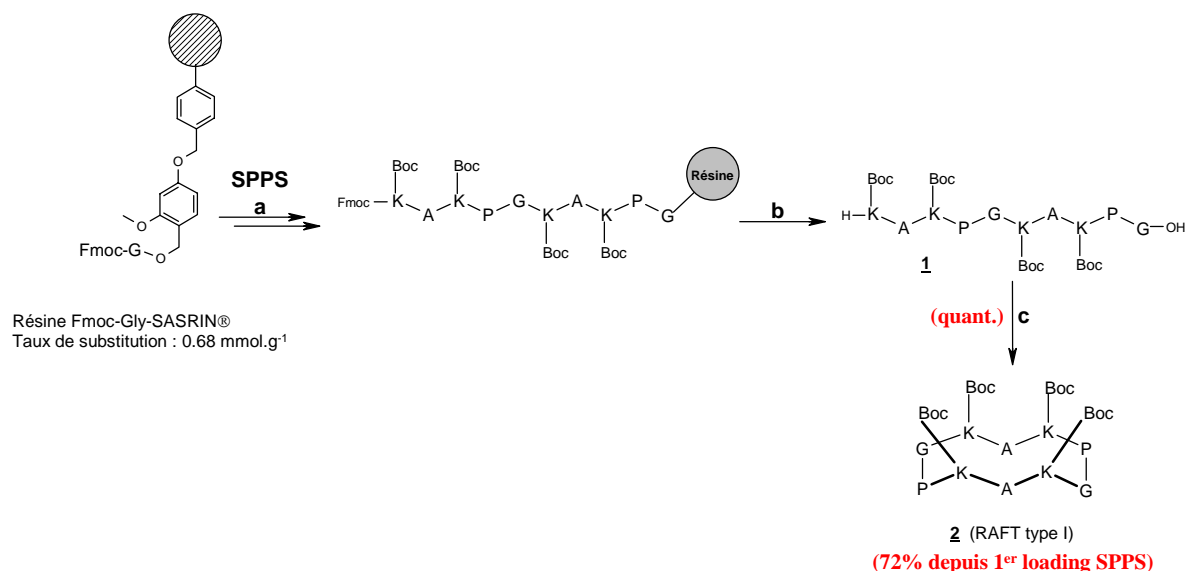
¹⁹ Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. Self-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 138-146.

La stratégie d'obtention des ligands étant convergente, nous présentons successivement la synthèse des précurseurs RAFTs et des synthons cyclopentapeptidiques, puis des différents ligands.

A.4. Synthèse des différents précurseurs.

A.4.1 – Synthèse du précurseur RAFT à un domaine : RAFT(Boc)₄ **2**.

La synthèse du précurseur RAFT **2**, à un domaine, comportant quatre sites simultanément fonctionnalisables (RAFT de type I), requiert une méthode mixte de synthèse peptidique en phase solide et en solution. (cf. Figure 5)



Réactifs : (a) SPPS : 1/ Pipéridine/DMF (1:4) ; 2/ Fmoc-Xaa-OH (2 eq.) , PyBOP (2 eq.) , DIPEA (3-4 eq.) , DMF ;
(b) 1/ Pipéridine/DMF (1:4) ; 2/ TFA/CH₂Cl₂ (1:99) ; (c) PyBOP (1.2 eq.) , DIPEA (3-4 eq.) , DMF (0.5 mM)

Figure 5 : Schéma d'obtention du RAFT **2**.

Le décapeptidique linéaire protégé, précurseur du RAFT, est synthétisé par SPPS selon la stratégie Fmoc/*t*Bu (de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale). L'élongation de la séquence linéaire est réalisée indifféremment sur une résine du type 2-chlorotrityle[®] ou SASRIN[®], dont la coupure s'effectue en conditions acides douces (1% TFA) compatibles avec l'utilisation des groupements protecteurs Boc des chaînes latérales des résidus lysines. (étapes **a** et **b**) La synthèse est initiée à partir du résidu glycine achiral en position C-terminale de façon à s'affranchir des phénomènes d'épimérisation qui peuvent éventuellement survenir dans l'étape ultérieure de cyclisation. (étape **c**) Les cycles de

déprotection du groupement protecteur Fmoc, en position N^α des acides aminés, sont effectués avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF. Le dosage spectrométrique ($\lambda = 299 \text{ nm}$) de l'adduit dibenzofulvène/pipéridine formé permet de suivre le taux de substitution de la résine au fur et à mesure de l'élongation de la séquence. Les couplages peptidiques sont eux réalisés au moyen de l'agent activateur PyBOP^{®20} et en présence d'un excès de réactifs (typiquement 2 eq. d'acide aminé protégé et d'agent de couplage). Chaque couplage est contrôlé par les tests colorimétriques classiques de Kaiser²¹ ou de TNBS²² sur un petit échantillon de résine. La position relative, dans la séquence primaire du décapeptide linéaire, des résidus lysines protégés sur leur chaîne latérale par le groupement Boc, contrôle l'obtention, après cyclisation, d'un châssis présentant quatre résidus lysines ayant leur chaîne latérale orientée du même côté du cycle (conventionnellement la face supérieure du RAFT). Après l'élimination du groupe Fmoc en position N-terminale et décrochage du peptide de la résine, la cyclisation intramoléculaire entre les deux extrémités déprotégées du peptide **1** est réalisée à pH 8-9 dans des conditions de haute dilution ($5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) dans le DMF en présence d'agent activateur PyBOP. Ces conditions permettent de limiter les phénomènes de dimérisation ou d'oligomérisation et de favoriser la réaction de cyclisation intramoléculaire. Le RAFT cyclique **2** est obtenu avec un rendement quantitatif à partir de son précurseur linéaire **1**.

Remarquons que, de façon générale, tous nos peptides linéaires ont été synthétisés par SPPS selon la même procédure.

A.4.2 – Préparation des deux types de matrices RAFT, électrophiles et nucléophiles : **6** et **8**.

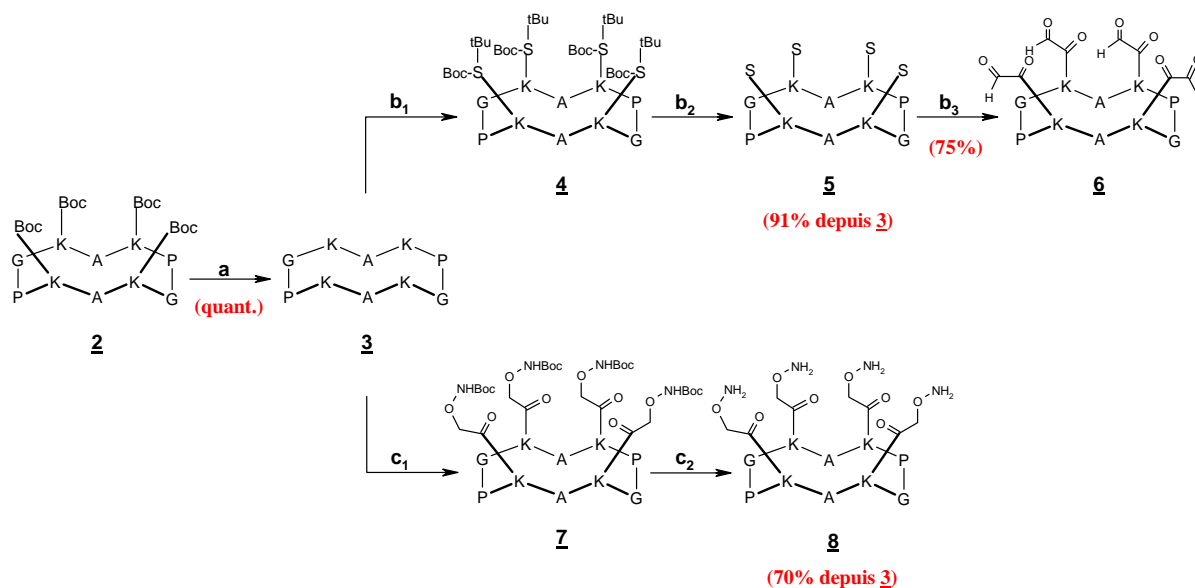
La fonctionnalisation des chaînes latérales des résidus lysines de la face supérieure du châssis RAFT par des motifs aldéhydes ou oxyamines requiert dans un premier temps la déprotection simultanée des quatre résidus lysines de l'intermédiaire **2**. (cf. Figure 6) L'élimination des groupements Boc est alors réalisée par acidolyse au moyen d'une solution

²⁰ Coste, J.; Le Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP : a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.

²¹ Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino group in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.

²² Hancock, W. S.; Battersby, J. E. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reaction in solid-phase synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 261-264.

d'acide trifluoroacétique à 50% dans le dichlorométhane. Le cyclodécapeptide **3**, totalement déprotégé, est obtenu après précipitation dans l'éther avec un rendement quantitatif.



Réactifs :

(a) TFA/CH₂Cl₂ (1:1);

(b₁) Boc-Ser(*t*Bu)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF; (b₂) TFA; (b₃) NaIO₄, H₂O;

(c₁) BocNHCH₂COOSucc **98**, DIPEA, DMF; (c₂) TFA/H₂O/TIS/CH₂Cl₂ (45:2,5:2,5:50)

Figure 6 : Schéma d'obtention des matrices RAFTs électrophile **6** et nucléophile **8**.

L'introduction des résidus sérines, précurseurs des fonctions aldéhydes, à l'extrémité des quatre chaînes latérales des lysines du RAFT **3** est réalisée par couplage peptidique avec l'acide aminé protégé Boc-Ser(*t*Bu)-OH. La formation de la liaison peptidique est réalisée dans le diméthylformamide à pH basique (8-9) en présence d'agent de couplage PyBOP. L'acide aminé et le PyBOP sont introduits dans le milieu réactionnel en léger excès à raison de 1,1 à 1,2 eq. par fonction amine libre. Les groupements Boc et *t*Bu des quatre résidus sérines de l'intermédiaire **4** sont ensuite simultanément éliminés par acidolyse au moyen d'acide trifluoroacétique. L'utilisation d'agents nucléophiles, H₂O et TIS, est indispensable pour piéger les carbocations *t*butyle libérés. La solution est évaporée et le peptide **5** précipité dans l'éther. L'oxydation de la fonction 1,2-aminoalcool de chaque résidu sérine est enfin réalisée dans l'eau en présence d'un excès de périodate de sodium (~ 3 eq. / résidu sérine). La réaction, suivie par CLHP, est complète après 30 min. Les sels d'iode (NaIO₄ en excès et NaIO₃ formé) ainsi que le formaldéhyde libéré par la coupure oxydante sont éliminés lors de la purification par CLHP du mélange réactionnel. Le composé **6**, comportant quatre motifs aldéhydes glyoxyliques, est obtenu avec un rendement de 75% (rendement de l'étape

d'oxydation). Il est caractérisé par spectrométrie de masse électrospray (modes positif et négatif) et détecté, en mode positif, sous forme d'hydrate.

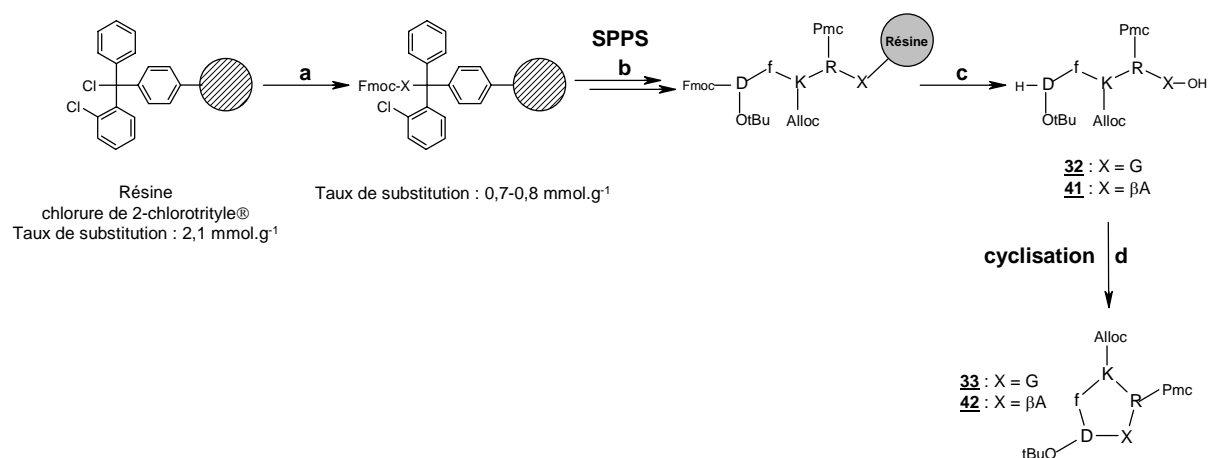
La synthèse de la matrice nucléophile **8** est elle réalisée à partir de l'intermédiaire **3** en seulement deux étapes. Les fonctions oxyamines sont introduites sous forme *N*-Boc monoprotégées. Les fonctions amines libres des quatre résidus lysines de **3** sont acylées au moyen de l'ester activé *N*-Boc-2-aminoxyacétate de succinimidyle **98**. La réaction se déroule dans le diméthylformamide à pH 8. Dans la seconde étape, les fonctions oxyamines de l'intermédiaire **7** sont déprotégées par hydrolyse des groupements Boc dans l'acide trifluoroacétique à 45% dans le dichlorométhane. A ce stade, l'utilisation d'agents nucléophiles (H₂O 2,5% et TIS 2,5%), est indispensable pour piéger les carbocations *t*butyle libérés et empêcher l'alkylation des fonctions oxyamines. Le composé **8**, comportant quatre motifs oxyamines, est obtenu avec un rendement global de 70% par rapport à **3**. Il est lui aussi caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif et identifié par ses ions monochargés (adduits H⁺, Na⁺ et K⁺).

A.4.3 – Préparation des synthons cyclopentapeptidiques c[-RGDfK(CO-CHO)-] **38** et c[-RGDfK(CO-CH₂-ONH₂)-] **40** ainsi que de leurs homologues -RβAD- **46** et **48**.

Des travaux antérieurs ont permis la préparation des monomères cyclopentapeptidiques c[-RGDfK-] fonctionnalisés sur leur résidu lysine soit par une fonction oxyamine soit par un aldéhyde glyoxylique.¹⁶ Les monomères contenant le motif contrôle -RβAD- sont préparés selon une stratégie tout à fait identique. (cf. Figures 7 et 8)

Les séquences linéaires protégées des pentapeptides sont dans un premier temps assemblées par SPPS. (cf. Figure 7) L'utilisation d'une résine acide-labile du type 2-chlorotriyle[®] ou SASRIN[®] est compatible avec l'utilisation des groupements protecteurs Pmc, *O**t*Bu et Alloc des chaînes latérales des autres résidus (arginine, acide aspartique et lysine). L'élongation des séquences est initiée à partir du résidu achiral, glycine ou β-alanine, en position C-terminale pour contourner les problèmes d'épimérisation lors de la cyclisation. Après déprotection de l'extrémité N-terminale et décrochage du peptide de la résine, les séquences linéaires protégées **32** et **41** sont cyclisées dans le DMF dans des conditions de

haute dilution (5.10^{-4} M) en présence d'agent activateur PyBOP, conduisant respectivement aux pentapeptides cycliques **33** et **42**.

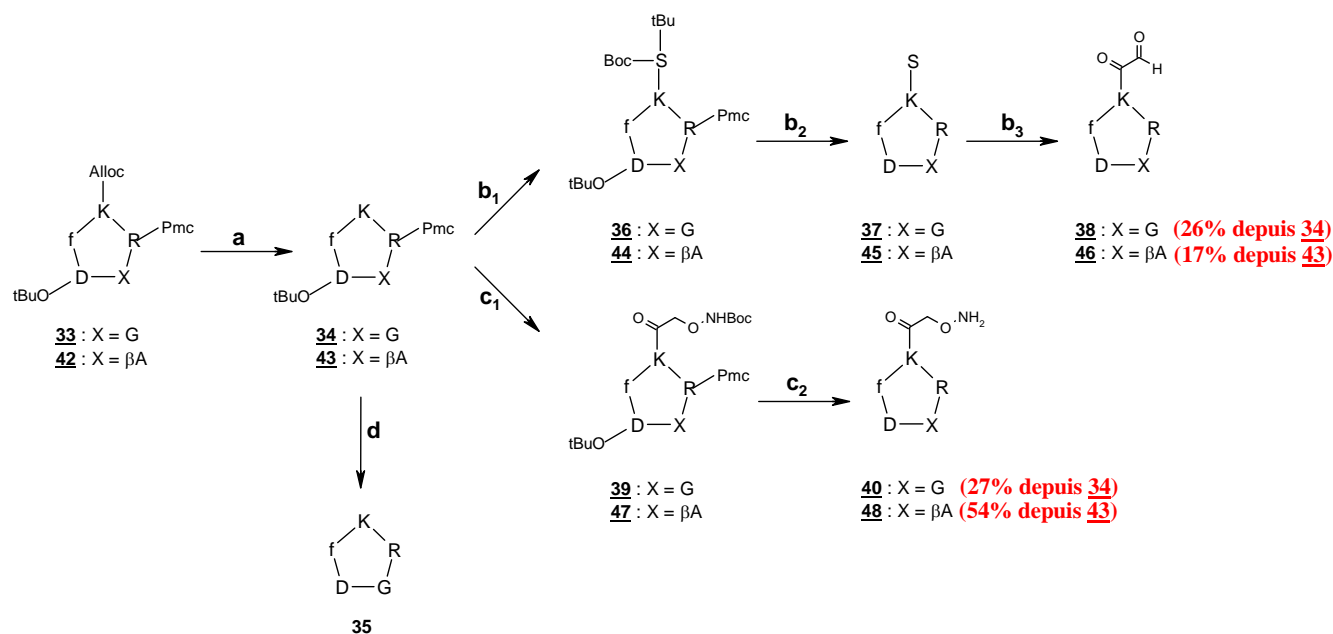


Réactifs : (a) Fmoc-Gly-OH ou Fmoc-βAla-OH (0,6 eq.), DIPEA, DCM anhydre ;
(b) SPPS : 1/ Pipéridine/DMF (1:4) ; 2/ Fmoc-Xaa-OH (2 eq.), PyBOP (2 eq.), DIPEA (3-4 eq.), DMF ;
(c) 1/ Pipéridine/DMF (1:4) ; 2/ TFA/CH₂Cl₂ (1:99) ; (d) PyBOP (1,2 eq.), DIPEA (3-4 eq.), DMF (0,5 mM)

Figure 7 : Schéma d'obtention des précurseurs cyclopentapeptidiques protégés.

La fonctionnalisation du résidu lysine des intermédiaires **33** et **42** requiert dans un premier temps la déprotection sélective de sa chaîne latérale. (cf. Figure 8) Le groupement Alloc est alors éliminé par une catalyse au palladium(0). Cette réaction se déroule en 1 h sous atmosphère d'argon en présence de Pd(PPh₃)₄ et d'un large excès de phénylsilane dans le dichlorométhane anhydre. Le phénylsilane, donneur d'hydrure, est employé pour piéger l'adduit π-allyl-palladium intermédiaire. Après évaporation de la solution, le peptide est précipité dans l'éther. Il n'est généralement pas purifié à cette étape. La fonctionnalisation de la lysine (^εNH₂) par la fonction aldéhyde ou oxyamine est ensuite réalisée selon un schéma analogue à celui employé pour la matrice RAFT. Les synthons aldéhydes, **38** et **46**, et oxyamines, **40** et **48**, sont caractérisés par spectrométrie de masse électrospray en mode positif.

Notons que la déprotection totale à l'acide trifluoroacétique de l'intermédiaire **34** permet d'accéder au cyclopentapeptide c[-RGDfK-] **35**. (cf. Figure 8, étape **d**) Ce composé, appelé « ligand monovalent », a été utilisé comme composé de référence lors de l'évaluation biologique des architectures multivalentes RAFT(c[-RGDfK-])_n.



Réactifs : (a) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, CH₂Cl₂ ;

(b₁) Boc-Ser(tBu)-OH, PyBOP, DIPEA, DMF ; (b₂) TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) ; (b₃) NaIO₄, H₂O ;

(c₁) BocNHCH₂COOSucc **98**, DIPEA, DMF ; (c₂) TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) ;

(d) TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5)

Figure 8 : Schéma d'obtention des synthons cyclopentapeptidiques dérivatisés par la fonction oxyamine ou aldéhyde glyoxylique.

A.5. Synthèse des ligands multivalents RAFT(c[-RGDfK-])_n.

A.5.1 – Synthèse des ligands tétravalents RAFT(c[-RGDfK-])₄ **49** et **50**.

Le mécanisme de formation d'une liaison éther d'oxime à partir d'un dérivé carbonylé et d'un éther d'oxyamine fait intervenir deux étapes.²³ (cf. Figure 9) L'addition du composé nucléophile sur le carbonyle conduit à la formation d'un intermédiaire carbinolamine qui se déshydrate pour donner l'éther d'oxime. Cette deuxième étape est favorisée à pH acide. De manière générale, les études cinétiques ont montré que le pH optimum de la formation de l'éther d'oxime est voisin de 4.

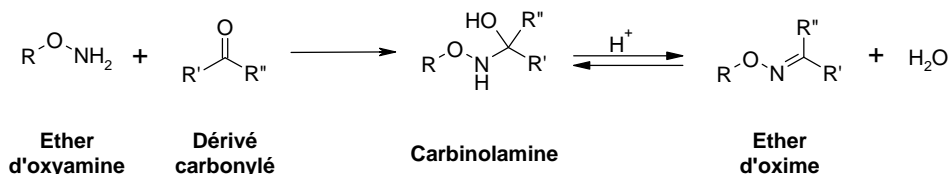


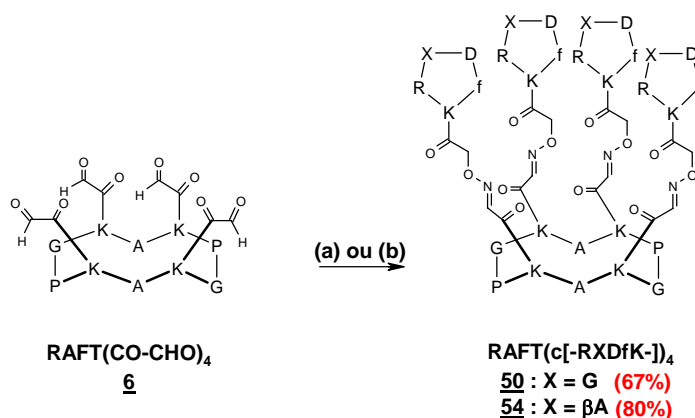
Figure 9 : Mécanisme de formation de la liaison éther d'oxime.

²³ Jencks, W. P. Studies on the mechanism of oxime and semicarbazone formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475-481.

Dans notre cas, le composé carbonylé est un aldéhyde glyoxylique. La liaison éther d'oxime glyoxylique formée est particulièrement stable. Des travaux antérieurs de notre laboratoire ont montré que ces liaisons ont une configuration majoritairement E.

Les réactions chimiosélectives de formation des liens éthers d'oxime ont été principalement réalisées dans un tampon aqueux d'acétate de sodium (0,1 M) à pH compris entre 4,0 et 4,6. Dans le cas de la synthèse des conjugués **49** et **50**, il est nécessaire d'ajouter de l'acétonitrile dans le solvant de réaction pour favoriser la solubilité des conjugués formés et limiter les problèmes d'agrégation.

Le conjugué **50** est synthétisé à partir de l'intermédiaire cyclopentapeptidique -RGD- oxyamine **40** et du gabarit RAFT(CO-CHO)₄ **6**. (cf. Figure 10) La réaction se déroule en présence d'un excès de composé **40** (1,2 eq. / fonction aldéhyde). Elle est complète après 3 h à 25°C. Le milieu réactionnel est purifié par CLHP de façon à éliminer l'excès du dérivé oxyamine **40**. Le conjugué **50** est obtenu avec un rendement de 67% et caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif par ses ions multichargés (2+), (3+) et (4+). Le conjugué contrôle RAFT(c[-RβADfK-])₄ **54** est obtenu de façon identique par l'addition des motifs -RβAD- oxyamines **48** sur le gabarit RAFT(CO-CHO)₄ **6**.



Réactifs :

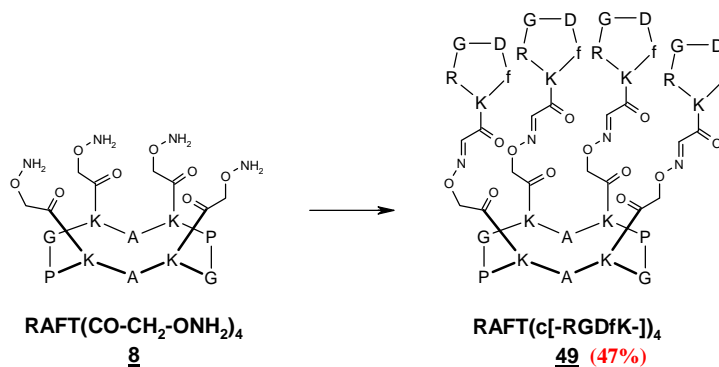
(a) CH₃CN/AcONa (0,1 M - pH 4,5) (1:2) ; c[-RGDfK(CO-CH₂-ONH₂-)] **40**

(b) AcONa (0,1 M - pH 4,5) ; c[-RβADfK(CO-CH₂-ONH₂-)] **48**

Figure 10 : Schéma d'obtention du ligand tétravalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ **50** et de l'homologue contrôle RAFT(c[-RβADfK-])₄ **54**.

Le conjugué **49** est synthétisé selon la stratégie inverse à partir de l'intermédiaire cyclopentapeptidique -RGD- aldéhyde **38** et du gabarit RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄ **8**. (cf. Figure 11) De manière analogue, la réaction se déroule en présence d'un excès de composé **38** (1,2

eq. / fonction oxyamine). Elle est complète après 4 h à 25°C. Le milieu réactionnel est purifié par CLHP de façon à éliminer l'excès du dérivé aldéhyde **38**. Le conjugué **49** est obtenu avec un rendement de 47% et caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif par ses ions multichargés (2+) à (5+).



Réactifs : $\text{CH}_3\text{CN}/\text{AcONa}$ (0,1 M - pH 4,5) (1:2) ; c[-RGDfK(COCHO)-] **38**

Figure 11 : Schéma d'obtention du ligand tétravalent $\text{RAFT}(\text{c}[-\text{RGDfK}-])_4$ **49**.

Des études de SM-SM réalisées sur chacun des deux conjugués **49** et **50** ont permis de visualiser les sites de fragmentation de la liaison éther d'oxime. Les conjugués sont principalement fragmentés au niveau de la liaison N-O de l'oxime. Ces études nous ont permis d'expliquer la présence de l'espèce monochargée à la valeur 657,2 (m/z) régulièrement détectée dans les spectres de masse des différents conjugués synthétisés à partir des synthons cyclopentapeptides -RGD- aldéhydes. Cette espèce pourrait correspondre au fragment c[-RGDfK(CO-C≡N)-] issu d'une fragmentation de la liaison N-O de l'oxime dans la chambre d'ionisation de l'appareil. Le même type de fragmentation de la liaison éther d'oxime a été également observé dans le cas de plusieurs de nos composés. Ce point est rediscuté dans le troisième volet de ce chapitre (PARTIE C, cf. paragraphe C.5.5).

A.5.2 – Méthode d'obtention des ligands multivalents $\text{RAFT}(\text{c}[-\text{RGDfK}-])_i$, $i \in \{1,2,3,4\}$:

50, 51, 52 et 53.

Une méthode simple et rapide a été mise en œuvre pour accéder aux ligands multivalents $\text{RAFT}(\text{c}[-\text{RGDfK}-])_n$ comportant un indice de valence compris entre 1 et 4.²⁴ (cf. Figure 12, A)

²⁴ Thèse M. Figuet, 2003.

Elle consiste à additionner les unités cyclopentapeptidiques -RGD- oxyamines **40** sur la matrice RAFT(CO-CHO)₄ **6** de façon ménagée. L'intermédiaire **40** est introduit en défaut (0,3 eq. / fonction aldéhyde) par rapport au gabarit **6**. Le chromatogramme d'analyse CLHP du milieu réactionnel met en évidence les quatre intermédiaires formés comprenant 1, 2, 3 ou 4 motifs c[-RGDfK-]. (cf. Figure 12, B) Chaque intermédiaire est séparé et isolé par purification CLHP. Les sites aldéhydes libres n'ayant pas réagi sont ensuite mis en réaction avec un excès de cyclopentapeptide -RβAD- oxyamine **48**. Cette astuce permet d'obtenir les quatre architectures multivalentes avec des masses moléculaires voisines. Cette caractéristique est importante pour la comparaison des différentes versions des ligands dans les tests biologiques réalisés *in vitro*. Cette méthode a permis d'accéder rapidement aux quatre conjugués RAFT(c[-RGDfK-])₁ **53**, RAFT(c[-RGDfK-])₂ **52**, RAFT(c[-RGDfK-])₃ **51** et RAFT(c[-RGDfK-])₄ **50**. En revanche, il est important de préciser qu'elle ne permet pas de contrôler la position des motifs c[-RGDfK-] sur le gabarit. Les composés de valence 1, 2 et 3 obtenus correspondent au mélange des différentes combinaisons possibles. (cf. Figure 12, C)

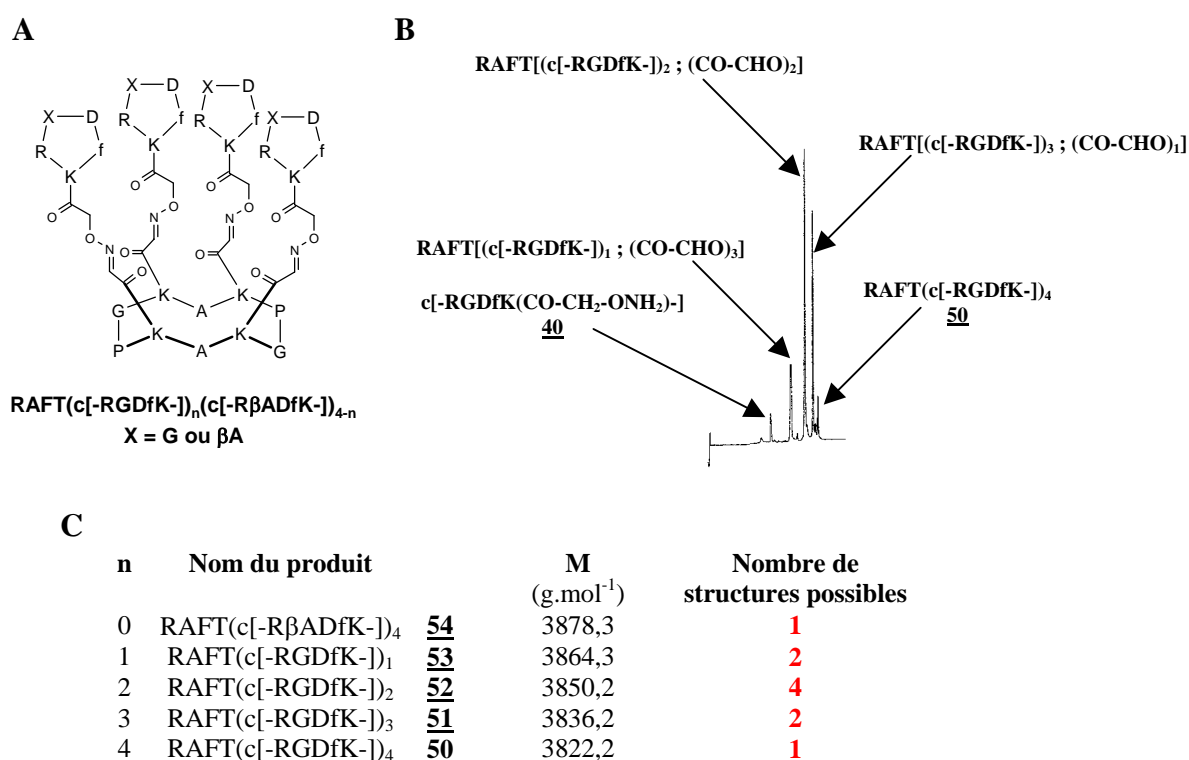
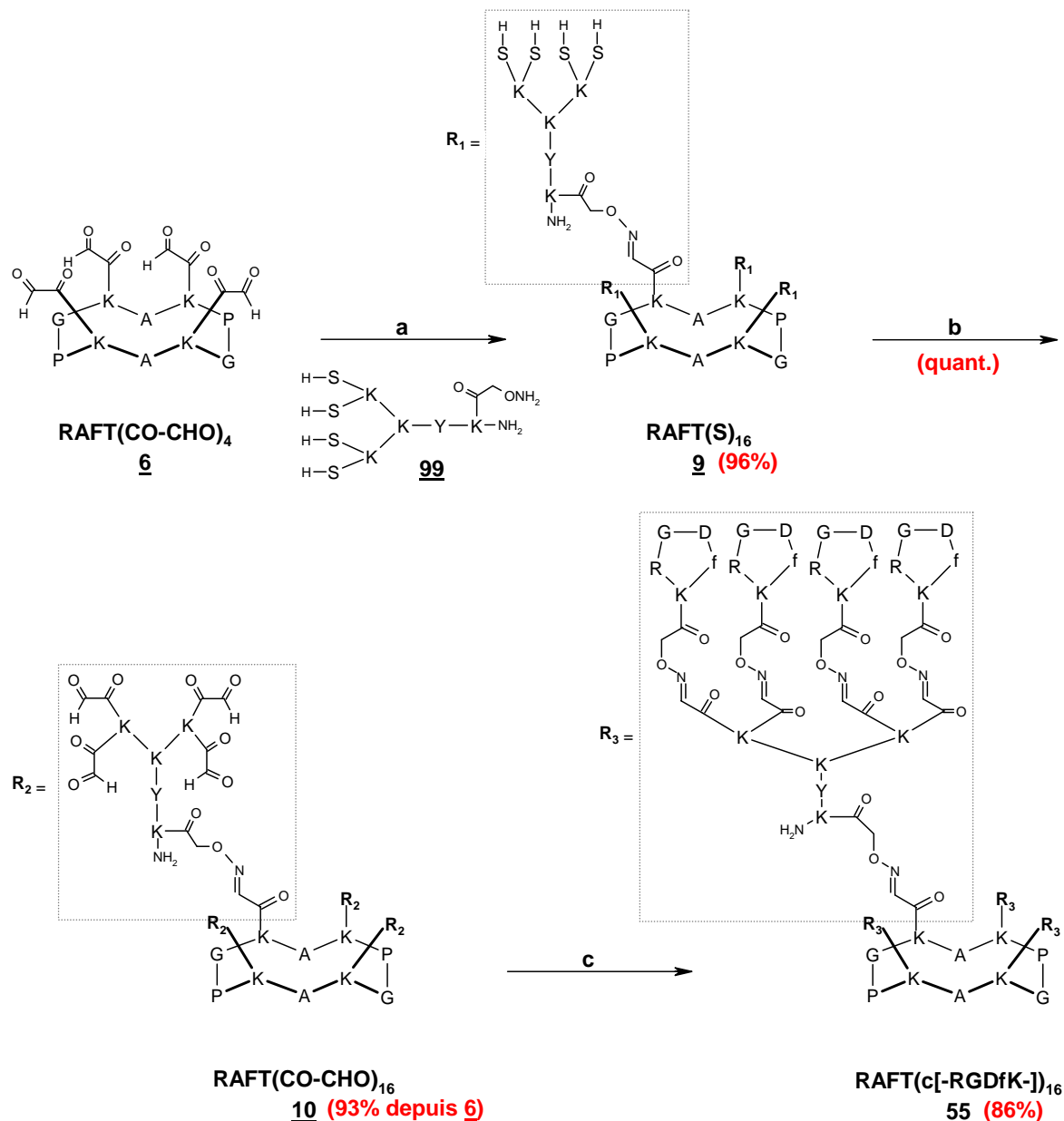


Figure 12 : A/ Structure des ligands RAFT(c[-RGDfK-])_n; B/ Chromatogramme d'analyse CLHP (C₁₈, 214 nm, 5-40%B en 15 min) du milieu réactionnel de **6** et **40** après 2 h de réaction ; C/ Nombre de combinaisons possibles pour chaque structure RAFT(c[-RGDfK-])_n isolée.

A.5.3 – Synthèse du conjugué hexadécavalent RAFT(c[-RGDfK-])₁₆ **55**.

Le composé hexadécavalent **55** a été obtenu en trois étapes à partir de la matrice électrophile RAFT(CO-CHO)₄ **6**. (cf. Figure 13)



Réactifs : (a) AcONa (0,1 M - pH 4,0) ; (b) NaIO₄, H₂O ;

(c) AcONa (0,1 M - pH 4,5)/CH₃CN(5:1) , c[-RGDfK(CO-CH₂-ONH₂)-] **40**

Figure 13 : Schéma d'obtention de la structure hexadécavalente RAFT(c[-RGDfK-])₁₆ **55**.

La première étape consiste en l'assemblage de motifs polylysines sur les chaînes latérales des quatre résidus lysines du RAFT aldéhyde **6**. Le bras polylysine a pour cela été

fonctionnalisé sur la chaîne latérale du résidu lysine de l'extrémité C-terminale par une fonction oxyamine (**99**). Le couplage est réalisé dans les conditions opératoires habituelles dans le tampon aqueux d'acétate de sodium 0,1 M à pH 4.0 en présence de 1,2 eq. du composé **99** par fonction aldéhyde. D'après le profil CLHP, aucun problème de réactivité du à l'encombrement n'a été observé. La réaction est complète après 2 h. Le conjugué **9** présentant 16 résidus sérines est isolé par purification CLHP et obtenu avec un rendement de 96%.

La deuxième étape consiste à oxyder les résidus sérines des bras polylysines par le périodate de sodium pour l'obtention des seize motifs aldéhydes glyoxyliques constituant les points d'accroche des monomères c[-RGDfK-] oxyamines **40**. L'oxydation est réalisée en 1 h en milieu aqueux et immédiatement suivie d'une purification par CLHP permettant d'éliminer les sels de sodium. L'intermédiaire **10** est obtenu avec un rendement global de 93% depuis le composé **6**.

L'assemblage chimiosélectif final est réalisé en présence de 24 eq. du cyclopentapeptide -RGD- oxyamine **40** dans un mélange de tampon acétate de sodium à pH 4,5 et d'acétonitrile (5:1). Le ligand hexadécavalent **55** est isolé par CLHP après 24 h de réaction et obtenu avec un très bon rendement de 86%. Il est caractérisé par spectrométrie de masse. (cf. Figure 14)

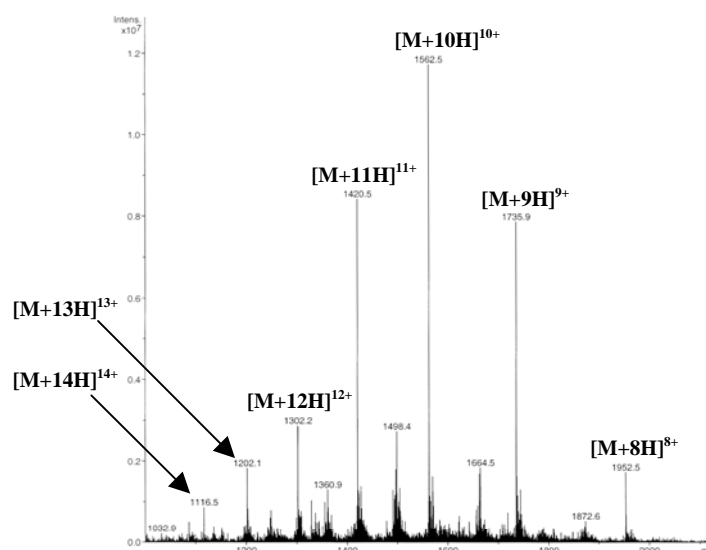


Figure 14 : Spectre de masse SM-ESI du ligand hexadécavalent RAFT(c[-RGDfK-])₁₆ **55**.

BILAN DES SYNTHÈSES ET ÉTUDES BIOLOGIQUES ENTREPRISES.

La mise en oeuvre des liaisons chimiosélectives éthers d'oxime nous a permis d'accéder efficacement à diverses architectures multivalentes du ligand c[-RGDfK-] à partir de matrices RAFTs à un domaine.

Le ligand tétravalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ a été obtenu par deux stratégies de synthèse inverses, tantôt à partir d'une matrice RAFT électrophile RAFT(CO-CHO)₄ (composé **50**), tantôt à partir d'une matrice RAFT nucléophile RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄ (composé **49**). Ces deux structures ont été comparées dans un test biologique *in vitro* afin de s'assurer que le sens du lien éther d'oxime ne modifie par l'interaction du ligand avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. (cf. PARTIE D) Cette vérification triviale est néanmoins indispensable pour pouvoir conjuguer indistinctement les motifs c[-RGDfK-] sur le RAFT par l'une ou l'autre stratégie dans la suite de nos synthèses, en fonction du conjugué souhaité.

Les structures multivalentes RAFT(c[-RGDfK-])_n comportant 1, 2 ou 3 motifs ligands ont été obtenues rapidement par l'addition ménagée de motifs c[-RGDfK(CO-CH₂-ONH₂)-] sur la matrice RAFT(CO-CHO)₄. Les sites aldéhydes libres de chaque intermédiaire isolé par CLHP ont été saturés par le cyclopentapeptide contrôle c[-R β ADfK(CO-CH₂-ONH₂)-]. Cette astuce permet d'obtenir les trois architectures, RAFT(c[-RGDfK-])₁ **53**, RAFT(c[-RGDfK-])₂ **52** et RAFT(c[-RGDfK-])₃ **51**, avec des masses moléculaires voisines de celle du RAFT(c[-RGDfK-])₄. La position des motifs c[-RGDfK-] sur le RAFT n'est pas contrôlée : les ligands obtenus correspondent à la librairie des différents isomères de position.

La structure hexadécavalente RAFT(c[-RGDfK-])₁₆ **55** a été obtenue par deux réactions chimiosélectives successives, la première permettant l'introduction de quatre motifs polylysines sur la matrice RAFT(CO-CHO)₄, la seconde l'introduction des seize motifs c[-RGDfK(CO-CH₂-ONH₂)-] à l'extrémité de chaque branche polylysine. Aucun problème de réactivité du à l'encombrement de la structure, ni aucune réaction secondaire de transoximation n'a été observé. L'efficacité de la synthèse de cette structure est remarquable et souligne l'intérêt des liaisons éthers d'oxime pour la construction d'architectures complexes de hauts poids moléculaires.

Ces différentes versions de ligands multivalents RAFT(c[-RGDfK-])_i ($i \in \{1,2,3,4,16\}$) ont été évaluées dans des tests biologiques *in vitro*. Ces tests ont dans un premier temps visé à attester la conservation de l'activité du motif c[-RGDfK-] conjugué au RAFT, en particulier le maintien de ses propriétés d'affinité et de sélectivité pour les cellules exprimant le récepteur $\alpha_v\beta_3$. Les différentes architectures ont d'autre part été testées de façon à étudier le paramètre de multivalence et à comparer leur affinité pour les cellules. (cf. PARTIE D)

B. CONJUGAISON DE MOLÉCULES DE DÉTECTION AU LIGAND MULTIVALENT RAFT(c[-RGDfK-])₄.

B.1. Objectif des travaux.

Les tests biologiques préliminaires nous ayant conduit à préférer le ligand de structure RAFT(c[-RGDfK-])₄, la deuxième partie des travaux de synthèse est consacrée à la conjugaison de ce ligand avec divers agents de détection. Ceux-ci ont été choisis parmi plusieurs familles pour la préparation de conjugués utiles pour nos études biologiques *in vitro* ou *in vivo* (biotine, fluorescéine) ou pour des applications d'imagerie non-invasive chez le petit animal (Cy5, ¹²⁵I-Tyr). Le RAFT est alors fonctionnalisé comme précédemment sur sa face supérieure par quatre copies du motif c[-RGDfK-], tandis que sa face inférieure est déclinée par une ou deux copies de la molécule de détection.

Nous apportons ici dans un premier temps quelques précisions sur les agents choisis et présentons ensuite la synthèse de cinq conjugués - (biotine)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄, (FITC)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄, (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄, (Tyr)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ et (Cy5)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ -, ainsi que celle des molécules contrôles correspondantes (homologues -RβAD-).

B.2. Choix des molécules de détection.

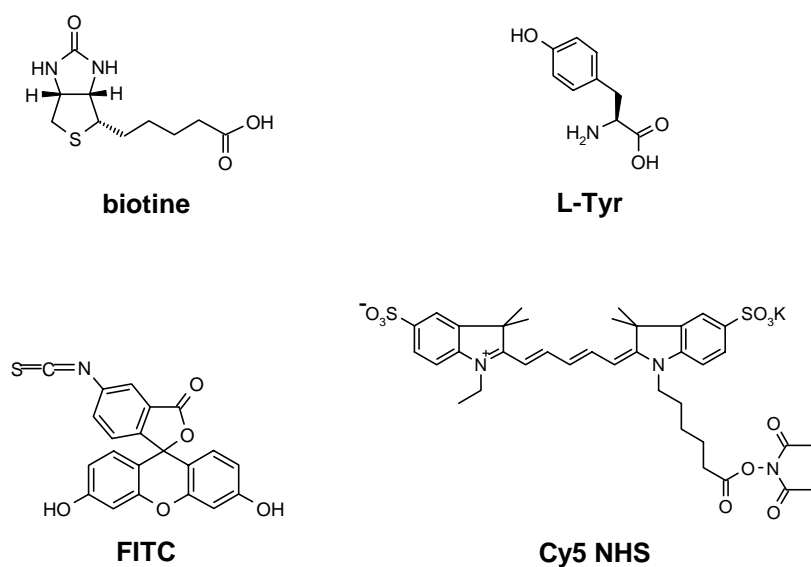


Figure 15 : Molécules utilisées pour le marquage du ligand tétravalent RAFT(c[-RGDfK-])₄.

❖ La Biotine.

La biotine est fréquemment utilisée comme outil de détection des molécules d'intérêt biologique. Possédant une très forte affinité pour l'avidine ($K_d = 10^{-15}$ M) et la streptavidine ($K_d = 10^{-13}$ M), elle est souvent employée dans des protocoles de fonctionnalisation de surfaces ou participe à des échafaudages moléculaires de détection (e.g. détections en sandwich d'immunomarquages). D'un point de vue synthétique, la biotine possède une fonction acide qui permet son incorporation directe sur les chaînes latérales des résidus lysines de la face inférieure des RAFTs. La réaction d'acylation doit alors être réalisée en présence d'un agent de couplage comme le PyBOP.

❖ La Fluorescéine.

La fluorescence constitue un moyen de détection largement employé lors des études biologiques pour l'utilisation de la microscopie ou de la cytométrie en flux. Elle présente l'avantage de visualiser directement la molécule marquée (protéine, acides nucléiques, anticorps...). Il existe aujourd'hui un vaste panel de fluorophores présentant des propriétés spectrales variées (e.g. fluorescéine, rhodamine, Alexas, cyanines...) qui permet leur utilisation concomitante dans des protocoles de marquage. Parmi eux, la fluorescéine présente des propriétés spectrales intéressantes pour la microscopie : ses longueurs d'onde d'excitation ($\lambda_{exc} = 495$ nm) et d'émission ($\lambda_{em} = 519$ nm) minimisent les problèmes de bruit de fond provenant des composants cellulaires ($\lambda_{abs} = 280$ nm pour les protéines), et son rendement quantique de fluorescence est très bon ($\phi = 0.85$). Son inconvénient majeur est le photoblanchiment sous irradiation prolongée. Commercialement vendue sous forme d'isothiocyanate (FITC), elle réagit avec les amines primaires ou secondaires pour donner des dérivés thiourées stables. Elle peut ainsi être facilement employée pour fonctionnaliser les chaînes latérales des résidus lysines de la face inférieure des RAFTs sans recourir aux agents de couplage.

❖ La Cyanine 5.

L'utilisation des sondes possédant des propriétés de fluorescence dans l'IR (proche IR ou IR lointain) a largement contribué au développement des techniques d'imagerie optique *in vivo* comme l'imagerie et la tomographie de fluorescence. L'émission de fluorescence de ces sondes, ayant lieu dans un domaine spectral compris entre 650 et 800 nm, présente de nombreux intérêts : *i*) les rayonnements IR sont faiblement absorbés par les tissus et les

liquides biologiques (notamment le sang) en comparaison avec les rayonnements dans le visible. Ils permettent alors d'atteindre des couches plus profondes de l'organisme ; *ii*) les interférences avec la lumière incidente d'excitation dissipée sont faibles (écart de Stokes important) ; *iii*) les photons des gammes de longueurs d'onde employées sont non-ionisants. Les nouveaux fluorophores indocyanines (Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7) constituent dans cette catégorie des outils intéressants. Commercialement vendue sous forme d'ester activé, la Cyanine 5 (Cy5, $\lambda_{\text{abs}} = 649 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$) est facilement conjuguée aux composés présentant des fonctions amines libres et peut alors être employée pour fonctionnaliser la chaîne latérale du résidu lysine de la face inférieure des RAFTs. L'inconvénient majeur de ce fluorochrome est son prix élevé (1120 €/ 10 mg de Cy5 NHS).

❖ La Tyrosine.

La scintigraphie est largement employée aujourd'hui par les cliniciens pour la détection des cancers. Les radionucléides émetteurs γ , β^+ ou β^- sont utilisés chez l'homme en analyse clinique (SPECT et PET) pour obtenir des informations d'ordre fonctionnel ou métabolique. L'iodation est une méthode largement employée pour marquer les peptides et peut se faire directement par substitution électrophile sur un acide aminé aromatique réactif (typiquement la tyrosine). Les trois isotopes utilisables pour le radiomarquage (^{123}I , ^{125}I et ^{131}I) ont des caractéristiques très différentes qui orientent leur utilisation. L'iode 125 ne peut s'employer que pour des investigations *in vitro* ou chez l'animal en raison de sa période trop longue (59,9 j) et de l'énergie de son émission γ un peu faible (27 keV). L'iode 123 (émetteur γ ; période 13 h), beaucoup plus onéreux à produire, est employé pour l'analyse clinique. L'iode 131, fournissant un rayonnement β^- de haute énergie, est utilisé de façon curative chez l'homme. D'un point de vue synthétique, l'insertion d'un résidu tyrosine sur la chaîne latérale du résidu lysine de la face inférieure des RAFTs est facilement réalisée par couplage peptidique.

B.3. Stratégie de synthèse.

La conjugaison des molécules de détection au ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ requiert l'utilisation de RAFTs présentant deux domaines d'adressage indépendants

(orthogonalement protégés), de type II (**12**) ou IV (**25**), admettant respectivement un ou deux motifs de détection. (cf. Figure 16)

Les intermédiaires, marqués sur la face inférieure par une ou deux copies de l'agent de détection (\mathcal{Z}) et fonctionnalisés sur la face supérieure par quatre motifs oxyamines, constituent les intermédiaires clés de notre stratégie de synthèse. Ils peuvent ensuite être fonctionnalisés de manière convergente avec les partenaires aldéhydiques -RGD- ou -R β AD- permettant l'accès rapide aux conjugués désirés ainsi qu'aux homologues -R β AD- contrôlés.

D'un point de vue synthétique, ces intermédiaires peuvent être obtenus à partir des RAFTs orthogonalement protégés (II ou IV) selon deux voies différentes suivant l'ordre de fonctionnalisation des deux faces :

- ou bien la face inférieure est fonctionnalisée en premier : les résidus lysines de la face inférieure sont alors déprotégés et immédiatement fonctionnalisés par l'agent de détection (**Stratégie A**, cas des conjugués avec la biotine ou la fluorescéine),

- ou bien la face supérieure est fonctionnalisée en premier : les résidus lysines de la face supérieure sont alors libérés de leur groupement protecteur Boc puis fonctionnalisés par les fonctions oxyamines protégées. (**Stratégie B**, cas des conjugués avec la tyrosine et la cyanine 5).

Le choix de l'une ou de l'autre stratégie dépend essentiellement de la molécule de détection à conjuguer.

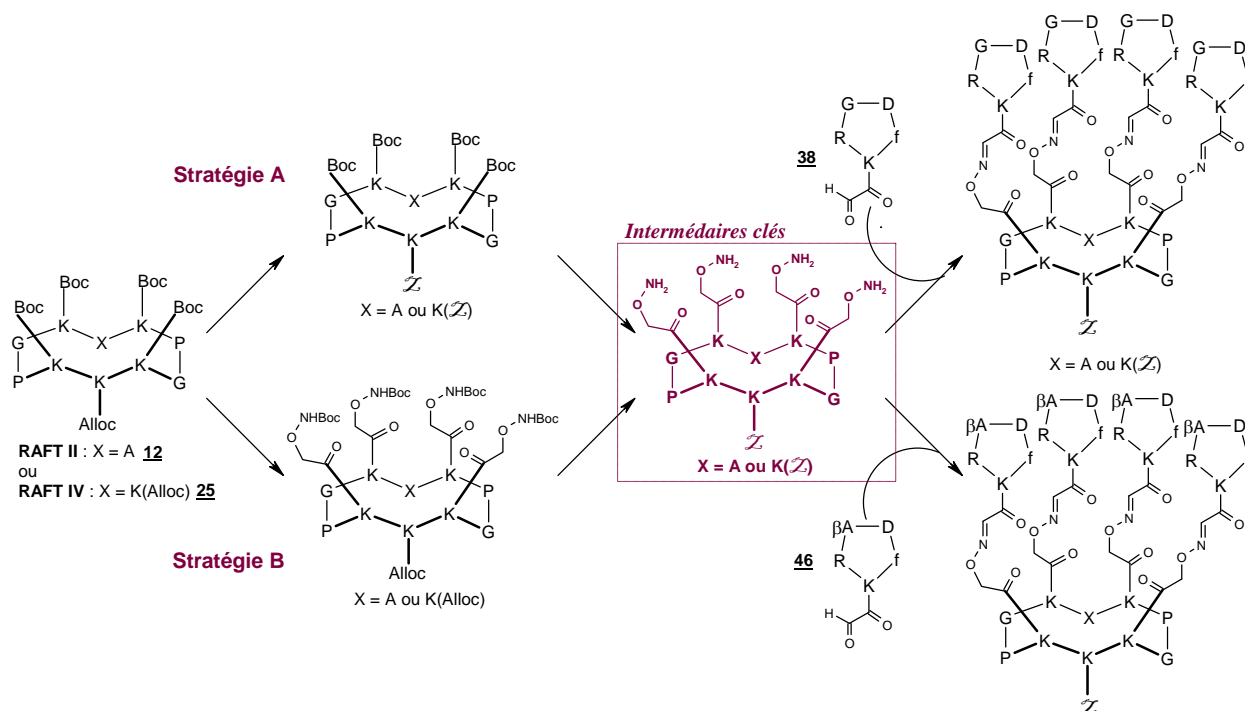


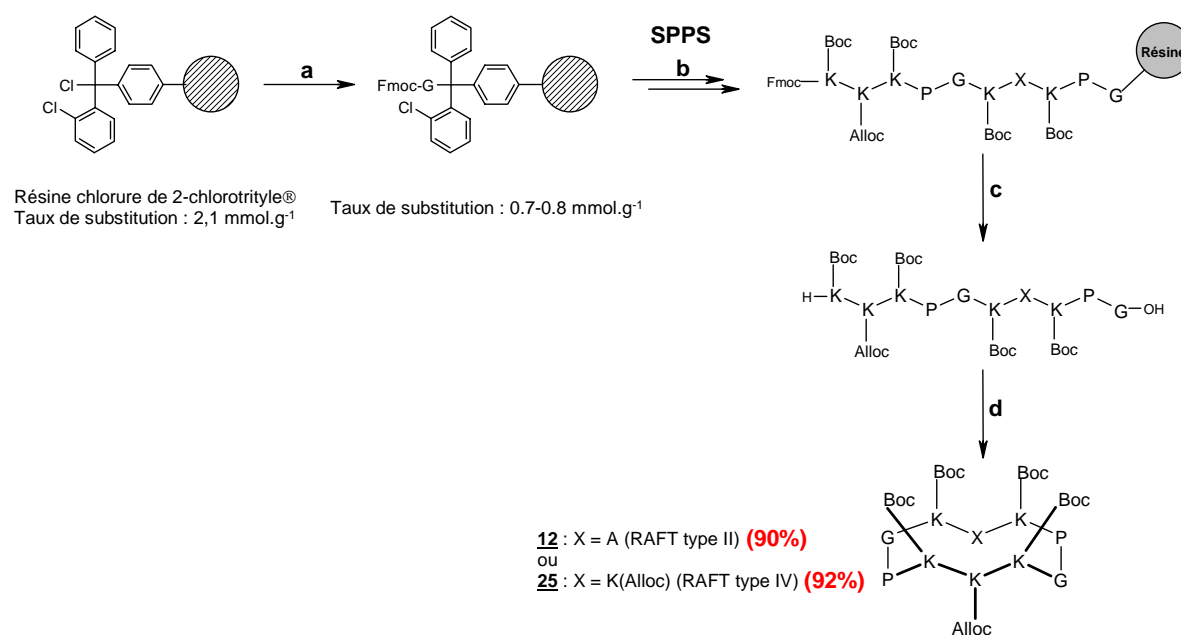
Figure 16 : Stratégies d'obtention des molécules conjuguées aux agents de détection (\mathcal{Z}). **Stratégie A** : \mathcal{Z} = Biotine, Fluorescéine ; **Stratégie B** : \mathcal{Z} = Tyrosine, Cyanine 5.

B.4. Synthèse des conjugués (marqueur)_nRAFT(c[-RGDFK-])₄.

La synthèse des conjugués avec les différents agents de détection sélectionnés requiert l'utilisation de RAFTs à deux domaines orthogonalement protégés. Nous décrivons donc en premier l'obtention de ces précurseurs, avant d'exposer les synthèses des conjugués avec la biotine ou la fluorescéine selon la stratégie A, puis des conjugués avec la tyrosine ou la cyanine 5 selon la stratégie B.

B.4.1 – Synthèse des RAFTs à deux domaines : (Alloc)RAFT(Boc)₄ **12** et (Alloc)₂RAFT(Boc)₄ **25**.²⁵

Les RAFTs présentant deux domaines d'adressage indépendants de type II (**12**) ou IV (**25**), contenant respectivement un ou deux sites fonctionnalisables sur la face inférieure, sont préparés selon les mêmes méthodes et de manière tout à fait analogue aux RAFTs à un domaine décrits dans la partie A. (cf. Figure 17)



Réactifs : (a) Fmoc-Gly-OH (0.6 eq.), DIPEA, DCM anhydre ;
(b) SPPS : 1/ Pipéridine/DMF (1:4) ; 2/ Fmoc-Xaa-OH (2 eq.), PyBOP (2 eq.), DIPEA (3-4 eq.), DMF ;
(c) 1/ Pipéridine/DMF (1:4) ; 2/ TFA/CH₂Cl₂ (1:99) ; (d) PyBOP (1.2 eq.), DIPEA (3-4 eq.), DMF (0.5 mM)

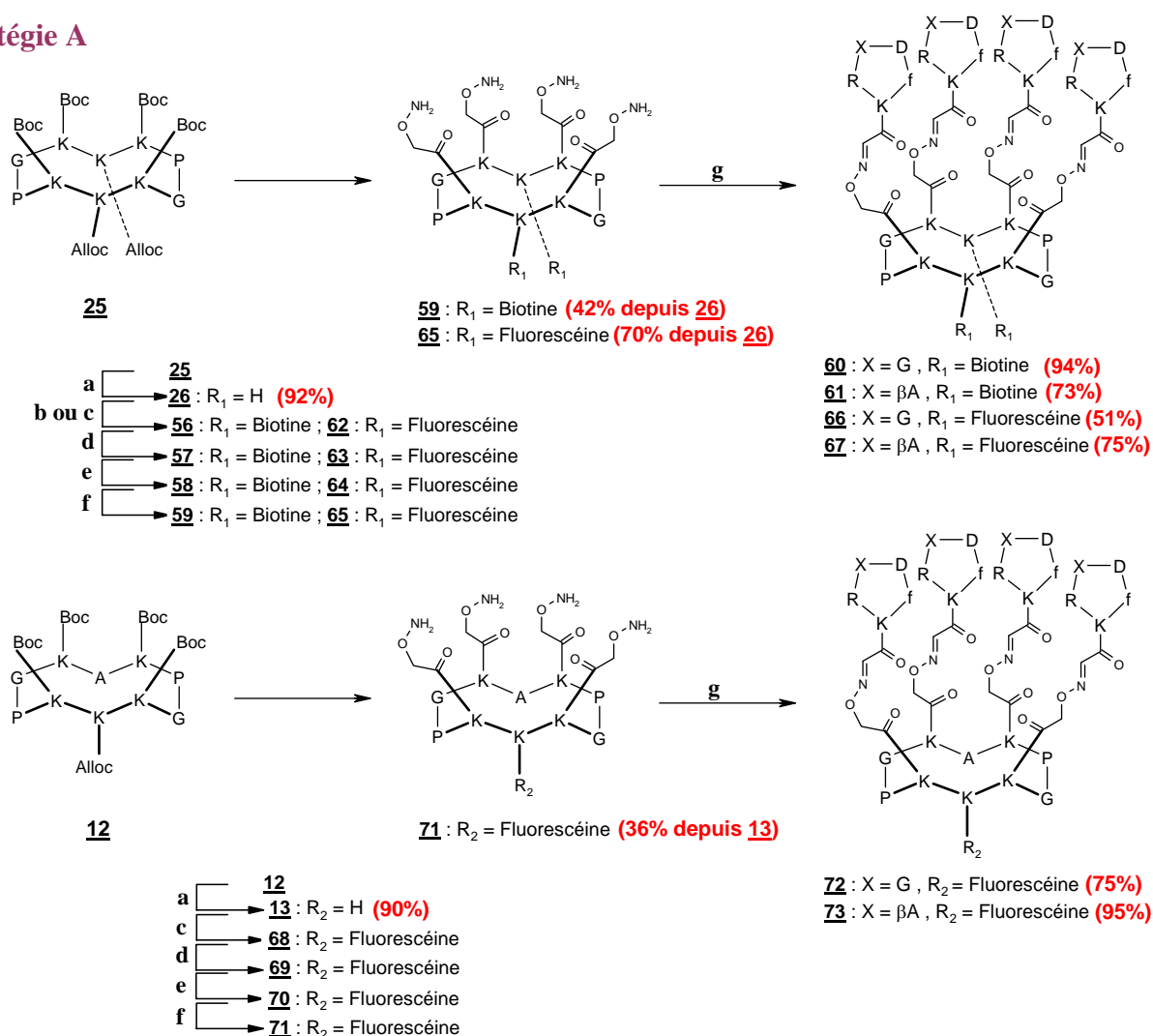
Figure 17 : Schéma d'obtention des RAFTs à deux domaines **12** et **25**.

²⁵ De façon cohérente à la notation utilisée pour les RAFTs à un domaine, nous avons choisi conventionnellement de noter entre parenthèse à gauche de l'acronyme RAFT les substituants de la face inférieure du gabarit, les substituants de la face supérieure demeurant entre parenthèse à droite.

Les résidus alanines (l'un ou les deux) de la séquence du RAFT à un domaine sont remplacés par des résidus lysines protégés sur leur chaîne latérale par un groupement Alloc. La position relative, dans la séquence primaire du décapeptide linéaire, des résidus lysines protégés soit par un groupement Boc, soit par un groupement orthogonal Alloc, contrôle l'obtention, après cyclisation, des châssis moléculaires présentant deux domaines d'adressage. L'orthogonalité des groupes protecteurs Boc et Alloc assure la fonctionnalisation régiosélective des deux faces. Les RAFTs cycliques **12** et **25** sont communément obtenus avec de bons rendements. Il ont été caractérisés par spectrométrie de masse.

B.4.2 – Synthèse des conjugués avec la biotine et la fluorescéine.

Stratégie A



Réactifs : (a) Pd(PPh₃)₄ , PhSiH₃ , CH₂Cl₂ ; (b) PyBOP , biotine , DIPEA , DMF ; (c) FITC (isomère I) , DMF ; (d) TFA/CH₂Cl₂ (1:1) ; (e) BocNHOCH₂COOSucc **98** , DIPEA , DMF ; (f) TFA/TIS/H₂O/CH₂Cl₂ (50:5:5:40) ; (g) AcONa (0,1 mM - pH 4,0)/CH₃CN (1:1) , c[-RGDfK(COCHO)-] **38** ou c[-RβADfK(COCHO)-] **46**

Figure 18 : Schéma général d'obtention des conjugués avec la biotine et la fluorescéine selon la stratégie A.

a) Synthèse des conjugués biotinylés : (biotine)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **60** et (biotine)₂RAFT(c[-RβADfK-])₄ **61**.

L'intermédiaire RAFT **59**, dans lequel la face inférieure est conjuguée à deux motifs biotine et les résidus lysines de la face supérieure sont fonctionnalisés par des groupements oxyamines, soit (biotine)₂RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄,²⁶ constitue l'intermédiaire clé permettant d'accéder aux conjugués **60** et **61**. (cf. Figure 18) Sa synthèse est réalisée à partir du RAFT **25**, à deux domaines orthogonalement protégés par les groupements Boc et Alloc, en cinq étapes :

i) La première étape est la déprotection des chaînes latérales des résidus lysines de la face inférieure du RAFT **25** par coupure des groupements Alloc catalysée au palladium(0). Cette réaction se déroule en 1 h sous atmosphère d'argon en présence de Pd(PPh₃)₄ et d'un large excès de phénylsilane dans le dichlorométhane anhydre. Le phénylsilane, donneur d'hydrure, est employé pour piéger l'adduit π-allyl-palladium intermédiaire. Le composé (H)₂RAFT(Boc)₄ **26** brut est obtenu avec un rendement de 92%. (étape **a**)

ii) L'introduction des deux motifs biotine est alors réalisée dans le diméthylformamide à pH 8 en présence de PyBOP avec 1,2 eq. de biotine par fonction amine libre. La réaction d'acylation est totale après 1 h et conduit au composé (biotine)₂RAFT(Boc)₄ **56** brut avec un rendement de 57%. (étape **b**)

iii) La troisième étape est la déprotection des chaînes latérales des quatre résidus lysines de la face supérieure par coupure acide des groupements Boc. Elle est réalisée dans l'acide trifluoroacétique à 50% dans le dichlorométhane et conduit au composé (biotine)₂RAFT(H)₄ **57** brut avec un rendement de 94%. (étape **d**)

iv) L'introduction des fonctions oxyamines N-Boc monoprotégées sur les quatre résidus lysines est réalisée par réaction d'acylation au moyen de l'ester activé N-Boc-2-aminoxyacétate de succinimidyle **98** dans le DMF anhydre à pH 8. Elle conduit au composé (biotine)₂RAFT(CO-CH₂-ONHBoc)₄ **58** brut avec un rendement de 86%. (étape **e**)

v) Enfin, la déprotection des fonctions oxyamines est réalisée par hydrolyse des groupements Boc dans l'acide trifluoroacétique à 50% dans le DCM en présence de nucléophiles piégeurs de carbocations (H₂O (2,5%) et TIS (2,5%)). L'intermédiaire (biotine)₂RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄ **59** brut est obtenu avec un rendement de 91%. (étape **f**)

²⁶ Pour faciliter la compréhension et le suivi des différentes étapes de la synthèse, on adopte ici pour les intermédiaires RAFTs la notation suivante : (R₁)_nRAFT(R₂)_m, où les groupes R₁ désignent les substituants des résidus lysyl de la face inférieure du RAFT et les groupes R₂, les substituants des résidus lysyl de la face supérieure, les groupes R₁ et R₂ pouvant être des hydrogènes.

A ce stade seulement, il est purifié par CLHP et obtenu avec un rendement global de 42% à partir du composé **26** (4 étapes). Cet intermédiaire peut alors être utilisé pour l'assemblage convergent des motifs aldéhydiques -RGD- **38** ou -RβAD **46**.

Le couplage chimiosélectif des motifs c[-RGDfK(CO-CHO)-] **38** (étape **g**) doit être réalisé dans un mélange 50:50 d'acétonitrile et de tampon acétate de sodium à pH 4.0 pour favoriser la solubilité du conjugué formé et éviter les problèmes d'agrégation. La réaction est très propre et totale après 3 h à 25°C. La purification CLHP finale permet l'élimination du cyclopentapeptide en excès (1,5 eq. par site sont utilisés) et l'obtention du conjugué final (biotine)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **60** avec un excellent rendement de 94%. De façon similaire, la molécule contrôle (biotine)₂RAFT(c[-RβADfK-])₄ **61** est obtenue par couplage chimiosélectif des motifs c[-RβADfK(CO-CHO)-] **46** sur l'intermédiaire **59** dans le tampon aqueux d'acétate de sodium à pH 4.0 et purification CLHP avec un rendement de 73%.

*b) Synthèse des conjugués fluorescents : (fluorescéine)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **66**, (fluorescéine)₂RAFT(c[-RβADfK-])₄ **67**, (fluorescéine)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **72** et (fluorescéine)RAFT(c[-RβADfK-])₄ **73**.*

La fluorescéine a été introduite sur la face inférieure des RAFTs sur une ou deux lysines. Les conjugués bi-fonctionnalisés ont tout d'abord été synthétisés dans le but de maximiser les intensités de fluorescence des composés et de s'affranchir des protocoles d'amplification du signal souvent nécessaires pour les observations au microscope à fluorescence. La synthèse des conjugués mono-fonctionnalisés s'est dans un second temps révélée indispensable pour pouvoir comparer directement les niveaux de fluorescence observés par microscopie ou cytométrie en flux avec ceux du conjugué monovalent de référence c[-RGDfK(fluorescéine)-] **74**.²⁷ (cf. Figure 19)

²⁷ Boturn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730-5739.

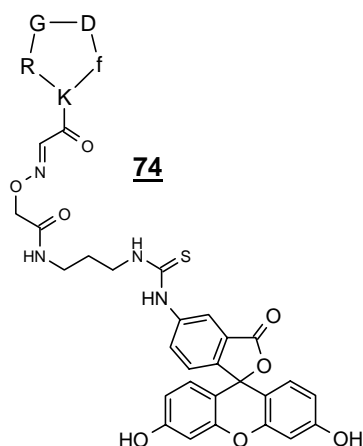


Figure 19 : Structure du conjugué monovalent de référence c[-RGDfK(fluorescéine)-] **74**.

La synthèse des conjugués bi-fluorescéine est réalisée selon la stratégie A, de façon tout à fait similaire à celle des conjugués biotinylés. (cf. Figure 18) La deuxième étape est remplacée par une réaction de thioacylation (étape c) pour l'introduction des deux copies du fluorochrome sous forme d'isothiocyanate (FITC). Celle-ci est alors réalisée dans le diméthylformamide avec 1,4 eq. de FITC par fonction amine libre. La réaction est totale après 1 h et conduit au composé (fluorescéine)₂RAFT(Boc)₄ **62** brut suffisamment propre pour être engagé dans les étapes suivantes sans purification. A l'issue des quatre étapes c, d, e et f, l'intermédiaire (fluorescéine)₂RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄ **65** est purifié par CLHP et obtenu avec un rendement de 70%. Cet intermédiaire est utilisé pour l'assemblage convergent des motifs aldéhydiques -RGD- et -RβAD.

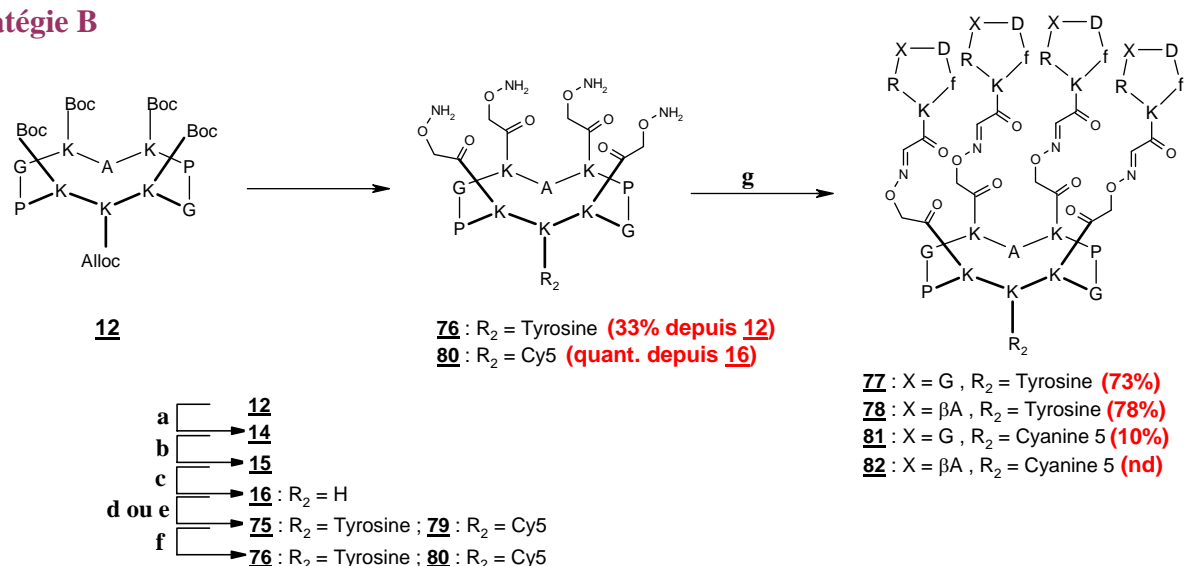
Les couplages chimiosélectifs des motifs c[-RGDfK(CO-CHO)-] **38** et c[-RβADfK(CO-CHO)-] **46** sont réalisés dans le tampon acétate de sodium à pH 4.0 à 25°C pendant 6 h et conduisent, après purification CLHP, aux conjugués **66** et **67** avec de bons rendements de 51 et 75% respectivement. (étape g)

La synthèse des conjugués mono-fonctionnalisés est réalisée à partir du RAFT **12** ne présentant qu'un seul résidu lysine sur la face inférieure, orthogonalement protégé par rapport à ceux de la face supérieure. (cf. Figure 18, partie inférieure du schéma) Elle fait intervenir les mêmes étapes que la synthèse des conjugués bi-fonctionnalisés. L'intermédiaire (fluorescéine)RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄ **71** est obtenu à l'issue de l'étape f avec un rendement de 36%.

Les couplages chimiosélectifs des motifs c[-RGDfK(CO-CHO)-] **38** et c[-RβADfK(CO-CHO)-] **46** (étape g) conduisent, après purification CLHP, aux conjugués **72** et **73** avec de très bons rendements de 75 et 95% respectivement.

B.4.3 – Synthèse des conjugués avec la tyrosine et la cyanine 5.

Stratégie B



Réactifs : (a) TFA/CH₂Cl₂ (1:1) ; (b) BocNHOCH₂COOSucc **98**, DIPEA, DMF ; (c) Pd(PPh₃)₄, PhSiH₃, CH₂Cl₂ ; (d) PyBOP, BocTyr(tBu)OH, DIPEA, DMF ; (e) Cy5NHS, DIPEA, DMF ; (f) TFA/TIS/H₂O/CH₂Cl₂ (50:5:5:40) ; (g) AcONa (0,1 mM - pH 4,0)/CH₃CN (1:1), c[-RGDfK(COCHO)-] **38** ou c[-RβADfK(COCHO)-] **46**

Figure 20 : Schéma général d'obtention des conjugués avec la tyrosine et la cyanine 5.

a) Synthèse des conjugués pour l'imagerie nucléaire : (Tyr)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **77** et (Tyr)RAFT(c[-RβADfK-])₄ **78**.

Des conjugués monofonctionnalisés avec un résidu tyrosine sont synthétisés en vue de leur radiomarquage à l'iode 125. Ils sont préparés à partir du RAFT **12** ne présentant qu'un seul résidu lysine sur la face inférieure, orthogonalement protégé par rapport à ceux de la face supérieure. Comme précédemment, l'intermédiaire RAFT, dans lequel la face inférieure est conjuguée à la tyrosine et les résidus lysines de la face supérieure sont fonctionnalisés par les groupements oxyamines - soit (Tyr)RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄ **76** -, constitue l'intermédiaire clé permettant d'accéder aux conjugués **77** et **78**. Néanmoins, une stratégie inverse à celle

employée pour les conjugués précédents (biotine et fluorescéine) est adoptée pour permettre l'utilisation de l'acide aminé protégé Boc-Tyr(*t*Bu)-OH. La face supérieure du RAFT est alors fonctionnalisée avant la face inférieure (Stratégie B) selon les cinq étapes suivantes : (cf. Figure 20)

i) La première étape est la déprotection des chaînes latérales des quatre résidus lysines de la face supérieure par coupure acide des groupements Boc et conduit au composé (Alloc)RAFT(H)₄ **14**. (étape **a**)

ii) Elle est immédiatement suivie par l'introduction des fonctions oxyamines *N*-Boc monoprotégées par réaction d'acylation sur les groupements amines libres au moyen de l'ester activé *N*-Boc-2-aminooxyacétate de succinimidyle **98**. Elle conduit au composé (Alloc)RAFT(CO-CH₂-ONHBoc)₄ **15**. (étape **b**)

iii) La troisième étape est la déprotection de la chaîne latérale du résidu lysine de la face inférieure du RAFT **15** par élimination du groupement Alloc catalysée au palladium(0) et permet l'accès au composé (H)RAFT(CO-CH₂-ONHBoc)₄ **16**. (étape **c**)

iv) L'introduction de la tyrosine est réalisée par couplage de l'acide aminé protégé Boc-Tyr(*t*Bu)-OH dans le diméthylformamide à pH 8 en présence de PyBOP et conduit au composé (BocTyr(*t*Bu))RAFT(CO-CH₂-ONHBoc)₄ **75**. (étape **d**)

v) La dernière étape est la déprotection totale du peptide par hydrolyse simultanée des groupements Boc et *t*Bu. Elle se déroule dans l'acide trifluoroacétique à 95% en présence de nucléophiles (p-crésol/H₂O/TIS). L'intermédiaire (Tyr)RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄ **76** est obtenu après purification CLHP avec un rendement de 33% par rapport au composé **12** (5 étapes). Cet intermédiaire peut alors être utilisé pour l'assemblage convergent avec les motifs aldéhydiques -RGD- et -RβAD.

Les couplages chimiosélectifs des motifs c[-RGDfK(CO-CHO)-] **38** et c[-RβADfK(CO-CHO)-] **46** (étape **g**) sont réalisés dans les mêmes conditions que précédemment et conduisent, après purification CLHP, aux conjugués **77** et **78** avec de très bons rendements de 73 et 78% respectivement.

Notons que les synthèses des conjugués avec la biotine, la fluorescéine et la tyrosine ont fait l'objet d'une publication jointe en Annexe 1.²⁷

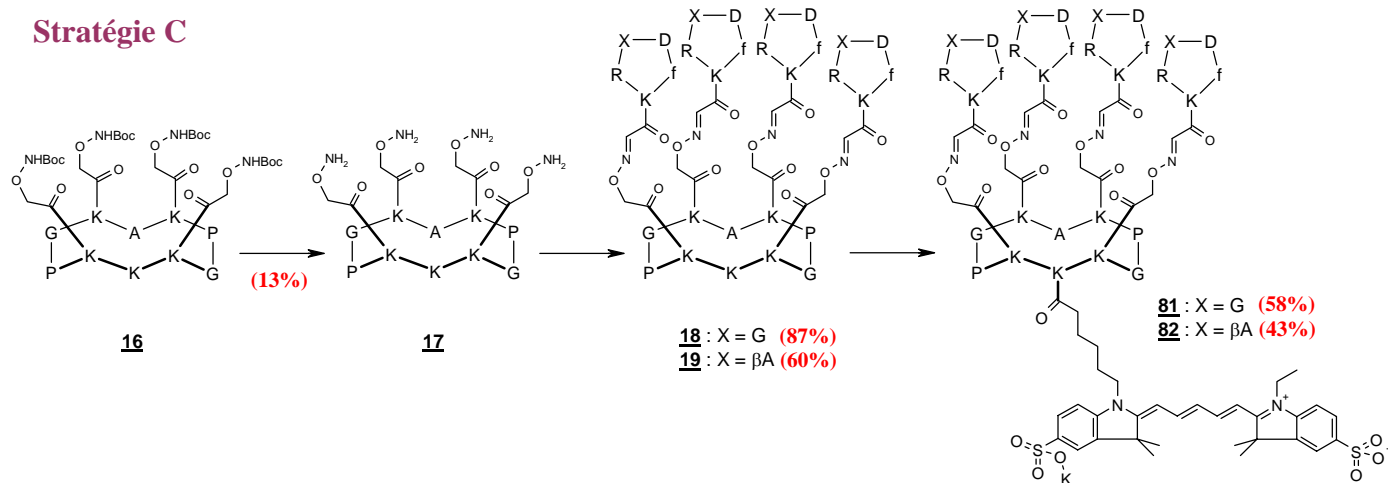
*b) Synthèse des conjugués pour l'imagerie optique in vivo : (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **81** et (Cy5)RAFT(c[-RβADfK-])₄ **82**.*

Les conjugués **81** et **82** ont dans un premier temps été synthétisés selon un schéma identique à celui employé pour les conjugués avec la tyrosine (Stratégie B). La synthèse est réalisée en 3 étapes à partir de l'intermédiaire (H)RAFT(CO-CH₂-ONHBoc)₄ **16**. (cf. Figure 20) Le fluorochrome Cy5, commercialement vendu sous forme d'ester activé de *N*-hydroxysuccinimide (Cy5NHS), est tout d'abord introduit sur la face inférieure du RAFT **16**. (étape **e**) La réaction se déroule dans un mélange 1:1 de diméthylformamide et dichlorométhane anhydres à pH 9 en présence d'une quantité équimolaire d'ester activé de Cyanine 5. Le peptide **79** est obtenu par précipitation dans l'éther avec un rendement quantitatif. Il est caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode négatif.

Les fonctions oxyamines de la face supérieure sont ensuite déprotégées par hydrolyse acide des groupements Boc (conditions classiques de TFA en présence de nucléophiles). (étape **f**) Aucune dégradation du fluorochrome n'a été observée dans ces conditions. L'intermédiaire **80** est obtenu après précipitation dans l'éther avec un rendement quantitatif. Il est caractérisé par spectrométrie électrospray en mode positif.

Cet intermédiaire permet de réaliser en parallèle les réactions de couplage chimiosélectif avec les cyclopentapeptides -RGD- (**38**) et -RβAD- (**46**) aldéhydes. Toutefois, à ce stade ultime, le RAFT oxyamine **80** en solution dans le tampon de réaction, a été pollué par des vapeurs d'acétone. Cette pollution a considérablement compliqué la purification du mélange réactionnel et conduit à l'obtention des conjugués **81** et **82** avec de très faibles rendements (10%).

A ce stade, le prix élevé de l'ester activé de la Cyanine 5 nous a alors conduit à considérer une autre stratégie de synthèse dans laquelle le fluorochrome est introduit lors de la dernière étape de la synthèse. (cf. Figure 21) La méthode ne permet alors plus d'accéder aux conjugués -RGD- et aux homologues -RβAD- aussi rapidement que dans les stratégies précédentes (Stratégies A et B) mais limite considérablement les pertes de Cyanine 5. (Stratégie C)



Réactifs : (a) TFA/H₂O/TIS/CH₂Cl₂ (50:5:5:40) ;

(b) (H₂O/0,1% TFA)/(CH₃CN/9,9% H₂O/0,1% TFA) (1:1) , c[-RGDfK(COCHO)-] **38** ou c[-RβADfK(COCHO)-] **46**

(c) Cy5NHS, DIPEA, DMF

Figure 21 : Schéma d'obtention des conjugués **81** et **82** selon la stratégie C.

La synthèse se déroule en trois étapes à partir de l'intermédiaire (H)RAFT(CO-CH₂-ONHBoc) **16** (intermédiaire commun aux synthèses des conjugués avec la tyrosine) :

i) La première étape est la déprotection des fonctions oxyamines de la face supérieure par coupure acide des groupements Boc dans l'acide trifluoroacétique à 50% dans le DCM en présence de nucléophiles (H₂O (2,5%) et TIS (2,5%)). Après évaporation des solvants, l'intermédiaire totalement déprotégé (H)RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄ **17** est solubilisé dans l'eau. La solution est filtrée (élimination des résidus de palladium de l'étape précédente) et lyophilisée.²⁸

ii) La deuxième étape est le couplage chimiosélectif des cyclopentapeptides aldéhydes. Elle se déroule en 1 h dans un mélange 50:50 des tampons H₂O/0,1% TFA et CH₃CN/9,9% H₂O/0,1% TFA en présence d'un léger excès des motifs aldéhydiques c[-RGDfK(CO-CHO)-] **38** ou c[-RβADfK(CO-CHO)-] **46** (1,2 eq. par site). La réaction étant chimiosélective, la fonction amine libre du résidu lysine de la face inférieure ne réagit pas. Les conjugués (H)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **18** et (H)RAFT(c[-RβADfK-])₄ **19** sont obtenus après purification CLHP avec des rendements de 87 et 60% respectivement.²⁹

iii) La dernière étape repose sur la fonctionnalisation de la face inférieure par la Cyanine 5. La réaction se déroule dans le diméthylformamide anhydre à pH 9 en présence d'une quantité équimolaire de l'ester activé de Cyanine 5 (*N*-hydroxysuccinimide). La

²⁸ Le faible rendement de cette étape (13%) s'explique par le fait que le composé **16** est un brut réactionnel.

²⁹ Les écarts de rendements observés entre les dérivés -RGD- et -RβAD- ne sont à priori pas dus à une différence de réactivité mais proviennent plutôt de notre geste opératoire.

présence des chaînes latérales déprotégées et potentiellement réactives des résidus arginines des motifs cyclopentapeptidiques de la face supérieure n'influe pas sur la sélectivité de la réaction en raison de la différence de pKa entre la fonction amine du groupement guanidinium de l'arginine (pKa = 12,5) et amine primaire du résidu lysine (pKa = 10,5). Un contrôle rigoureux du pH assure la chimiosélectivité de la réaction. Les conjugués (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **81** et (Cy5)RAFT(c[-RβADfK-])₄ **82** sont purifiés par CLHP et obtenus respectivement avec des rendements de 58 et 43%.²⁹ Ces composés ont été caractérisés par CLHP à 214 et 646 nm et par spectrométrie de masse électrospray en mode positif. (cf. Figure 22)

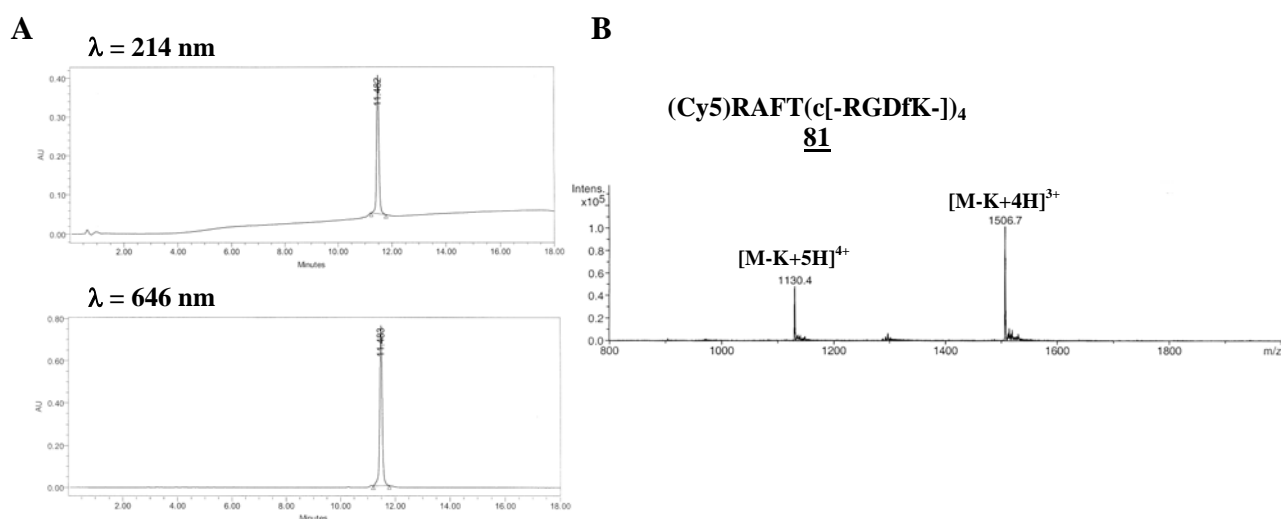


Figure 22 : A/ Chromatogrammes d'analyse CLHP (C₁₈, 214 nm et 646 nm, 5-60% B en 15 min) du composé **81** isolé ; B/ Spectre SM-ESI (mode positif) du composé **81**.

BILAN DES SYNTHÈSES ET ÉTUDES BIOLOGIQUES ENTREPRISES.

La liaison éther d'oxime, employée pour assembler les motifs c[-RGDfK-] sur le RAFT, étant non seulement efficace mais aussi hautement chimiosélective et flexible, nous avons pu accéder facilement et efficacement à des architectures présentant une fonction de détection sur la face inférieure de matrices RAFTs à deux domaines. Le ligand tétravalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ a été conjugué à différentes molécules de détection afin de pouvoir envisager l'étude de son activité biologique au moyen de diverses techniques.

La biotine, la fluorescéine ou la tyrosine ont été introduites, en un ou deux exemplaires, par acylation (biotine, tyrosine) ou thioacylation (FITC) des chaînes latérales des résidus lysines de la face inférieure du RAFT avant l'étape de conjugaison chimiosélective des motifs c[-RGDfK(CO-CHO)-]. Cette stratégie convergente a permis d'accéder en parallèle aux conjugués souhaités (biotine)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **60**, (FITC)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **66**, (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **72** et (Tyr)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **77** ainsi qu'aux molécules contrôles (homologues -RβAD-), indispensables pour les études biologiques. Dans le cas de la synthèse du conjugué avec la cyanine 5, le fluorochrome a été introduit en dernier lieu afin d'en limiter les pertes. La structure (H)RAFT(c[-RGDfK-])₄, présentant un résidu lysine libre sur la face inférieure, a été acylée par l'ester activé de la cyanine 5 pour conduire au conjugué (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **81**, les conditions de pH assurant la chimiosélectivité de la réaction.

La diversité des stratégies employées pour l'obtention de ces différents composés témoigne de la versatilité de nos synthèses.

Les ligands tétravalents RAFT(c[-RGDfK-])₄ conjugués à la biotine ou à la fluorescéine, **60**, **66** et **72**, ont été destinés à des études biologiques *in vitro* dans le but de caractériser l'interaction de cette structure avec les cellules exprimant l'intégrine α_vβ₃. (cf. PARTIE D) Le conjugué (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **81** a lui fait l'objet d'études *in vivo* chez la souris, afin d'évaluer l'aptitude de ce vecteur, administré par voie systémique, à cibler spécifiquement les zones de néo-angiogenèse tumorale et les tumeurs localisées ou métastatiques. (cf. PARTIE E) Le conjugué (Tyr)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **77** a été marqué à l'iode 125 au sein du laboratoire des radiopharmaceutiques biocliniques (INSERM E0340, Pr. D. Fagret) et est actuellement évalué dans des protocoles d'imagerie nucléaire.

C. CONJUGAISON DE MOLÉCULES CYTOTOXIQUES AU VECTEUR RAFT(c[-RGDfK-])₄.

C.1. Objectif des travaux.

Les résultats des études biologiques réalisées *in vitro* et *in vivo* ayant justifié la pertinence de l'utilisation du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ comme outil de vectorisation vers les foyers malins, la troisième partie de nos travaux de synthèse est consacrée à la conjugaison de ce ligand avec différentes molécules cytotoxiques. Ces dernières ont été choisies parmi différentes classes de molécules (peptides, drogues de chimiothérapie, protéines) de façon à étudier la modularité de l'approche synthétique et à évaluer par la suite les capacités du système pour la vectorisation de composés de tailles, propriétés physiques et modes d'action différents. Trois protagonistes cytotoxiques sont ancrés de manière covalente à la face inférieure du ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄ : le peptide 14-mer (KLAKLAK)₂, la doxorubicine et la sous-unité A de la Ricine. Ces drogues sont rattachées au RAFT soit au moyen d'un lien covalent stable éther d'oxime, soit d'un lien disulfure sensible aux environnements réducteurs.

Le lien éther d'oxime ayant été présenté auparavant, nous apportons dans un premier temps quelques précisions sur les liens disulfures, ainsi que sur les drogues que nous avons sélectionnées. Nous présentons ensuite la synthèse du conjugué (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄, dans lequel deux peptides (KLAKLAK)₂ ont été introduits par couplage oxime sur la face inférieure du RAFT (stratégie « double oxime »). En dernier lieu, nous exposons les synthèses de trois conjugués dans lesquels les modules cytotoxiques ont été introduits par couplage disulfure, soient (ss-KLA)RAFT(c[-RGDfK-])₄, (Dox)RAFT(c[-RGDfK-])₄ et (Ricine-Chaîne A)RAFT(c[-RGDfK-])₄ (stratégie « double lien chimiosélectif »).

C.2. Intérêt des liaisons disulfures pour la conjugaison de drogues au vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄.

S'il est indispensable de rattacher les molécules de marquage au vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄ par un lien stable *in vivo*, il peut en revanche être souhaitable de relier l'élément

cytotoxique par un lien chimique labile dans les conditions intracellulaires. Le rattachement de la drogue au vecteur est susceptible de modifier, d'amoindrir ou même d'abolir ses propriétés cytotoxiques. Si la drogue est reliée au vecteur par un lien labile, elle pourra, une fois désolidarisée du système de vectorisation, atteindre sa cible intracellulaire et exercer son activité cytotoxique comme elle doit normalement le faire. Les liaisons disulfures, sensibles aux environnements réducteurs, constituent dans cette optique une méthode de conjugaison tout à fait appropriée à notre système. Dans l'organisme, les activités de réduction des disulfures s'observent essentiellement de façon intracellulaire dans le cytosol (enzymes de la famille des thiorédoxines et glutarédoxines) ainsi que dans les lysosomes (e.g. enzyme GILT, *Gamma interferon-reducible thiol-reductase*).³⁰ La drogue rattachée au vecteur par un pont disulfure pourra alors être libérée de façon intracellulaire au niveau de ces deux compartiments. A l'inverse, les environnements extracellulaires ont plutôt des propriétés oxydantes (concentrations beaucoup plus fortes en cystine qu'en cystéine et faibles en glutathione réduite).³¹ Toutefois, il est important de considérer que, dans le cas des tumeurs, les conditions d'hypoxie peuvent se traduire par des environnements anormalement réducteurs.³² Ceci laisse envisager que dans la région tumorale, la drogue, conjuguée par une liaison disulfure, pourra être libérée du vecteur de façon extracellulaire.

L'ensemble de ces considérations nous a conduit à choisir deux types de drogues, aptes (e.g. doxorubicine) ou non (e.g. peptide (KLAKLAK)₂, chaîne A de la ricine) à pénétrer seules les membranes cellulaires.

D'un point de vue synthétique, une méthode efficace de formation d'une liaison disulfure intermoléculaire hétérodimérique consiste à employer le groupement 3-nitro-2-pyridinesulfényl (NPys). Ce groupement présente l'avantage d'avoir un double rôle de protecteur et d'activateur des fonctions thiols.³ Il peut ainsi être employé à la fois comme groupement protecteur de la fonction thiol (S-NPys) dans la synthèse de l'intermédiaire et comme groupement activateur du thiol dans la réaction de formation du disulfure. Dans cette dernière réaction, l'attaque nucléophile du thiol libre sur la fonction thiol activée se déroule

³⁰ Arunachalam, B.; Phan, U. T.; Geuze, H. J.; Cresswell, P. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes : Characterization of a Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 745-750.

³¹ Jones, D. P.; Carlson, J. L.; Mody, V. C.; Cai, J.; Lynn, M. J.; Sternberg, P. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 625-635.

³² Saito, G.; Swanson, J. A.; Lee, K. D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 199-215. ; Jaffar, M.; Williams, K. J.; Stratford, I. J. Bioreductive and gene therapy approaches to hypoxic diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *53*, 217-228.

dans des conditions douces, légèrement acides (pH 4,5-7,0) pour limiter les réactions d'oxydation secondaires conduisant à la formation de disulfures homodimériques. La formation du disulfure hétérodimérique se traduit par la libération de la 3-nitro-2-thiopyridone possédant des propriétés d'absorption dans l'UV-visible. (cf. Figure 23)

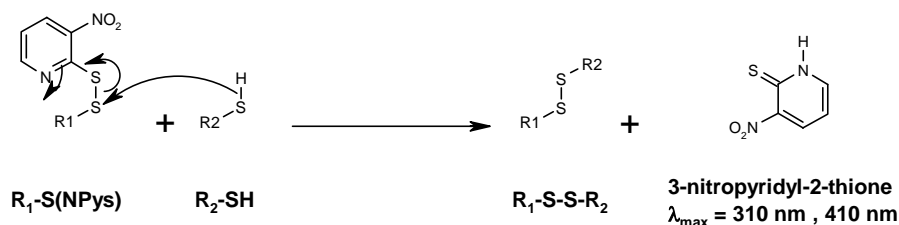


Figure 23 : Réaction de couplage d'un thiol libre et d'un thiol activé par le groupement NPys pour la formation d'un disulfure hétérodimérique.³³

C.3. Choix des molécules cytotoxiques à vectoriser.

Nous avons sélectionné des drogues parmi trois grandes familles de molécules cytotoxiques : un peptide, une drogue de chimiothérapie et une toxine.

❖ Le peptide (KLAKLAK)₂.

Les composés ne traversant pas spontanément les parois cellulaires, mais présentant une activité cytotoxique une fois internalisés, sont susceptibles de témoigner des capacités de vectorisation intracellulaire de notre système RAFT(c[RGDfK-])₄. Dans cette catégorie de molécules, les peptides antimicrobiens, comme le peptide (KLAKLAK)₂, constituent une famille intéressante.

La séquence (KLAKLAK)₂ est apparue suite aux travaux de M.M. Javadpour, qui a étudié des modèles de petits peptides amphipathiques (7-, 14- et 21-mer) présentant une activité antimicrobienne sélective, comparable à celles de peptides naturels comme la mélittine, la magainine ou la cécropine.³⁴ Cette séquence est constituée de 14 résidus organisés selon le schéma [(PNN)(PNN)P]₂ où P désigne un résidu polaire et N un résidu non polaire. Elle peut former une hélice α amphipathique contenant une face polaire (résidus lysines) et une face apolaire (résidus leucines et alanines). (cf. Figure 24)

³³ Les deux valeurs de λ_{\max} précisées pour la 3-nitropyridyl-2-thione libérée correspondent aux bandes d'absorption des deux formes tautomériques 3-nitro-2-thiopyridine et 3-nitro-2-thiopyridone respectivement.

³⁴ Javadpour, M. M.; Juban, M. M.; Lo, W. C.; Bishop, S. M.; Alberty, J. B.; Cowell, S. M.; Becker, C. L.; McLaughlin, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3107-3113.

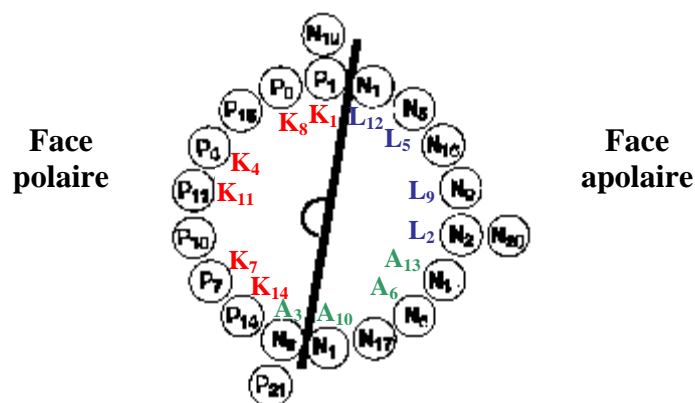


Figure 24 : Organisation hélicoïdale d'un peptide de séquence générale [(PNN)(PNN)P]_n (P : résidu polaire, N : résidu non polaire) et application à la séquence (KLAKLAK)₂.

Source : Javadpour, M. M.; Juban, M. M.; Lo, W. C.; Bishop, S. M.; Alberty, J. B. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3107-3113

Cette séquence a une activité bactériostatique à 6 μM contre différentes souches de bactéries (*E. coli*, *P. aeruginosa* ou *S. aureus*) tandis que son activité cytotoxique sur des cellules de mammifères est observée à des concentrations 100 fois supérieures (>517 μM avec des cellules de fibroblastes 3T3 et >750 μM avec des érythrocytes). La sélectivité observée a été attribuée essentiellement à la différence entre les membranes externes bactériennes chargées négativement et celles des cellules de mammifère globalement neutres. La séquence (KLAKLAK)₂ chargée positivement se lie alors plus efficacement aux parois bactériennes. Cette séquence a été utilisée par la suite en conjugaison avec des peptides lui permettant de franchir les membranes cellulaires. Ainsi, le groupe de R. Pasqualini l'a conjugué aux peptides cycliques CNGRC et ACDCRGDCFC (RGD-4C) ciblant les tumeurs.³⁵ *In vitro* sur des cellules de sarcome de Kaposi, les conjugués ont effectivement une toxicité nettement supérieure (IC₅₀ de 10 et 42 μM respectivement) par rapport à celle de la séquence (KLAKLAK)₂ seule (IC₅₀ de 387 μM). La toxicité intracellulaire de la séquence (KLAKLAK)₂ a été attribuée à un mécanisme intrinsèque d'induction de l'apoptose faisant intervenir les mitochondries. Le peptide affecte la membrane mitochondriale probablement selon un processus analogue à la destruction de la membrane bactérienne et active la caspase 3 conduisant à l'apoptose. Ces conjugués ont également été évalués *in vivo* chez des souris porteuses de tumeurs du modèle MDA-MB-435 (greffes de carcinomes mammaires humains). Le conjugué (RGD-4C)-GG-(klaklak)₂³⁶ a montré un effet antitumoral significatif mesuré à la

³⁵ Ellerby, H. M.; Arap, W.; Ellerby, L. M.; Kain, R.; Andrusiak, R.; Rio, G. D.; Krajewski, S.; Lombardo, C. R.; Rao, R.; Ruoslahti, E.; Bredesen, D. E.; Pasqualini, R. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat. Med.* **1999**, 5, 1032-1038.

³⁶ La séquence toxique klaklaklaklak a été synthétisée à partir d'acides aminés de la série D pour empêcher les dégradations enzymatiques.

fois sur le volume des tumeurs après 90 jours de traitement ainsi que sur le poids des tumeurs et des poumons (envahissement métastatique) au jour 110. Utilisée dans des approches voisines des nôtres, la séquence (KLAKLAK)₂ nous a ainsi semblé un modèle de drogue intéressant.

D'un point de vue synthétique, cette séquence peut être obtenue par SPPS et facilement fonctionnalisée sur son extrémité N-terminale soit par un résidu sérine (équivalent masqué d'aldéhyde) pour sa conjugaison au vecteur par lien oxime, soit par un résidu cystéine pour sa conjugaison par pont disulfure. Un petit espaceur de 2 résidus glycines entre le site de fonctionnalisation au RAFT et la séquence (KLAKLAK)₂ est introduit pour assurer la flexibilité de la séquence et minimiser les encombrements avec le vecteur.³⁷

❖ La doxorubicine.

La doxorubicine est un produit antibiotique naturel qui a été découvert il y a plus de 30 ans (dérivé 14-hydroxy de la daunorubicine produit par le champignon *Streptomyces peucetius*). (cf. Figure 25)

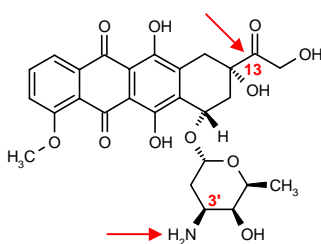


Figure 25 : Structure de la doxorubicine.

Elle appartient à la famille des anthracyclines et présente une activité anti-néoplasique sur un large spectre de tumeurs. Son mécanisme d'action est encore discuté aujourd'hui. La doxorubicine pourrait avoir plusieurs effets à l'origine de sa toxicité : 1) l'intercalation et l'alkylation de l'ADN, 2) des coupures de brin par stabilisation du complexe topoisomérase-II/ADN (*cleavable complex*), 3) l'interférence avec le déroulement de l'ADN et les activités hélicases, 4) la peroxydation des lipides et 5) des effets directs sur les membranes.³⁸ La doxorubicine (Adriamycin[®]) est la molécule cytotoxique la plus employée dans les protocoles actuels de chimiothérapie. Elle est utilisée seule ou en combinaison avec d'autres drogues pour le traitement de nombreux cancers dont les lymphomes malins et les leucémies. Elle est

³⁷ Pour simplifier l'appellation de nos conjugués, nous avons par la suite utilisé les trois lettres « KLA » pour désigner l'ensemble de la séquence cytotoxique. Dans le cas où elle a été conjuguée par pont disulfure, elle est notée « ss-KLA ».

³⁸ Gewirtz, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunomycin. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, 57, 727-741.

de loin la plus efficace des drogues employées pour le traitement des cancers du sein. Sa toxicité (cardiaque, hépatique et hématologique) entraîne cependant chez les patients des effets secondaires sévères qui limitent considérablement les doses auxquelles elle peut être administrée. Différentes stratégies ont alors été envisagées pour tenter de concentrer son action sur les cellules tumorales et réduire sa toxicité sur les autres organes. Ces efforts ont conduit au développement d'une version lysosomale (Doxil, doxorubicine encapsulée dans des liposomes PEGylés) actuellement utilisée pour le traitement des sarcomes de Kaposi. De façon plus expérimentale, le groupe de E. Ruoslahti et R. Pasqualini l'a conjuguée aux peptides cycliques CNGRC et RGD-4C.³⁹ Les auteurs ont décrit dans chaque cas une augmentation de l'efficacité anti-tumorale de la drogue et une réduction significative de sa toxicité dans un modèle de souris greffées par des tumeurs de carcinomes mammaires MDA-MB-435.

L'ensemble de ces considérations nous a conduit à envisager sa vectorisation par notre système. La doxorubicine présente un squelette aromatique plan hydrophobe. Elle est connue pour pénétrer seule les membranes cellulaires. Cette propriété pourrait s'avérer tout à fait essentielle dans le cas où elle serait dissociée du vecteur avant son entrée dans les cellules.

D'un point de vue synthétique, la molécule présente plusieurs sites de fonctionnalisation pour l'introduction d'une fonction thiol, notamment la fonction amine du sucre et la fonction carbonyle (C₁₃). (cf. Figure 25) Plusieurs travaux ayant décrit que le groupement 3'-amino de l'unité saccharidique est indispensable à la toxicité de la drogue,⁴⁰ nous avons préféré fonctionnaliser le carbonyle.⁴¹

❖ La chaîne A de la Ricine.

Les toxines représentent une autre famille de composés très convoitée dans les applications de vectorisation. Elles ont tout d'abord été conjuguées à différents anticorps⁴² ou plus récemment à des facteurs de croissance.⁴³ Les toxines inhibant l'activité des ribosomes

³⁹ Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* **1998**, *279*, 377-380.

⁴⁰ Nagy, A.; Schally, A. V.; Armatis, P.; Szepeshazi, K.; Halmos, G.; Kovacs, M.; Zarandi, M.; Groot, K.; Miyazaki, M.; Jungwirth, A.; Horvath, J. Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 7269-7273. ; Langer, M.; Kratz, F.; Rothen-Rutishauser, B.; Wunderli-Allenspach, H.; Beck-Sickinger, A. G. Novel peptide conjugates for tumor-specific chemotherapy. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1341-1348.

⁴¹ Pour simplifier l'appellation de nos conjugués, nous avons par la suite utilisé le diminutif usuel « Dox ».

⁴² Pastan, I.; Willingham, M.; Fitzgerald, D. J. P. Immunotoxins. *Cell* **1986**, *47*, 641-648.

⁴³ Lappi, D. A.; Baird, A. Mitotoxins : growth factor-targeted cytotoxic molecules. *Prog. Growth Factor Res.* **1991**, *2*, 223-236.

(RIPs, *ribosome-inactivating proteins*) sont des enzymes d'origine végétale appartenant à la catégorie des ARNr *N*-glycohydrolases (E.C. 3.2.2.22). Elles se répartissent en deux catégories :

- les RIPs de type 1 ne possèdent qu'une seule chaîne capable de traverser la membrane cellulaire et responsable de l'activité enzymatique,
- les RIPs de type 2 sont constituées de deux chaînes reliées par un pont disulfure : la chaîne A est responsable de l'activité enzymatique et la chaîne B de l'internalisation de l'hétérodimère dans les cellules.

La Ricine (abrégiée par les sigles RCA₆₀, RCA_{II}, Ricin D ou RCL III) est une RIP de type 2 d'environ 60 kDa extraite des graines de ricin (*Ricinus communis*). Sa chaîne A (RTA, *Ricin Toxin A*) provoque la coupure de la liaison *N*-glycosidique de l'adénosine A4324 de la sous-unité 28S de l'ARN ribosomique et entraîne l'arrêt de la synthèse protéique. La chaîne A seule ne peut passer les membranes cellulaires, elle n'exerce alors son activité cytotoxique que si elle est vectorisée à l'intérieur des cellules. Cette propriété en fait un outil intéressant pour sa conjugaison à notre système de vectorisation. La chaîne A de la Ricine compte 267 résidus s'organisant en 8 hélices α et 8 feuillets β . (cf. Figure 26) Sa séquence comporte deux résidus cystéines. Le résidu cystéine C171 est situé au milieu de la séquence et se niche, dans la protéine native, au sein d'une hélice α . Le résidu C259 est lui situé au proche voisinage de l'extrémité C-terminale et est plus accessible.^{44,45} Ceci nous permet d'envisager une conjugaison directe par pont disulfure via le résidu C259 de la protéine sur le ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄.

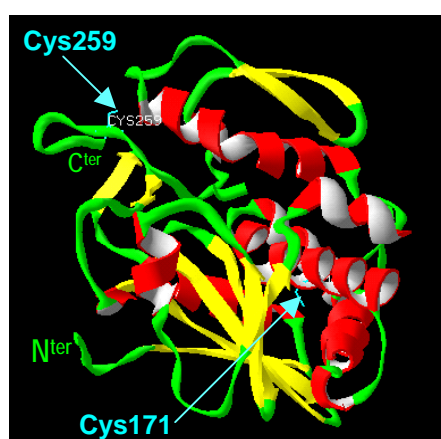


Figure 26 : Représentation de la chaîne A de la Ricine.

⁴⁴ Le résidu C259 est le résidu impliqué dans la liaison covalente disulfure entre les deux chaînes RTA et RTB de la ricine.

⁴⁵ Lord, J. M.; Roberts, L. M.; Robertus, J. D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *Faseb J.* **1994**, 8, 201-208.

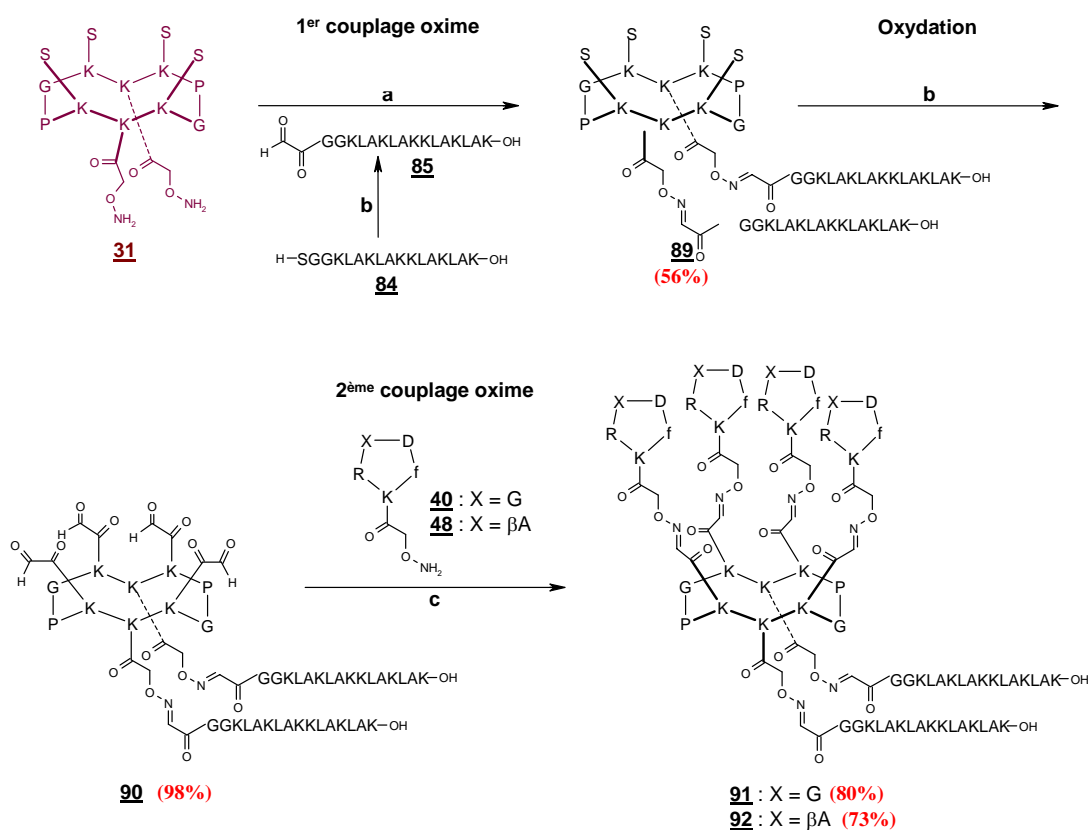
Suite à ces précisions, nous présentons désormais les méthodes que nous avons employées pour conjuguer ces trois drogues au vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄.

C.4. Stratégie « double oxime » : synthèse du conjugué (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ 91 et de son homologue -RβAD- contrôle 92.

C.4.1 – Stratégie de synthèse.

Le peptide apoptogène (KLAKLAK)₂ est dans un premier temps rattaché au vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄ par un lien covalent stable de type éther d'oxime. La stratégie de synthèse de tels conjugués requiert alors la mise en œuvre de deux réactions chimiosélectives d'oximation successives (stratégie « double oxime »), l'une pour la conjugaison des motifs cytotoxiques sur la face inférieure du RAFT, l'autre pour la fonctionnalisation de la face supérieure par les motifs ligands c[-RGDfK-].

L'assemblage des unités cyclopentapeptidiques -RGD- ou -RβAD- est réalisée dans la dernière étape de la synthèse de façon à accéder en parallèle au conjugué (KLA)₂RAFT[c[-RGDfK-])₄ 91 ainsi qu'à son homologue -RβAD- contrôle 92. Ce choix impose la fonctionnalisation de la face supérieure du RAFT par les résidus sérines, équivalents masqués d'aldéhydes, et la face inférieure par les fonctions oxyamines. L'intermédiaire (CO-CH₂-ONH₂)₂RAFT(S)₄ 31 constitue ainsi dans cette stratégie un intermédiaire clé. (cf. Figure 27) Il présente deux sites de fonctionnalisation sur la face inférieure de façon à introduire deux copies du module cytotoxique. Ceci impose également la dérivatisation des modules à assembler par les fonctions chimiques adéquates, soit d'une séquence (KLAKLAK)₂ fonctionnalisée par un aldéhyde glyoxylique (OHC-CO-GG-(KLAKLAK)₂ 85), ainsi que des synthons cyclopentapeptidiques -RGD- et -RβAD- oxyamines (40 et 48 respectivement).



Réactifs :

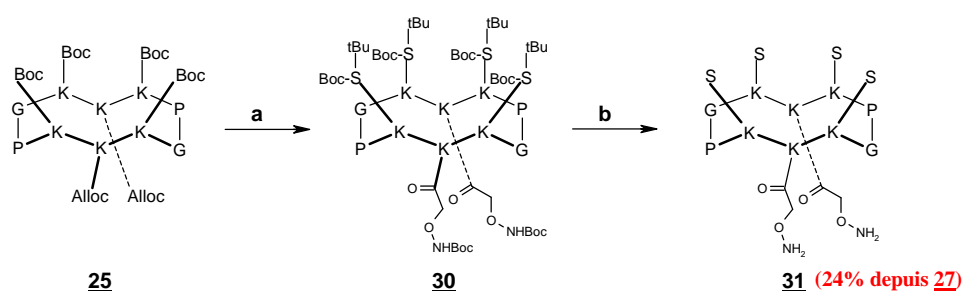
(a) AcONa pH 4,6 (0,1 M) ; (b) NaIO₄, H₂O ; (c) AcONa pH 4,6 (0,1 M)

Figure 27 : Schéma d'obtention des conjugués (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **91** et (KLA)₂RAFT(c[-RβADfK-])₄ **92**.

C.4.2 – Préparation des synthons (CO-CH₂-ONH₂)₂RAFT(S)₄ **31** et OHC-CO-GG(KLAKLAK)₂ **85**.

L'intermédiaire **31** est préparé en cinq étapes à partir du RAFT **25** à deux domaines orthogonalement protégés par des groupements Boc et Alloc. (cf. Figure 28) Les résidus lysines de la face supérieure du RAFT sont dans un premier temps déprotégés par coupure acide des groupements Boc dans les conditions habituelles (TFA/CH₂Cl₂ 1:1) puis fonctionnalisés par les résidus sérines protégés Boc-Ser(*t*Bu)-OH. La fonctionnalisation de la face inférieure par les fonctions oxyamines (au moyen de l'ester activé du *N*-Boc-2-aminoxyacétate de succinimidyle **98**) est réalisée après l'étape de déprotection des groupes Alloc. La dernière étape consiste en la déprotection totale du peptide par hydrolyse simultanée des groupements Boc et *t*Bu. Elle se déroule dans l'acide trifluoroacétique à 95% en présence

de nucléophiles ($\text{H}_2\text{O}/\text{TIS}$). L'intermédiaire $(\text{CO}-\text{CH}_2-\text{ONH}_2)_2\text{RAFT}(\text{S})_4$ **31** est obtenu après purification CLHP avec un rendement global de 24% (4 étapes).



Réactifs :

(a) 1/ TFA/ CH_2Cl_2 (1:1) : **27** ; 2/ BocSer(*t*Bu)OH , PyBOP , DIPEA , DMF ; 3/ Pd(PPh_3)₄ , PhSiH₃ , CH_2Cl_2 ;
 4/ BocNH $\text{OCH}_2\text{COOSucc}$, DIPEA , DMF ; (b) TFA/ $\text{H}_2\text{O}/\text{TIS}$ (95:2,5:2,5)

Figure 28 : Schéma d'obtention du précurseur $(\text{CO}-\text{CH}_2-\text{ONH}_2)_2\text{RAFT}(\text{S})_4$ **31**.

Le synthon OHC-CO-GG-(KLAKLAK)₂ **85** est préparé quant à lui à partir de la séquence linéaire H-SGG(KLAKLAK)₂-OH **84**. (cf. Figure 27) Celle-ci est obtenue selon les méthodes classiques de SPPS en stratégie Fmoc/*t*Bu à partir d'une résine de type 2-chlorotrityle[®]. Le dernier résidu de la séquence (résidu sérine en position N-terminale) est introduit sous forme protégée Boc-Ser(*t*Bu). Le traitement final de la résine par une solution concentrée de TFA à 95% permet alors simultanément de décrocher le peptide de la résine et de déprotéger complètement tous les résidus de la séquence. Le peptide linéaire nu est purifié par CLHP et obtenu avec un rendement global de 32%. La fonctionnalisation de la séquence sur l'extrémité N-terminale par la fonction aldéhyde glyoxylique est réalisée par oxydation au périodate du résidu sérine. Celle-ci est opérée dans les conditions habituelles en milieu aqueux en présence de 2,5 eq. de périodate de sodium. Les sels de sodium sont éliminés par purification CLHP. L'aldéhyde glyoxylique correspondant **85** est obtenu avec un rendement de 74% et est caractérisé par spectrométrie de masse électrospray en mode positif.

C.4.3 – Synthèse des conjugués $(\text{KLA})_2\text{RAFT}([\text{c}[-\text{RGDfK-}])_4$ **91** et $(\text{KLA})_2\text{RAFT}([\text{c}[-\text{R}\beta\text{ADfK-}])_4$ **92**.

L'assemblage des éléments cytotoxiques (KLA) et des motifs de reconnaissance (cyclopentapeptides) est réalisé par deux réactions chimiosélectives d'oximation consécutives à partir de l'intermédiaire **31** selon la stratégie présentée précédemment. (cf. Figure 27)

La première réaction chimiosélective permet d'introduire les deux copies de la séquence **85** sur la face inférieure du RAFT. La réaction est réalisée dans le tampon aqueux d'acétate de sodium (0,1 M) à pH 4,6 en présence d'un léger excès de l'intermédiaire aldéhydique **85** (1,3 eq. / fonction oxyamine). Le couplage est laissé pendant 24 h à température ambiante jusqu'à consommation totale de l'intermédiaire **31**. Le milieu réactionnel est ensuite traité par une solution de benzyloxyamine. Cette astuce nous a permis de résoudre les problèmes liés à la séparation des réactifs en excès du produit de la réaction. En effet, quelques soient les conditions d'élution employées, nous ne sommes pas parvenus à séparer convenablement l'intermédiaire **85** en excès dans le milieu du produit d'intérêt **89**. L'addition de benzyloxyamine au mélange réactionnel permet alors de consommer l'excès d'intermédiaire **85** et conduit à la formation d'un adduit Bn-O-N=CH-CO-KLA qui peut lui être facilement éliminé par purification CLHP. (cf. Figure 29) On peut noter également, sur le chromatogramme d'analyse CLHP du milieu réactionnel, la présence du monoadduit (KLA)₁RAFT(S)₄. L'intermédiaire **89** est finalement obtenu avec un rendement modeste de 56%. Il est caractérisé par spectrométrie de masse électrospray.

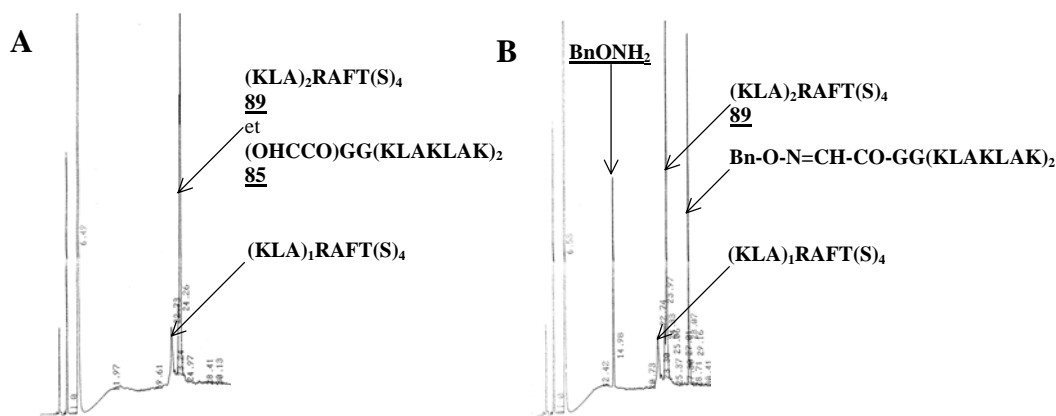


Figure 29 : Chromatogrammes d'analyse CLHP (C₁₈, 214 nm, 5-60% B en 30 min) du milieu réactionnel avant (A) et après (B) l'addition de benzyloxyamine.

Les quatre résidus sérines de la face supérieure du RAFT sont ensuite oxydés par le périodate de sodium de façon à obtenir les fonctions aldéhydes glyoxyliques constituant les points d'attache des ligands lors de la seconde réaction d'oximation. L'intermédiaire **89** est alors oxydé dans les conditions habituelles (NaIO₄/H₂O) puis le mélange réactionnel est purifié par CLHP de façon à éliminer les sels de sodium. Le composé **90** comportant quatre fonctions aldéhydes libres est obtenu avec un excellent rendement de 98%.

L'étape ultime de la synthèse consiste enfin en l'assemblage chimiosélectif des unités cyclopentapeptidiques -RGD- oxyamines **40** sur l'intermédiaire **90**. La réaction est réalisée dans un mélange 1:1 de tampon acétate de sodium (0,1 M – pH 4.6)/acétonitrile en présence d'un léger excès des motifs c[-RGDfK(CO-CH₂-ONH₂-)] **40** (1,2 eq. / fonction aldéhyde). Le couplage est laissé 24 h à température ambiante. La purification finale du milieu réactionnel permet d'éliminer l'intermédiaire **40** en excès (cf. Figure 30, A) et d'isoler le conjugué **91** avec un bon rendement de 80%. Lors de cette dernière étape, nous n'avons pas détecté la présence du sous-produit c[-RGDfK(KLA)-] **93**⁴⁶ qui pourrait résulter d'une réaction de transoximation. En revanche, l'analyse par spectrométrie de masse du conjugué **91** isolé met en évidence la présence d'une impureté non détectée jusqu'ici. (cf. Figure 30, B) Cette impureté pourrait correspondre au composé (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₃ qui présente un résidu lysine en moins dans la séquence primaire du RAFT (cyclopeptide à 9 résidus au lieu de 10).

Le conjugué contrôle **92** est obtenu en parallèle, de façon analogue par addition des motifs c[-RβAdfK(CO-CH₂-ONH₂-)] **48**, avec un rendement de 73%. Il est également caractérisé par spectrométrie de masse électrospray.

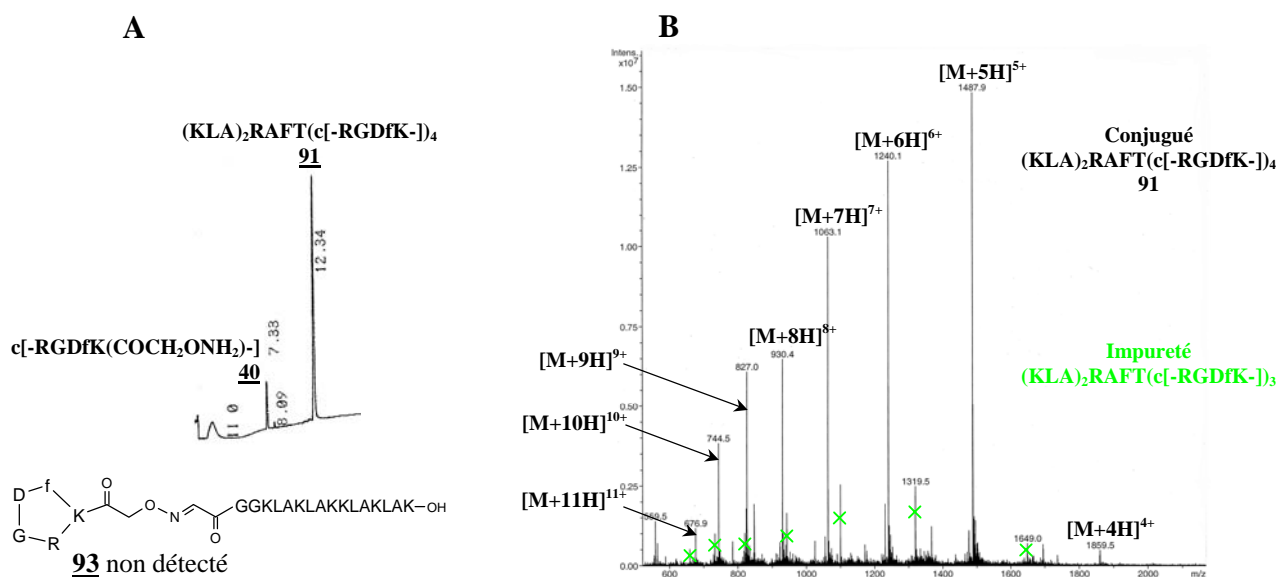


Figure 30 : A/ Chromatogramme d'analyse CLHP (C₁₈, 214 nm, 5-60% B en 15 min) du milieu réactionnel ; B/ Spectre de SM-ESI du conjugué **91** isolé.

⁴⁶ Le composé c[-RGDfK(KLA)-] **93** a été synthétisé et caractérisé indépendamment.

Lors des études biologiques *in vitro* sur cellules HEK293(β_3) de ces composés, nous n'avons pas pu mettre en évidence une toxicité supérieure du conjugué (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **91** par rapport à celle observée avec le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ **50** dépourvu de module cytotoxique. (cf. PARTIE F) Les séquences (KLAKLAK)₂ du conjugué ne semblent pas exercer leur activité cytotoxique. Nous avons émis deux principales hypothèses sur la structure du conjugué qui pourraient être à l'origine de ces résultats :

- la présence du module de vectorisation sur l'extrémité N-terminale de la séquence (KLAKLAK)₂ inhibe son activité ; la séquence doit être libérée du vecteur pour exercer son action cytotoxique, or le lien éther d'oxime, stable *in vivo*, ne permet pas sa libération,

- des phénomènes d'encombrement ou d'interaction entre les deux séquences (KLAKLAK)₂ du conjugué empêchent leur fixation à la membrane mitochondriale.

Nous avons alors choisi d'abandonner la stratégie double oxime au profit de la conjugaison par pont disulfure et préféré par la suite l'introduction d'un seul motif cytotoxique plutôt que deux.

C.5. Stratégie « double lien chimiosélectif » : synthèse des conjugués (ss-KLA)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **94 , (Dox)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **96** et (Ricine-Chaîne A)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **97**.**

C.5.1 – Stratégie de synthèse.

Dans cette approche, les molécules cytotoxiques sont rattachées au ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ par l'établissement d'une liaison disulfure. Cette stratégie nécessite donc la formation de deux liens chimiosélectifs différents successifs (stratégie « double lien chimiosélectif ») : les liens éthers d'oxime pour l'assemblage des motifs -RGD- sur la face supérieure du RAFT et les liens disulfures pour la conjugaison du module cytotoxique sur la face inférieure.

Le couplage par pont disulfure des molécules cytotoxiques aux ligands multivalents RAFT(c[-RGDfK-])₄ requiert un gabarit RAFT fonctionnalisé sur la face inférieure par une fonction thiol. Celle-ci peut être facilement introduite au moyen d'un résidu cystéine sur la lysine. Pour disposer d'un intermédiaire commun à la synthèse des conjugués avec les différentes drogues, nous avons choisi de faire porter le groupement activateur NPys par la fonction thiol du RAFT. (cf. Figure 31) Cet intermédiaire (Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-])₄

22 constitue ainsi l'intermédiaire clé de cette stratégie. Il peut être engagé dans des synthèses parallèles avec les différentes drogues envisagées porteuses d'une fonction thiol libre et permettre alors l'accès à nos conjugués. De la même façon, l'intermédiaire (Cys(NPys))RAFT(c[-RβADfK-])₄ **23** permet d'accéder aux composés contrôlés nécessaires pour les tests biologiques.

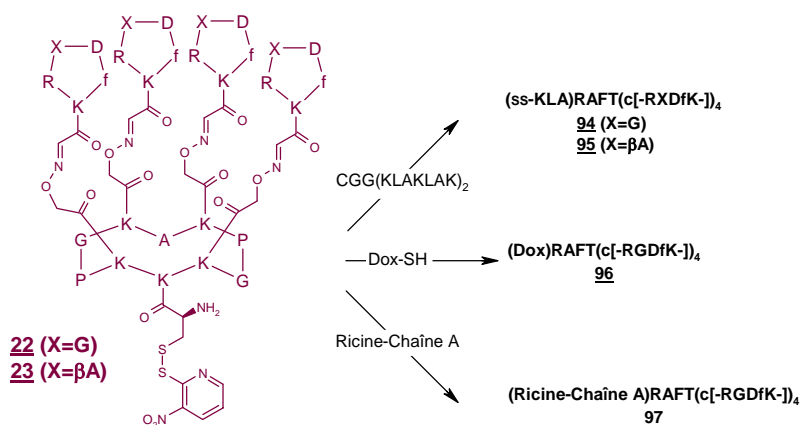


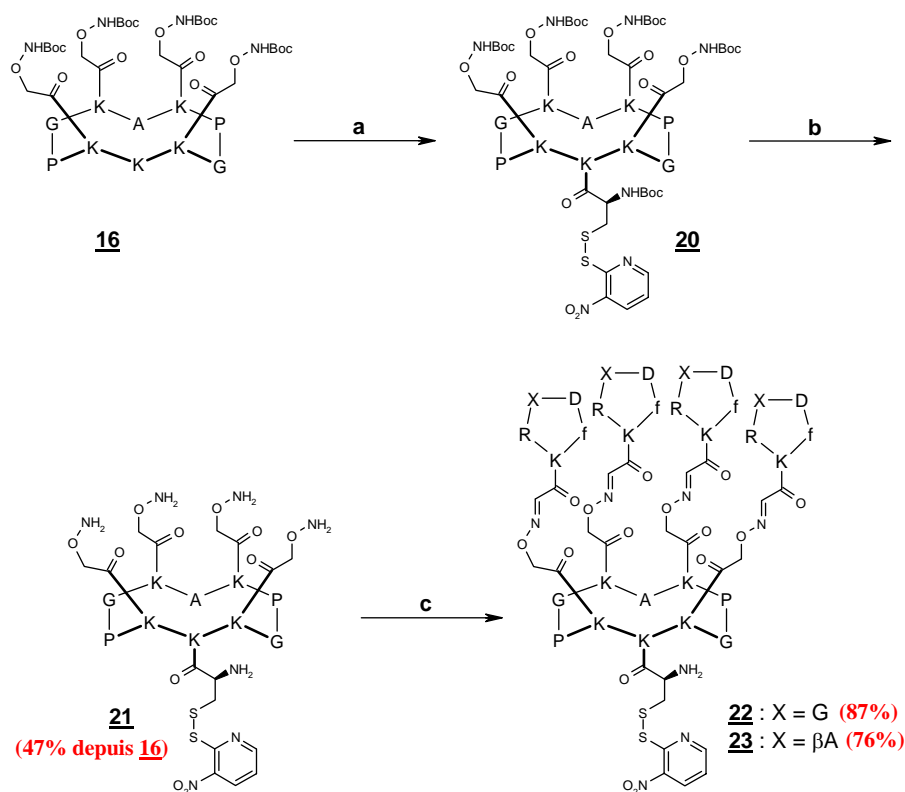
Figure 31 : Intermédiaire clé (Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-])₄ **22** pour la synthèse des vecteurs conjugués aux molécules cytotoxiques.

Comme auparavant, nous présentons en premier la préparation des précurseurs **22** et **23**, puis exposons successivement la synthèse des différents conjugués.

C.5.2 – Synthèse des intermédiaires (Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-])₄ **22** et (Cys(NPys))RAFT(c[-RβADfK-])₄ **23**.

L'inconvénient majeur du groupement NPys est son incompatibilité avec la stratégie Fmoc/*t*Bu de SPPS. Il n'est pas stable dans les conditions de déprotection à la pipéridine des groupements Fmoc. Le résidu cystéine protégé par le groupe NPys est donc introduit lors des étapes en solution.

Les intermédiaires clés **22** et **23** sont obtenus à partir d'un RAFT commun (**16**), présentant quatre oxyamines protégées sur la face supérieure et aucun substituant sur la face inférieure (intermédiaire également commun à la synthèse des conjugués monofonctionnalisés avec la tyrosine ou la cyanine 5, cf. partie **B**). (cf. Figure 32)



Réactifs : (a) BocCys(NPys)OH, PyBOP, DIPEA, DMF ; (b) TFA/H₂O/TIS/CH₂Cl₂ (45:2,5:2,5:50)
 (c) c[-RGDfK(COCHO)-] **38** ou c[-R β ADfK(COCHO)-] **46**, H₂O/CH₃CN (1:1)

Figure 32 : Schéma d'obtention des intermédiaires (Cys(NPys))RAFT[c[-RGDfK-]]₄ **22** et (Cys(NPys))RAFT[c[-R β ADfK-]]₄ **23**.

Le résidu cystéine est introduit sur la face inférieure du RAFT **16** par acylation de la fonction amine libre du résidu lysine au moyen de l'acide aminé protégé Boc-Cys(NPys)-OH. Le couplage peptidique est réalisé dans les conditions habituelles en présence de PyBOP à pH 9. Le composé **20** obtenu est aussitôt déprotégé avec une solution de TFA à 50% dans le DCM en présence des nucléophiles usuels TIS et H₂O pour piéger les carbocations *t*butyle libérés. L'intermédiaire **21** est obtenu sous forme d'une poudre jaune pâle (absorption du groupement NPys dans le visible, $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm) avec un rendement global de 47%. Cet intermédiaire est conjugué en parallèle avec les aldéhydes glyoxyliques des cyclopentapeptides -RGD- et -R β AD-. Le couplage chimiosélectif des motifs c[-RGDfK(COCHO)-] **38** avec le composé **21** est réalisé dans un mélange 1:1 d'eau et d'acétonitrile. La réaction est très propre et totale après 50 min à température ambiante. (cf. Figure 33, A) La purification CLHP finale permet l'élimination du cyclopentapeptide **38** en excès (1,3 eq. par site sont utilisés) et l'obtention du conjugué (Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-])₄ **22** avec un

rendement de 87%. (cf. Figure 33, B) Il est caractérisé par spectrométrie de masse électrospray et identifié par ses ions multichargés (3+), (4+) et (5+). (cf. Figure 33, C)

L'homologue (Cys(NPys))RAFT(c[-RβADfK-])₄ **23** est obtenu, dans des conditions tout à fait similaires par couplage chimiosélectif des unités c[-RβADfK(CO-CHO)-] **46** sur **21**, avec un rendement de 76%.

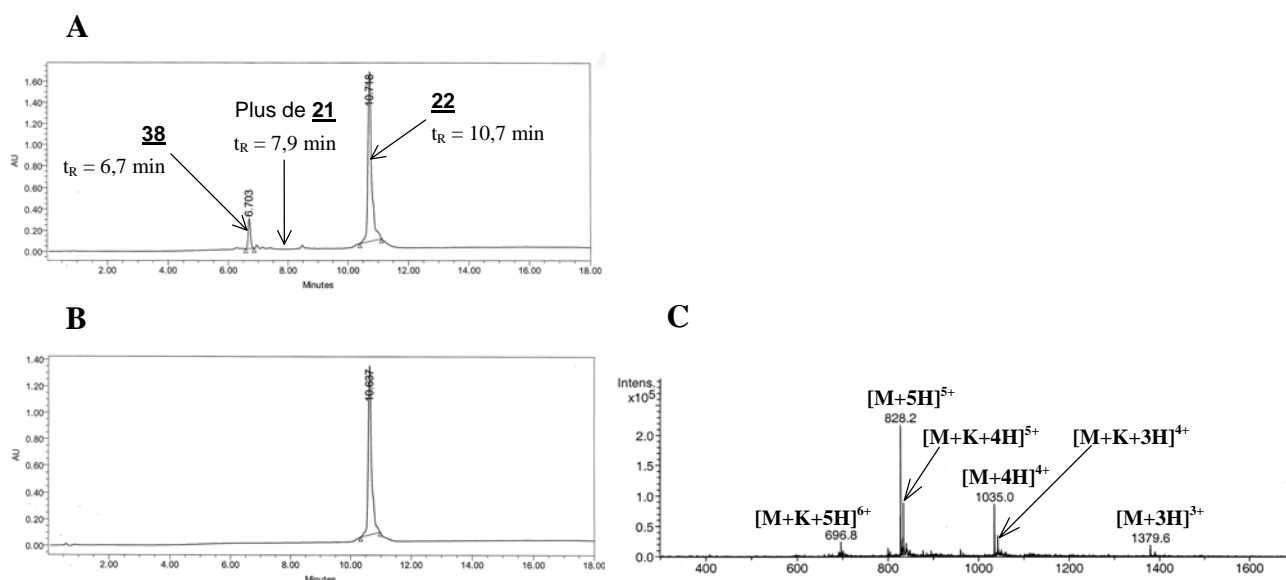


Figure 33 : A/ Chromatogramme d'analyse CLHP (C₁₈, 214 nm, 5-60% B en 15 min) du milieu réactionnel après 50 min de réaction ; B/ Chromatogramme d'analyse CLHP (C₁₈, 214 nm, 5-60% B en 15 min) du composé **22** isolé après purification CLHP ; C/ Spectre SM-ESI du composé **22** isolé.

C.5.3 – Synthèse du conjugué (ss-KLA)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **94**.

Avant de réaliser la conjugaison de la séquence cytotoxique CGG(KLAKLAK)₂ sur l'intermédiaire **22**, nous avons, dans un premier temps, étudié sur un exemple simple la réaction de couplage entre un composé S-H et un composé S-NPys et mis au point une méthode de dosage par UV permettant de suivre la réaction de formation du disulfure.

a) Étude préalable de la réaction de déplacement d'un disulfure.

L'attaque nucléophile d'un thiol libre sur un thiol activé par le groupement NPys s'accompagne de la libération de la 3-nitropyridyl-2-thione. Le groupement NPys lié par pont disulfure (S-NPys) a un maximum d'absorption vers 350 nm, tandis que la thione libérée a deux maxima d'absorption vers 310 et 410 nm (bandes d'absorption des deux formes

tautomères thiopyridine et thiopyridone). Ces caractéristiques peuvent permettre le suivi de la réaction de formation du disulfure par spectrométrie UV-Visible. Pour mettre au point la méthode de dosage, nous avons dans un premier temps étudié l'exemple simple du couplage de deux résidus cystéines, l'un Boc-Cys(NPys)-OH, l'autre H-Cys-OH. (cf. Figure 34)

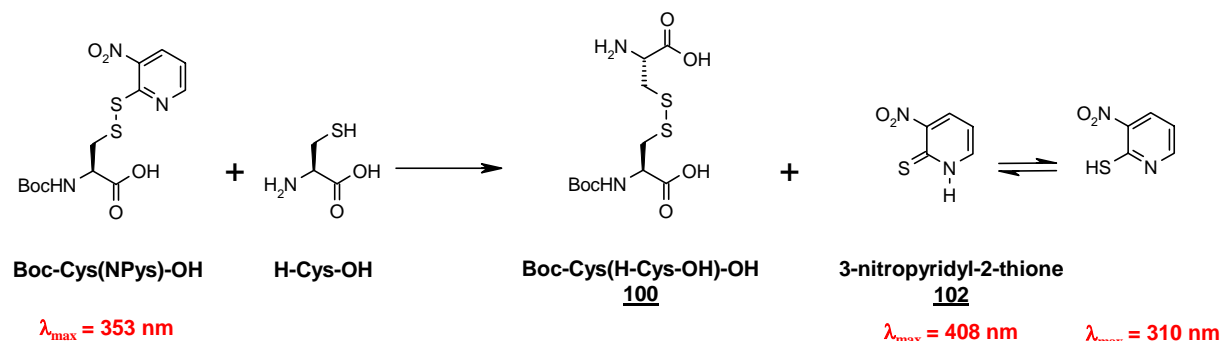


Figure 34 : Suivi de la réaction de formation du disulfure hétérodimérique **100** par spectroscopie UV-Visible.

Des quantités croissantes de la cystéine libre (H-Cys-OH) en solution dans un mélange PBS/DMF (4:1) à pH 7 sont ajoutées à une solution de Boc-Cys(NPys)-OH dans le même solvant. La réaction est laissée 30 min à température ambiante avant d'être analysée par UV. Le spectre UV est mesuré entre 250 et 550 nm. La superposition des spectres de chaque condition fait apparaître deux points isobestiques à 337 nm et 394 nm.⁴⁷ (cf. Figure 35) La présence de ces points est en faveur d'une transition entre les espèces sans intermédiaire.⁴⁸ La bande d'absorption à 310 nm est celle qui permet de suivre la formation du disulfure avec les plus grands écarts de densité optique. (cf. Figure 36) Cependant, la bande à 408 m, plus proche de la zone du visible, risque moins de subir l'influence d'autres bandes d'absorption des autres molécules dans les réactions avec nos conjugués.

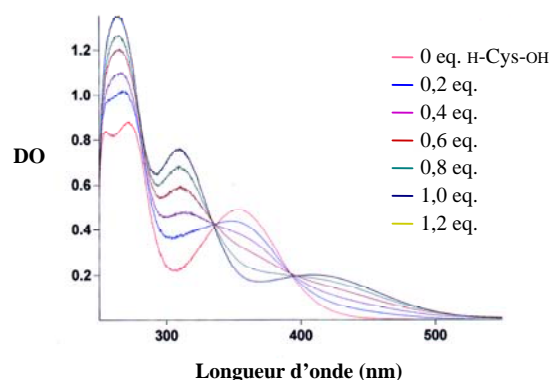


Figure 35 : Suivi de la réaction de formation du disulfure hétérodimérique **100** par spectroscopie UV-Visible.

⁴⁷ A ces valeurs de longueur d'onde, les coefficients d'extinction des deux espèces, consommée et formée (soit *S*-NPys et thiopyridine ou *S*-NPys et thiopyridone), sont identiques.

⁴⁸ Notons toutefois que le point isobestique est une condition nécessaire mais pas suffisante à la transition en une seule étape.

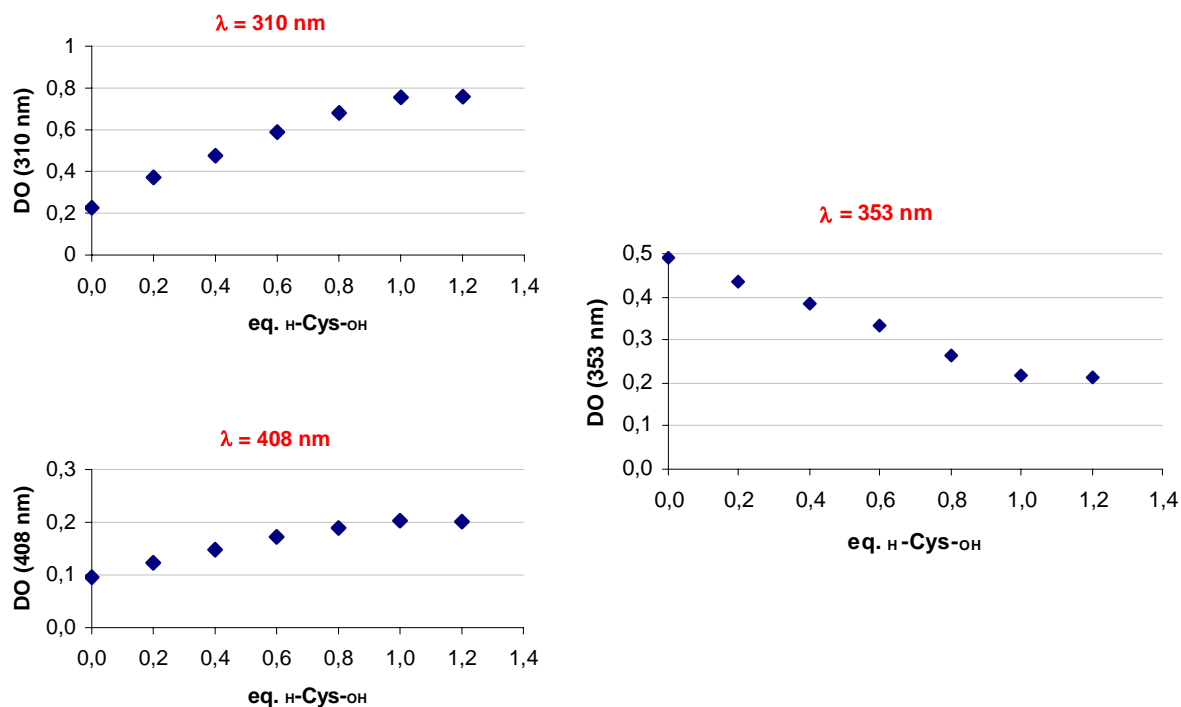


Figure 36 : Graphes de la variation de la densité optique aux longueurs d'onde 310, 353 et 408 nm en fonction de la quantité de cystéine libre ajoutée.

b) Synthèse du conjugué (ss-KLA)RAFT(c[-RGDfK-])₄ 94.

Le conjugué (ss-KLA)RAFT(c[-RGDfK-])₄ 94 est obtenu par couplage de la séquence CGG(KLAKLAK)₂ 86, présentant une fonction thiol libre en position N-terminale, sur le RAFT S-activé 22. (cf. Figure 37)

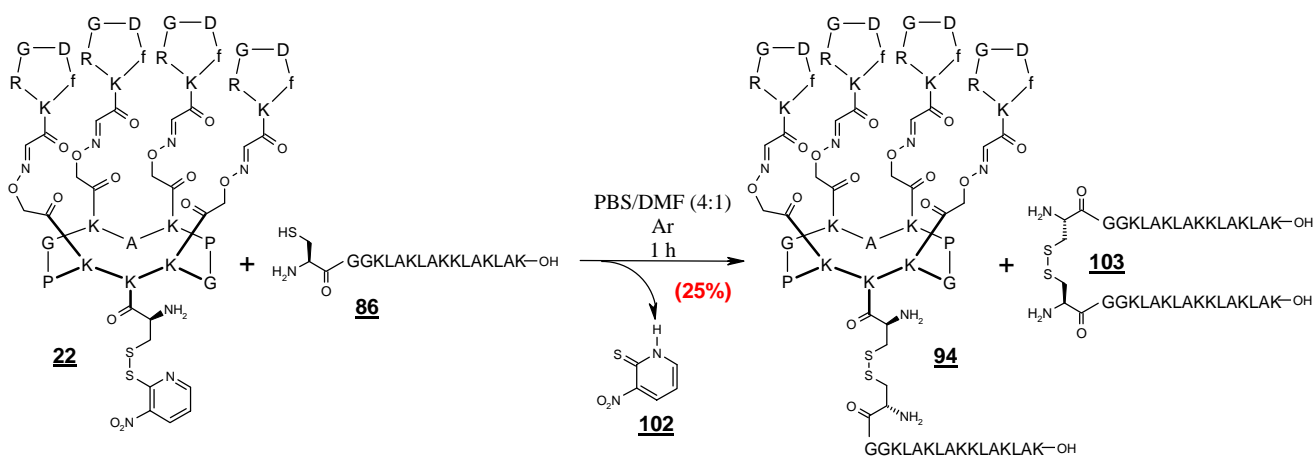


Figure 37 : Schéma d'obtention du conjugué (ss-KLA)RAFT[c(-RGDfK-)]₄ 94.

Plusieurs essais ont du être réalisés pour nous permettre d'optimiser les conditions de formation du disulfure souhaité et limiter les réactions d'oxydation secondaires conduisant aux disulfures homodimériques. Par ailleurs, des problèmes de purification du milieu réactionnel, provenant de la mauvaise séparation des réactifs, produits et impuretés par CLHP, ainsi que des faibles écarts entre les masses molaires de ces différentes espèces, nous ont conduit à préférer la présence de certains sous-produits par rapport à d'autres.

Le tableau suivant précise les masses molaires et temps de rétention CLHP des différentes espèces qui ont pu être identifiées dans les milieux réactionnels :

Ordre d'élué par CLHP	Composé	N° produit	M (g.mol ⁻¹)	t _R CLHP ⁴⁹ (C ₁₈ , 214 nm)
1	3-nitropyridyl-2-thione	102	156,2	7,6 min
2	(Cys)RAFT(c[-RGDfK-]) ₄	/	3982,4	19,9 min
3	H-CGG(KLAKLAK) ₂ -OH	86	1741,3	21,0 min
4	[(Cys)RAFT(c[-RGDfK-]) ₄] ₂	/	7966,8	21,5 min
5	(ss-KLA)RAFT(c[-RGDfK-]) ₄	94	5721,7	22,3 min
6	(Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-]) ₄	22	4136,6	22,8 min
7	[H-CGG(KLAKLAK) ₂ -OH] ₂	103	3480,5	23,6 min

La réaction est réalisée sous argon dans un milieu tamponné PBS/DMF (4:1). La présence de DMF est indispensable pour des questions de solubilités des réactifs et des produits. L'utilisation du PBS permet de travailler en milieu tamponné à pH 7. Les solvants utilisés pour la réaction sont soigneusement dégazés par bullage d'argon pendant 1 h et laissés sous vide pendant quelques minutes. Ces précautions sont indispensables pour éliminer l'oxygène dissous dans les solvants. Les deux synthons **22** et **86** sont solubilisés à 10 mM dans le mélange de solvant. L'intermédiaire **86** (~ 1,5 eq.) est ajouté goutte à goutte sur la solution du thiol activé **22**. L'addition est immédiatement accompagnée de l'apparition d'une couleur jaune intense caractéristique de la 3-nitropyridyl-2-thione libérée.

Etant donné les écarts de temps de rétention des différentes espèces susceptibles d'être présentes dans le milieu réactionnel, nous avons estimé judicieux de travailler en présence d'un excès de l'intermédiaire **86**. Ceci permet la consommation totale de l'intermédiaire **22** et prévient la formation de son homodimère, difficilement séparable du produit d'intérêt **94**. L'excès de **86** conduit en revanche inévitablement à la formation de son disulfure homodimérique **103**. Toutefois, les temps de rétention des formes monomérique **86** et dimérique **103** permettent une séparation correcte du conjugué **94** souhaité. (cf. tableau ci-dessus et Figure 38, A)

⁴⁹ Conditions d'analyse CLHP : Gradient : 20-60% B en 40 min ; solvant A : H₂O/TFA (99,9:0,1) ; solvant B : CH₃CN/H₂O/TFA (90:9,9:0,1).

Par ailleurs, les différences de poids moléculaires entre les 4 espèces présentes dans le milieu (i.e. le réactif **86** en excès, le conjugué **94** désiré et les sous-produits **102** et **103**) nous ont permis d'envisager une autre technique de purification que la CLHP : l'ultrafiltration. Deux systèmes d'ultrafiltration ont été testés afin de séparer le conjugué **94** désiré du monomère **86** en excès, de l'homodimère **103** et du sous-produit **102** :

- Un système de type CENTRICON (cutt-off 3000) : ce dispositif a permis de ne séparer que la 3-nitropyridyl-2-thione **102** ($M = 156,2 \text{ g.mol}^{-1}$) du milieu réactionnel, tous les autres composés sont retenus dans le concentrat. Même le monomère **86** ($M = 1741,3 \text{ g.mol}^{-1}$) n'est pas éliminé. Il est probable que la structure tridimensionnelle hélicoïdale de la séquence $(\text{KLAKLAK})_2$ ne favorise pas son passage au travers des pores de la membrane.

- Un système de type AMICON Ultra (cutt-off 5000) : ce dispositif laisse au contraire passer toutes les espèces dans les mêmes proportions et ne permet pas d'enrichir le milieu en conjugué **94**.

Le conjugué **94** a donc finalement été isolé de façon classique par purification CLHP. Les conditions drastiques (récupération uniquement du sommet du pic) employées pour l'isolement du produit ont conduit à l'obtention du produit avec un rendement faible (25%). Le conjugué **94** a été caractérisé par spectrométrie de masse électronique spray. (cf. Figure 38, C)

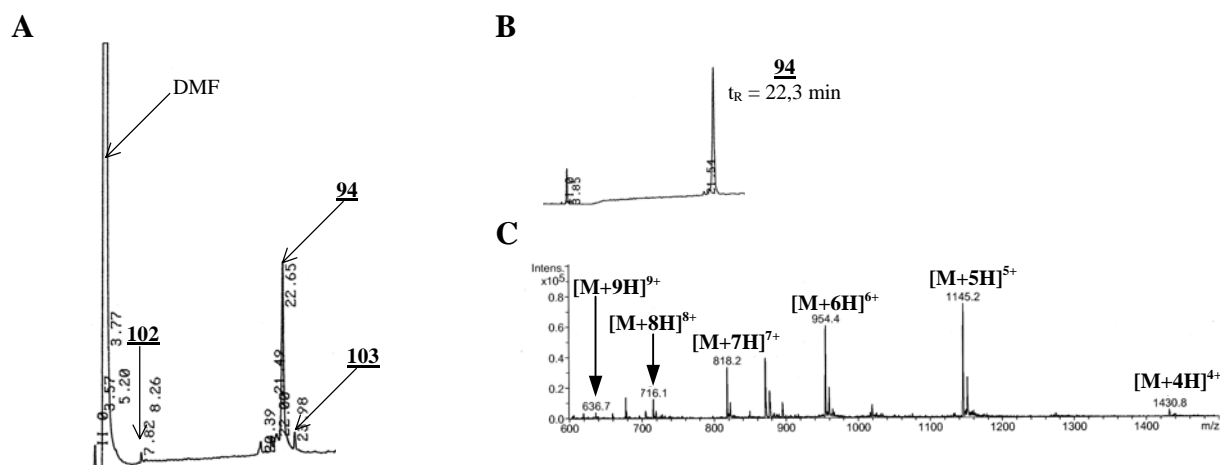


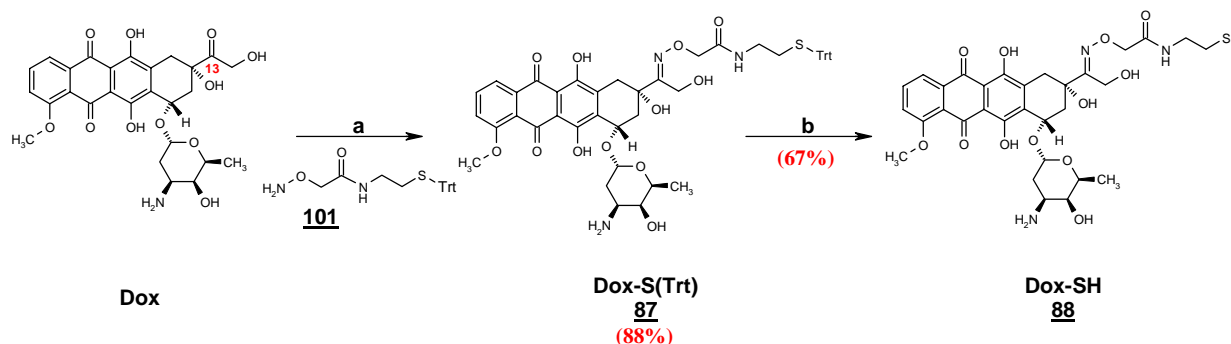
Figure 38 : A/ Chromatogramme d'analyse CLHP du milieu réactionnel après 1 h de réaction (C_{18} , 214 nm, 20-60% B en 40 min) ; B/ Chromatogramme d'analyse CLHP (C_{18} , 214 nm, 20-60% B en 40 min) du composé **94** isolé après purification CLHP du milieu réactionnel ; C/ Spectre SM-ESI du composé **94**.

Les conditions réactionnelles employées pour la conjugaison ne sont pas optimales. L'utilisation de conditions plus acides (pH 4-5), comme celles utilisées plus tard pour la synthèse du conjugué avec la doxorubicine, et d'un temps de réaction court (5 min) doit permettre de limiter la formation des homodimères et d'améliorer le rendement de la réaction. Ces différents paramètres sont en cours d'étude.

Remarquons également que les complications rencontrées au cours de nos expériences nous ont pas donné l'occasion d'utiliser le test colorimétrique mis au point préalablement pour suivre l'avancement de la réaction. Cette méthode pourra toutefois être utilisée par la suite par nos collaborateurs poursuivant ces études.

C.5.4 – Synthèse du conjugué (Dox)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **96**.

Nous avons au préalable procédé à la préparation du dérivé **88** de la doxorubicine présentant une fonction thiol libre (doxorubicine fonctionnalisée sur le carbonyl en position 13). Ce dérivé peut être obtenu en deux étapes à partir de la doxorubicine au moyen d'un linker bifonctionnel (composé **101**). (cf. Figure 39) Ce linker présente sur une extrémité une fonction thiol protégée (S-Trt) et sur l'autre extrémité une fonction éther d'oxyamine libre. Il a été synthétisé au laboratoire par S.D. Edupuganti.⁵⁰



Réactifs : (a) H₂O/CH₃CN (1:1) ; (b) ZnBr₂, DCM (0,5 mM)

Figure 39 : Schéma d'obtention de l'intermédiaire Dox-SH **88**.

La première étape de la synthèse du composé **88** consiste en la formation chimiosélective d'une liaison éther d'oxime entre la fonction oxyamine du linker et le carbonyl C₁₃ de la doxorubicine. La réaction se déroule dans un mélange d'eau et d'acétonitrile 1:1 à température ambiante (30°C) en présence d'un excès de **101** et est suivie

⁵⁰ Post-doctorat. 2003.

par CLHP. (cf. Figure 40, A) Elle conduit à la formation du composé **87** (taux de conversion 88%) sous la forme de deux isomères (**1** et **2**). Chacun d'eux a pu être isolé par CLHP et caractérisé par spectrométrie de masse. L'isomère **1**, très majoritaire et stable, pourrait correspondre à l'isomère E de la liaison éther d'oxime formée, et l'isomère **2** à l'isomère Z (ce dernier évoluant spontanément vers **1** dans le DMSO). Des études de RMN 2D (NOESY et HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) nous ont permis d'attribuer tous les signaux du spectre RMN ^1H de l'isomère majoritaire **1**. (cf. Figure 41) En revanche, il ne nous a pas été possible d'identifier avec certitude l'isomérisation de la liaison éther d'oxime. Par ailleurs, une approche par modélisation moléculaire ne nous a pas apporté d'argument supplémentaire : les énergies calculées des deux isomères Z et E sont tout à fait comparables.

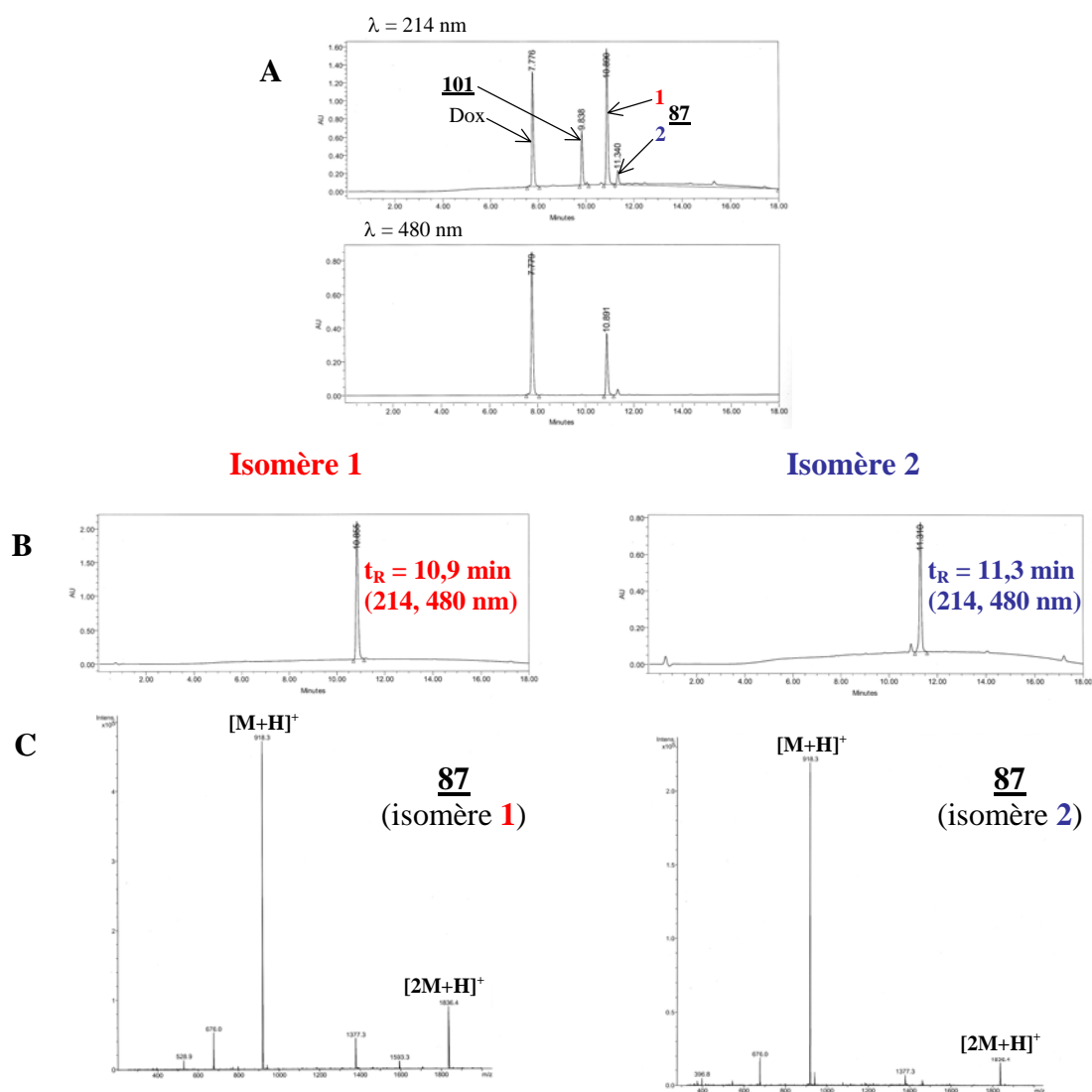
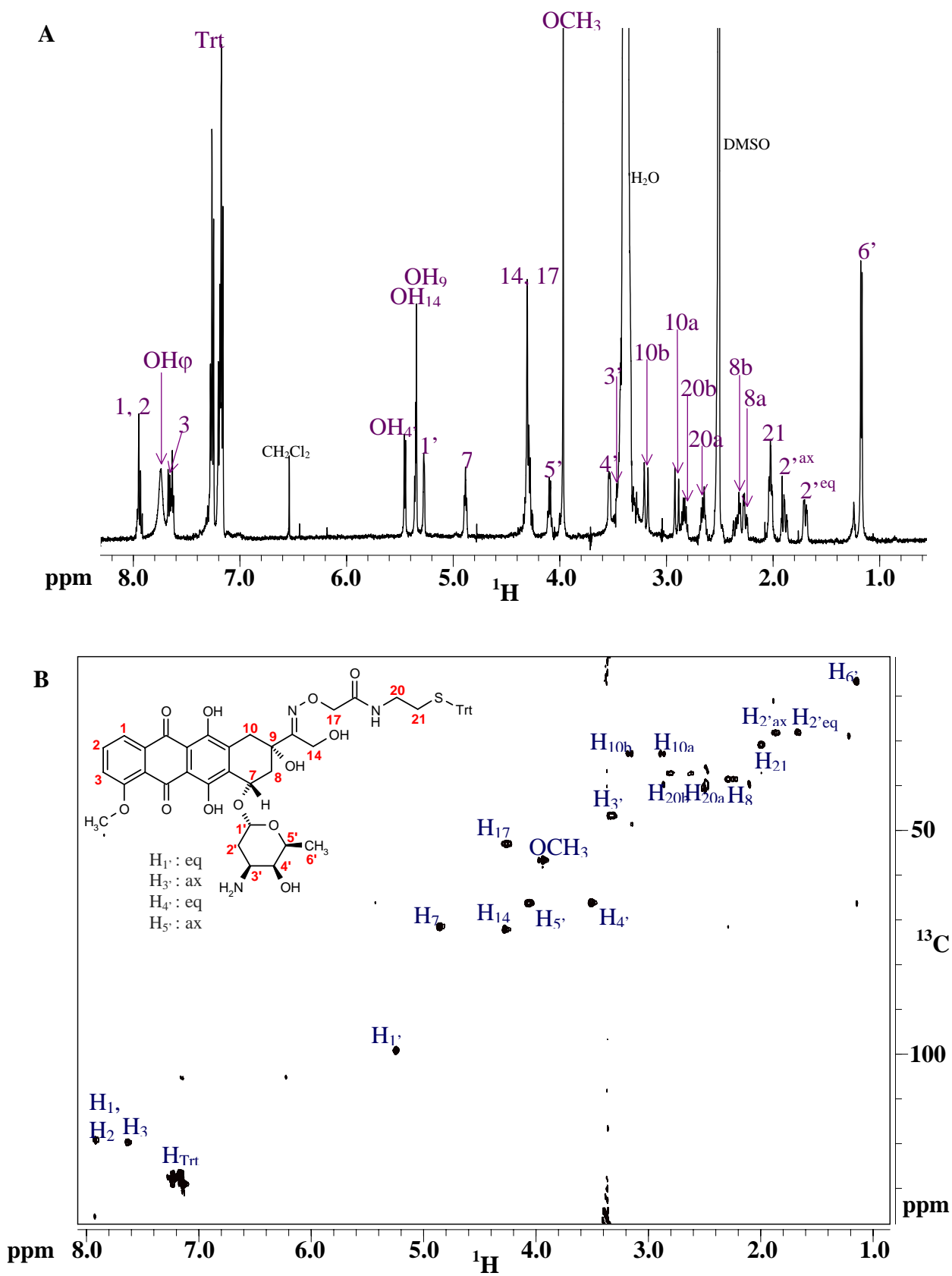


Figure 40 : A/ Chromatogrammes de CLHP (C_{18} , 214 nm et 480 nm, 5-100% B en 15 min) après 2 h de réaction ; B/ Chromatogrammes d'analyse CLHP (C_{18} , 214 nm, 5-100% B en 15 min) des isomères **1** et **2** isolés ; C/ Spectres SM-ESI des isomères **1** et **2**.



La deuxième étape a été réalisée sur l'isomère majoritaire de l'intermédiaire **87** (isomère **1**). Elle consiste en l'élimination du groupement trityle du linker. (cf. Figure 39) Différents essais ont montré qu'il n'est pas possible d'utiliser les conditions classiques de déprotection à l'acide trifluoroacétique concentré. Ces conditions dégradent l'intermédiaire **87** notamment par la coupure de la liaison glycosidique. Nous avons alors utilisé une méthode au bromure de zinc anciennement décrite pour les synthèses d'oligonucléotides.⁵¹ La réaction se déroule dans le dichlorométhane dans des conditions diluées (0,5 mM) et en présence d'un gros excès de ZnBr₂ (~ 200 eq.).

L'addition rapide du sel de zinc conduit en quelques minutes à la formation d'un précipité rouge/violet sombre correspondant à l'adduit thio-zincique. (cf. Figure 42)

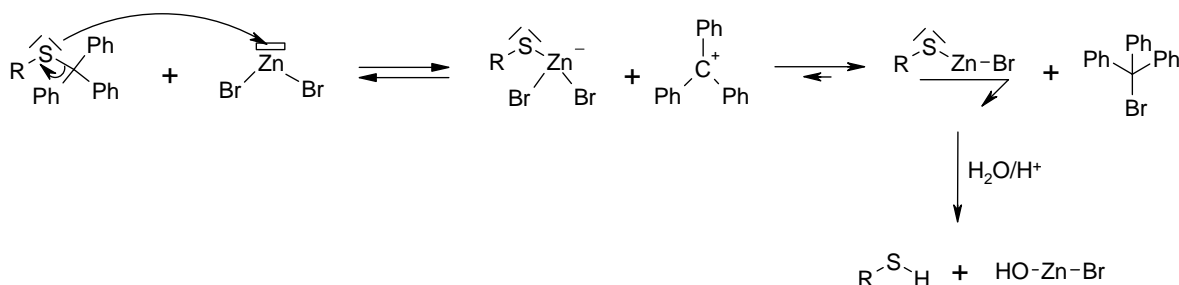


Figure 42 : Mécanisme supposé de la déprotection de la fonction thiol par élimination du groupe trityle au bromure de zinc.

La formation de cet adduit doit s'accompagner du départ d'un ion Br⁻. Le départ du brome n'est pas favorable au zinc, toutefois le processus s'accompagne de la précipitation du produit déplaçant l'équilibre dans le sens souhaité. Le carbocation trityle stable, récupéré dans la phase organique après filtration, a été isolé et identifié par spectrométrie de masse DCI. (cf. Figure 43, C) Le précipité correspondant à l'adduit thio-zincique est ensuite hydrolysé par une solution acide CH₃CN/H₂O/TFA (90:9,9:0,1) afin d'obtenir la fonction thiol libre. Ces conditions sont efficaces et permettent une transformation totale et rapide de **87** en **88** comme l'atteste l'analyse CLHP. (cf. Figure 43, A et B) Une purification par CLHP est néanmoins nécessaire pour éliminer les sels de zinc (ZnBrOH, ZnBr₂). Le composé **88** est alors obtenu avec un rendement de 67%. Son spectre de masse présente deux pics correspondant à l'ion monochargé [M+H]⁺ ainsi qu'à l'ion monochargé [M-sucre+H]⁺ du fragment ayant perdu l'unité saccharidique. (cf. Figure 43, D) Ce fragment est régulièrement observé sur les

⁵¹ Kohli, V.; Blöcker, H.; Köster, H. The triphenylmethyl (trityl) group and its uses in nucleotide chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2683-2686.

spectres de masse de nos dérivés de doxorubicine (Dox, intermédiaires **87**, **88** ou ultérieurement conjugué **96**).

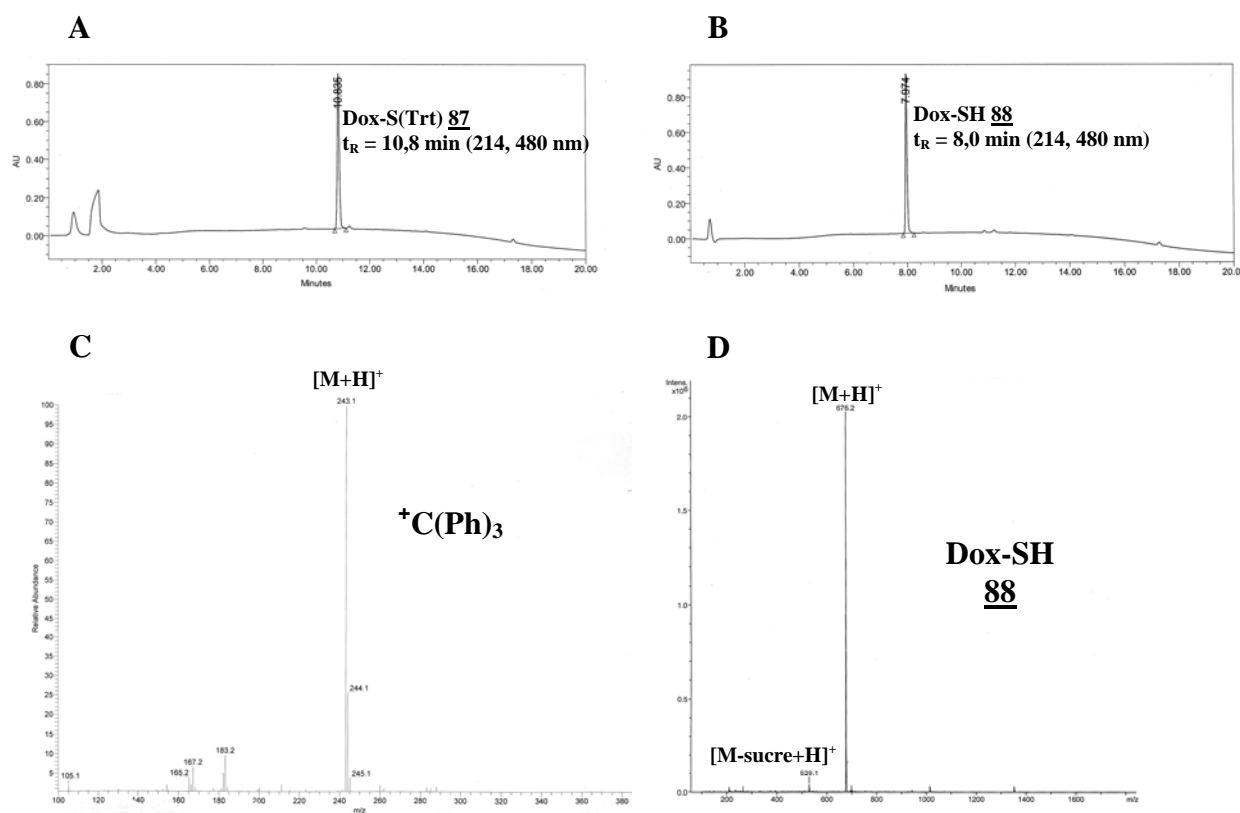


Figure 43 : A/ Chromatogramme d'analyse CLHP (C₁₈, 214 nm, 5-100% B en 15 min) du milieu réactionnel au temps initial ; B/ Chromatogramme d'analyse CLHP (C₁₈, 214 nm, 5-100% B en 15 min) de la solution d'hydrolyse du précipité ; C/ Spectre SM-DCI (mode positif) du cation trityle isolé ; D/ Spectre SM-ESI du composé **88** purifié.

Le conjugué (Dox)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **96** est obtenu par couplage de l'intermédiaire **88**, présentant une fonction thiol libre, sur l'intermédiaire **22** S-activé. (cf. Figure 44)

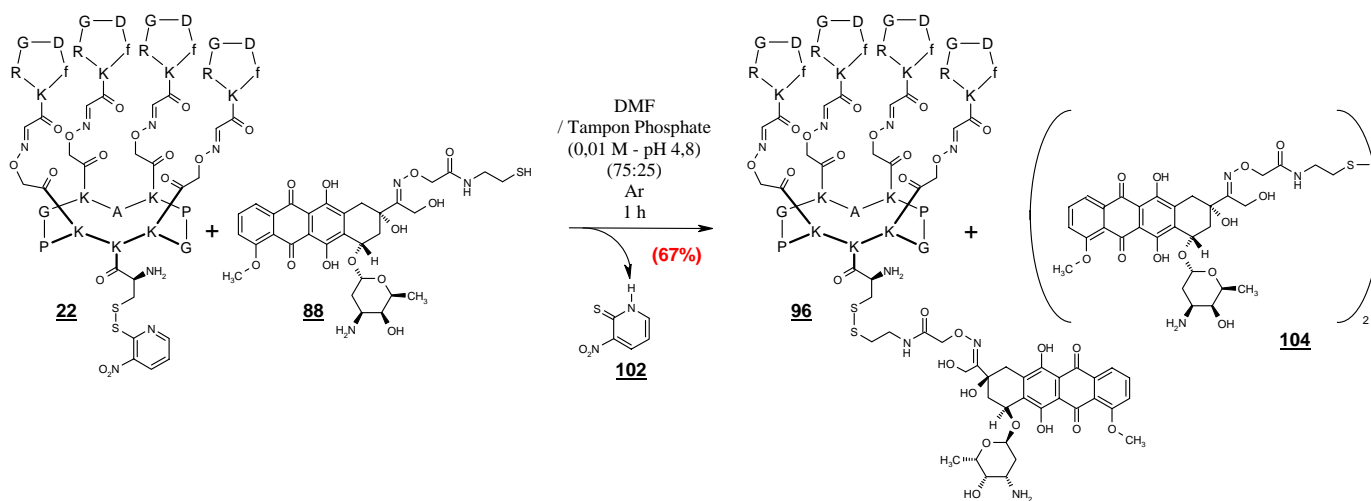


Figure 44 : Schéma d'obtention du conjugué (Dox)RAFT[c[-RGDfK-])₄ **96**.

Plusieurs tentatives ont été nécessaires pour mettre au point les conditions réactionnelles. La réaction a été réalisée à température ambiante sous argon dans un mélange DMF/tampon phosphate 0,01 M à pH 4,8 préalablement désoxygéné. Ces conditions n'ont pas suffi malgré tout à prévenir la formation du sous-produit **104**⁵² issu de l'homodimérisation du dérivé **88**, mais l'addition de l'intermédiaire **22** en solution à 1 mM sur l'intermédiaire **88** pulvérulent permet de limiter sa formation. L'intermédiaire **88** est utilisé en léger excès (~ 1,2 eq.) de façon à conduire la réaction jusqu'à consommation totale de l'intermédiaire **22**. L'absence de ce réactif dans le mélange réactionnel facilite ensuite la purification par filtration sur gel, les techniques usuelles de CLHP⁵³ ne permettant pas de séparer efficacement les espèces du mélange réactionnel. Nous avons également utilisé la spectrométrie de masse électronique pour détecter les différents composés du mélange et suivre l'avancée des réactions. (cf. Figure 45, A)

La purification du milieu réactionnel a été réalisée par filtration sur gel au moyen d'une colonne Sephadex G15. La taille des pores de cette colonne ralentit la traversée des molécules ayant une masse molaire inférieure à 1500. Elle permet alors de récupérer dans les premières fractions d'élution le conjugué **96** ($M = 4656,1 \text{ g.mol}^{-1}$) souhaité et de retenir davantage les monomère **88** ($M = 675,7 \text{ g.mol}^{-1}$) et dimère **104** ($M = 1349,4 \text{ g.mol}^{-1}$) de doxorubicine présents dans le milieu réactionnel. Cependant, l'analyse par spectrométrie de masse des fractions isolées du conjugué montre dans chaque fraction une quantité résiduelle de dimère **104** (espèce très minoritaire dans certaines fractions mais toujours détectée). (cf. Figure 45, B et C) Le conjugué **96** est finalement obtenu avec un rendement acceptable de 67%. Il a été caractérisé par spectrométrie de masse électronique et identifié par les pics des ions multichargés (3+), (4+), (5+) et (6+).

⁵² Ce composé a été synthétisé et caractérisé indépendamment.

⁵³ Utilisation de colonnes C₁₈ ou C₄ et optimisation des gradients.

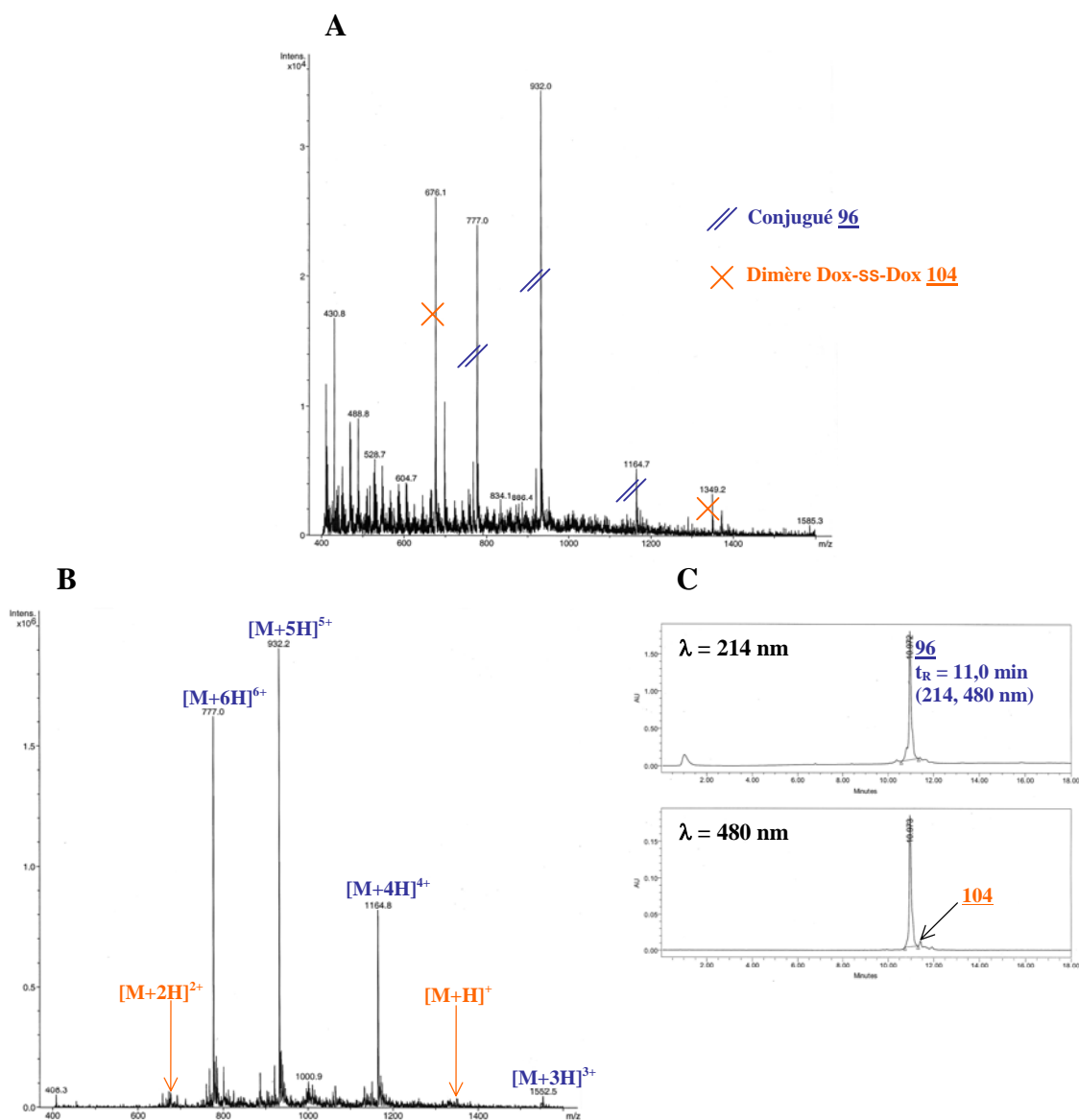


Figure 45 : A/ Spectre SM-ESI du milieu réactionnel après 1 h de réaction ; B/ Spectre SM-ESI du conjugué **96** isolé après filtration sur gel ; C/ Chromatogrammes d'analyse CLHP (C_{18} , 214 nm et 480 nm, 5-60% B en 15 min) du conjugué **96**.

C.5.5 – Synthèse du conjugué (Ricine-Chaîne A)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **97**.

Afin de conjuguer la protéine sur le ligand multivalent porteur d'une fonction thiol activée (Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-])₄ **22**, nous avons choisi de travailler dans des conditions non-dénaturantes et utilisé la solution de conditionnement de la protéine telle qu'elle est vendue par la société Sigma-Aldrich. Ces conditions permettent de maintenir la protéine dans sa conformation native et de conserver ses propriétés cytotoxiques. Préserver la conformation native est en outre essentiel pour conserver la différence d'accessibilité des

deux résidus cystéines C171 et C259. En effet, contrairement au résidu C171 inclus dans une hélice α au cœur de la protéine, le résidu C259, proche de l'extrémité C-terminale, est exposé au milieu extérieur et est donc plus enclin à réagir avec l'intermédiaire 22. La chaîne A de la Ricine est fournie sous forme déglycosylée et conditionnée dans une solution aqueuse de glycérol tamponnée riche en sels. La concentration de la protéine dans la solution est de l'ordre de 77 μM . L'intermédiaire 22 est introduit dans cette solution en large excès (~ 70 eq.) de façon à se placer dans des conditions de dilution acceptables pour le déroulement de la réaction (5 mM). Le peptide n'est que partiellement soluble dans le tampon utilisé, il se forme des agrégats de couleur jaune intense. Cette couleur peut être attribuée à la formation de la 3-nitropyridyl-2-thione et suggère que la réaction de couplage par formation du disulfure a effectivement eu lieu. Toutefois, la formation du conjugué n'a pas pu être observée par CLHP du fait des conditions de dilutions trop importantes de la protéine. Seul l'intermédiaire 22 en excès est détecté dans le milieu réactionnel. De même, le conjugué n'a pas pu être mis en évidence directement par spectrométrie de masse électrospray du fait de la présence de sels à forte concentration dans le milieu. Ni le couplage CL-SM, ni le dessalage par dialyse n'ont permis de résoudre ce problème. Nous avons alors été amené à utiliser une méthode indirecte de SM-SM pour mettre en évidence la formation du conjugué.

Des expériences de SM-SM ont ainsi été menées en parallèle sur les trois échantillons suivants :

- l'intermédiaire (Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-])₄ 22 dans un mélange H₂O/CH₃CN (1:1),
- la solution tamponnée de glycérol contenant la protéine Ricine-Chaîne A,
- le milieu réactionnel (solution tamponnée de glycérol) contenant l'intermédiaire 22 en excès, la protéine non-conjuguée et/ou le conjugué 97 attendu.

Le tableau suivant précise les valeurs (m/z) des ions multichargés recherchés, isolés et fragmentés dans chacun de ces échantillons :

(Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ <u>22</u>	Ricine-Chaîne A	(Ricine-Chaîne A)RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ <u>97</u>
Mcalc = 4136,6 g.mol ⁻¹	Mcalc = 29909,8 g.mol ⁻¹	Mcalc = 33890 g.mol ⁻¹
1379,9 (3+)	1360,5 (22+)	1356,6 (25+)
1035,1 (4+)	1301,4 (23+)	1304,5 (26+)
828,3 (5+)	1247,2 (24+)	1256,2 (27+)
	1197,4 (25+)	1211,4 (28+)
	1151,4 (26+)	1169,6 (29+)
	1108,8 (27+)	1130,7 (30+)

◆ Expérience de SM-SM réalisée sur le peptide (Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-])₄ **22**.

Le spectre de masse SM du peptide **22** présente 3 pics, correspondant aux espèces multichargées (3+), (4+) et (5+). (cf. Figure 46, A) La SM-SM réalisée successivement sur chacune des 3 espèces met en évidence essentiellement deux types de fragmentation du produit : (cf. Figures 46, B et 47)

- Une fragmentation au niveau de la liaison oxime reliant les motifs c[-RGDfK-] au RAFT (**fragmentation 1**). Elle est caractérisée par le pic de l'espèce monochargée c[-RGDfK(CO-CN)-] à 657,2 (**Fragment 1**).

- Une fragmentation de la liaison disulfure s'accompagnant de la perte du groupement NPys du résidu cystéine (**fragmentation 2**). Elle est caractérisée par les pics des ions multichargés (3+) ($m/z = 1379,9$), (4+) ($m/z = 1035,1$) et (5+) ($m/z = 828,3$) de l'espèce (Cys)RAFT(c[-RGDfK-])₄ (**Fragment 2**).

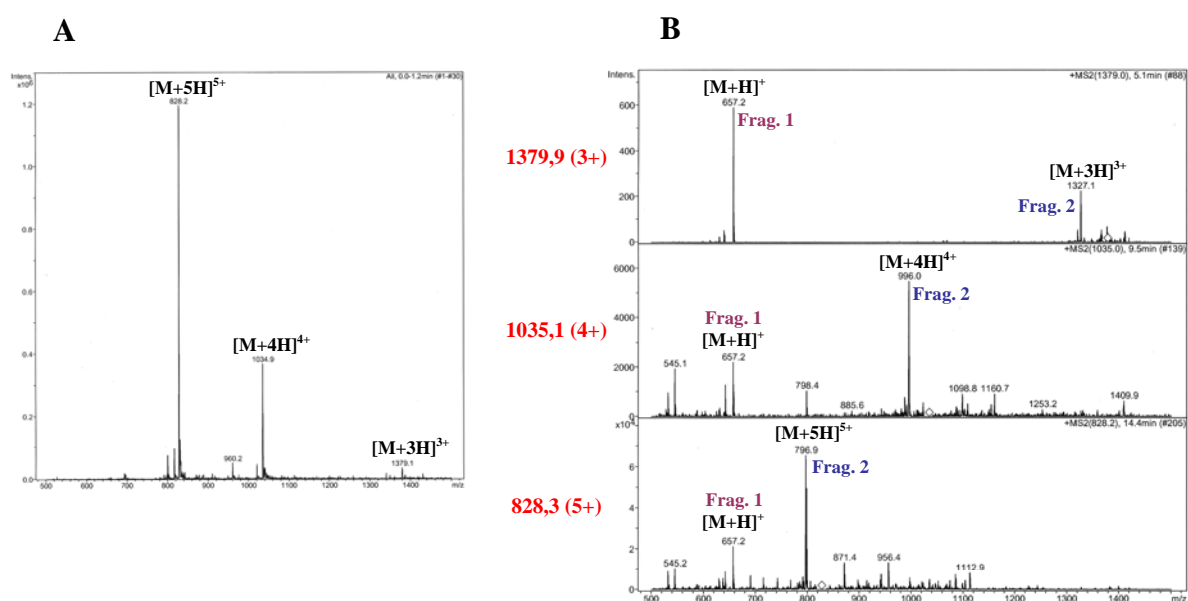


Figure 46 : A/ Spectre SM-ESI de l'intermédiaire (Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-])₄ **22** ; B/ Spectres de SM/SM des 3 ions isolés et fragmentés. L'identification de l'ion (valeur m/z théorique et charge) est reportée sur la gauche de chaque spectre.

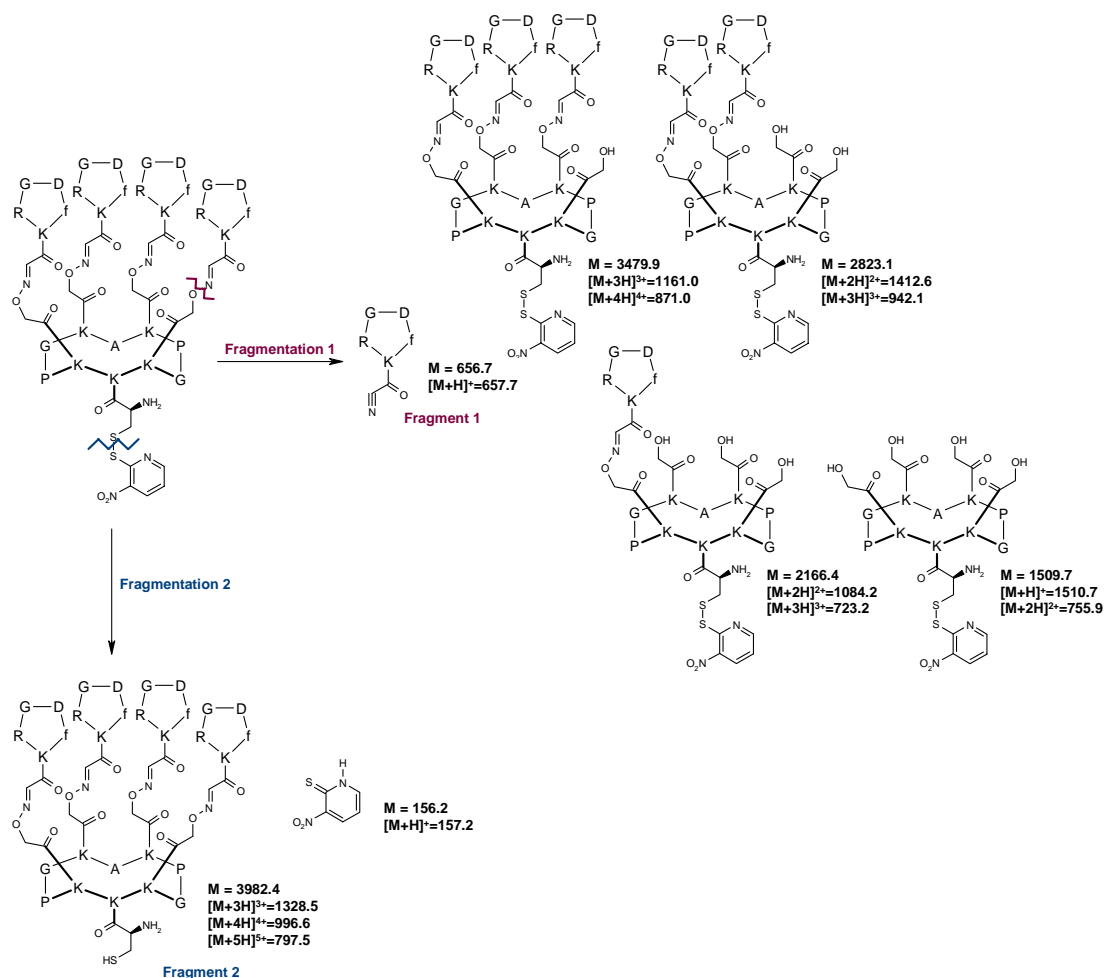


Figure 47 : Schéma des deux principaux modes de fragmentation de la molécule **22**. Les valeurs (m/z) des multichargés indiquées sont obtenues à partir des masses calculées.

◆ Expérience de SM-SM avec la protéine seule.

Le spectre de masse SM de la protéine est brouillé par les sels contenus dans le milieu de conditionnement, si bien qu'il n'a pas pu être déconvolué. (cf. Figure 48, A) On parvient toutefois à isoler les espèces multichargées à partir des valeurs m/z attendues (calculées à partir de la masse molaire de la protéine). La SM-SM est réalisée sur 6 ions correspondant aux espèces multichargées 22+ à 27+ de la protéine. Pour chaque ion fragmenté, on retrouve l'allure générale du spectre global de la protéine. (cf. Figure 48, B)

De façon évidente, aucun pic n'est observé à la valeur 657,2 attendue pour le fragment **1**, ni aux valeurs 996,0 ou 796,9 attendues pour le fragment **2**, de l'intermédiaire **22**. Cette vérification est néanmoins indispensable pour s'assurer que les fragments observés dans le troisième échantillon ne peuvent pas provenir de la protéine non conjuguée.

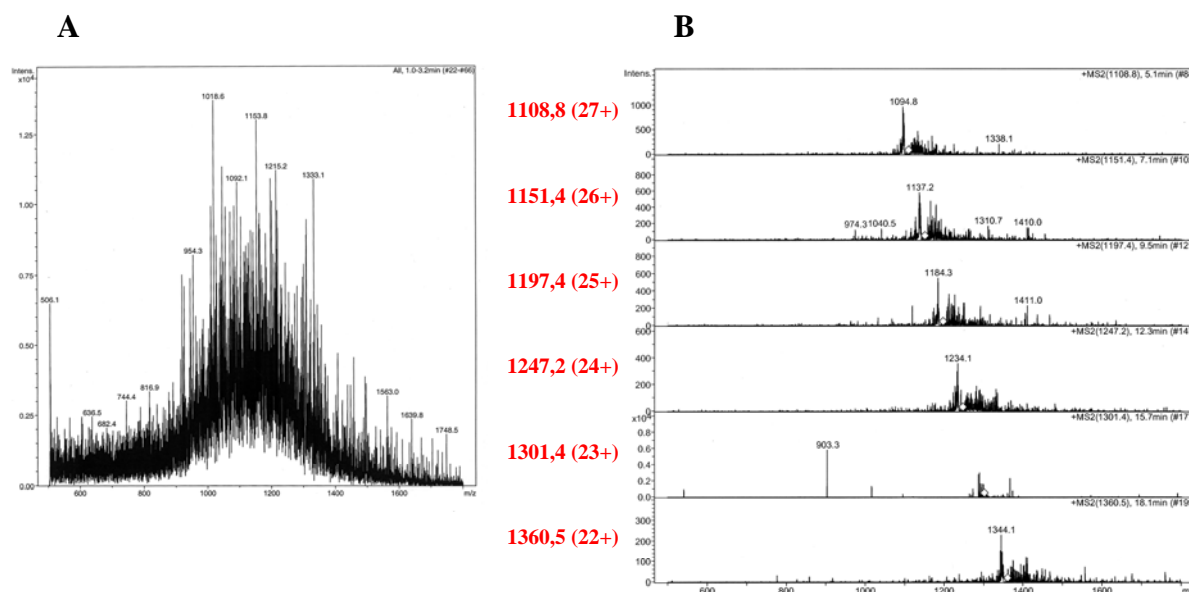


Figure 48 : A/ Spectre SM-ESI de la Ricine-Chaîne A dans la solution tamponnée de glycérol ; B/ Spectres de SM/SM des 6 ions isolés et fragmentés. L'identification de l'ion (valeur m/z théorique et charge) est reportée sur la gauche de chaque spectre.

◆ Expérience de SM-SM réalisée avec le milieu réactionnel.

Le spectre de masse SM du milieu réactionnel présente les 2 pics des espèces multichargées (4+) et (5+) de l'intermédiaire **22** en excès dans le milieu ainsi qu'une forêt de pics entre 1000 et 1400 correspondant aux pics de la protéine en présence des sels. (cf. Figure 49, A)

Pour la SM-SM, on isole et fragmente dans un premier temps les ions à partir des valeurs m/z attendues pour le conjugué **97** (calculées à partir de la masse molaire de **97**). La SM-SM est réalisée sur 6 ions correspondant aux espèces multichargées 25+ à 30+. Pour chaque ion fragmenté, on repère sur les spectres SM-SM, de façon plus ou moins intense, la présence de l'espèce monochargée à 657,2 correspondant au fragment **1**. (cf. Figure 49, B) En revanche, aucun pic caractéristique n'est décelé pour le fragment **2**.

Dans un second temps, on effectue la SM-SM sur les ions (4+) et (5+) du peptide **22** en excès dans le milieu. (cf. Figure 49, C) On isole et fragmente les ions comme précédemment. On retrouve alors les mêmes spectres que ceux obtenus avec la solution du peptide **22** seul. (cf. Figure 47) Les pics caractéristiques des deux fragments **1** et **2** sont détectés. Les pics relatifs au fragment **2** sont nettement plus intenses que ceux du fragment **1**.

Ainsi, lors de la fragmentation des ions supposés du conjugué **97**, la détection du fragment **1** (issu de la fragmentation de la liaison éther d'oxime) en même temps que

l'absence des pics caractéristiques du fragment **2** confirme que le fragment **1** observé ne provient pas du peptide **22** en excès dans le milieu. Ce fragment est donc issu d'une nouvelle entité que l'on suppose être le conjugué peptide-protéine **97** attendu.

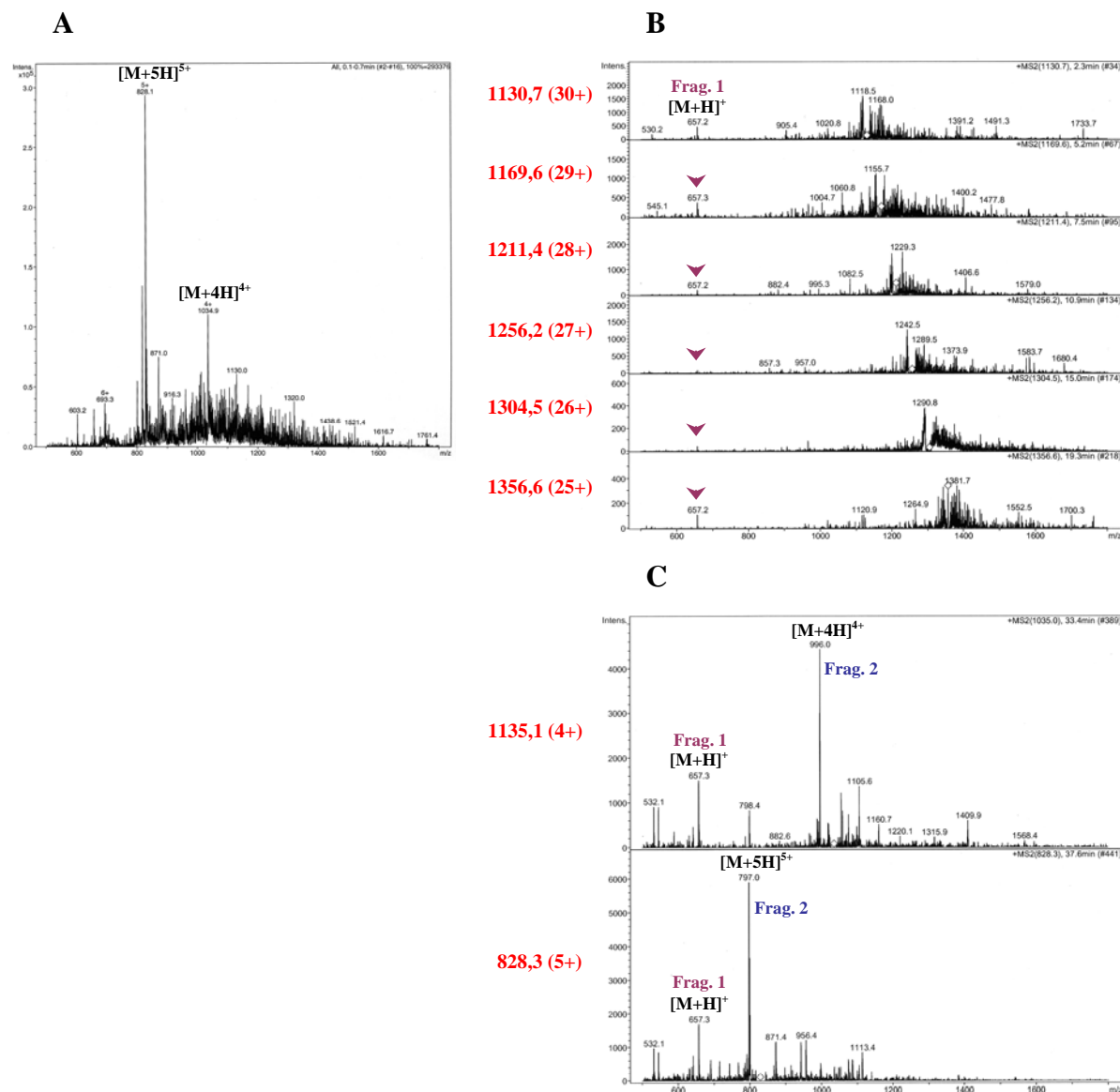


Figure 49 : A/ Spectre SM-ESI du milieu réactionnel ; B/ Spectres de SM/SM de 6 ions du conjugué attendu **97** isolés et fragmentés. L'identification de l'ion (valeur m/z théorique et charge) est reportée sur la gauche de chaque spectre ; C/ Spectres de SM/SM de 2 ions de l'intermédiaire **22** en excès dans le milieu. De même, l'identification de l'ion (valeur m/z théorique et charge) est reportée sur la gauche de chaque spectre.

Ces résultats ont été répétés sur trois milieux réactionnels différents et ont conduit aux mêmes observations. Elles ne sont qu'une preuve indirecte de la formation du conjugué **97** mais semblent néanmoins confirmer l'hypothèse de la possibilité de conjuguer directement la

chaîne A de la Ricine au ligand tétravalent par l'établissement d'un pont disulfure entre la protéine et le RAFT.

Nous avons également envisagé la méthode de spectrométrie de masse SELDI-TOF pour tenter de mettre en évidence directement le conjugué **97**. Comme précédemment, les expériences sont menées en parallèle sur trois échantillons différents : le peptide **22** seul, la protéine seule, et le milieu réactionnel (condition trépliquée). Le spectre de la protéine seule ($M_{\text{Ricine-Chaîne A}} = 29\,909,8 \text{ g.mol}^{-1}$) fait apparaître un pic unique large au delà de 31 000 tandis que le spectre du milieu réactionnel fait apparaître dans les hautes masses deux pics larges autour de 31 000 et 34 500. Ce deuxième pic pourrait correspondre au conjugué **97** ($M_{\text{97}} = 33\,890 \text{ g.mol}^{-1}$). Ces résultats sont tout à fait préliminaires. Ils demandent à être répétés et affinés par une étude plus poussée (utilisation de barrettes échangeuses d'anions et meilleure calibration de l'appareil).

Nous tenterons par ailleurs de réaliser des gels d'électrophorèse qui devraient nous permettre de mettre en évidence directement le conjugué.

BILAN DES SYNTHÈSES ET ÉTUDES BIOLOGIQUES ENTREPRISES.

Trois drogues de différentes familles ont été conjuguées au vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄ selon des stratégies de synthèse faisant intervenir deux réactions chimiosélectives successives pour le rattachement des motifs c[-RGDfK-] et du module cytotoxique au RAFT : soit deux liaisons éthers d'oxime successives, soit une liaison éther d'oxime suivie d'une liaison disulfure.

Le peptide cytotoxique 14-mer (KLAKLAK)₂ a été conjugué de manière covalente sur la face inférieure du vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄ par lien éther d'oxime ou par pont disulfure. La première approche a permis de valider la stratégie de synthèse dans laquelle les différents modules fonctionnels sont introduits successivement sur le RAFT par oximation chimiosélective. L'efficacité de la stratégie est remarquable, le conjugué (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **91** est obtenu avec un bon rendement et aucune réaction secondaire de transoximation n'a été décelée. En revanche, en termes d'activité biologique, les résultats préliminaires obtenus *in vitro* avec ce composé nous ont incité à préférer la conjugaison des drogues au vecteur par un lien disulfure labile. (cf. PARTIE F) D'un point de vue synthétique, la conjugaison de la séquence (KLAKLAK)₂ sur le vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄ par pont disulfure a été moins performante que celle réalisée par lien éther d'oxime. Les réactions d'oxydation secondaires sont délicates à maîtriser et le produit final (ss-KLA)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **94** difficilement séparé des réactifs et sous-produits tant par CLHP que par chromatographie par gel d'exclusion.

La doxorubicine, fonctionnalisée par une fonction thiol sans modification de son unité saccharidique, a également été conjuguée par pont disulfure sur l'intermédiaire (Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-])₄, porteur d'une fonction thiol activée. L'efficacité de la réaction est modeste et le conjugué (Dox)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **96** a été isolé par chromatographie par gel d'exclusion.

Les conjugués (ss-KLA)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **94** et (Dox)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **96** sont en cours d'évaluation dans des tests de cytotoxicité.

Une protéine cytotoxique a également été conjuguée au vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄ par pont disulfure. Le conjugué avec la chaîne A de la ricine **97** a été mis en évidence de manière indirecte par une méthode de spectrométrie de masse.

La diversité des drogues rattachées à notre vecteur souligne la modularité de notre approche synthétique et doit permettre d'évaluer notre système pour la vectorisation de composés de tailles, propriétés physiques et modes d'action différents.

ÉTUDES BIOLOGIQUES

D. ÉVALUATION *IN VITRO* DES LIGANDS -RGD- MULTIVALENTS SUPPORTÉS SUR GABARIT RAFT - CARACTÉRISATION DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DU LIGAND RAFT(c[-RGDfK-])₄.

D.1. Objectif des travaux.

La première partie des études biologiques a visé à caractériser, *in vitro*, l'interaction des nouveaux ligands -RGD- multivalents synthétisés avec des cellules exprimant le récepteur $\alpha_V\beta_3$. Nous avons cherché à s'assurer du maintien des propriétés de reconnaissance et de sélectivité du motif cyclopentapeptidique c[-RGDfK-] greffé sur le gabarit RAFT. Nous avons ensuite envisagé plusieurs tests pour comparer l'activité des différentes structures multivalentes RAFT(c[-RGDfK-])_n et étudier le paramètre de multivalence. Enfin, nous avons engagé le ligand tétravalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ dans une étude biologique plus approfondie de façon à caractériser le mode d'interaction de cette structure avec le récepteur $\alpha_V\beta_3$ ciblé. Nous exposons ici les résultats de ces différents tests.⁵⁴

D.2. Choix des modèles cellulaires pour les études *in vitro*.

L'étude de nos ligands requiert l'utilisation de modèles cellulaires présentant des niveaux d'expression du récepteur $\alpha_V\beta_3$ suffisamment importants et stables. L'emploi de cellules modifiées par transfection, plutôt que de cellules exprimant naturellement l'intégrine, permet de contrôler ces deux paramètres.

⁵⁴ Les protocoles des expériences réalisées dans le cadre des études biologiques sont détaillés dans la deuxième partie du chapitre Partie Expérimentale.

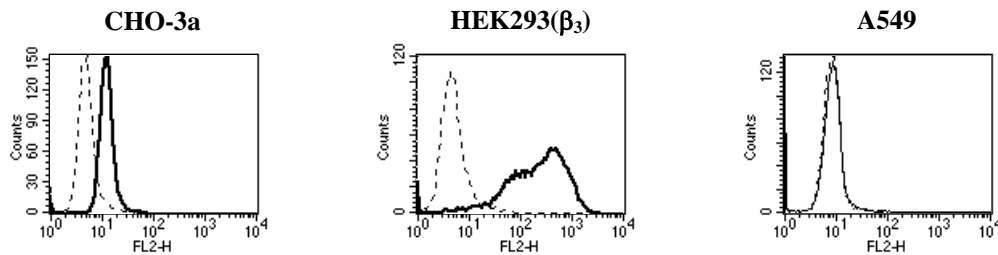


Figure 50 : Niveaux d'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ des modèles cellulaires employés pour les études *in vitro*. Histogrammes des intensités de fluorescence (FL2) des populations de cellules analysées par FACS après immunomarquage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par l'anticorps monoclonal 23C6 couplé à la R-phycoérythrine (traits pleins). Les cellules non traitées par l'anticorps sont présentées en contrôle négatif (traits pointillés).

Les tests *in vitro* ont été principalement menés sur trois modèles de cellules :

➤ Le clone **CHO-3a** : ces cellules ont été obtenues par transfection stable de la lignée cellulaire CHO (cellules épithéliales ovariennes de hamster chinois) par un plasmide codant pour la sous-unité β_3 humaine. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ exprimée par ces cellules est hybride : la chaîne α_v endogène provient du hamster, la chaîne β_3 transfectée est d'origine humaine. L'intérêt des cellules CHO réside dans le fait qu'elles expriment naturellement peu d'intégrines. Le clone CHO-3a obtenu présente donc une expression prépondérante de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par rapport aux autres couples d'hétérodimères.

➤ Le clone **HEK293(β_3)** : ces cellules ont été obtenues par transfection stable de la lignée cellulaire HEK293 (cellules épithéliales humaines de rein embryonnaire) par un plasmide codant pour la sous-unité β_3 humaine. Les deux sous-unités - α_v endogène et β_3 transfectée - de l'intégrine sont alors d'origine humaine. Ces cellules présentent la caractéristique de sur-exprimer à un niveau très élevé le récepteur $\alpha_v\beta_3$. (cf. Figure 50) En revanche, la distribution cellulaire du récepteur est atypique : l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, normalement concentrée dans les structures d'adhérence focales, est exprimée, dans ces cellules, de façon homogène dans le cytoplasme et sur la membrane cytoplasmique. (cf. Figure 51) Bien qu'assez éloigné des niveaux d'expression physiologiques du récepteur $\alpha_v\beta_3$, ce modèle nous a permis d'analyser le mode d'interaction des ligands avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'intérêt de l'utilisation de ce clone réside en outre dans le fait que nous disposons du contrôle HEK293(β_1). (cf. ci-après)

➤ Les cellules endothéliales **HUVEC** : beaucoup plus physiologique que le modèle précédent, ces cellules sont des cellules endothéliales primaires humaines de cordon ombilical. Elles expriment naturellement de nombreuses intégrines différentes. Elles ont néanmoins pour inconvénients majeurs leur difficulté de maintien en culture (cellules non immortalisées ne pouvant subir que quelques passages) ainsi que leur fragilité lors des manipulations.

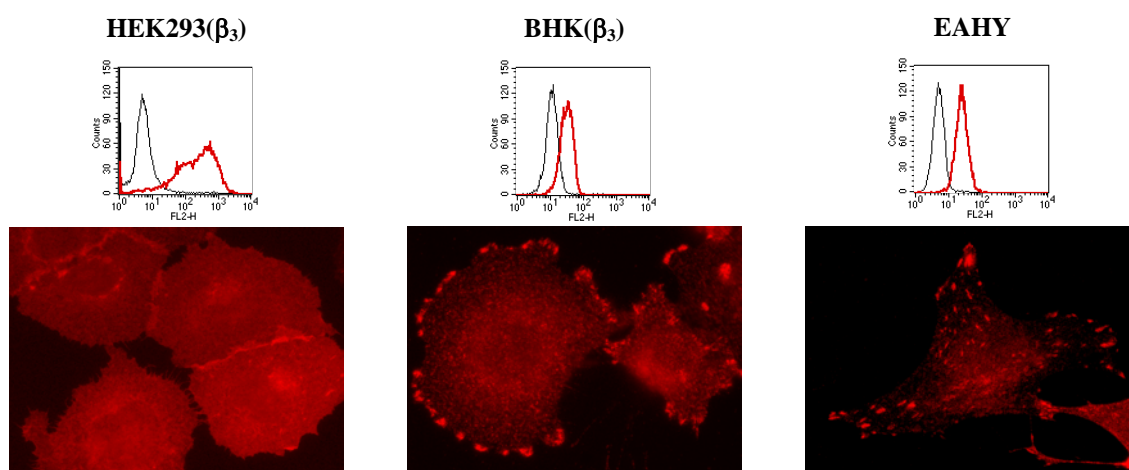


Figure 51 : Comparaison du profil de distribution de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ des cellules HEK293(β_3) avec celui des cellules BHK(β_3) ou EAHY. Les cellules BHK(β_3) sont des cellules de rein de jeune hamster transfectées par la sous-unité β_3 humaine ; les cellules EAHY sont des cellules endothéliales immortalisées exprimant naturellement l'intégrine (témoin physiologique). Dans les deux modèles de comparaison, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est localisée dans les structures d'adhérence focales. Les cellules HEK293(β_3) présentent une expression homogène de l'intégrine dans le cytoplasme et sur la membrane et particulièrement importante dans les jonctions intercellulaires.

Les cellules contrôles, dépourvues du récepteur $\alpha_v\beta_3$, ont été choisies parmi :

➤ Le clone **HEK293(β_1)** : analogue du modèle HEK293(β_3), ces cellules ont été obtenues par transfection stable de la lignée cellulaire HEK293 par un plasmide codant pour la sous-unité β_1 humaine. Notons que, les cellules HEK293 non transfectées auraient également pu être utilisées comme contrôle négatif, mais n'étaient pas disponibles au laboratoire.

➤ Les cellules **A549** : ces cellules sont un modèle de carcinome pulmonaire non-à-petites cellules. Les données de la littérature sur l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par ces cellules sont contradictoires. Dans nos conditions de marquage, l'expression de l'intégrine n'a jamais été détectée. (cf. Figure 50)

D.3. Mise en évidence de la fonctionnalité du motif c[-RGDfK-] conjugué au gabarit RAFT.

Nous nous sommes, dans un premier temps, assuré de la spécificité de nos ligands multivalents pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et avons comparé leur affinité⁵⁵ pour les cellules à celle du cyclopentapeptide monovalent c[-RGDfK-]. Nous avons pour cela envisagé deux tests cellulaires :

- un test d'adhésion des cellules sur des surfaces fonctionnalisées par les différents ligands,
- un test de compétition entre les ligands solubles et le substrat naturel du récepteur $\alpha_v\beta_3$ immobilisé, vis à vis de l'adhésion des cellules.

D.3.1 – Tests d'adhésion.

Les tests d'adhésion ont été réalisés dans le but de contrôler la capacité des structures multivalentes à permettre l'adhésion des cellules.

Pour cela, nous avons utilisé des plaques 96 puits, recouvertes de streptavidine, que nous avons fonctionnalisées par les ligands biotinylés (solutions à 1 μ M dans le PBS). Neuf substrats ont ainsi été étudiés :

Ligand tétravalent	(biotine) ₂ RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 60
Homologue -RβAD- contrôle	(biotine) ₂ RAFT(c[-R β ADfK-]) ₄ 61
Ligands monovalents ⁵⁶	c[-RGDfK(biotine)-]
	c[-RGDfK(β A-biotine)-]
	c[-RGDfK(β A ₂ -biotine)-]
	c[-RGDfK(β A ₃ -biotine)-]
	c[-RGDfK(β A ₄ -biotine)-]
Substrat naturel	fibronectine-biotine

Après saturation (BSA) des sites d'adhésion non spécifiques, les cellules CHO-3a en suspension ont été déposées dans chaque puits et incubées sur les différents substrats pendant 45 min à 37°C. Les puits ont ensuite été rincés et les cellules adhérentes fixées à l'éthanol et colorées au bleu de méthylène. La proportion de cellules adhérentes sur chaque substrat a été mesurée par dosage spectrométrique ($\lambda = 630$ nm). (cf. Figure 52)

⁵⁵ Capacité des ligands à se lier au récepteur cellulaire $\alpha_v\beta_3$.

⁵⁶ Ces six composés, non numérotés, ont été synthétisés au laboratoire dans des travaux antérieurs. Leur synthèse est décrite dans la publication jointe en Annexe 1.

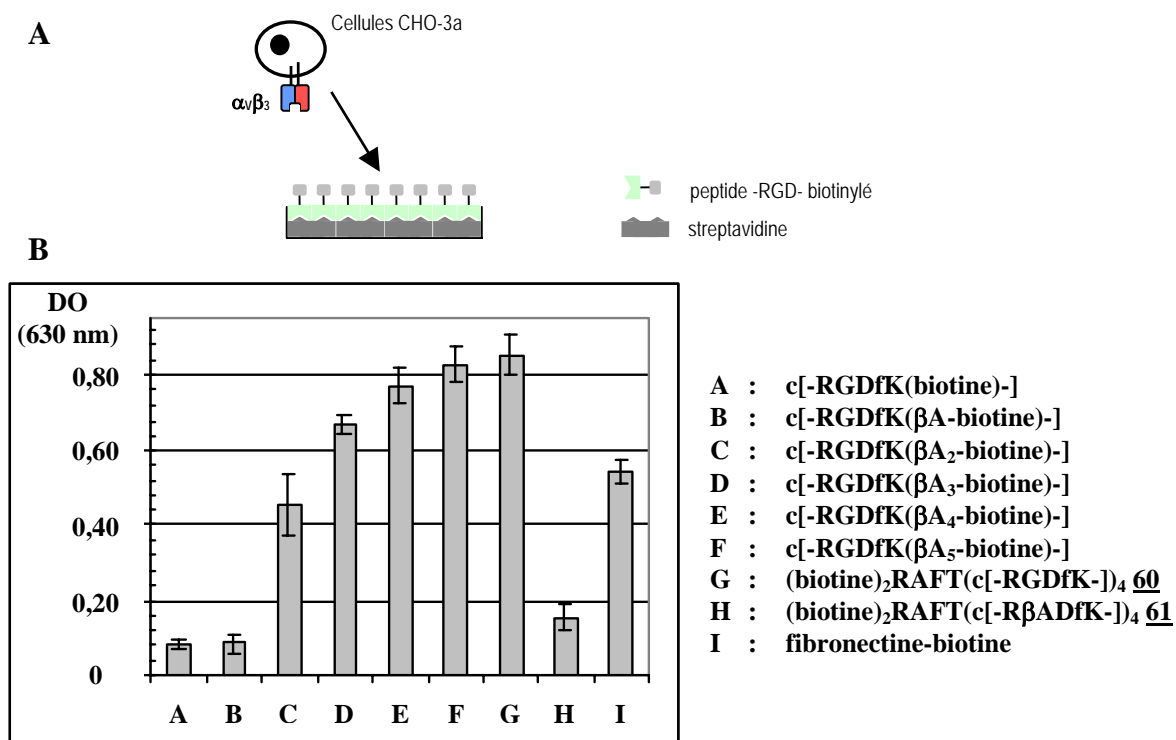


Figure 52 : Test d'adhésion des cellules CHO-3a sur des surfaces fonctionnalisées par les ligands -RGD-. A/ Schéma du test ; B/ Graphique récapitulatif des résultats des dosages spectrométriques.

La quantification des cellules adhérentes montre que le ligand tétravalent (biotine)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄, comme le ligand monovalent c[-RGDfK(β A₅-biotine)-], permet aux cellules CHO-3a d'adhérer (conditions **G** et **F** respectivement dans le graphe 52, B), alors que celles-ci adhèrent faiblement sur le peptide contrôle (biotine)₂RAFT(c[-R β ADfK-])₄ (condition **H**). Cette première observation montre que les propriétés de reconnaissance et de fixation des unités c[-RGDfK-] ne sont pas altérées par leur conjugaison au RAFT. La structure multivalente (biotine)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ conserve les propriétés de liaison du ligand monovalent.

Dans le cas du cyclopentapeptide monovalent c[-RGDfK-], on observe une capacité croissante d'adhésion des cellules avec la taille du bras espaceur (enchaînement de résidus β -alanine) entre le motif ligand c[-RGDfK-] et la molécule de biotine. Sans espaceur, le conjugué monovalent c[-RGDfK(biotine)-] ne permet pas aux cellules d'adhérer (condition **A**), probablement à cause de l'encombrement du complexe biotine-streptavidine, utilisé pour l'immobilisation des peptides, qui gêne l'interaction entre le récepteur $\alpha_v\beta_3$ et le motif -RGD-. L'augmentation graduelle de la taille de l'espaceur restaure progressivement

l'accessibilité du motif -RGD- (conditions **A** à **F**). Un espaceur de 5 résidus β A (condition **F**) permet alors d'observer l'adhésion des cellules sur la surface du ligand monovalent dans les mêmes proportions que sur celle du ligand multivalent. Dans le cas du conjugué multivalent (biotine)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄, c'est le RAFT qui joue le rôle d'espaceur et qui assure la séparation dans l'espace des motifs ligands c[-RGDfK-] et des molécules de biotine.

Ces tests ne permettent pas, en revanche, de mettre en évidence une augmentation d'affinité pour les cellules de la structure multivalente par rapport au ligand monovalent : le nombre de cellules adhérentes est identique sur l'un ou l'autre des deux substrats. L'absence de différence est certainement liée au principe même du test. La fixation des peptides sur la surface solide via le complexe biotine-streptavidine atténue les différences de structure entre le c[-RGDfK-] monovalent et le RAFT(c[-RGDfK-])₄ (les cellules voient un tapis de ligands c[-RGDfK-] dans les deux cas). Ces tests ne sont par conséquent pas appropriés pour réaliser la comparaison des différentes architectures multivalentes RAFT(c[-RGDfK-])_n.

D.3.2 – Tests de compétition.

Des tests de compétition nous ont semblé plus adaptés pour mettre en évidence les différences d'affinité des différents ligands pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ces tests permettent d'évaluer l'efficacité des ligands solubles à entrer en compétition avec le substrat naturel immobilisé de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (vitronectine) pour l'adhésion des cellules (i.e. test d'inhibition de l'adhésion des cellules sur la vitronectine par les ligands).

Pour cela, nous avons utilisé des plaques 96 puits que nous avons fonctionnalisées par la vitronectine. Les sites non-fonctionnalisés du plastique ont été saturés par une protéine inerte (BSA). Les cellules CHO-3a en suspension ont été mélangées à des solutions de concentrations croissantes en peptides, immédiatement déposées sur la vitronectine et incubées pendant 30 min à 37°C. Les puits ont ensuite été délicatement rincés, puis les cellules fixées au méthanol et colorées au bleu de méthylène. La représentation graphique de la densité optique mesurée ($\lambda = 630$ nm) en fonction de la concentration en peptide donne la courbe d'inhibition du ligand pour l'adhésion des cellules à la vitronectine et permet en théorie d'accéder à la valeur de l'IC₅₀, correspondant à la concentration en peptide pour laquelle 50% des cellules n'adhèrent plus au substrat immobilisé.

Nous avons ainsi évalué sept exemplaires des ligands -RGD- supportés sur RAFT :

Ligands -RGD- supportés sur RAFT	RAFT(c[-RGDfK-]) ₁ <u>53</u>
	RAFT(c[-RGDfK-]) ₂ <u>52</u>
	RAFT(c[-RGDfK-]) ₃ <u>51</u>
	RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ <u>50</u>
	RAFT(c[-RGDfK-]) ₁₆ <u>55</u>
	(biotine) ₂ RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ <u>60</u>
	(Tyr)RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ <u>77</u>
Ligands monovalents	c[-RGDfK-] <u>35</u>
	c[-RGDfK(βA ₅ -biotine)-]
Molécules contrôles	RAFT(c[-RβAdfK-]) ₄ <u>54</u>
	(biotine) ₂ RAFT(c[-RβAdfK-]) ₄ <u>61</u>
	(Tyr)RAFT(c[-RβAdfK-]) ₄ <u>78</u>

Ces molécules ont fait l'objet de nombreux tests. Cependant, il ne nous est pas possible d'attribuer rigoureusement une valeur d'IC₅₀ à chacune d'entre elles à cause du manque de reproductibilité des tests et des écarts importants dans la position absolue des courbes dans l'échelle de concentration en peptides selon les tests. (cf. Figure 53, B)

Les résultats globaux des différents tests sont, en revanche, cohérents. Les courbes d'inhibition des différents peptides se situent toujours dans un ordre identique les unes par rapport aux autres et montrent une capacité de compétition croissante des ligands avec le nombre de motifs c[-RGDfK-] greffés sur le RAFT :



Il est possible que les problèmes de reproductibilité rencontrés proviennent en partie des phénomènes d'internalisation qui peuvent survenir pendant la période d'incubation des cellules avec les peptides à 37°C. Les tests de compétition ne nous ont donc pas permis de quantifier l'affinité des différentes structures multivalentes des ligands.

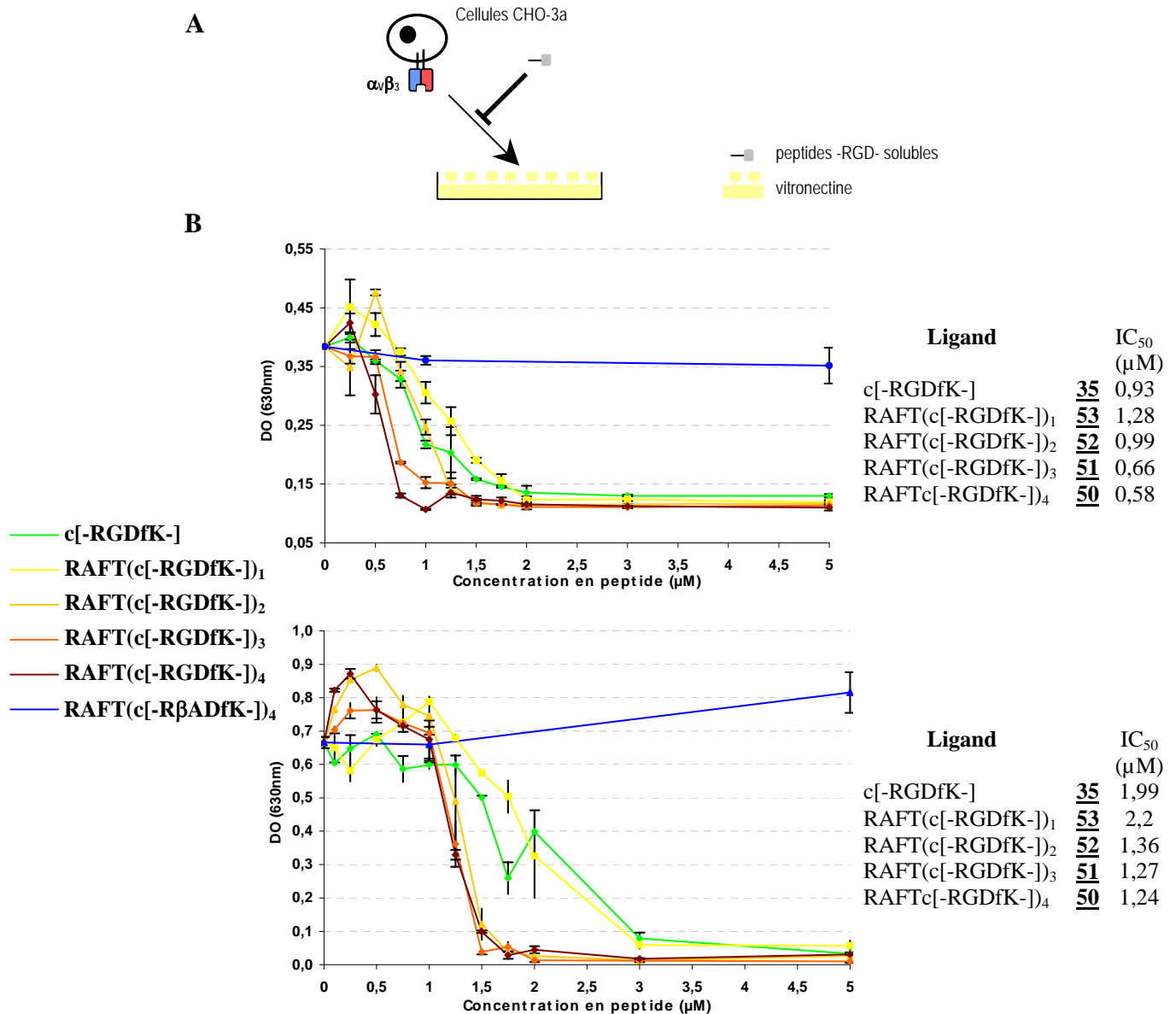


Figure 53 : Test d'inhibition de l'adhésion des cellules CHO-3a à la vitronectine par les ligands -RGD- solubles. A/ Schéma du test ; B/ Exemples de résultats de deux tests distincts.

Au cours de ces tests, nous avons observé une organisation particulière des cellules en présence des ligands -RGD- multivalents. En effet, on remarque pendant le temps d'incubation des cellules avec les ligands multivalents RAFT(c[-RGDfK-])_n (n>1), l'adhésion des cellules les unes aux autres, l'établissement de contacts intercellulaires et la formation de « chaînettes de cellules ». (cf. Figure 54) Ces structures particulières n'ont en revanche pas été observées dans les cas suivants :

- ni avec le peptide contrôle RAFT(c[-R β ADfK-])₄ qui n'a aucun effet sur l'adhésion des cellules : les cellules adhèrent et s'étalent normalement sur le substrat de vitronectine quelque-soit la concentration en peptide,

- ni avec le ligand monovalent c[-RGDfK-] : au delà de 3-4 μ M, le ligand empêche totalement l'adhésion des cellules au substrat, mais celles-ci adoptent une forme arrondie, caractéristique des cellules non-adhérentes, et demeurent parfaitement indépendantes les unes des autres,

- ni avec le ligand monovalent RAFT(c[-RGDfK-])₁ : à la concentration qui abolit les phénomènes d'adhésion (4-5 μ M), les cellules adoptent une forme arrondie comme avec le cyclopentapeptide c[-RGDfK-] et ne se structurent pas en chaînettes comme avec les ligands multivalents.

Cette observation suggère une propriété particulière des ligands présentant plusieurs copies du motif c[-RGDfK-] sur le RAFT. Ceux-ci semblent favoriser les interactions cellule/cellule et renforcer les jonctions intercellulaires.

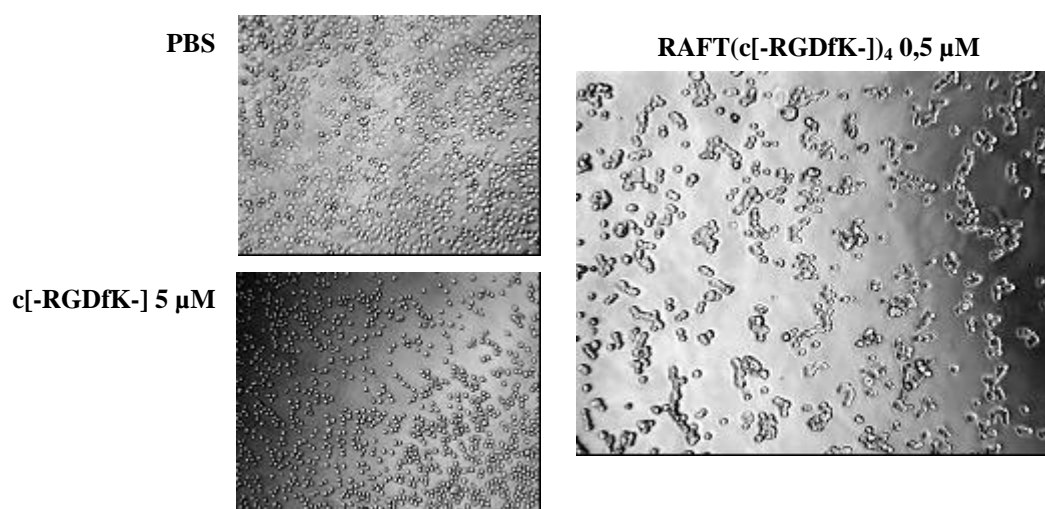


Figure 54 : Test d'inhibition de l'adhésion des cellules CHO-3a à la vitronectine par les ligands -RGD-solubles. Clichés de microscopie en transmission des cellules pendant la période d'incubation à 37°C en l'absence de peptide (PBS), en présence de 5 μ M du peptide c[-RGDfK-] **35** ou en présence de 0,5 μ M du peptide RAFT(c[-RGDfK-])₄ **50**.

De la même façon qu'avec les cellules CHO-3a, les tests de compétition avec la vitronectine ont également été réalisés avec le modèle cellulaire HEK293(β_3) que nous avons par la suite largement employé pour l'étude de l'architecture multivalente RAFT(c[-RGDfK-])₄. Nous avons comparé avec ces cellules les structures monovalente c[-RGDfK-] **35** et

tétravalente $\text{RAFT}(\text{c}[-\text{RGDfK-}])_4$ **50**. Les résultats obtenus sont beaucoup plus reproductibles que ceux présentés avec le modèle CHO-3a.

Des valeurs d' IC_{50} de 30 et 3 μM ont pu être déterminées respectivement pour chacun des deux ligands. (cf. Figure 55) Si l'on rapporte ces valeurs au nombre de motifs -RGD- présentés par chaque structure, le ligand tétravalent $\text{RAFT}(\text{c}[-\text{RGDfK-}])_4$ montre alors une affinité 2,5 fois supérieure pour les cellules $\text{HEK293}(\beta_3)$ à celle du $\text{c}[-\text{RGDfK-}]$.

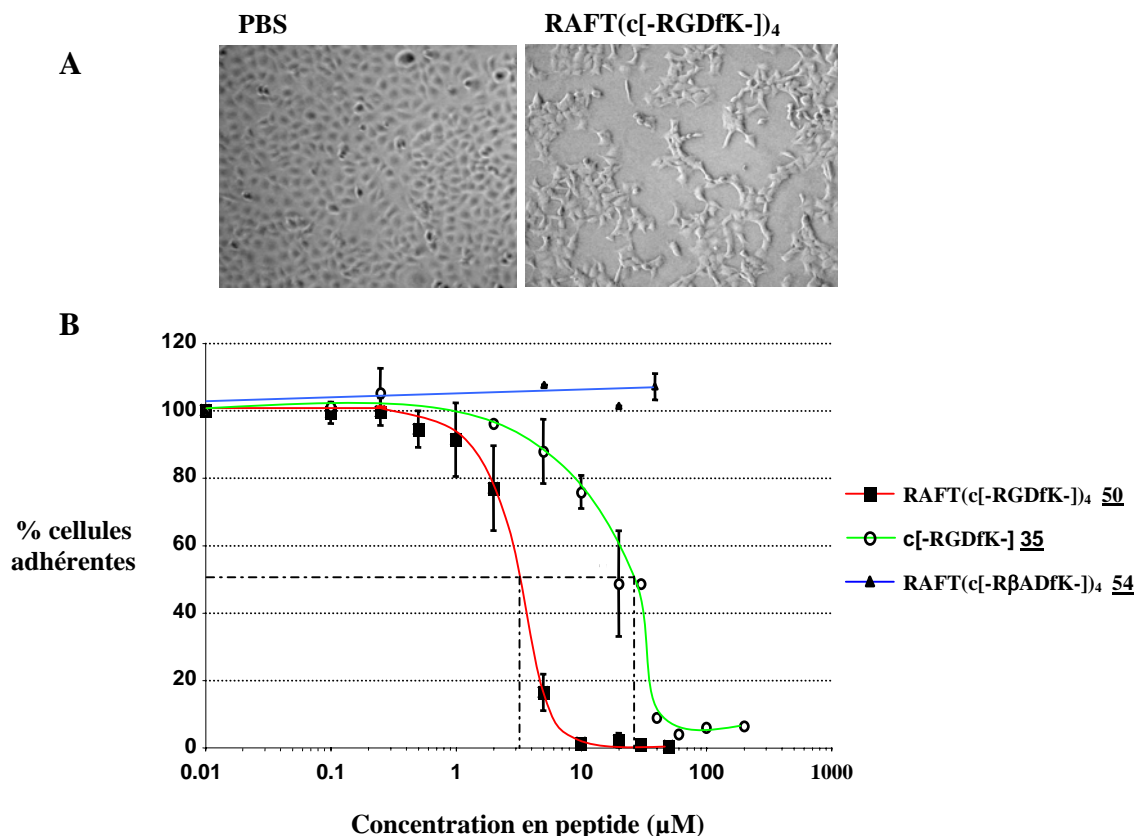


Figure 55 : Test d'inhibition de l'adhésion des cellules $\text{HEK293}(\beta_3)$ à la vitronectine par les ligands -RGD-solubles. A/ Clichés de microscopie en transmission des cellules pendant la période d'incubation à 37°C en l'absence de peptide (PBS) ou en présence de $0,5 \mu\text{M}$ du peptide $\text{RAFT}(\text{c}[-\text{RGDfK-}])_4$ **50** ; B/ Courbes d'inhibition des ligands monovalent **35** ($\text{IC}_{50} = 30 \mu\text{M}$) et tétravalent **50** ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$).

Le modèle $\text{HEK293}(\beta_3)$ semble plus approprié que le modèle des cellules CHO-3a pour la réalisation des tests de compétition. Il est probable que la surexpression du récepteur $\alpha_V\beta_3$ et sa distribution plus homogène permettent une comparaison quantitative plus aisée des différents ligands.

D.4. Inhibition de l'adhésion et induction de l'apoptose des cellules endothéliales primaires par le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄.

La fixation des ligands -RGD- sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ induit l'apoptose des cellules endothéliales primaires. Ce phénomène, provoqué par la privation d'adhérence des cellules sur leur substrat, a été désigné par le terme « Anoïkis » (apoptose induite par des interactions cellule/matrice inadéquates ou inappropriées).⁵⁷

Nous avons souhaité comparer l'activité du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ à celle du ligand monovalent c[-RGDfK-] dans ces phénomènes. Pour cela, des cellules endothéliales humaines en culture primaire (HUVEC) ont été cultivées sur la vitronectine en présence de l'un ou de l'autre ligand pendant 6 h à 37°C :

		Dose étudiée
Ligand tétravalent	RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 50	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (3 μM)
Homologue -RβAD- contrôle	RAFT(c[-R β ADfK-]) ₄ 54	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (3 μM)
Ligand monovalent	c[-RGDfK-] 35	10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (17 μM)

Les clichés de microscopie en transmission, réalisés à la fin de la période d'incubation des cellules, permettent de visualiser l'absence d'adhésion des cellules HUVEC en présence des deux peptides -RGD-. (cf. Figure 56, A) Alors que les cellules s'étalent normalement sur le substrat en l'absence de peptide (NT) ou en présence du peptide contrôle RAFT(c[-R β ADfK-])₄, les cellules incubées en présence du ligand monovalent c[-RGDfK-] sont incapables de s'étaler et conservent une forme arrondie. Le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ conduit à un résultat similaire mais, au lieu d'être arrondies et isolées comme avec le c[-RGDfK-], les cellules forment des amas compacts. Cette observation concorde avec celles réalisées sur les autres lignées cellulaires exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$: les cellules en suspension avec le c[-RGDfK-] monovalent sont isolées tandis que celles incubées avec le RAFT(c[-RGDfK-])₄ se collent les unes aux autres. Ceci soutient l'hypothèse d'un renforcement des jonctions intercellulaires médié par ce peptide.

Dans chaque condition, les cellules (adhérentes et flottantes) ont ensuite été marquées par l'Annexine V conjuguée à la FITC et par l'iodure de propidium. Le pourcentage de

⁵⁷ Meredith, J. E., Jr.; Fazeli, B.; Schwartz, M. A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell* **1993**, *4*, 953-961. ; Frisch, S. M.; Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 619-626. ; Valentijn, A. J.; Zouq, N.; Gilmore, A. P. Anoïkis. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 421-425.

cellules apoptotiques a été quantifié par une analyse au FACS. (cf. Figure 56, B) Les cellules marquées par le conjugué Annexine V-FITC (cellules présentant des résidus phosphatidylsérines de la membrane plasmique externalisés) et non marquées par l'iodure de propidium (cellules non perméables, non nécrotiques) sont en début d'apoptose. Ce pourcentage est considérablement plus élevé dans le cas du ligand multivalent (43%) par rapport aux conditions contrôles (4-6%) et bien supérieur à celui observé avec le cyclopentapeptide monovalent (13%) pourtant utilisé à une dose près de 6 fois supérieure. Ces résultats montrent une plus grande efficacité du ligand multivalent à provoquer l'apoptose des cellules endothéliales et permettent d'envisager l'évaluation de ses propriétés anti-angiogéniques *in vivo*.

Il est important de souligner que l'apoptose des cellules HUVEC observée dans ce test est provoquée par la privation d'adhésion des cellules au substrat. Les HUVEC, très sensibles au détachement de leur matrice, meurent de la compétition que réalise le peptide avec la vitronectine qui empêche aux cellules de s'étaler.

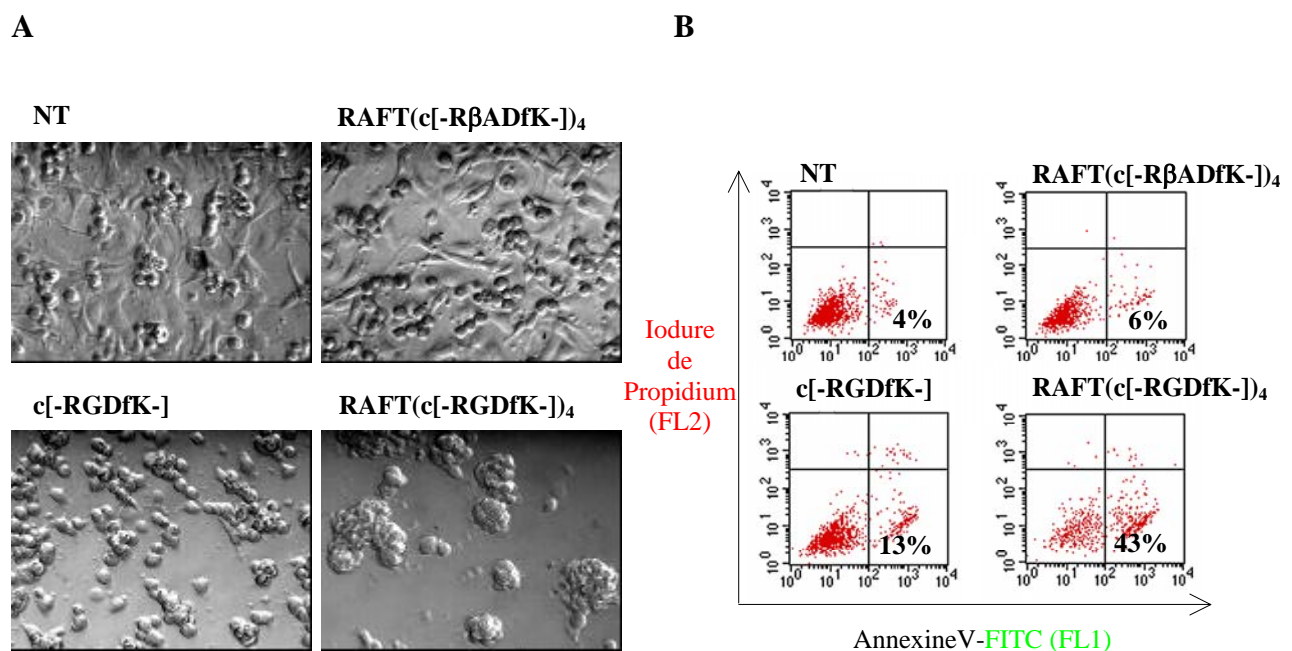


Figure 56 : Induction de l'apoptose des cellules HUVEC par les ligands -RGD- solubles. A/ Clichés de microscopie en transmission après 6 h d'incubation des cellules à 37°C en présence des peptides ; B/ Profils de FACS : intensités de fluorescence dans les canaux vert (FL1, FITC) et rouge (FL2, IP) des populations de cellules soumises à un double marquage par l'Annexine V conjuguée à la FITC et par l'iodure de propidium. Le pourcentage de cellules apoptotiques (FL1 +, FL2 -), dans les conditions d'incubation sans peptide (NT) ou en présence des peptides RAFT(c[-RβADfK-])₄ **54**, c[-RGDfK-] **35** ou RAFT(c[-RGDfK-])₄ **50**, est reporté dans le domaine graphique correspondant.

D.5. Localisation cellulaire du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄.

Les peptides conjugués à la fluorescéine (FITC) ont été employés pour observer et étudier par microscopie de fluorescence leur interaction avec les cellules. Nous avons, autant que possible, utilisé les conjugués monofonctionnalisés (i.e. (fluorescéine)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **72** et (fluorescéine)₁RAFT(c[-RβADfK-])₄ **73**) plutôt que les composés comportant deux molécules de fluorescéine (i.e. (fluorescéine)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **66** et (fluorescéine)₂RAFT(c[-RβADfK-])₄ **67**) pour pouvoir comparer les intensités de fluorescence observées avec celles obtenues avec le ligand monovalent c[-RGDfK(fluorescéine)-] **74**.

D.5.1 – Distribution cellulaire du conjugué (fluorescéine)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄.

La fixation du ligand multivalent a été observée par microscopie de fluorescence sur différents modèles cellulaires et selon différents protocoles d'incubation avec les cellules.

Lorsque l'on incube des cellules adhérentes HEK293(β₃) pendant 30 min à 37°C avec 2 μM du conjugué multivalent (fluorescéine)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **72**, nous observons, après rinçage et fixation des cellules, la présence du fluorochrome essentiellement au niveau de trois zones : (cf. Figure 57, A)

- un marquage extrêmement intense est observé dans les jonctions intercellulaires,
- un marquage diffus plus faible est observé dans tout le cytoplasme,
- un marquage vésiculaire est observé en périphérie du noyau.

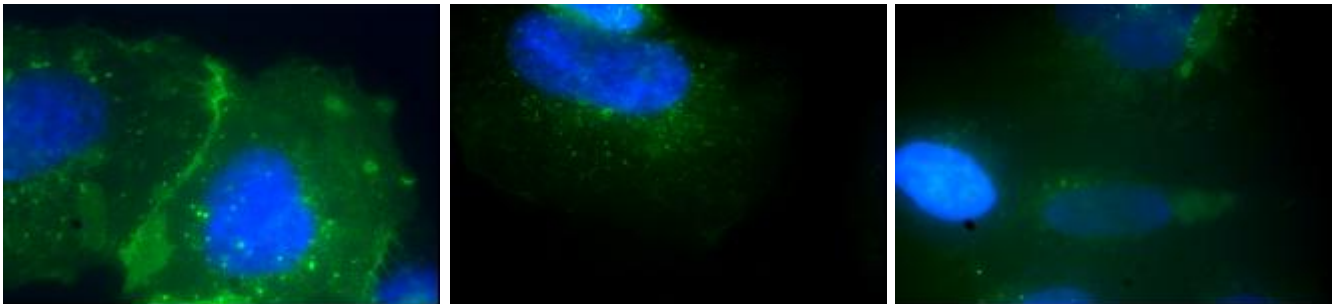
Aucun signal de fluorescence n'est détecté dans le noyau.

Précisons que la concentration en peptide a été choisie à 2 μM pour limiter le décollement des cellules (IC₅₀ = 3 μM). A cette concentration, seul le signal d'autofluorescence des cellules est observé dans les conditions d'incubation avec le conjugué contrôle (fluorescéine)₁RAFT(c[-RβADfK-])₄ **73** ou avec le conjugué monovalent c[-RGDfK(fluorescéine)-] **74**.

Lorsque l'incubation des cellules avec le peptide est réalisée à 4°C, on observe toujours un fort marquage par le conjugué multivalent dans les jonctions intercellulaires. En revanche, le marquage intracellulaire n'est plus visible. (cf. Figure 58, B)

A Cellules HEK293(β_3)(FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄

c[-RGDfK(FITC)-]

(FITC)₁RAFT(c[-R β DfK-])₄

B Cellules CHO-3a

(FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄

c[-RGDfK(FITC)-]

C Cellules HUVEC

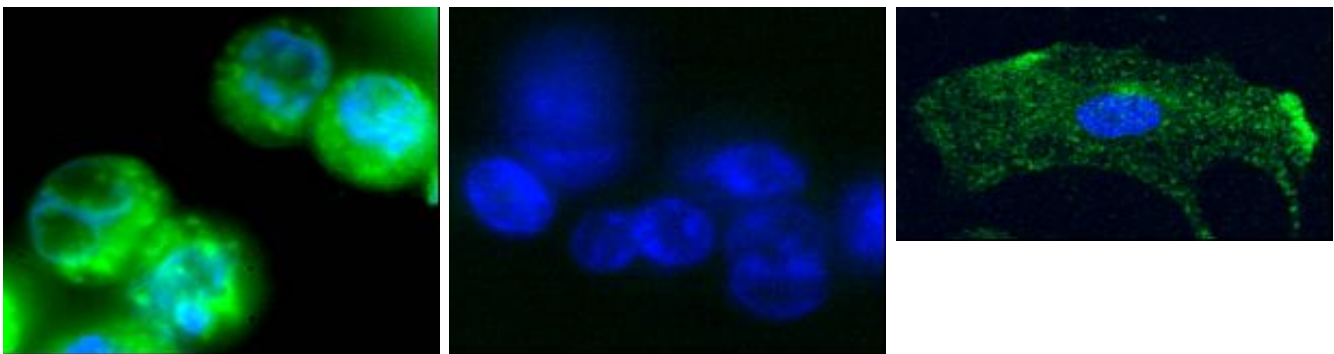
(FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄

Figure 57 : Clichés de microscopie de fluorescence de différents modèles cellulaires mis en présence des peptides conjugués à la fluorescéine (37°C). A/ Cellules adhérentes HEK293(β_3) ; B/ Cellules CHO-3a en suspension ; C/ Cellules adhérentes HUVEC.

Le marquage du peptide dans les jonctions intercellulaires conforte les observations réalisées précédemment (formation de chaînettes, agrégation des cellules) suggérant une forte affinité du ligand multivalent pour les zones d'adhérence cellule/cellule. La forte concentration du ligand multivalent dans ces jonctions explique le renforcement des contacts intercellulaires observé.

D'autre part, le marquage intracellulaire du conjugué à 37°C, non observé à 4°C, démontre une internalisation du ligand multivalent selon un processus actif.

La fixation et l'internalisation du ligand multivalent dépendent de la présence de cations divalents calcium dans le milieu. En effet, lorsque l'incubation des cellules avec le peptide est réalisée en présence d'un chélateur de calcium (EGTA), qui prive la solution de la

présence d'ions Ca^{2+} , la fixation du ligand multivalent sur les cellules est abolie. Ce résultat est cohérent avec une fixation spécifique du peptide sur l'intégrine dont la conformation, permettant la liaison de ligands extracellulaires, dépend de la présence de ces cations.⁵⁸

Des observations similaires ont été réalisées avec des cellules adhérentes HUVEC ou avec des cellules CHO-3a, adhérentes ou en suspension. (cf. Figure 57, B et C) En revanche, aucun signal de fluorescence supérieur au signal d'autofluorescence n'a été observé avec des cellules dépourvues du récepteur $\alpha_v\beta_3$ (cellules HEK293(β_1) ou A549). Cette observation confirme la spécificité de notre ligand multivalent pour les cellules exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Dans le cas des cellules CHO-3a en suspension (cf. Figure 57, B), il est important de souligner que nous avons observé le signal de fluorescence dans le compartiment intracellulaire de manière identique selon que l'on utilise le ligand directement couplé à la fluorescéine, (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **72**, ou bien le ligand biotinylé, (biotine)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **60**, incubé avec un complexe streptavidine-FITC préalablement au traitement des cellules. Cette observation suggère que le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ est capable de faire pénétrer une protéine (streptavidine) dans les cellules.

D.5.2 – Étude du mode d'internalisation.

Pour déterminer si le mode d'internalisation cellulaire du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ fait intervenir la voie des endosomes, nous avons effectué un marquage des vésicules endosomales précoces.

Pour cela, les cellules adhérentes HEK293(β_3) ont dans un premier temps été incubées en présence des ligands -RGD- conjugués à la FITC (2 μM) soit à 37°C, soit à 4°C. Les cellules ont été rincées, fixées et perméabilisées, puis soumises à un immunomarquage par l'anticorps anti-EEA1 (*Early Endosomes Antigen-1*) spécifique des endosomes primitifs. La révélation de cet anticorps a été réalisée au moyen d'un anticorps secondaire couplé à la Cyanine 3.

⁵⁸ Humphries, M. J. Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 311-339. ; Legler, D. F.; Wiedle, G.; Ross, F. P.; Imhof, B. A. Superactivation of integrin $\alpha_v\beta_3$ by low antagonist concentrations. *J. Cell Sci.* **2001**, 114, 1545-1553.

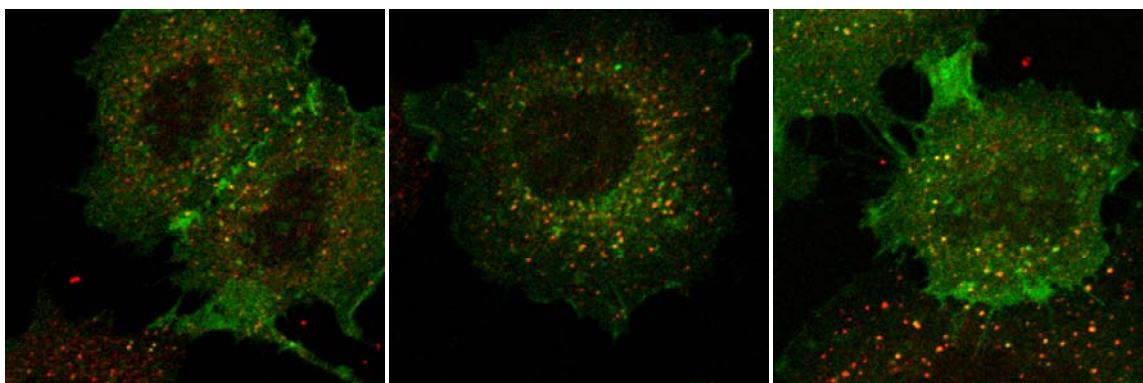
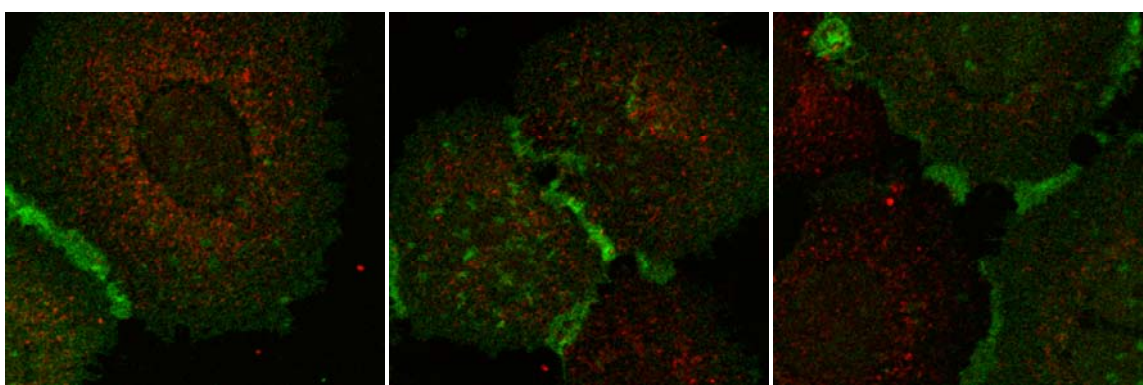
A : 37°C**B : 4°C**

Figure 58 : Etude du mode d'internalisation du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄. Les cellules HEK293(β3) sont incubées pendant 30 min à 37°C (A) ou à 4°C (B) avec le conjugué (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **72** à 2 μM (marquage du peptide en vert). Les cellules rincées et fixées sont soumises à un immunomarquage avec l'anticorps EEA1, spécifique des endosomes précoces, révélé par un anticorps secondaire couplé à la Cyanine 3 (marquage des endosomes précoces en rouge). La colocalisation du peptide et des endosomes s'observe par un signal résultant jaune.

Les clichés de microscopie permettent de visualiser, à l'intérieur des cellules, des points de colocalisation du conjugué multivalent (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ (fluorescence verte) avec les endosomes (fluorescence rouge) à 37°C (signal résultant jaune). (cf. Figure 58, A) En revanche, aucune colocalisation n'est observée à 4°C, le marquage du peptide étant observé exclusivement à la surface des cellules. (cf. Figure 58, B) Comme précédemment, aucun signal de fluorescence n'a été détecté dans les conditions contrôles, en l'absence de peptide ou en présence de l'homologue -RβAD-, (FITC)₁RAFT(c[-RβADfK-])₄, ni même avec le conjugué monovalent c[-RGDfK(FITC)-]. (cf. Figure 59)

Le ligand multivalent est donc en partie internalisé par la voie des endosomes.

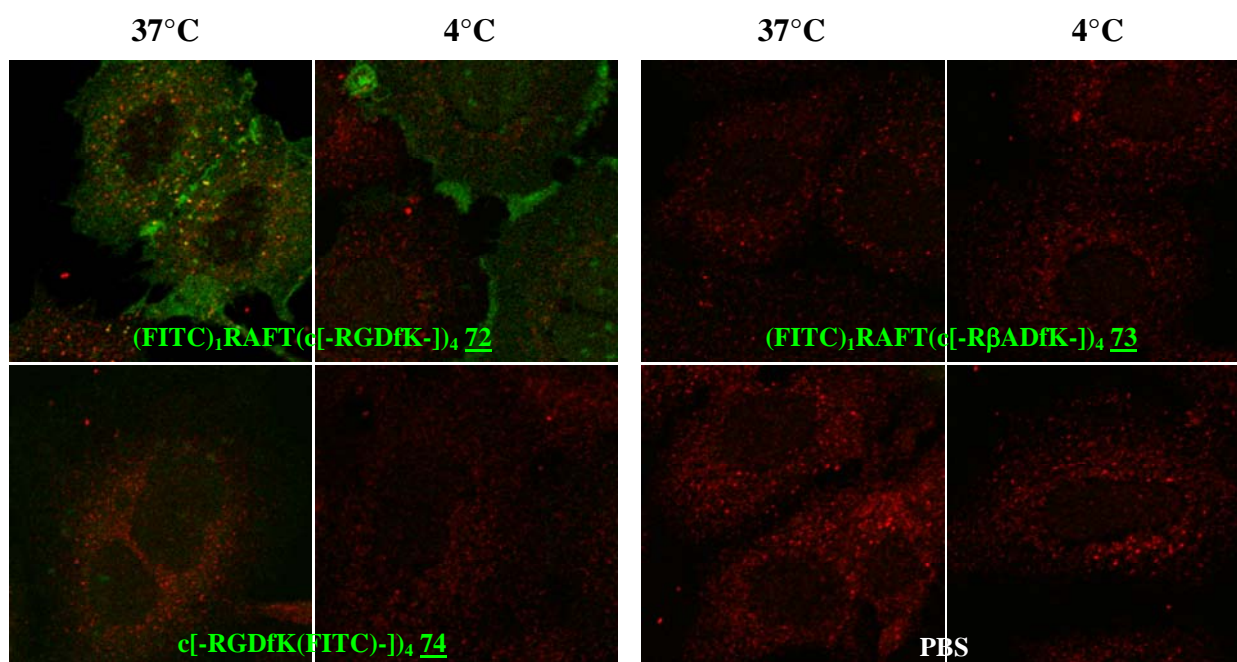


Figure 59 : Etude du mode d'internalisation du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄. Les cellules HEK293(β3) sont incubées pendant 30 min à 37°C ou à 4°C avec les peptides -RGD- conjugués à la FITC (fluorescence verte) puis soumises à un immunomarquage par l'anticorps EEA1 marqué par un anticorps secondaire couplé à la Cyanine 3 (fluorescence rouge).

Le mode d'internalisation des peptides -RGD- est encore mal connu. Castel et al. ont montré que le cyclopentapeptide c[-RGDf(NMe)V-] (cilengitide) est internalisé par des cellules de mélanomes exprimant ou non la sous-unité α_v , suggérant une endocytose par diffusion indépendante de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. A l'inverse, l'anticorps monoclonal bloquant 17E6, spécifique de la chaîne α_v , est internalisé par endocytose récepteur-dépendante et simultanément avec l'intégrine, diminuant alors le nombre d'intégrines fonctionnelles à la surface des cellules.⁵⁹

Nos résultats ne permettent pas de statuer sur l'internalisation concomitante de notre ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. En revanche, une partie de l'internalisation intervient par endocytose. L'absence d'internalisation du peptide avec les cellules dépourvues de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, est en faveur d'une endocytose récepteur-dépendante.

L'internalisation du peptide multivalent doit également faire intervenir un autre mécanisme puisqu'un marquage diffus intracellulaire du conjugué est observé. Ce marquage

⁵⁹ Castel, S.; Pagan, R.; Mitjans, F.; Piulats, J.; Goodman, S.; Jonczyk, A.; Huber, F.; Vilaro, S.; Reina, M. RGD peptides and monoclonal antibodies, antagonists of alpha(v)-integrin, enter the cells by independent endocytic pathways. *Lab. Invest.* **2001**, *81*, 1615-1626.

étant observé rapidement après la mise en présence du peptide sur les cellules, il est peu probable qu'il provienne de la libération du peptide des endosomes.

D.6. Colocalisation du ligand multivalent avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

D.6.1 – Observation de la colocalisation par microscopie de fluorescence.

Lorsque nous avons entrepris de visualiser par microscopie de fluorescence la colocalisation du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, nous avons constaté, de façon surprenante, une exclusion partielle des signaux du peptide et de l'intégrine. Cette observation a été réalisée sur les cellules HEK293(β_3) par un double marquage avec le ligand multivalent conjugué à la FITC et l'anticorps monoclonal 23C6.

Les cellules adhérentes HEK293(β_3) ont tout d'abord été incubées à 37°C en présence des différents peptides conjugués à la FITC (0,5 - 2 μ M). Les cellules rincées, fixées et perméabilisées, ont ensuite été soumises à un immunomarquage par l'anticorps monoclonal 23C6, spécifique de l'hétérodimère $\alpha_v\beta_3$, révélé indirectement par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-647.

Les clichés de microscopie de fluorescence font apparaître une diminution du marquage de l'intégrine dans le cas où les cellules ont été au préalable incubées en présence du conjugué multivalent (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ 72.(cf. Figure 60)

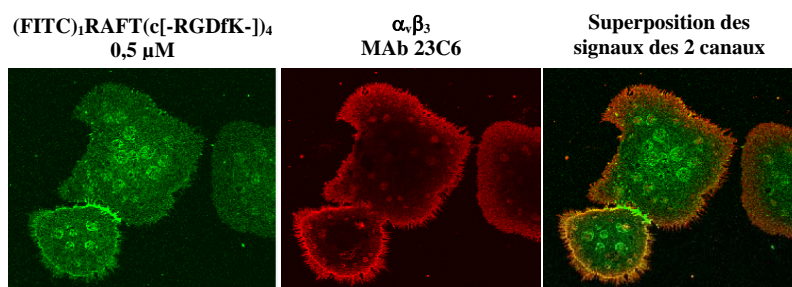


Figure 60 : Clichés de microscopie de fluorescence obtenus après incubation des cellules HEK293(β_3) avec 0,5 μ M du conjugué multivalent (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ et immunomarquage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec l'anticorps monoclonal 23C6 révélé de manière indirecte avec l'Alexa-647.

Le marquage de l'intégrine par l'anticorps disparaît très nettement dans les zones où le peptide est concentré, notamment dans les jonctions intercellulaires. Dans les zones plus faiblement marquées par le peptide, comme à la périphérie de la membrane cellulaire, on observe une colocalisation de l'intégrine et du peptide.

Ce phénomène de disparition partielle du marquage de l'intégrine n'a en revanche été observé ni avec le conjugué monovalent c[-RGDfK(FITC)-] **74**, ni avec l'homologue -R β AD-contrôle (FITC)₁RAFT(c[-R β ADfK-])₄ **73**.

D.6.2 – Étude de l'inhibition de la fixation de l'anticorps monoclonal 23C6 par le ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄.

Nous avons quantifié, en cytofluorimétrie de flux, la disparition du marquage de l'anticorps 23C6, en présence du peptide.

Pour cela, les cellules HEK293(β_3), en suspension, ont été incubées à 4°C pendant 30 min en présence des différents ligands -RGD- (conjugués ou non à la FITC) :

		Doses étudiées
Ligands tétravalents	RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 50	0,1 μ M – 5 μ M
	(FITC) ₁ RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 72	
Homologues -RβAD- contrôles	RAFT(c[-R β ADfK-]) ₄ 54	0,1 μ M – 5 μ M
	(FITC) ₁ RAFT(c[-R β ADfK-]) ₄ 73	
Ligands monovalents	c[-RGDfK-] 35	0,1 μ M – 5 μ M
	c[-RGDfK(FITC)-] 74	

L'incubation des cellules avec les peptides a été réalisée à 4°C pour s'affranchir des phénomènes d'internalisation. Les cellules ont ensuite été rincées deux fois puis marquées par l'anticorps monoclonal 23C6 directement couplé à la R-phycoérythrine (23C6-RPE). Les cellules, rincées et fixées, ont été analysées par FACS. (cf. Figure 61)

Alors que le marquage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par l'anticorps 23C6-RPE n'est pas affecté par le ligand monovalent c[-RGDfK-], même à des fortes concentrations en peptide (jusqu'à 20 μ M), on observe une diminution très significative du signal de fluorescence dans le canal de fluorescence de la phycoérythrine dans le cas où les cellules ont été préalablement incubées avec le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄. (cf. Figure 61, A) Ce phénomène est observé jusqu'à des concentrations en peptide de quelques dizaines de nM. A 5 μ M, plus de 50% du marquage de l'intégrine est absent. (cf. Figure 61, B) Les résultats sont

rigoureusement identiques selon que l'on utilise les ligands conjugués à la FITC ou les ligands nus, dépourvus d'agent de détection.

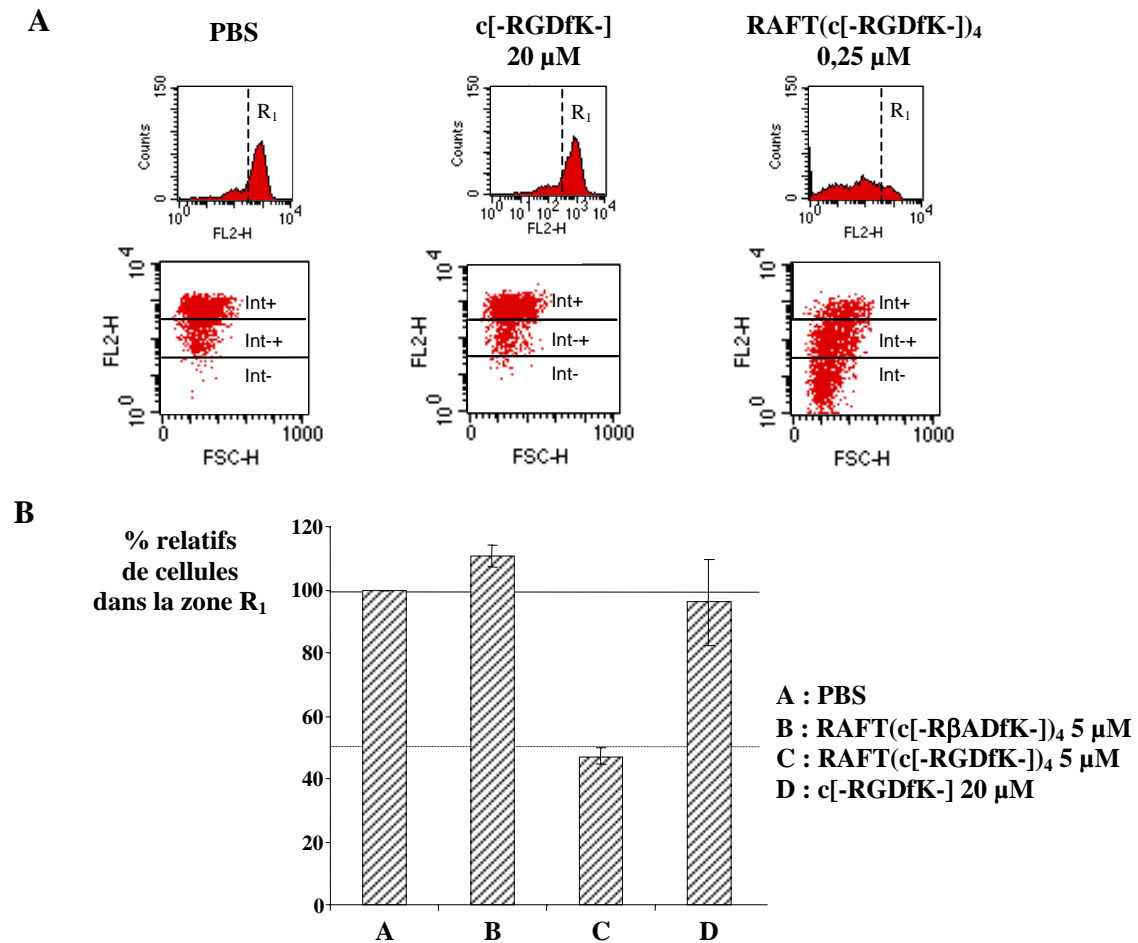


Figure 61 : Doubles marquages des cellules HEK293(β_3) par les ligands -RGD- et par l'anticorps monoclonal 23C6-RPE. A/ Profils de FACS : intensités de fluorescence des populations de cellules dans le canal rouge (FL2, RPE) obtenus dans les conditions d'incubation sans peptide (PBS), en présence de 20 μM de c[-RGDfK-] **35** ou de 0,25 μM de RAFT(c[-RGDfK-])₄ **50** ; B/ Quantification du nombre de cellules dans la zone R₁, définie à partir de la population de cellules fortement marquées par l'anticorps en l'absence de peptide (condition PBS).

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour tenter de déterminer les causes à l'origine de la disparition du marquage de l'intégrine provoquée par le ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄ :

i) le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ masque l'épitope de l'intégrine reconnu par l'anticorps 23C6, soit par une fixation directe sur l'épitope, soit par un encombrement stérique qui empêche l'accès du paratope de l'anticorps,

ii) l'interaction du ligand multivalent avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ provoque un changement conformationnel de l'hétérodimère qui empêche l'anticorps de reconnaître son site de fixation,

iii) la fixation du ligand multivalent provoque l'internalisation de l'intégrine et diminue le nombre des récepteurs $\alpha_v\beta_3$ fonctionnels présents à la surface des cellules.

Cette dernière hypothèse peut toutefois être écartée étant donné que les phénomènes sont observés de façon identique après une incubation du peptide à 37°C ou à 4°C. Pour cette même raison, la perte de reconnaissance de l'anticorps n'est pas non plus imputable à la formation de clusters d'intégrines.

L'inhibition semble par ailleurs propre à l'anticorps monoclonal 23C6 puisqu'elle n'a pas été observée avec l'anticorps monoclonal LM609, anticorps bloquant spécifique de l'hétérodimère $\alpha_v\beta_3$. Précisons que les épitopes de l'hétérodimère $\alpha_v\beta_3$ reconnus par chacun de ces deux anticorps monoclonaux ne sont pas connus à ce jour.

D.6.3 – Effet de la multivalence : tests des différentes versions des ligands RAFT(c[-RGDfK-])_n.

Le test d'inhibition de la fixation de l'anticorps 23C6, extrêmement reproductible, a été employé pour comparer les différentes structures des ligands multivalents.

Nous avons dans un premier temps comparé les activités des deux ligands tétravalents RAFT(c[-RGDfK-])₄ **49** et **50**, obtenus par des stratégies inverses de synthèse, afin de mettre en évidence l'importance éventuelle de l'orientation des liaisons éthers d'oxime dans la fixation du ligand à l'intégrine. Ces deux composés diffèrent par le sens des liens éthers d'oxime, reliant les unités c[-RGDfK-] au RAFT. Le ligand **49** a été obtenu à partir du cyclopentapeptide aldéhyde c[-RGDfK(CO-CHO)-] **38** et de la matrice nucléophile RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄ **8**, tandis que le tétramère **50** a été préparé selon la stratégie inverse à partir du cyclopentapeptide oxyamine c[-RGDfK(CO-CH₂-ONH₂)-] **40** et de la matrice électrophile RAFT(CO-CHO)₄ **6**. (cf. PARTIE A)

Les résultats obtenus avec chacun de ces deux ligands ne permettent pas de les distinguer. (cf. Figure 62) Les courbes d'inhibition de la fixation de l'anticorps 23C6 sont identiques pour les deux versions du ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄ et permettent de leur attribuer, pour ce phénomène, une valeur d'IC₅₀ de 50 nM.

Il semble raisonnable, à l'issue de ce test, de penser que le sens des liens éthers d'oxime reliant les motifs c[-RGDfK-] au RAFT n'a pas d'incidence sur la fixation du ligand tétramérique au récepteur $\alpha_v\beta_3$.

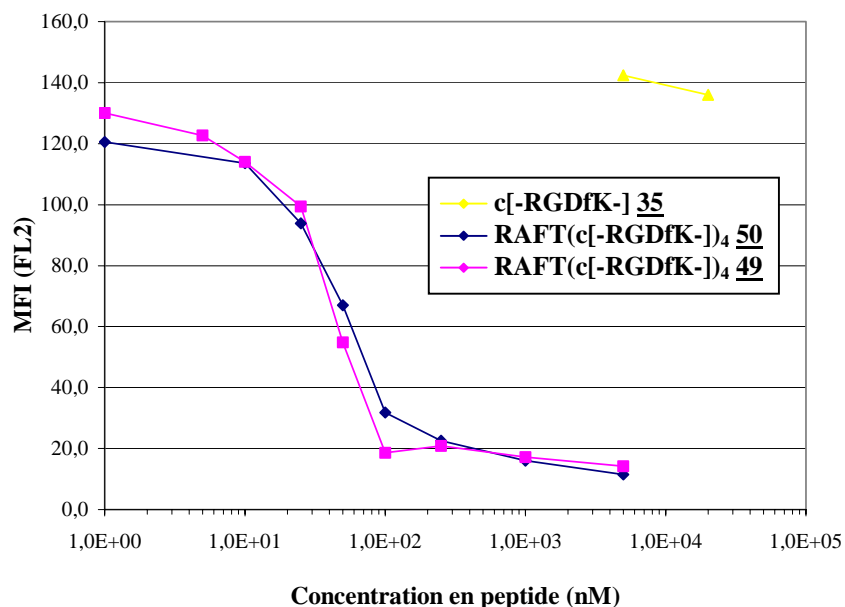


Figure 62 : Courbes des intensités de fluorescence (MFI, FL2) des populations de cellules préincubées avec les ligands tétravalents RAFT(c[-RGDfK-])₄ 49 et 50 et marquées par l'anticorps monoclonal 23C6 couplé à la R-phycoérythrine.

De la même manière, nous avons évalué les différentes structures des ligands multivalents RAFT(c[-RGDfK-])_n : (cf. Figure 63)

		Doses étudiées
Ligands -RGD- supportés sur RAFT	RAFT(c[-RGDfK-]) ₁ <u>53</u>	1 nM – 20 μ M
	RAFT(c[-RGDfK-]) ₂ <u>52</u>	1 nM – 10 μ M
	RAFT(c[-RGDfK-]) ₃ <u>51</u>	1 nM – 7 μ M
	RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ <u>50</u>	1 nM – 5 μ M
	RAFT(c[-RGDfK-]) ₁₆ <u>55</u>	0,25 nM – 5 μ M
Ligand monovalent	c[-RGDfK-] <u>35</u>	1 nM – 20 μ M

La comparaison des deux structures monovalentes, RAFT(c[-RGDfK-])₁ 53 et c[-RGDfK-] 35, met en évidence l'implication de l'architecture RAFT dans le processus d'inhibition. (cf. Figure 63) A des concentrations inférieures à 250 nM, les deux structures n'empêchent pas fixation de l'anticorps 23C6 sur l'intégrine. Lorsque l'on augmente graduellement la concentration du composé RAFT(c[-RGDfK-])₁, l'inhibition apparaît progressivement et atteint 40% (IC₆₀) à 20 μ M, alors que le peptide c[-RGDfK-] n'a toujours aucun effet à cette dose. Cette observation tend à montrer qu'une partie du processus

d'inhibition de la fixation de l'anticorps sur son épitope provient de l'encombrement stérique de la structure des ligands supportés sur RAFT fixés sur l'intégrine.

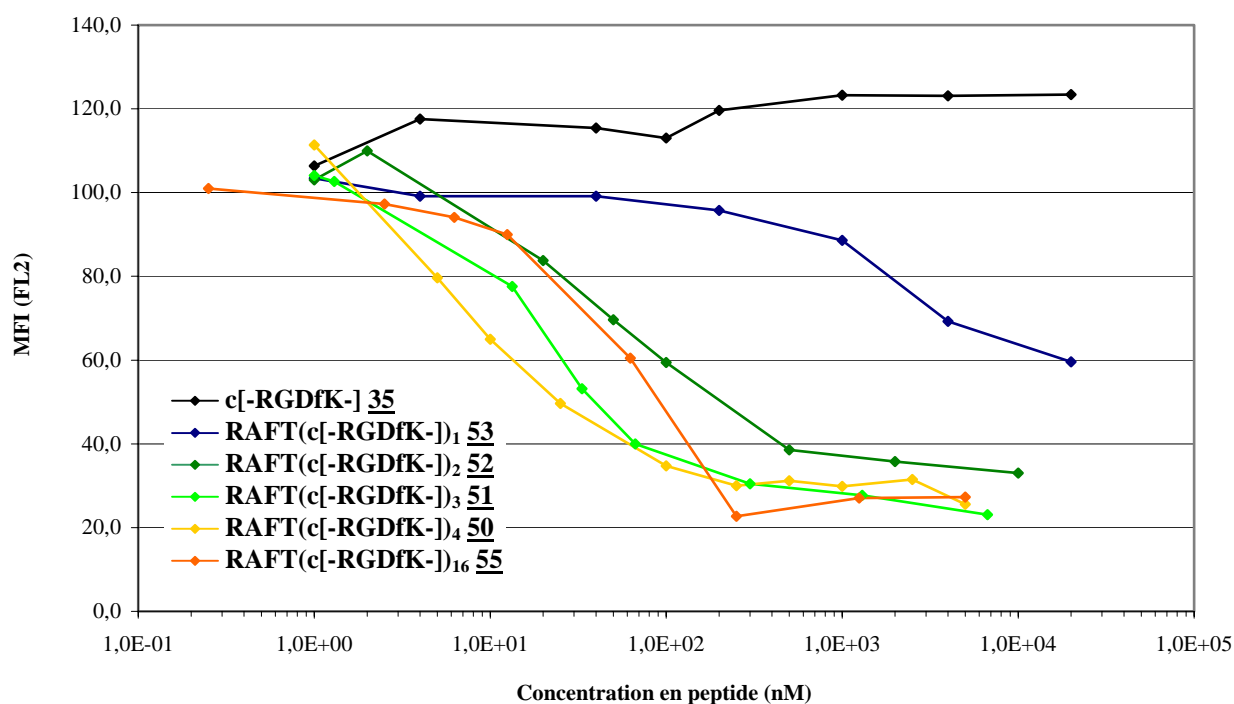


Figure 63 : Courbes des intensités de fluorescence (MFI, FL2) des populations de cellules préincubées avec les ligands -RGD- et marquées par l'anticorps monoclonal 23C6 couplé à la R-phycoérythrine.

Cependant, le phénomène stérique n'est pas le plus important puisque l'introduction d'un seul motif c[-RGDfK-] supplémentaire sur le RAFT (remplacement d'un motif non-sens c[-RβADfK-] de la structure RAFT(c[-RGDfK-])₁ **53** par un motif ligand c[-RGDfK-]) fait passer l'IC₆₀ de 20 μM (**53**) à 100 nM (**52**). Lorsque le nombre de motifs c[-RGDfK-] présenté sur le RAFT augmente de 2 jusqu'à 4, le processus d'inhibition accroît :

	IC ₆₀ (nM)
RAFT(c[-RGDfK-]) ₂ (52)	100
RAFT(c[-RGDfK-]) ₃ (51)	30
RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ (50)	15

Ainsi, en augmentant la concentration locale des motifs ligands sur la structure multivalente, l'anticorps se fixe de plus en plus difficilement sur l'hétérodimère. Les trois structures RAFT(c[-RGDfK-])₂, RAFT(c[-RGDfK-])₃ et RAFT(c[-RGDfK-])₄ provoquant un encombrement stérique similaire sur l'intégrine (les positions des ligands c[-RGDfK-] du ligand tétravalent sont occupées par des motifs non-sens c[-RβADfK-] dans les structures di- et trivalentes), cette observation suggère l'intervention d'un autre facteur que le seul phénomène stérique dans l'inhibition de la fixation de l'anticorps et la participation des

différents motifs c[-RGDfK-] sur le RAFT au phénomène. L'expérience étant réalisée à 4°C, nous ne pouvons pas envisager ici l'intervention d'un phénomène de clustering des intégrines. Ces résultats sont alors plutôt en faveur d'un changement de conformation de l'hétérodimère $\alpha_v\beta_3$ induit par la fixation des différents motifs c[-RGDfK-] sur l'intégrine.

Notons que le composé hexadécavalent RAFT(c[-RGDfK-])₁₆ **55** s'avère moins efficace que les composés avec trois ou quatre motifs. Cette observation pourrait traduire un manque d'affinité de cette structure pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pouvant provenir de l'encombrement des seize motifs c[-RGDfK-].

D.6.4 – Inhibition de la fixation du ligand monovalent par le ligand multivalent.

Dans la continuité de ces tests, nous avons ensuite envisagé de bloquer la fixation du cyclopeptide monovalent c[-RGDfK-] avec le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ et d'observer la compétition entre les deux ligands.

Pour cela, les cellules HEK293(β_3) en suspension ont été incubées à 4°C pendant 30 min avec des concentrations élevées des différents ligands « froids », non conjugués à la FITC :

		Dose utilisée
Ligand tétravalent	RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 50	50 μ M
Homologue -RβAD- contrôle	RAFT(c[-R β ADfK-]) ₄ 54	50 μ M
Ligand monovalent	c[-RGDfK-] 35	200 μ M

Les cellules ont ensuite été rincées, puis incubées à nouveau pendant 30 min à 4°C en présence des ligands « chauds », conjugués à la FITC :

		Dose utilisée
Conjugué tétravalent	(FITC) ₁ RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 72	2,5 μ M
Homologue -RβAD- contrôle	(FITC) ₁ RAFT(c[-R β ADfK-]) ₄ 73	2,5 μ M
Conjugué monovalent	c[-RGDfK(FITC)-] 74	2,5 et 10 μ M

Une nouvelle fois, les cellules ont été rincées, fixées puis analysées par FACS. L'intensité de fluorescence de la FITC des populations de cellules a été mesurée dans chaque condition. (cf. Figure 64)

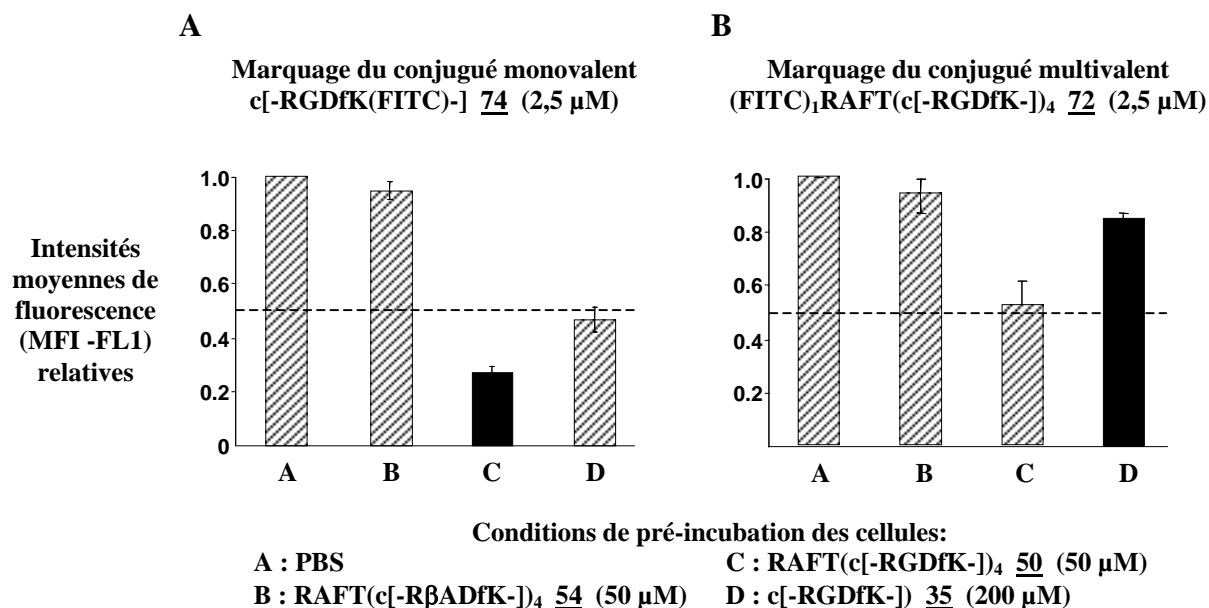


Figure 64 : Graphiques des intensités relatives de fluorescence (MFI, FL1) des populations de cellules préincubées avec des concentrations saturantes des ligands -RGD- « froids » (non porteurs de fluorochrome) puis marquées par les ligands conjugués à la FITC.

On observe que la fixation du conjugué monovalent c[-RGDfK(FITC)-] est inhibée à 70% par la préincubation des cellules avec le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄. (cf. Figure 64, Graphe A, condition C) En revanche, la fixation du conjugué multivalent (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ est peu affectée par la fixation préalable du ligand monovalent c[-RGDfK-]. (cf. Figure 64, Graphe B, condition D)

L'incubation des cellules avec les peptides étant réalisée à 4°C, nous ne pouvons pas expliquer ce phénomène par l'internalisation des hétérodimères $\alpha_v\beta_3$ qui pourrait intervenir avec le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ et non avec le c[-RGDfK-].

L'inhibition de la fixation du c[-RGDfK-] sur l'intégrine par le ligand multivalent et non l'inverse peut s'expliquer par le fait que le ligand multivalent a une affinité plus forte que le ligand monovalent pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le conjugué c[-RGDfK(FITC)-] ne chasse pas le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ fixé sur l'intégrine, tandis que le conjugué (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ déplace le c[-RGDfK-] pour se fixer sur le récepteur. L'augmentation d'affinité de la version multivalente peut s'expliquer par un effet statistique (si la liaison d'un motif c[-RGDfK-] sur l'intégrine est rompue, un autre motif du ligand multivalent peut aussitôt le remplacer) ou par un effet de stabilisation stérique (liaison simultanée de plusieurs motifs c[-RGDfK-] à l'intégrine). Ce deuxième point a également été discuté précédemment, dans le cas de l'inhibition de la fixation de l'anticorps 23C6 sur l'intégrine.

D.7. Étude de la diffusion membranaire et de la mobilité des intégrines $\alpha_V\beta_3$ après fixation du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄.

Les récepteurs de la famille des intégrines sont connus pour former des clusters (regroupement des récepteurs dans un espace restreint de la membrane) sous l'effet de l'activation par les ligands extracellulaires.⁶⁰ Dans le cas de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, ces structures ont été mises en évidence lors des phénomènes d'adhérence et d'étalement (contacts focaux) et lors de la migration des cellules.⁶¹ Outre les méthodes microscopiques qui permettent de détecter des amas de récepteurs en contact avec la matrice, la méthode principale décrite dans la littérature pour mettre en évidence indirectement la formation de ces structures consiste à mesurer la mobilité des récepteurs.⁶² En effet, un récepteur engagé dans un cluster est moins mobile que lorsqu'il se trouve libre et indépendant des autres. Nous avons cherché à savoir si le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ est susceptible d'induire le clustering des intégrines $\alpha_V\beta_3$ et avons alors envisagé la méthode de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) pour étudier la mobilité des récepteurs $\alpha_V\beta_3$. La technique de FRAP consiste à mesurer la vitesse de diffusion de sondes fluorescentes couplées au récepteur et apporte indirectement une information sur leur mobilité.

Ces expériences ont été réalisées sur les cellules HEK293(β_3), adhérentes sur une lamelle de verre et vivantes (cellules non fixées). Juste avant l'expérience de FRAP, les cellules ont été incubées à température ambiante (22°C) pendant 8 min dans une solution contenant l'anticorps monoclonal LM609 (anticorps spécifique de l'hétérodimère $\alpha_V\beta_3$ non affecté par la présence du peptide RAFT(c[-RGDfK-])₄) couplé à la R-phycoérythrine (MAb LM609-RPE) et les différents ligands conjugués à la FITC, soit :

		Dose étudiée
Conjugué tétravalent	(FITC) ₁ RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 72	0,5 μ M
Homologue -RβAD- contrôle	(FITC) ₁ RAFT(c[-R β ADfK-]) ₄ 73	0,5 μ M
Conjugué monovalent	c[-RGDfK(FITC)-] 74	0,5 et 2 μ M

⁶⁰ Giancotti, F. G.; Ruoslahti, E. Integrin signaling. *Science* **1999**, 285, 1028-1032. ; Martin, K. H.; Slack, J. K.; Boerner, S. A.; Martin, C. C.; Parsons, J. T. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science* **2002**, 296, 1652-1653. ; Arnaout, M. A.; Goodman, S. L.; Xiong, J. P. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2002**, 14, 641-651. ; Miyamoto, S.; Akiyama, S. K.; Yamada, K. M. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* **1995**, 267, 883-885.

⁶¹ Ballestrem, C.; Hinz, B.; Imhof, B. A.; Wehrle-Haller, B. Marching at the front and dragging behind: differential $\alpha_V\beta_3$ -integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J. Cell Biol.* **2001**, 155, 1319-1332.

⁶² Lee, C. C.; Revington, M.; Dunn, S. D.; Petersen, N. O. The lateral diffusion of selectively aggregated peptides in giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **2003**, 84, 1756-1764.

L'utilisation des ligands conjugués à la FITC est indispensable pour permettre de repérer les cellules au microscope sans utiliser la fluorescence relative à l'anticorps (R-phycoérythrine). On précise néanmoins que les mêmes expériences ont été réalisées avec les ligands -RGD- nus, dépourvus de fluorochrome. La tâche de repérage des cellules et du choix de la zone de FRAP est beaucoup plus délicate dans ce cas, mais ces expériences ont conduit à des résultats identiques.

Les expériences ont été réalisées à la température de la salle de microscopie (salle climatisée à 22°C).

Après l'incubation avec l'anticorps et le peptide, la lamelle supportant les cellules a été délicatement rincée et déposée sur le dispositif expérimental permettant de réaliser les expériences de microscopie. Ce dispositif permet de maintenir la présence du peptide soluble pendant l'observation des cellules au microscope et pendant toute la durée des expériences de FRAP (cellules en contact avec 400 μ L de la solution de peptide seul). (cf. Figure 65) Les observations des cellules ont été réalisées au microscope confocal biphotonique et les acquisitions effectuées sur le canal rouge ($\lambda = 543$ nm, fluorescence de la R-phycoérythrine).

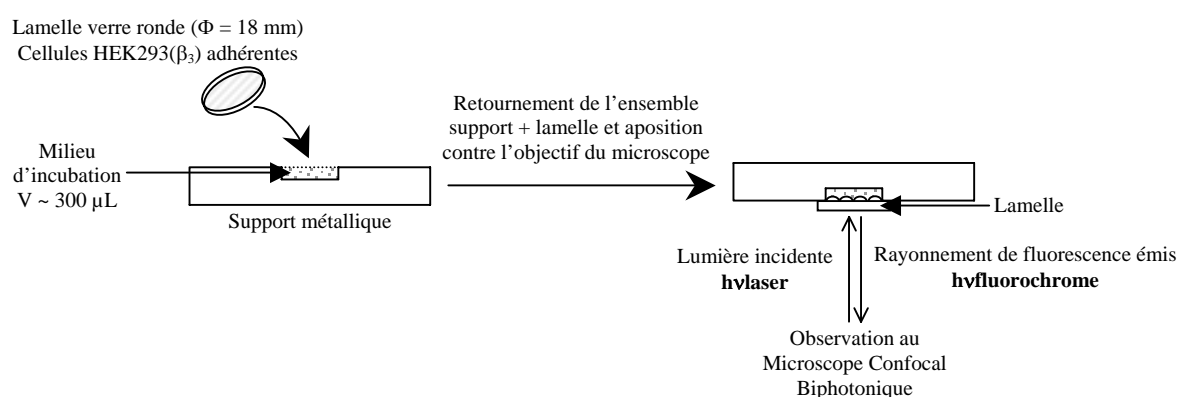


Figure 65 : Schéma du dispositif expérimental utilisé pour les expériences de FRAP.

Les expériences de FRAP ont été réalisées dans une petite zone circulaire (ROI, *Region of Interest*, diamètre 3 μ m) choisie en dehors des zones de contacts intercellulaires et de préférence sur la membrane apicale de la cellule. Chaque mesure de FRAP comporte une succession de trois étapes :

- 1- Mesure de la fluorescence émise par la phycoérythrine dans la ROI à $t = 0$,
- 2- Extinction de la fluorescence des molécules de phycoérythrine dans la ROI par photoblanchiment (laser 100% pendant 2 s) – cette étape détruit, de manière irréversible, les fluorochromes présents dans la ROI,

3- Mesure de l'intensité de la fluorescence dans le canal rouge dans la ROI toutes les 5 s pendant 2 min – la fluorescence qui réapparaît dans la ROI provient de la migration des intégrines marquées de l'extérieur de la ROI dans la zone photoblanchie.

Le suivi au cours du temps de l'intensité de fluorescence dans la ROI donne la courbe de récupération de la fluorescence dans la zone photoblanchie et apporte une information sur la vitesse de diffusion des sondes fluorescentes. Cette dernière étant reliée à la mobilité du complexe récepteur/anticorps/fluorochrome, la courbe obtenue permet d'accéder indirectement à la mobilité des récepteurs $\alpha_v\beta_3$ en présence ou non d'un ligand. (cf. Figure 66)

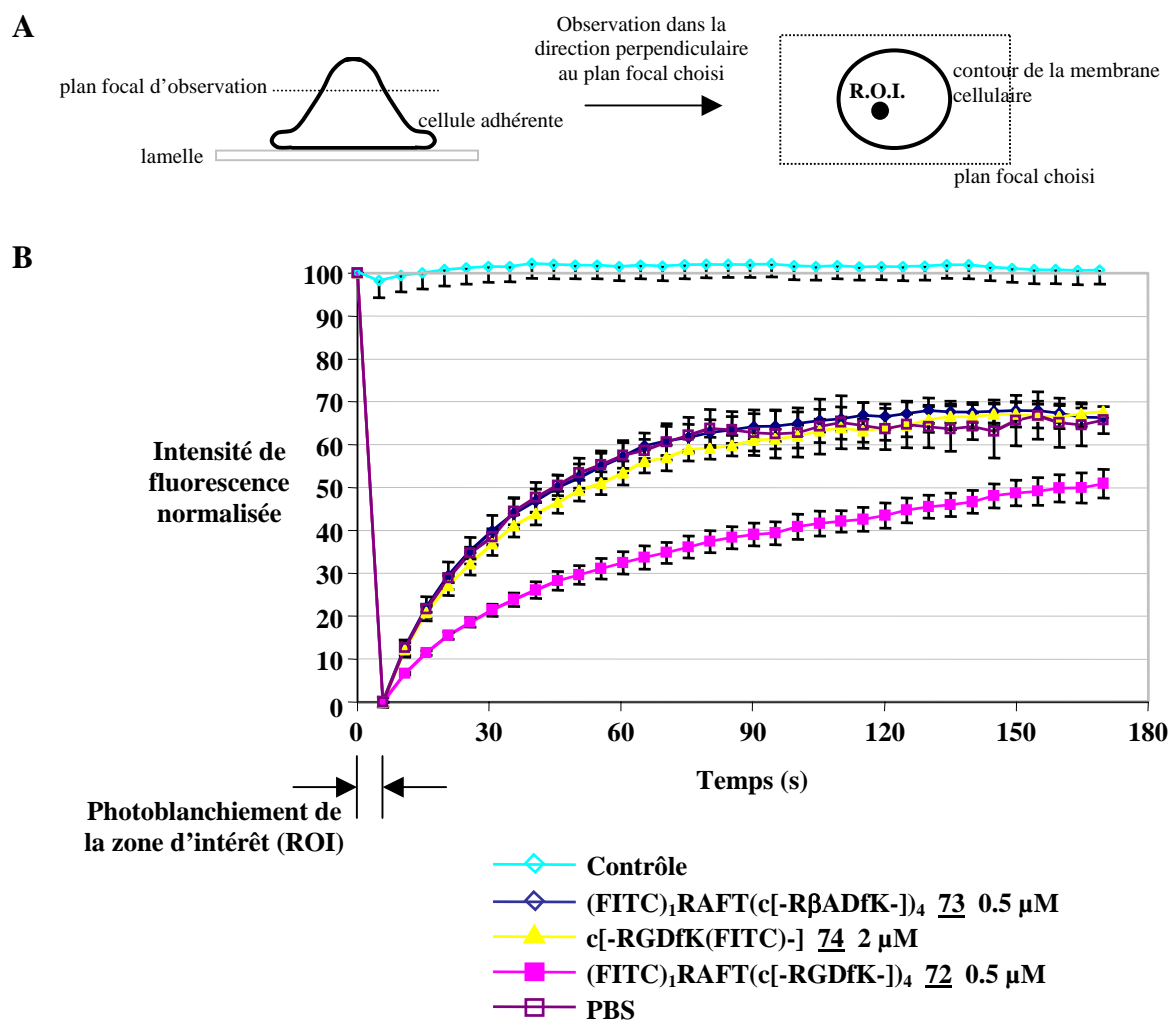


Figure 66 : Expérience de FRAP. A/ Illustration de la méthode de définition de la ROI ; B/ Graphique récapitulatif des courbes de récupération de fluorescence après photoblanchiment de la R-phycoérythrine dans la zone d'intérêt.

Les résultats obtenus montrent une récupération de fluorescence, et donc une diffusion des intégrines, identique dans les conditions d'incubation des cellules en l'absence de peptide (PBS), en présence du peptide contrôle (FITC)₁RAFT(c[-RβADfK-])₄ **73** ou en présence du ligand monovalent c[-RGDfK(FITC)-] **74**. Aux erreurs de mesure près, les trois courbes se superposent. Dans ces trois cas, la fluorescence mesurée atteint un plateau en deçà du plateau théorique attendu (récupération de 100% de la fluorescence). Les contrôles effectués nous ont permis de s'assurer que cet écart n'est pas une conséquence du photoblanchiment du fluorochrome au cours des acquisitions (courbe « Contrôle » dans le graphe 66, B). Cet écart représente donc la fraction des récepteurs immobiles.

Dans la condition où les cellules sont incubées en présence du peptide multivalent (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **72**, la récupération de la fluorescence est très nettement ralentie en comparaison avec toutes les autres conditions. Ce résultat suggère une diminution importante de la mobilité des intégrines $\alpha_v\beta_3$ lorsqu'elles sont liées au peptide multivalent.

La diminution de la mobilité des récepteurs $\alpha_v\beta_3$ induite par le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ suggère l'engagement des intégrines $\alpha_v\beta_3$ dans des structures de type clusters. Toutefois, ce résultat peut également provenir d'un autre phénomène : suite à l'activation du récepteur $\alpha_v\beta_3$ par le ligand multivalent, la partie intracellulaire de l'intégrine a été ancrée à des protéines intracellulaires du cytosquelette comme la taline, la paxilline et la vinculine, Src, FAK ou les microfilaments d'actine.⁵⁸ Ces deux hypothèses, clustering des récepteurs et accumulation de protéines sur la queue cytoplasmique de l'intégrine, ne sont pas exclusives l'une de l'autre et il est possible que l'altération de la mobilité des intégrines observée soit le résultat des deux phénomènes. Dans tous les cas, nos résultats démontrent une activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ qui n'est pas observée avec le ligand monovalent c[-RGDfK-]. L'étude de l'organisation des microfilaments d'actine par microscopie de fluorescence ne nous a malheureusement pas apporté d'arguments supplémentaires. Nous avons également tenté de montrer l'accumulation de la forme phosphorylée de la protéine FAK (*Focal Adhesion Kinase*) soit par microscopie de fluorescence, soit par une technique de Western Blot, mais les résultats étaient peu reproductibles.

D.8. Conclusion.

Remarquons en tout premier lieu que les premiers tests d'adhésion des cellules CHO-3a sur les ligands biotinylés, immobilisés sur les surfaces de streptavidine, ont montré l'intérêt majeur de la matrice RAFT qui permet de séparer spatialement, le domaine supérieur des ligands c[-RGDfK-], du domaine inférieur qui porte les molécules de détection. Cette caractéristique est essentielle pour des applications futures de vectorisation de drogues, car la présence de la drogue sur la face inférieure du vecteur ne doit pas affecter ses propriétés de ciblage.

Le modèle artificiel des cellules HEK293(β_3) nous a permis, *in vitro*, de comparer l'activité du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ avec celle du cyclopentapeptide original c[-RGDfK-].

En termes d'affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, le tétramère supporté sur RAFT s'est révélé 2,5 fois plus efficace pour inhiber l'adhésion de ces cellules à la vitronectine. Cette propriété est à l'origine du phénomène d'anoïkis observé chez les cellules HUVEC. Le ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄ induit l'apoptose des cellules endothéliales primaires beaucoup plus efficacement que le cyclopentapeptide monovalent. Ce dernier étant actuellement employé dans des protocoles cliniques comme agent anti-angiogénique, cette propriété constitue un atout important pour notre structure multivalente.

Le ligand multivalent présente par ailleurs des propriétés absentes du ligand monovalent. Tout d'abord, en se concentrant dans les jonctions intercellulaires, il induit et renforce les contacts cellule/cellule. L'origine de ce phénomène n'est pas clairement identifiée. Il pourrait être le résultat du pontage d'intégrines appartenant à des cellules adjacentes ou provenir d'une signalisation intracellulaire médiée par le ligand multivalent conduisant à la participation d'autres molécules d'adhérence.

Par ailleurs, le ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄ est internalisé selon un processus actif, ATP-dépendant, en partie par une endocytose médiée par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Nos résultats ne permettent pas toutefois de statuer sur l'internalisation concomitante de l'intégrine et du peptide.

Enfin, le ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄ active l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ soit par clustering, soit par la fixation de protéines cytoplasmiques à la queue intracellulaire du récepteur. Il empêche également la reconnaissance et la fixation de l'anticorps monoclonal 23C6 sur l'intégrine

$\alpha_v\beta_3$ ainsi que celle du cyclopentapeptide c[-RGDfK-]. Nous ne savons pas à ce jour si ces phénomènes sont dus à une modification conformationnelle de l'hétérodimère $\alpha_v\beta_3$ ou à l'occupation des sites de fixation de ces deux entités.

L'ensemble de nos résultats nous a conduit à évaluer les propriétés de ce ligand *in vivo*.

E. ÉTUDE DU CIBLAGE DES TUMEURS *IN VIVO* ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI-TUMORALE DU LIGAND MULTIVALENT RAFT(c[-RGDfK-])₄.

E.1. Objectif des travaux.

La deuxième partie des études biologiques a été consacrée à l'évaluation de l'activité du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ *in vivo*, chez un modèle animal murin, immunodéficient, porteur de différents types de tumeurs. Nous avons dans un premier temps évalué l'efficacité du ligand multivalent pour cibler des foyers tumoraux pré-établis, localisés ou métastatiques, et avons comparé le marquage des tumeurs à celui obtenu avec le ligand monovalent c[-RGDfK-]. Ces expériences ont été réalisées par macroscopie non-invasive des animaux traités par les ligands conjugués à la Cyanine 5, au moyen des techniques d'imagerie de fluorescence dans le proche IR développées au sein de notre groupe. Nos travaux ont dans un second temps visé à apprécier l'activité anti-tumorale du ligand multivalent. Les principaux résultats de ces travaux sont présentés ici.

E.2. Choix des modèles cellulaires pour les études *in vivo*.

S'il est indispensable de travailler dans les études *in vitro* avec des modèles de cellules $\alpha_v\beta_3$ positives, cette propriété n'est pas nécessairement requise pour les études *in vivo*. En fonction du statut $\alpha_v\beta_3$, positif ou négatif, des cellules tumorales injectées aux animaux, deux cas peuvent se présenter :

- si les cellules tumorales exogènes n'expriment pas l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, alors l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ciblée se trouve uniquement sur les cellules endothéliales des néo-vaisseaux développés par l'animal lors de l'établissement et l'extension de la tumeur,

- si les cellules tumorales injectées expriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, alors le récepteur $\alpha_v\beta_3$ ciblé est à la fois exprimé par les cellules tumorales ainsi que par la vascularisation formée lors du développement tumoral. (cf. Figure 67)

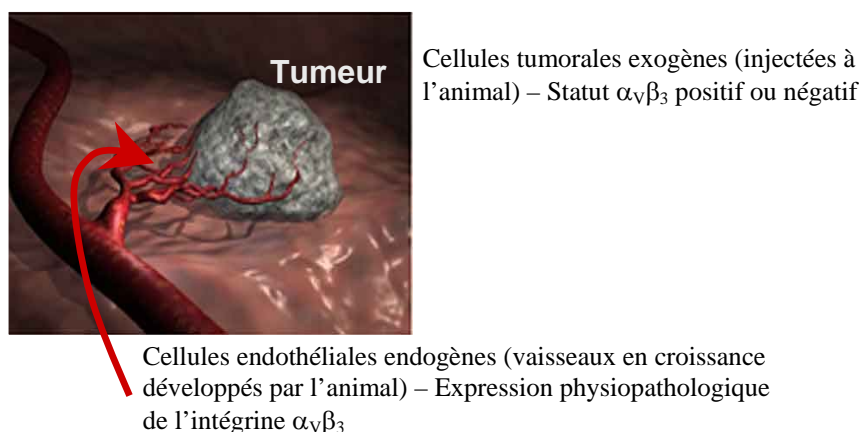


Figure 67 : Illustration de l'établissement de la tumeur après injection des cellules tumorales à l'animal.

Pour nos études *in vivo* chez la souris Nude, nous avons employé trois modèles différents de cellules :

➤ Les cellules **IGR-OV1** : ces cellules, issues d'une lignée tumorale humaine d'un cancer de l'ovaire, expriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

➤ Les cellules **A549** : ces cellules sont issues d'une lignée tumorale humaine d'un carcinome pulmonaire non-à-petites cellules. Elles n'expriment pas l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans nos conditions de marquage.

➤ Les cellules **Ts/Apc** : ces cellules proviennent d'un modèle de carcinome mammaire développé chez la souris. Ce modèle tumoral, de statut $\alpha_v\beta_3$ négatif, a été choisi pour ses propriétés très angiogéniques.⁶³

E.3. Étude préliminaire : activité anti-tumorale du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ administré en intra-tumoral.

Nous avons dans un premier temps étudié l'effet du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ sur des tumeurs localisées pré-établies chez les souris.

Pour cela, des cellules tumorales du modèle A549 (statut $\alpha_v\beta_3$ négatif) ont été injectées en sous-cutanée dans le dos de souris immunodéficientes (souris Swiss Nudes). Lorsque les tumeurs ont atteint des dimensions de l'ordre de $3 \times 3 \text{ mm}^2$, les différents ligands

⁶³ Lollini, P.L.; De Giovanni, C.; Landuzzi, L.; Nicoletti, G.; Fraberti, F.; Cavallo, F.; Giovarelli, M.; Forni, G.; Modica, A.; Modesti, A. Transduction of genes coding for a histocompatibility (MHC) antigen and for its physiological inducer interferon-gamma in the same cell : efficient MHC expression and inhibition of tumour and metastasis growth. *Human Gene Therapy*, **1995**, 6, 743-752.

en solution dans du PBS ont été injectés en sous-cutanée dans la tumeur de façon répétée (2 fois par semaine pendant 4 semaines) :

		Dose étudiée
Ligand tétravalent	RAFT(c[-RGDfK-]) <u>50</u>	20 μM (100 μL/inj.) soit 7,6 μg/inj.
Homologue -RβAD- contrôle	RAFT(c[-RβADfK-]) <u>54</u>	20 μM (100 μL/inj.) soit 7,8 μg/inj.
Ligand monovalent	c[-RGDfK-] <u>35</u>	20 μM (100 μL/inj.) soit 1,2 μg/inj.

Le volume des tumeurs des souris de chaque groupe a été suivi tout au cours de l'expérience et mesuré au terme de l'expérimentation. Après sacrifice des animaux, les tumeurs ont été prélevées et soumises à une analyse histologique. Les vaisseaux sanguins des coupes de tumeurs ont été révélés au moyen d'un anticorps dirigé contre le marqueur PECAM-1 (CD31, *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*). Les résultats obtenus montrent que le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ ralentit la progression des tumeurs alors qu'aucun effet n'est observé aux doses étudiées avec le ligand monovalent c[-RGDfK-] et à fortiori avec l'homologue -RβAD- contrôle. (cf. Figure 68, A)

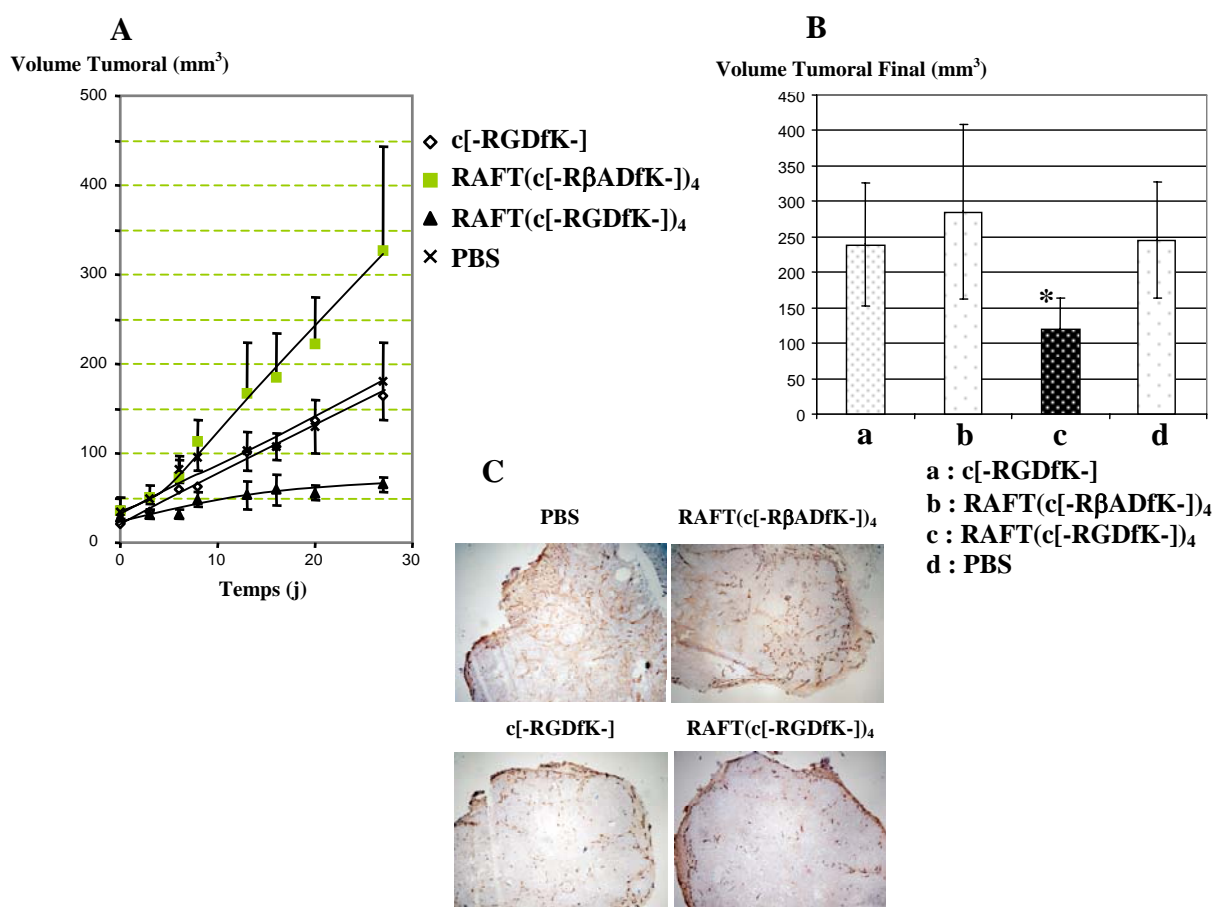


Figure 68 : Étude de l'activité anti-proliférative *in vivo* des peptides -RGD- administrés en intra-tumoral à des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées du modèle A549. A/ Suivi du volume des tumeurs dans chaque groupe traité au cours d'une expérimentation ; B/ Graphique des volumes tumoraux finaux obtenus après deux séries d'expérimentation ; C/ Clichés des coupes de tumeurs après immunomarquage PECAM-1.

Ces expériences répétées deux fois (n = 5 puis n = 4) nous ont permis d'établir que la réduction du volume tumoral observée sous l'effet du ligand multivalent est statistiquement significative en comparaison avec tous les autres groupes contrôles. (cf. Figure 68, B)

Les tumeurs A549 n'exprimant pas le récepteur $\alpha_v\beta_3$, l'effet anti-prolifératif observé peut être attribué à un effet anti-angiogénique. Le marquage des vaisseaux sanguins des coupes de tumeurs montre une diminution du nombre de vaisseaux sanguins dans les tumeurs traitées par le ligand multivalent par rapport aux tumeurs non traitées (PBS) ou aux tumeurs traitées par le peptide contrôle RAFT(c[-R β ADfK-])₄. (cf. Figure 68, C) Cependant, les comptages effectués ne permettent pas de mettre en évidence une différence statistiquement significative du nombre de vaisseaux dans la condition du traitement par le RAFT(c[-RGDfK-])₄ par rapport aux autres conditions.

Ces résultats préliminaires sont très encourageants en comparaison avec ceux décrits dans la littérature. En effet, Allman et al. ont montré une réponse anti-tumorale sur des xénogreffes de tumeurs A375 (mélanomes) du peptide c[-RGDfV-] administré en intratumoral à la dose de 50 mg/Kg/j.⁶⁴ Dans notre cas, un ralentissement identique de la progression des tumeurs est observé à une dose 400 fois plus faible (0,125 mg/Kg/j).

E.4. Étude du ciblage des tumeurs *in vivo* par imagerie de fluorescence.

Avant d'étudier l'activité anti-tumorale de notre ligand multivalent administré par voie systémique, nous avons tout d'abord souhaité visualiser le ciblage des tumeurs et avons réalisé cette étude par macroscopie de fluorescence.

E.4.1 – Intérêt de la fluorescence dans le proche infra-rouge et description de l'appareillage de macroscopie.

L'utilisation de sondes possédant des propriétés de fluorescence dans l'infra-rouge (proche IR ou IR lointain) a largement contribué au développement des nouvelles techniques d'imagerie optique *in vivo*, comme l'imagerie et la tomographie de fluorescence. L'émission

⁶⁴ Allman, R.; Cowburn, P.; Mason, M. In vitro and in vivo effects of a cyclic peptide with affinity for the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cells. *Eur. J. Cancer* **2000**, *36*, 410-422.

de fluorescence de ces sondes, ayant lieu dans un domaine spectral compris entre 650 et 800 nm, présente de nombreux intérêts :⁶⁵

i) Les rayonnements IR sont faiblement absorbés par les tissus et les liquides biologiques (notamment le sang) en comparaison avec les rayonnements dans le visible. Ils permettent alors d'atteindre des couches plus profondes de l'organisme. (cf. Figure 69, A)

ii) L'émission naturelle de fluorescence (autofluorescence) des différents organes dans cette gamme de longueurs d'onde est par ailleurs extrêmement faible. (cf. Figure 69, B, cliché d)

iii) Les interférences avec la lumière incidente d'excitation dissipée sont faibles.

iv) Les photons des gammes de longueurs d'onde employées sont non-ionisants.

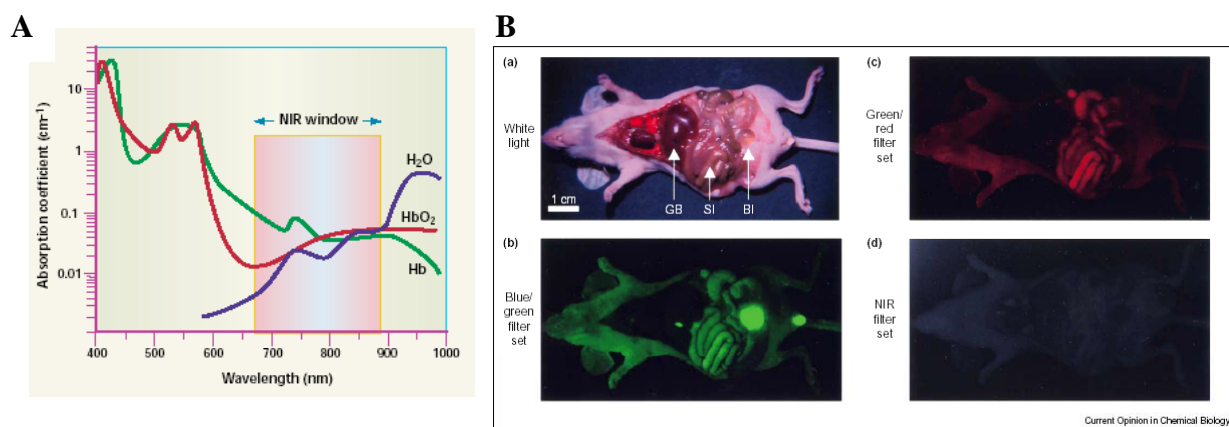


Figure 69 : Avantages de l'utilisation des sondes possédant des propriétés de fluorescence dans le proche infra-rouge. A/ Faible absorption des liquides physiologiques dans cette gamme de longueurs d'onde ; B/ Absence de signal d'autofluorescence des organes.

Source : Frangioni, J.V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, 7, 626-634

Dans notre cas, nous avons employé la Cyanine 5. Ce fluorochrome présente les avantages d'être de taille modeste, d'avoir une faible toxicité ainsi qu'une bonne solubilité dans l'eau. Il est néanmoins caractérisé par un faible écart de Stoke's ($\lambda_{\text{abs}} = 649 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$) qui a contraint l'utilisation d'un appareillage avec un excellent système de filtration optique.⁶⁶ (cf. Figure 70) Ces équipements ont été développés au sein de notre laboratoire (Atelier d'Imagerie du Petit Animal) en collaboration avec le Laboratoire d'Imagerie et des Systèmes d'Acquisition (CEA/Grenoble LETI, Dr. P. Rizo).

⁶⁵ Petrovsky, A.; Schellenberger, E.; Josephson, L.; Weissleder, R.; Bogdanov, A., Jr. Near-infrared fluorescent imaging of tumor apoptosis. *Cancer Res* **2003**, 63, 1936-1942.

⁶⁶ Texier, I. F.; Josserand, V.; Garanger, E.; Razkin, J.; Jin, Z.; Dumy, P.; Favrot, M. C.; Boturyn, D.; Coll, J. L. Luminescent probes for optical *in vivo* imaging. *Proceedings of SPIE* **2005**, 5704, 16-23.

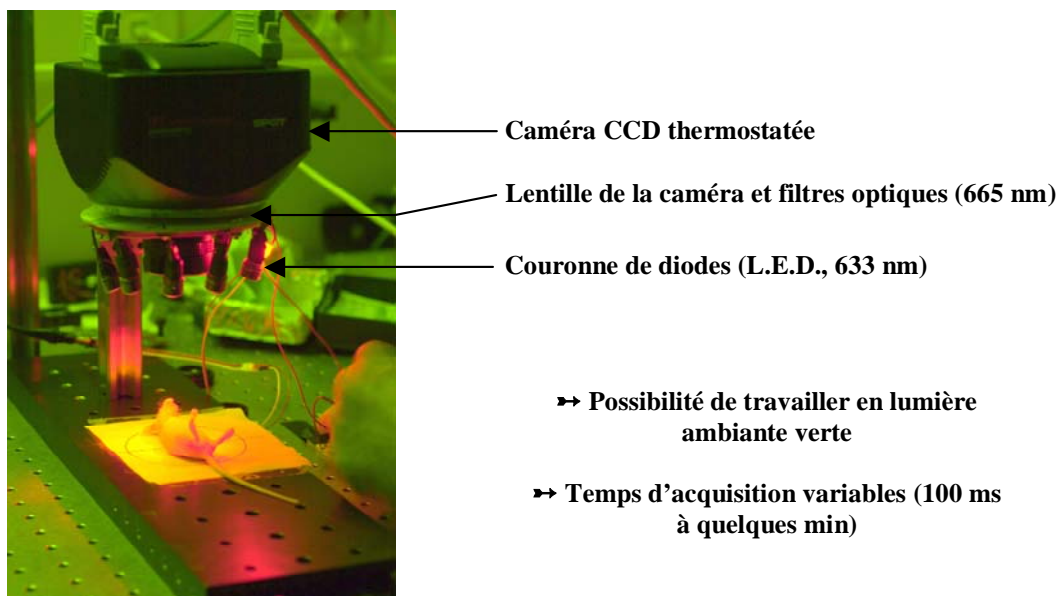


Figure 70 : Représentation de l'instrumentation d'imagerie de fluorescence non-invasive du petit animal.

E.4.2 – Ciblage de tumeurs sous-cutanées.

Nous avons, dans un premier temps, évalué la capacité du conjugué multivalent (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ à cibler les vaisseaux sanguins tumoraux en imageant des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées établies à partir du modèle Ts/Apc de statut $\alpha_v\beta_3$ négatif.

Pour cela, les peptides conjugués à la Cyanine 5, solubilisés dans du PBS, ont été administrés de façon systémique, en une seule fois, par voie intraveineuse à raison de 50 μg (200 μL) de conjugué par souris :

		Quantité de produit injectée
Conjugué tétravalent	(Cy5)RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 81	50 μg (11,0 nmol – 55 μM)
Homologue -RβAD- contrôle	(Cy5)RAFT(c[-R β ADfK-]) ₄ 82	50 μg (10,8 nmol - 54 μM)
Conjugué monovalent	c[-RGDfK(Cy5)-] 83	50 μg (39 nmol – 195 μM)

Les quantités de produit injectées ont été choisies pour avoir un nombre de motifs c[-RGDfK-] similaire dans les conditions des deux ligands monovalent et multivalent. Notons toutefois que dans ces conditions, la quantité de fluorochrome est 4 fois plus importante dans le cas du conjugué monovalent.

Les résultats d'imagerie montrent que les tumeurs sous-cutanées sont intensément marquées à la fois par le conjugué multivalent (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ et par le conjugué monovalent c[-RGDfK(Cy5)-]. Aucune fixation du conjugué contrôle (Cy5)RAFT(c[-R β ADfK-])₄ n'est en revanche observée dans les tumeurs. (cf. Figure 71, A)

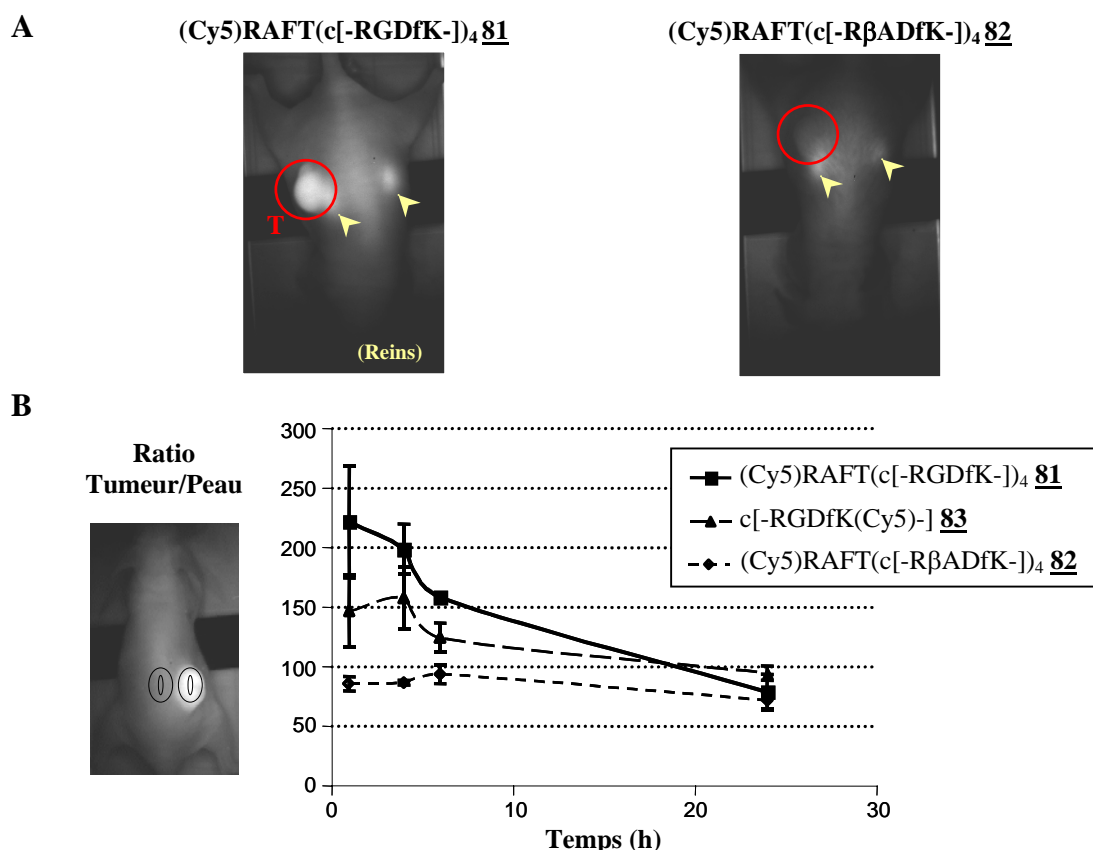


Figure 71 : Imagerie de tumeurs s.c. localisées pré-établies du type TS/Apc chez des souris Swiss Nude par les ligands conjugués à la Cyanine 5 administrés par i.v. (50 µg/souris).

Dans le cas des animaux traités par le conjugué multivalent (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄, on observe le signal de fluorescence de la Cyanine 5 se concentrer dans la tumeur au cours de la première heure après l'injection, puis lentement s'effacer au cours du temps. Avec le peptide monovalent c[-RGDfK(Cy5)-], on observe également une forte accumulation dans la tumeur mais celle-ci semble moins spécifique qu'avec le ligand multivalent. En effet, la fluorescence des autres organes est beaucoup plus importante. Ce peptide, de taille beaucoup plus petite que celle du ligand multivalent (rapport de masse molaire d'environ 3,6), diffuse beaucoup plus rapidement dans les tissus et produit un bruit de fond plus important.

Pour quantifier l'accumulation des deux conjugués dans la tumeur, nous avons employé le ratio du nombre de photons détectés dans la tumeur par rapport au nombre de photons détectés dans une zone de taille identique proche de la tumeur. (cf. Figure 71, B) Cette méthode nous a permis de constater effectivement une accumulation plus spécifique du ligand multivalent dans la tumeur. Il nous faut néanmoins reproduire ces résultats en injectant le conjugué monovalent en quantité quatre fois moins importante pour avoir la même quantité de fluorochrome dans les conditions des deux ligands (injection de 10 nmol des conjugués **81**,

82 et **83**). Cette vérification est indispensable pour nous assurer que le signal non spécifique observé avec le conjugué monovalent n'est pas du à un excès de fluorochrome.

Une expérience similaire a été réalisée sur des souris porteuses de tumeurs sous-cutanées du modèle IGR-OV1, de statut $\alpha_V\beta_3$ positif.

Les peptides conjugués à la Cyanine 5 ont été injectés par voie systémique, soit en intra-veineuse, soit en intra-péritonéale :

		Quantité de produit injectée
Conjugué tétravalent	(Cy5)RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 81	50 µg (11,0 nmol – 55 µM)
Homologue -RβAD- contrôle	(Cy5)RAFT(c[-RβADfK-]) ₄ 82	50 µg (10,8 nmol - 54 µM)
Conjugué monovalent	c[-RGDfK(Cy5)-] 83	50 µg (39 nmol – 195 µM)

Les résultats obtenus confirment les observations déjà réalisées avec des tumeurs $\alpha_V\beta_3$ négatives. (cf. Figure 72)

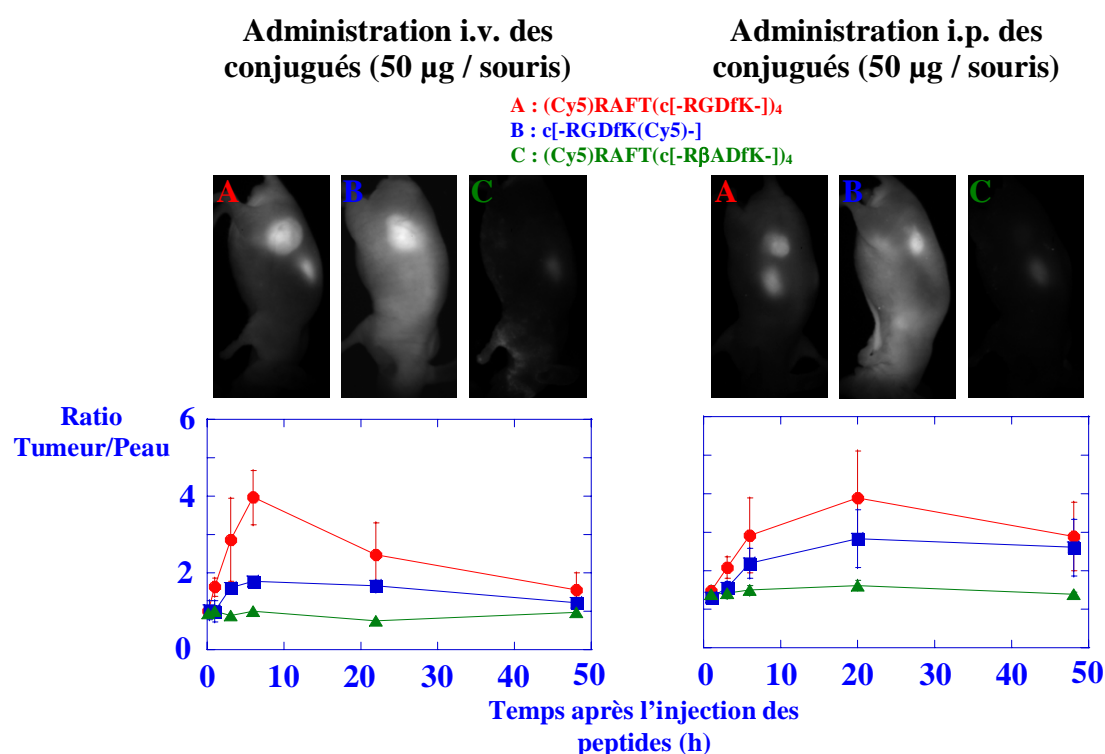


Figure 72 : Imagerie de tumeurs s.c. localisées pré-établies du type IGR-OV1 chez des souris Swiss Nude par les ligands -RGD- conjugués à la Cyanine 5 administrés par i.v. ou i.p. (50 µg / souris).

Le ligand multivalent (**A**) détecte les tumeurs sous-cutanées plus spécifiquement que le ligand monovalent (**B**). Les deux modes d'administration des peptides (i.v. et i.p.)

conduisent à des cinétiques différentes de distribution du conjugué multivalent (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ dans la tumeur. La concentration du peptide dans la tumeur est plus rapide dans le cas d'une administration par voie intra-veineuse : le signal maximum est obtenu 6 h après l'injection des peptides alors qu'il est obtenu seulement 20 h après l'injection des peptides par voie intrapéritonéale.

E.4.3 – Ciblage de métastases intra-péritonéales.

Nous avons, dans un second temps, évalué la capacité de nos ligands à cibler des nodules métastatiques du modèle IGR-OV1, de statut $\alpha_v\beta_3$ positif, disséminés dans la cavité péritonéale. Ces métastases artificielles ont été obtenues par injection de cellules tumorales IGR-OV1 par voie intrapéritonéale. Comme précédemment, les peptides conjugués à la Cyanine 5, solubilisés dans du PBS, ont été administrés de façon systémique, en une seule fois, par voie intraveineuse à raison de 50 μg (200 μL) de conjugué par souris :

		Quantité de produit injectée
Conjugué tétravalent	(Cy5)RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 81	50 μg (11,0 nmol – 55 μM)
Homologue -RβAD- contrôle	(Cy5)RAFT(c[-R β ADfK-]) ₄ 82	50 μg (10,8 nmol - 54 μM)
Conjugué monovalent	c[-RGDfK(Cy5)-] 83	50 μg (39 nmol – 195 μM)

L'imagerie des souris anesthésiées montre que le conjugué multivalent (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ se localise effectivement dans des structures abdominales alors qu'aucun signal n'est détecté avec l'homologue -R β AD- contrôle. (cf. Figure 73, A)

Les animaux sacrifiés ont été une seconde fois imagés après ouverture ventrale de la peau et extraction des muscles abdominaux. Le signal de fluorescence du conjugué (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ est alors très intense dans les métastases tandis que l'homologue contrôle a été complètement éliminé. (cf. Figure 73, B) Notons que les organes de filtration et d'élimination, comme les poumons, le foie ou la rate, ne sont pas marqués. Par contre, une élimination rapide de ces composés par les reins est observée. Le conjugué monovalent c[-RGDfK(Cy5)-] est également détecté dans les métastases. Cependant, davantage de marquage non spécifique, notamment dans les intestins, est obtenu avec ce composé.

Les nodules tumoraux de chaque souris ont ensuite été extraits, fixés, coupés et observés par microscopie de fluorescence biphotonique dans le canal de fluorescence de la Cyanine 5. Dans le cas des animaux traités par le conjugué multivalent (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄, on observe un fort marquage extracellulaire et cytoplasmique des cellules tumorales et des cellules endothéliales du stroma tumoral. (cf. Figure 73, C) Le marquage des

cellules tumorales est en accord avec l'immunomarquage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Précisons néanmoins que les anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$ disponibles ne se fixant pas sur l'intégrine murine, seule la comparaison des marquages avec le peptide et l'anticorps a pu être réalisée pour l'hétérodimère humain des cellules tumorales et non pour l'intégrine murine des vaisseaux tumoraux.

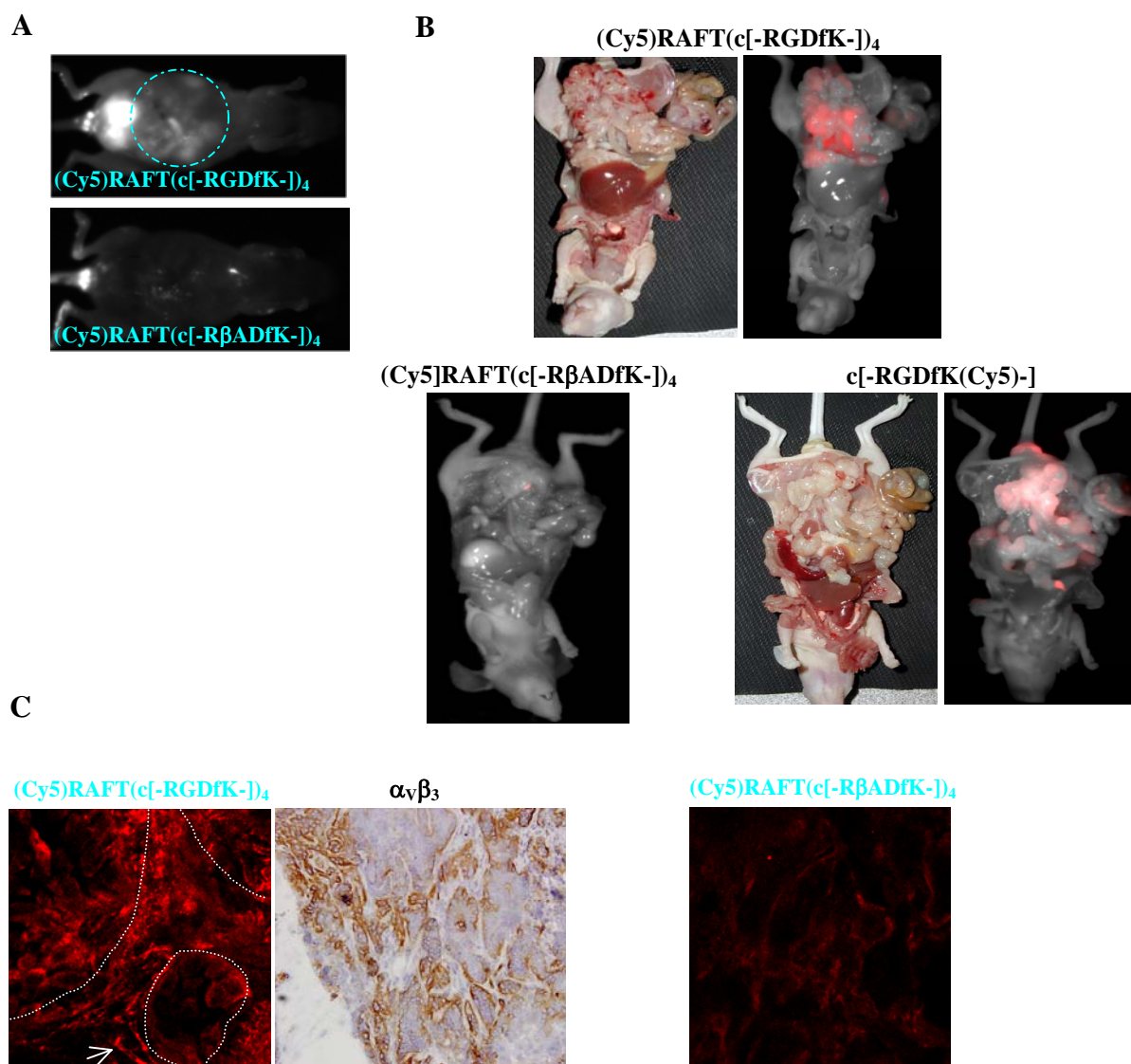


Figure 73 : Imagerie de métastases artificielles IGR-OV1 péritonéales chez des souris Swiss Nude par les ligands -RGD- conjugués à la Cyanine 5 administrés par i.v. (50 μg / souris). A/ Clichés de macroscopie de fluorescence (Cy5) des animaux anesthésiés ; B/ Clichés de macroscopie en transmission et de fluorescence des animaux sacrifiés ; C/ Clichés de microscopie de fluorescence (Cy5) des coupes de tumeurs et de microscopie en transmission après marquage immunohistologique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ humaine (cellules tumorales).

Ces nouveaux résultats montrent de l'efficacité de notre conjugué multivalent à cibler des tumeurs métastatiques $\alpha_V\beta_3$ positives.

E.5. Étude de l'élimination urinaire du conjugué (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄.

Une étude simple a pu être engagée à l'issue des expérimentations non-invasives précédentes pour estimer la dégradation du ligand multivalent. Cette étude a été réalisée sur les urines des animaux préalablement traités par les composés conjugués à la cyanine 5.

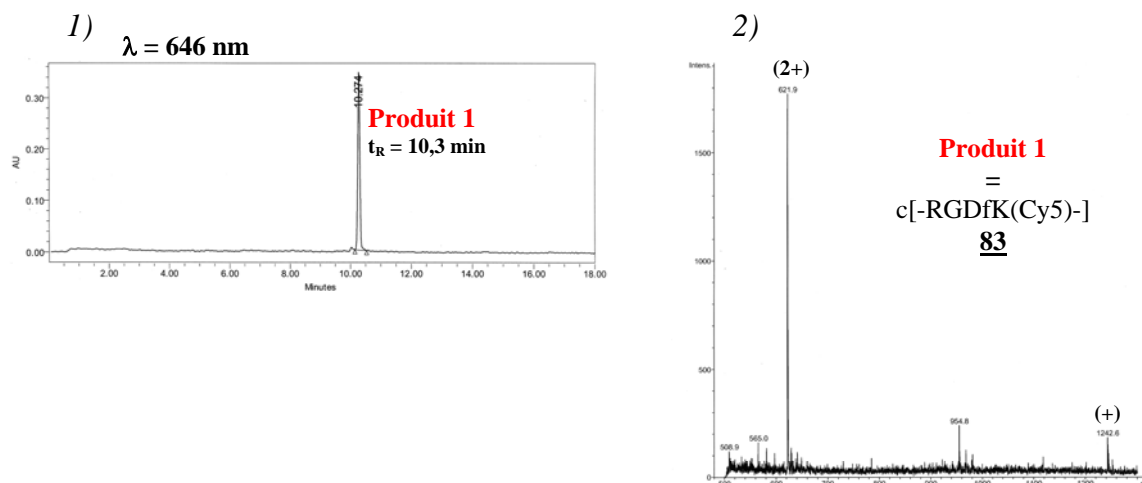
Les urines des souris ont été collectées entre 2 et 6 h après l'administration systémique (i.v.) des solutions des différents peptides conjugués à la Cy5 (50 μ g conjugué / souris). Les échantillons d'urine ont été analysés par CLHP et spectrométrie de masse. Il n'est pas possible d'analyser directement par spectrométrie de masse toutes les espèces présentes dans les échantillons bruts car l'urée précipite dans le capillaire d'injection de l'appareil. Les composés sont d'autre part présents en trop faible quantité pour envisager une dilution des échantillons qui permettrait de contourner ce problème. Les échantillons bruts d'urines ont donc dans un premier temps été soumis à une analyse CLHP. Les composés absorbant à la longueur d'onde d'absorption de la cyanine 5 (646 nm) ont été isolés et soumis à une analyse par spectrométrie de masse électrospray. (cf. Figure 74)

Dans le cas du ligand monovalent c[-RGDfK(Cy5)-] **83**, le fluorochrome est retrouvé dans les urines sous la forme d'un seul produit (**produit 1**) correspondant au conjugué intact. Dans le cas du conjugué multivalent (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **81** comme dans celui du composé contrôle (Cy5)RAFT(c[-R β ADfK-])₄ **82**, les chromatogrammes de CLHP à 646 nm présentent essentiellement 2 produits dans les proportions 5,5:1. Le produit majoritaire (**produit 2**) est un produit de dégradation du conjugué. L'analyse par spectrométrie de masse a montré qu'il pourrait s'agir du composé H-K(Cy5)-OH formé par coupure enzymatique du châssis cyclodécapeptidique RAFT. Le produit minoritaire (**produit 3**) correspond au conjugué intact.

Le conjugué multivalent est donc éliminé par voie urinaire à 15% sous forme intacte et à 85% sous une forme biotransformée. Le ligand monovalent est lui, du fait de sa petite taille, épuré par le rein et éliminé à 100% sous une forme intacte non-catabolisée. Il paraît indispensable à l'issue de cette étude de réaliser une étude approfondie des voies de

dégradation du ligand multivalent dans l'organisme et de déterminer son niveau de dégradation dans le sang.

A Souris traitées par le conjugué monovalent c[-RGDfK(Cy5)-] 83



B Souris traitées par le conjugué multivalent (Cy5)RAFTc[-RGDfK-]₄ 81

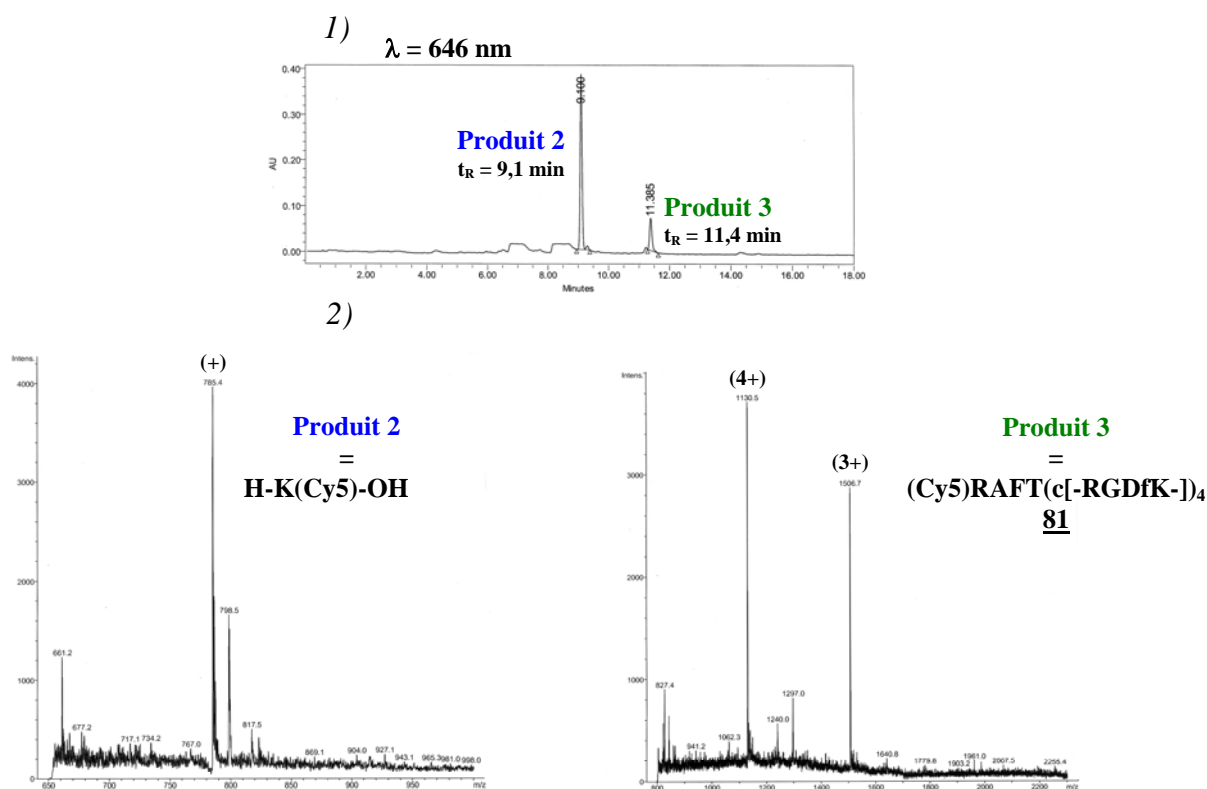


Figure 74 : Étude de l'élimination urinaire des ligands conjugués à la Cy5. A/ Analyse d'un échantillon d'urine d'une souris injectée par i.v. par le conjugué monovalent c[-RGDfK(Cy5)-] 83 : 1) Analyse CLHP de l'échantillon brut d'urine (C₁₈, 646 nm, 5-60% B en 15 min) ; 2) Spectre MS-ESI du **produit 1** isolé ; B/ Analyse d'un échantillon d'urine d'une souris injectée par i.v. par le conjugué multivalent (Cy5)RAFTc[-RGDfK-]₄ 81 : 1) Analyse CLHP de l'échantillon brut d'urine (C₁₈, 646 nm, 5-60% B en 15 min) ; 2) Spectres MS-ESI des produits **2** et **3** isolés.

E.6. Étude de l'activité anti-tumorale du ligand multivalent administré par voie systémique.

Ayant démontré une localisation spécifique dans les tumeurs, quelque-soit leur statut $\alpha_v\beta_3$, de nos conjugués multivalents administrés par voie intraveineuse, nous avons tenté d'évaluer leur activité anti-tumorale lors d'une administration par voie systémique.

Pour cela, des cellules du modèle TS/Apc ou IGR-OV1 ont été inoculées en sous-cutanée dans le dos de souris Swiss Nude. Lorsque les tumeurs ont atteint une dimension de l'ordre de $3 \times 3 \text{ mm}^2$, les ligands ont été injectés de façon répétée en intrapéritonéale trois fois par semaine pendant 2 (tumeurs TS/Apc) ou 3 semaines (tumeurs IGR-OV1), soit :

		Dose étudiée
Ligand tétravalent	RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 50	100 µg/j/souris
Homologue -RβAD- contrôle	RAFT(c[-RβADfK-]) ₄ 54	100 µg/j/souris
Ligand monovalent	c[-RGDfK-] 35	100 µg/j/souris

La taille des tumeurs a été mesurée tout au long de l'expérience. Les résultats obtenus ne montrent aucun effet du ligand multivalent ni du ligand monovalent sur la progression des tumeurs. En comparaison avec les résultats obtenus lors de l'administration du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ en intra-tumoral, ces résultats suggèrent que la quantité de peptide administré par i.p. atteignant la tumeur n'est pas suffisante pour exercer une activité cytotoxique. Ceci peut provenir d'une dose trop faible ou d'un problème de dégradation. Dans la littérature, l'activité antitumorale du cyclopentapeptide a été observée à une dose très supérieure à celle employée dans nos conditions (1,2 mg/j/souris).⁶⁷ Il est nécessaire d'envisager une étude *in vivo* plus complète pour déterminer la dose de peptide efficace (effet dose) et d'étudier la dégradation du peptide dans le sang.

E.7. Conclusion.

Ces études *in vivo* chez la souris Nude nous ont permis de mettre en évidence le ciblage efficace et la détection de tumeurs localisées ou métastatiques par le conjugué multivalent (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ administré par voie systémique. Ce composé, injecté

⁶⁷ Buerkle, M. A.; Pahernik, S. A.; Sutter, A.; Jonczyk, A.; Messmer, K.; Dellian, M. Inhibition of the α_v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours *in vivo*. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 788-795.

par intraveineuse, cible la néo-vascularisation de tumeurs $\alpha_v\beta_3$ négatives sous-cutanées. Administré par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, il se concentre activement dans des tumeurs sous-cutanées $\alpha_v\beta_3$ positives et détecte des nodules métastatiques disséminés dans la cavité intra-péritonéale. Nos résultats montrent, de manière générale, une localisation plus spécifique des tumeurs avec le conjugué multivalent qu'avec le conjugué monovalent de référence.

Un effet anti-prolifératif significatif a été obtenu lorsque le ligand multivalent a été injecté en intra-tumorale. En revanche, aucun effet n'a été observé à la dose étudiée lorsqu'il est administré par voie systémique.

L'ensemble de ces résultats nous a conduit à envisager la conjugaison de molécules toxiques afin d'accroître la toxicité des ligands RAFT(c[-RGDfK-])₄ et de vectoriser spécifiquement des drogues vers les tumeurs.

F. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE DE LA CYTOTOXICITÉ DES VECTEURS DE DROGUES.

F.1. Objectif des travaux.

Cette dernière partie, très succincte, expose les résultats des tests préliminaires que nous avons réalisés sur le vecteur de la séquence (KLAKLAK)₂, (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄. Les deux séquences cytotoxiques (KLAKLAK)₂, portées par ce conjugué, sont rattachées sur la face inférieure du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ par des liens éthers d'oxime. Nous avons tenté d'évaluer la cytotoxicité de cette structure et de mettre en évidence son activité apoptotique.

F.2. Évaluation de la toxicité du conjugué (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **91** sur des cellules HEK293(β₃).

Nous avons mesuré la capacité du vecteur (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ à induire l'apoptose des cellules HEK293(β₃) au moyen d'un test classique à l'Annexine V et à l'iodure de propidium. L'Annexine V se fixe sur les résidus phosphatidylsérines de la membrane cellulaire, externalisés par « flip-flop » lors du déclenchement des mécanismes d'apoptose. Elle permet alors de détecter les cellules en phase d'apoptose précoce. L'iodure de propidium, imperméant membranaire, permet lui de discriminer les cellules en apoptose tardive ou nécrotiques dont l'intégrité membranaire est altérée.

Des cellules adhérentes HEK293(β₃), cultivées pendant 24 h en plaques 24 puits, ont donc été mises en présence de 0,5 μM des différents composés introduits dans du milieu complet :

<u>Conjugué -RGD-/(KLAKLAK)₂</u>	
Conjugué tétravalent	(KLA) ₂ RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 91
Conjugué monovalent	c[-RGDfK(KLA)-] 93
<u>Contrôles</u>	
Homologue -RβAD- contrôle	(KLA) ₂ RAFT(c[-RβADfK-]) ₄ 92
Ligand tétravalent	RAFT(c[-RGDfK-]) ₄ 50
Séquence (KLAKLAK) ₂	SGG(KLAKLAK) ₂ 84

La concentration des peptides a été choisie à 0,5 μ M pour limiter le décollement des cellules et s'affranchir des phénomènes d'apoptose induits par l'inhibition d'adhésion des cellules (Anoïkis).

Après 24 h d'incubation à 37°C en présence des différents peptides, les cellules sont récupérées, soumises à un double marquage par l'Annexine V conjuguée à la FITC et par l'iodure de propidium, puis analysées par FACS. (cf. Figure 75)

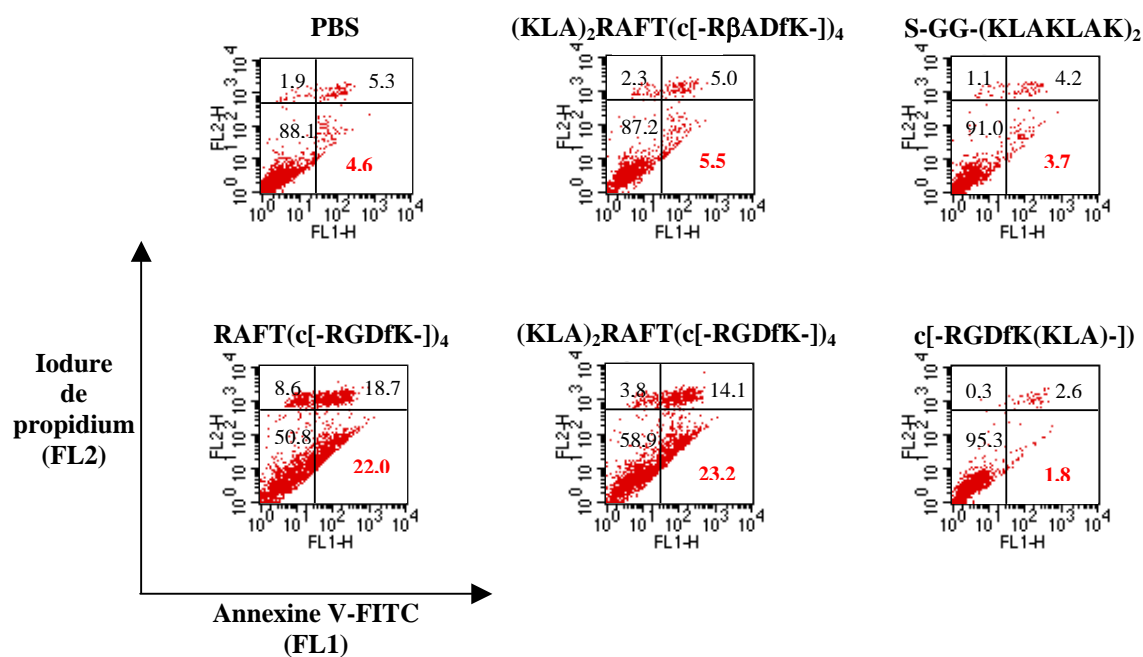


Figure 75 : Quantification par FACS de l'apoptose des cellules HEK293(β_3) induite par les différents peptides par double marquage à l'Annexine V-FITC et à l'Iodure de Propidium.

Les résultats obtenus montrent effectivement une augmentation significative du nombre de cellules en apoptose précoce (marquées par le conjugué Annexine V-FITC et non marquées par l'iodure de propidium) dans la condition d'incubation avec le vecteur (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ (23,2%) par rapport à la condition sans peptide (PBS, 4,6%). Aucune toxicité n'est observée avec l'homologue contrôle (KLA)₂RAFT(c[-RβADfK-])₄ (5,5%), ni avec la séquence (KLAKLAK)₂ dépourvue de système de vectorisation (3,7%). Aucune toxicité du conjugué monovalent c[-RGDfK(KLA)-] n'est également détectée aux concentrations étudiées. Toutefois, il n'est pas possible de distinguer les situations observées avec le vecteur de drogue (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ et avec le système de ciblage seul, dépourvu de module cytotoxique, RAFT(c[-RGDfK-])₄. Chacun de ces deux composés induit fortement l'apoptose des cellules. Cette observation suggère alors que la toxicité du vecteur

(KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ n'est pas supérieure à celle du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ dans ces conditions expérimentales.

Plusieurs causes pourraient être à l'origine de ce phénomène :

i) la toxicité du peptide multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ est déjà trop importante pour observer l'effet additionnel de la séquence (KLAKLAK)₂ aux concentrations testées,

ii) la fraction de conjugué pénétrant les cellules est insuffisante pour observer l'activité cytotoxique propre à la séquence (KLAKLAK)₂. Nous utilisons une concentration en conjugué de 0,5 µM, alors que la toxicité de la séquence (KLAKLAK)₂ est décrite à 100 µM,³⁵

iii) la séquence peptidique (KLAKLAK)₂, non protégée sur son extrémité C-terminale, est dégradée dans la cellule par les peptidases avant d'exercer son activité cytotoxique,

iv) des phénomènes d'encombrement ou d'interaction entre les deux séquences (KLAKLAK)₂ du conjugué empêchent leur fixation à la membrane mitochondriale,

v) la présence du module de vectorisation sur l'extrémité N-terminale de la séquence (KLAKLAK)₂ inhibe son activité. Une fois internalisé, le peptide (KLAKLAK)₂ n'est pas libre d'exercer son activité mitochondriale car il reste solidaire du système de vectorisation RAFT(c[-RGDfK-])₄.

L'absence de différence entre les cytotoxicités du ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ et du vecteur (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ dans ces tests préliminaires est très certainement due au fait que le RAFT(c[-RGDfK-])₄ à 0,5 µM pendant 24 h sur les cellules est toxique par décollement et que la séquence (KLAKLAK)₂ rattachée au vecteur n'est pas suffisamment active pour observer une toxicité supérieure.

Ces résultats nous ont incité à envisager une stratégie différente de conjugaison du peptide (KLAKLAK)₂ au ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄. L'absence de libération de la séquence cytotoxique du système de vectorisation pouvant être un facteur limitant, nous avons conjugué le peptide (KLAKLAK)₂ par un lien disulfure sensible aux conditions réductrices intracellulaires. Nous avons également préféré l'introduction d'un seul motif cytotoxique plutôt que deux. Cette même stratégie a été appliquée pour l'obtention des conjugués avec la doxorubicine et la chaîne A de la ricine.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Nos travaux ont été consacrés à la conception, à la synthèse et à la caractérisation des propriétés biologiques de nouveaux vecteurs synthétiques ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'expression spécifique de cette intégrine sur la vascularisation tumorale en fait une cible judicieuse pour des vecteurs d'agents cytotoxiques. Son rôle dans la formation des vaisseaux sanguins tumoraux permet, de surcroît, d'envisager de déréguler ses fonctions pour inhiber la néo-angiogenèse, la progression et l'invasion tumorale. Notre système de vectorisation est conçu à partir d'un châssis moléculaire cyclodécapeptidique RAFT. Ce gabarit présente deux faces d'adressage indépendantes permettant de séparer le domaine des ligands, assurant le ciblage du vecteur, des molécules vectorisées. Cette caractéristique est essentielle pour garantir l'indépendance des deux fonctions et assurer que les molécules transportées par le vecteur n'affectent pas les propriétés de reconnaissance des ligands. Le deuxième atout du squelette cyclodécapeptidique RAFT réside dans la présentation de quatre résidus lysines sur sa face supérieure permettant de conférer au vecteur une fonction de ciblage multivalente. Celle-ci est assurée par la présentation multimérique de motifs cyclopentapeptidiques c[-RGDfK-], ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Des gabarits RAFTs à un domaine ont tout d'abord été employés pour synthétiser plusieurs architectures multivalentes du ligand c[-RGDfK-]. La conjugaison des multiples copies du ligand sur le RAFT a été réalisée par des liaisons éthers d'oxime, connues pour leur stabilité *in vitro* et *in vivo*. L'excellente chimiosélectivité de ces liaisons nous a permis d'accéder efficacement aux conjugués multivalents RAFT(c[-RGDfK-])_n, d'indice de valence 1, 2, 3, 4 et 16. En particulier, l'architecture hexadécavalente RAFT(c[-RGDfK-])₁₆ a été synthétisée par deux réactions d'oximation successives : la première pour l'introduction de squelettes polylysines sur le RAFT, la seconde pour le couplage des seize motifs ligands. Aucun problème de réactivité dû à l'encombrement stérique, ni aucune réaction parasite de transoximation n'ont été observés.

Les différentes versions RAFT(c[-RGDfK-])_n (n={1,2,3,4,16}) ont permis d'étudier, *in vitro* sur cellules, l'effet du paramètre de multivalence. Les tests d'inhibition de la fixation de l'anticorps monoclonal 23C6 sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont montré la participation des différents motifs c[-RGDfK-] des structures multivalentes au phénomène. La structure monovalente RAFT(c[-RGDfK-])₁ n'a un effet significatif qu'à forte concentration (20 μ M), tandis que le cyclopentapeptide c[-RGDfK-] seul n'a lui aucun effet inhibiteur. Ceci rend compte de la part

jouée par l'encombrement de l'architecture RAFT(c[-RGDfK-])₄ fixée sur l'intégrine dans le phénomène d'inhibition. Les ligands di-, tri- et tétravalents présentent, eux, une activité inhibitrice à des concentrations de quelques dizaines de nM, augmentant graduellement avec le nombre de motifs c[-RGDfK-] sur le RAFT. En revanche, une diminution de l'effet d'inhibition a été observée avec le conjugué hexadécavalent, traduisant une perte d'affinité de cette structure pour le récepteur, probablement due à son encombrement stérique.

Des gabarits RAFTs à deux domaines ont, dans un deuxième temps, été employés pour conjuguer la structure tétravalente RAFT(c[-RGDfK-])₄ à diverses molécules de détection, en vue de l'étude de son activité biologique *in vitro* et *in vivo*. Diverses stratégies de synthèse ont été développées pour incorporer la biotine, la fluorescéine, la cyanine 5 et la tyrosine sur la face inférieure du ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄ ou de son homologue contrôle RAFT(c[-RβADfK-])₄, indispensable aux tests biologiques. La chimiosélectivité de la réaction d'oximation a permis de mettre au point des synthèses convergentes, dans lesquelles les motifs cyclopentapeptidiques sont introduits dans la dernière étape sur le RAFT marqué par l'agent de détection, et ainsi d'accéder en parallèle aux conjugués souhaités ainsi qu'à leurs homologues -RβAD-.

Le gain apporté par la présentation tétravalente clusterisée du motif c[-RGDfK-] sur le châssis RAFT a été mis en évidence *in vitro* et *in vivo*.

Les tests *in vitro* ont été essentiellement réalisés sur le modèle cellulaire HEK293(β₃) exprimant fortement le récepteur α_vβ₃. Le ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄ inhibe l'adhésion de ces cellules sur la vitronectine avec une efficacité 2,5 fois supérieure au cyclopentapeptide c[-RGDfK-]. De fait, il est également plus puissant pour induire l'anoikis des cellules endothéliales primaires HUVEC. *In vivo*, cette propriété anti-angiogénique se traduit par le ralentissement de la progression de tumeurs A549, de statut α_vβ₃ négatif, pré-établies chez des souris traitées en intra-tumorale. Dans ces expériences, l'effet anti-prolifératif a été obtenu à une dose 400 fois inférieure à celle employée dans la littérature avec le cyclopentapeptide c[-RGDfV-] sur des tumeurs de mélanomes A375, de statut α_vβ₃ positif.

En termes de localisation cellulaire, le ligand multivalent RAFT(c[-RGDfK-])₄ se localise fortement dans les jonctions intercellulaires induisant le renforcement des contacts cellule-cellule. Nous ne savons pas si ce phénomène résulte d'une signalisation médiée par le peptide ou d'un pontage physique de deux intégrines de cellules adjacentes par les motifs c[-RGDfK-] du ligand. Cette propriété pourrait être mise à profit pour associer au vecteur des drogues

induisant la lyse de la membrane cellulaire. Le ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄ est d'autre part internalisé en partie par une endocytose récepteur-dépendante alors que le cyclopentapeptide c[-RGDfK-] est décrit pour être internalisé de façon non-spécifique par diffusion. L'internalisation du RAFT(c[-RGDfK-])₄ est une propriété essentielle en vue de son utilisation comme vecteur de drogues. La connaissance du mode d'internalisation est importante pour orienter le choix des drogues vectorisées ainsi que leur mode de conjugaison au vecteur.

En termes de mode d'interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, nos résultats montrent également une différence importante entre le cyclopentapeptide et le tétramère RAFT(c[-RGDfK-])₄. Le site de fixation du cilengitide sur la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et ses points de fixation sur les deux protéines de l'hétérodimère ont été identifiés et décrits dans la littérature (étude aux rayons X du complexe ternaire cristallisé formé par l'intégrine et le cilengitide en présence de cations manganèse). Nous ne savons pas si le cyclopentapeptide et le RAFT(c[-RGDfK-])₄ se fixent sur le même site de l'intégrine, ni si plusieurs motifs du ligand tétravalent entrent en interaction directe avec le récepteur. Une étude aux rayons X pourrait apporter une réponse. Nous avons initié des travaux de modélisation moléculaire sur le modèle du récepteur purifié (expériences de Docking) pour évaluer la pertinence de ces deux éventualités. Dans le cadre de nos tests cellulaires, plusieurs phénomènes mettent en évidence un mode d'interaction différent du c[-RGDfK-] et du RAFT(c[-RGDfK-])₄ avec l'intégrine. En particulier, l'inhibition de la reconnaissance de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par son anticorps spécifique 23C6, et la réduction de la mobilité des intégrines, sont des phénomènes provoqués par le ligand tétravalent et non observés avec le cyclopentapeptide. La perte de mobilité des récepteurs est habituellement attribuée à la formation de clusters. Sur la considération de la taille du ligand RAFT(c[-RGDfK-])₄ devant celle de l'intégrine, il semble difficile d'imaginer le pontage de deux hétérodimères par le ligand pour la formation de clusters. En revanche, si le ligand ne peut ponter seul plusieurs récepteurs, il est envisageable qu'une coopération entre les ligands induise une signalisation favorisant le regroupement des intégrines. La diminution de la mobilité des récepteurs $\alpha_v\beta_3$ peut également provenir de l'accumulation de protéines intracellulaires sur l'extrémité cytoplasmique de la chaîne β_3 induite par l'activation de l'intégrine par le ligand. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour conclure. Une approche *in vitro* de précipitation quantitative du ligand avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ purifiée pourrait permettre de déterminer le rapport ligand/récepteur. Une approche de biologie

moléculaire pourrait, elle, permettre d'identifier les partenaires protéiques associés à la partie intracellulaire du récepteur ainsi que les voies de signalisation activées.

In vivo, le conjugué (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ a permis d'imager, par macroscopie de fluorescence, des tumeurs localisées ou métastatiques implantées chez des souris. Injecté par intraveineuse, il détecte les micro-vaisseaux de tumeurs sous-cutanées de statut $\alpha_v\beta_3$ négatif. Administré par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, il détecte des tumeurs $\alpha_v\beta_3$ positives sous-cutanées et des nodules métastatiques disséminés dans le péritoine. Jusque très récemment, l'imagerie de fluorescence n'avait pas encore été décrite avec le cyclopentapeptide.

En termes d'activité anti-tumorale, un effet anti-prolifératif significatif a été obtenu lorsque le ligand multivalent a été injecté en intra-tumorale. Il faut envisager de déterminer sa dose efficace lorsqu'il est administré par voie systémique.

Dans leur ensemble, nos résultats *in vitro* et *in vivo* soutiennent la pertinence de l'utilisation du RAFT(c[-RGDfK-])₄ comme système de vectorisation vers les tumeurs.

Plusieurs vecteurs de drogues ont par la suite été synthétisés. Différentes stratégies de conjugaison des drogues ont, pour ce faire, été développées. L'approche dans laquelle les différents modules fonctionnels sont introduits successivement sur la matrice RAFT par oximation chimiosélective a été validée pour la conjugaison du peptide cytotoxique (KLAKLAK)₂. L'efficacité de la stratégie est remarquable et aucune réaction parasite de transoximation n'a, une fois encore, été décelée. Une méthode de conjugaison des drogues par pont disulfure a également été développée. L'intérêt de l'utilisation du pont disulfure est double : elle permet non seulement d'envisager la libération intra-cellulaire de la molécule cytotoxique vectorisée, mais aussi de conjuguer à notre vecteur des protéines toxiques présentant dans leur séquence des résidus cystéines. L'intermédiaire synthétique (Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-])₄ a été synthétisé pour permettre d'accéder de manière convergente aux conjugués avec le peptide (KLAKLAK)₂, la doxorubicine et la chaîne A de la ricine. Dans ce dernier cas, le conjugué a été mis en évidence de manière indirecte par une méthode de spectrométrie de masse. Une caractérisation par des gels d'électrophorèse ou par spectrométrie de masse SELDI-TOF est à envisager.

La diversité des molécules conjuguées au vecteur montre la modularité de notre approche synthétique. Cette diversité va, en outre, permettre d'évaluer les capacités de notre système pour la vectorisation de composés de tailles, propriétés physiques et modes d'action différents. Il serait pertinent à partir de l'intermédiaire synthétique

(Cys(Npys))RAFT(c[-RGDfK-])₄ de conjuguer par pont disulfure une grande variété de drogues différentes pour synthétiser une librairie de produits et évaluer leur efficacité en vue d'applications de « thérapie personnalisée » : la drogue conjuguée au vecteur pourrait être adaptée en fonction du type de chimiorésistance de la tumeur.

Dans leur ensemble, nos travaux ont apporté des résultats nouveaux dans le domaine des ligands peptidiques -RGD- ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ils ont également permis de valider l'utilisation du RAFT(c[-RGDfK-])₄ comme vecteur synthétique et permettent aujourd'hui d'envisager des perspectives de travail prometteuses tant dans le domaine des sondes moléculaires pour l'imagerie de la néo-angiogenèse que dans le développement de vecteurs de drogues pour la thérapie anti-cancéreuse.

Nos résultats confortent de surcroît le développement des gabarits cyclodécapeptidiques RAFT pour des applications de vectorisation. Notre laboratoire tente aujourd'hui d'explorer leur utilisation pour cibler d'autres récepteurs.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Protocoles de synthèse.

Nous avons pris la liberté de décrire la partie expérimentale du manuscrit en anglais. Ce document pourra alors être employé par tous les utilisateurs du laboratoire, y compris les collaborateurs étrangers, et constitue par ailleurs un outil profitable pour la rédaction des publications relatant nos travaux.

I.1. Materials and equipments.

I.1.1 – Reagents and solvents.

Protected amino acids were obtained from Advanced ChemTech Europe (Brussels, Belgium), Bachem Biochimie SARL (Voisins-les-Bretonneux, France), France Biochem SA (Meudon, France), Merck Eurolab (Fontenay-sous-Bois, France) or Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences - VWR, Limonest, France). PyBOP[®] was purchased from Calbiochem-Novabiochem. Rink-amide MBHA[®] resin was obtained from Calbiochem-Novabiochem, Fmoc-Gly-SASRIN[®] resin from Bachem Biochimie SARL and 2-chlorotritylchloride[®] and H-Lys(Boc)-2-chlorotrityl[®] resins from Advanced ChemTech Europe. Other reagents were obtained from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Acros (Noisy-le-Grand, France). Cy5NHS ester was purchased from Amersham Biosciences (Orsay, France).

I.1.2 – HPLC analysis.

RP-HPLC analyses were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller, a Waters 2487 Dual Absorbance Detector and a Waters In-Line Degasser. Two analytical columns were used : the Nucleosil 120 Å 3 µm C₁₈ particles, 30 x 4 mm² was operated at 1.3 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 15 min run time and the Nucleosil 100 Å 3 µm C₁₈ particles, 250 x 4.6 mm² was operated at 1 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 30 min run time. UV monitoring was performed most of the time at 214 nm and

250 nm. Solvent A consisted of H₂O containing 0.1% TFA and solvent B of CH₃CN containing 9.9% H₂O and 0.1% TFA. Water was of Milli-Q quality and was obtained after filtration of distilled water through a Milli-Q[®] cartridge system. CH₃CN and TFA were of HPLC use quality and were obtained from Carlo-Erba and SdS (Peypin, France) respectively.

I.1.3 – HPLC purification.

RP-HPLC purifications were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller and a Waters 2487 Dual Absorbance Detector. Degassing of solvents was performed with 50 mL.min⁻¹ nitrogen. The preparative column, Delta-Pak[™] 300 Å 15 µm C₁₈ particles, 200 x 25 mm² was operated at 22 mL.min⁻¹ with linear gradient programs in 30 min run time. Solvents A and B were the same than the ones used in RP-HPLC analysis (I.1.2).

I.1.4 – Mass spectrometry analysis.

Electron spray ionization (ESI-MS) mass spectra were obtained either on a VG Platform II (Micromass) with the kind help of W. Monetta (LEDSS, UJF Grenoble, P. Dumy) and D. Ruffieu (Laboratoire de Biochimie C, CHU-Grenoble, V. Ducroc) or on an Esquire 3000 (Bruker) by W. Monetta and C. Jamin (LEDSS, UJF Grenoble, P. Dumy). Desorption Chemical Ionisation mass spectra were obtained on a Thermofinnigan Polaris Q with Direct Exposure Probe by J-P. Gaude (LEDSS, UJF Grenoble, P. Dumy). Surface enhanced laser desorption/ionization - time of flight (SELDI-TOF) was performed on a CIPHERGEN (Ciphergen Biosystems) with NP20 and SAX2 protein chips by K. Sadoul (LEDAC, IAB Grenoble, M. Block).

I.1.5 – NMR spectrometry.

NMR spectra were recorded on BRUKER AC200 or Avance 300 and U⁺500 Varian spectrometers with the kind help of J. GARCIA (LEDSS, UJF Grenoble, P. Dumy). Chemical shifts are expressed in ppm and calculated taking the solvent peak as an internal reference (DMSO : 2.5 ppm). Coupling constants are in Hz and signals are described using the usual abbreviations : s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet)...

I.2. General procedures for the syntheses of peptides.

I.2.1 – Syntheses of linear protected peptides by SPPS.

Assembly of all linear protected peptides was performed manually by solid-phase peptide synthesis (SPPS) using the standard 9-fluorenylmethoxycarbonyl/tertbutyl (Fmoc/tBu) protection strategy. Device consisted in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit. The latter allowed elimination of excess reagents and solvents under compressed air. Before use, the vessel was treated for 12 h (typically overnight) with $(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}_2$ as lubricant to prevent resin beads from sticking to the glass inner wall during the synthesis. It was then carefully washed with CH_2Cl_2 until complete acid trace clearance. At the beginning of the synthesis and after each ether washing, the resin was washed and swollen twice with DCM (20 mL/g resin) for 15 min and once with DMF (20 mL/g resin) for 15 min. DMF used for the synthesis was extemporaneously degassed under argon for 1 h.

I.2.2 – Coupling of N^α -Fmoc-protected amino acids.

Coupling reactions were performed using, relative to the resin loading, 1.5-2 eq. of N^α -Fmoc-protected amino acid in situ activated with 1.5-2 eq. PyBOP and 3-4 eq. DIPEA in DMF (10 mL/g resin) for 30 min. The resin was then washed twice with DMF (20 mL/g resin) for 1 min and twice with DCM (20 mL/g resin) for 1 min.

I.2.3 – Cleavage of N^α -Fmoc protecting groups.

N^α -Fmoc protecting groups were removed by treatment with piperidine/DMF (1:4) (10 mL/g resin) for 10 min. The process was repeated three times and the resin was further washed five times with DMF (10 mL/g resin) for 1 min. The completeness of the deprotection was checked by UV measurement. Indeed, Fmoc groups releasing afforded dibenzofulvene whose adduct with piperidine absorbs light in the UV range ($\lambda = 299 \text{ nm}$, $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Cleavage and washing solutions were thus together collected and the volume of the solution was adjusted to a known value (V) with MeOH. Absorbance of this solution at 299 nm gave the number of Fmoc protecting groups released from the cleavage according to the Beer-Lambert relation :

$$n_{\text{Fmoc}} = \frac{\text{OD} (299 \text{ nm}) \times V}{\epsilon (299 \text{ nm}) \times l} \quad (l : \text{length of optical path})$$

This method was commonly used for the following of SPPS and to determine, in an indirect manner, the loading of the resin.

I.2.4 – Control tests during peptide sequence elongation.

Kaiser and TNBS tests were performed to check the completeness of amino acid coupling reactions.

Kaiser test required :

- a Ninhydrine (500 mg) solution in 10 mL EtOH,
- a Phenol (80 g) solution in 20 mL EtOH,
- 2 mL of a KCN 1 mM solution diluted in 100 mL Pyridine.

Three drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was heated at 80-110°C for 3 min. Remaining of free amino functions resulted in a blue coloration of the resin beads (positive Kaiser test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative Kaiser test).

TNBS test required :

- a solution of 1% trinitrobenzenesulfonic acid in DMF,
- a solution of DIPEA/DMF (1:9).

Six drops of each solution were added to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was left at r.t. for 1 min. Remaining of free amino functions resulted in a bright orange-red coloration of the resin beads (positive TNBS test). Coupling reaction with the protected amino acid should then be repeated until the beads remain colourless (negative TNBS test).

I.2.5 – Cleavage of the resin.

Synthetic linear peptides were recovered directly upon repeated acid cleavage of the resins according to the following conditions :

Resin type	Cleavage solution	Procedure
SASRIN [®]	TFA/DCM (1:99)	(10 mL/g resin) – 3 min
2-chlorotritylchloride [®]	TFA/DCM (1:99)	(10 mL/g resin) – 5 min – 3 times
Rink-amide MBHA [®]	TFA/TIS/H ₂ O (95:2.5:2.5)	(10 mL/g resin) – 2 h

The combined washings were concentrated under reduced pressure and the crude linear peptide was obtained by precipitation and triturating from ether. The peptides were analyzed by RP-HPLC and, if necessary, purified on a preparative column.

I.2.6 – Cyclization reactions of linear peptides in solution.

C- and N-termini deprotected linear peptides were dissolved in DMF (0.5 mM) and the pH of the solution was adjusted to 8-9 by addition of DIPEA. PyBOP (1.2 eq.) was added and the solution was stirred at r.t. for at least 1 h. The solvent was removed under reduced pressure and the residue dissolved in the minimum of CH₂Cl₂. Ether was added to precipitate the peptide. The latter was triturated and washed three times with ether affording crude material, which was, most of the time, further used without additional purification.

I.2.7 – Cleavage of lateral chain protecting groups in solution phase.

a) N^ε-Boc cleavage.

Removal of N^ε-Boc protecting groups was carried out in a solution containing 50% TFA in DCM for 1 h at r.t. The crude product was concentrated, triturated and washed with ether.

b) Simultaneous Boc, OtBu, Pmc cleavages.

Simultaneous removal of Boc, Pmc and OtBu protecting groups was carried out in a solution containing 95% TFA, 2.5% TIS and 2.5% H₂O for 1 h at room temperature. Fully deprotected peptides were concentrated and dissolved in water. The solution was then filtrated and lyophilized. Alternatively, the crude product was concentrated, triturated and washed with ether.

c) N^ε-Alloc cleavage.

N^ε-Alloc protecting groups were removed by dissolving the peptide in anhydrous DCM (anhydrous DMF can be added for the complete dissolution of the peptide) under argon and by adding phenylsilane (25 eq.) for 3 min and Pd(PPh₃)₄ (0.25 eq.) for 1 h at r.t. The mixture was treated with methanol for 30 min before evaporation of the solvents under reduced pressure. The product was finally triturated and washed with ether.

I.2.8 – Coupling of N^α-protected amino acids in solution.

The N^ε-deprotected lysine-containing peptide was dissolved in DMF (5 mM) and the pH was adjusted to 8-9 with DIPEA. PyBOP (1.1-1.2 eq.) and N^α-protected amino acid (1.1-1.2 eq.) were added and the reaction mixture was stirred for 1 h at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and the peptide was precipitated, triturated and washed three times with ether.

I.2.9 – Oxidative cleavage of serine by sodium periodate.

The serine deprotected-containing peptide was dissolved in H₂O (10 mM) and NaIO₄ (3-5 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 30 min to 4 h at r.t. and immediately purified by RP-HPLC.

I.2.10 – Chemoselective oxime ligations.

The RAFT (5.10⁻³ M) was dissolved either in :

- a) sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.0),
- b) sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.0)/acetonitrile (1:1), or
- c) solvent A/solvent B (1:1).

The peptide to be grafted was added (1.5 eq./site) and the reaction stirred for 1 to 24 h at r.t. The conjugate was isolated after RP-HPLC purification and lyophilised.

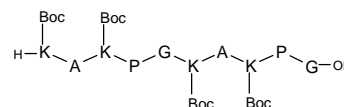
I.2.11 – Remark.

The compounds were sometimes obtained as TFA salts, either after TFA treatment or RP-HPLC purification. In these case, the quantities of compounds (mol) are calculated taking the molecular weight of the TFA salts considering all the potential sites to be protonated.

I.3. Synthesis of RAFT intermediates.

I.3.1 – Synthesis of one domain-containing RAFTs.

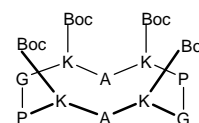
H-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G-OH : **1**



The linear decapeptide **1** was assembled on SASRIN[®] resin (500 mg, 0.53 mmol.g⁻¹) using the procedure I.2.1 to I.2.4. The peptide was released from the resin following protocol I.2.5. The free linear protected peptide was obtained as a white solid powder (297 mg) after precipitation, triturating and washing in ether. This crude material was used without additional purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 9.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-] : **2**

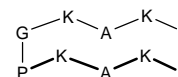


The cyclization reaction was carried out as described in protocol I.2.6 using the crude linear peptide **1** (297 mg). Precipitation and work-up in ether afforded cyclic peptide **2** as a white solid powder (265 mg). The crude was dissolved in methanol (10 mg.mL⁻¹) and purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min). Compound **2** was obtained as a white solid powder (259.1 mg, 1.9.10⁻⁴ mol).

❖ **Yield** : 72% (overall yield from first loading of SPPS)

❖ **RP-HPLC** : RT = 11.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

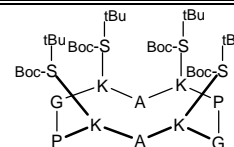
c[-P-G-K(H)-A-K(H)-P-G-K(H)-A-K(H)-] : **3**



Boc protecting groups were removed from the cyclic peptide **2** (259.1 mg, 1.9.10⁻⁴ mol) in a solution containing TFA/DCM (1:1). The mixture was stirred for 1 h at r.t. and concentrated under reduced pressure. The peptide **3** was precipitated, triturated and washed in ether and obtained as a white solid powder (269.8 mg). This material was used without further purification.

- ❖ **Yield** : quantitative
- ❖ **RP-HPLC** : RT = 12.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 30 min)
- ❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₄₄H₇₈N₁₄O₁₀ (calcd MW = 963.2 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+2H]²⁺ = 482.2, [M+3H]³⁺ = 321.8, [M+4H]⁴⁺ = 241.7

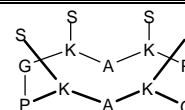
c[-P-G-K(BocS(*t*Bu))-A-K(BocS(*t*Bu))-P-G-K(BocS(*t*Bu))-A-K(BocS(*t*Bu))-] : 4



To a solution of compound 3 (150 mg, 1.10⁻⁴ mol) in 10 mL DMF, were added Boc-Ser(*t*Bu)-OH (130.5 mg, 5.10⁻⁴ mol) and DIPEA to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 30 min at r.t. and then concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound 4 which was further used without additional purification.

- ❖ **RP-HPLC** : RT = 14.0 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

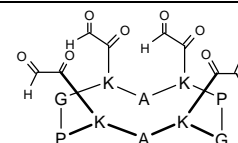
c[-P-G-K(S)-A-K(S)-P-G-K(S)-A-K(S)-] : 5



To the crude product 4 was added a solution of 10 mL TFA. After 1 h, the reaction was concentrated under reduced pressure. Compound 5 (160 mg, 9.1.10⁻⁵ mol) was obtained after precipitation and washing with ether.

- ❖ **Yield** : 91% (overall yield from 3)
- ❖ **RP-HPLC** : RT = 6.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)

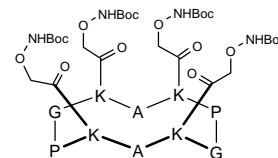
c[-P-G-K(CO-CHO)-A-K(CO-CHO)-P-G-K(CO-CHO)-A-K(CO-CHO)-] : 6



To a solution of compound 5 (160 mg, 9.1.10⁻⁵ mol) in 10 mL of aqueous solution was added NaIO₄ (64 mg, 3.10⁻⁴ mol). The reaction was stirred for 30 min at r.t. and purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) to afford compound 6 as a white powder (80 mg, 6.7.10⁻⁵ mol).

- ❖ **Yield** : 75%
- ❖ **RP-HPLC** : RT = 6.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)
- ❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₅₂H₇₈N₁₄O₁₈ (calcd MW = 1187.3 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+4H₂O+Na]⁺ = 1281.5
- ❖ **MS (ESI-MS, negative mode)** : m/z : [M-H]⁻ = 1185.7, [M-2H]²⁻ = 592.2

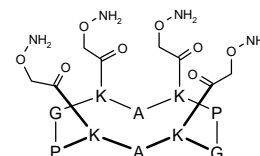
c[-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-A-K(CO-CH₂-ONHBoc)-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-A-K(CO-CH₂-ONHBoc)-] : 7



To a solution of compound 3 (151 mg, $1.1 \cdot 10^{-4}$ mol) in 10 mL anhydrous DMF were added BocNH₂CH₂COOSucc 98 (134 mg, $4.7 \cdot 10^{-4}$ mol) and DIPEA to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 30 min at r.t. and then concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound 7 which was further used without additional purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 9.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-A-K(CO-CH₂-ONH₂)-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-A-K(CO-CH₂-ONH₂)-] : 8



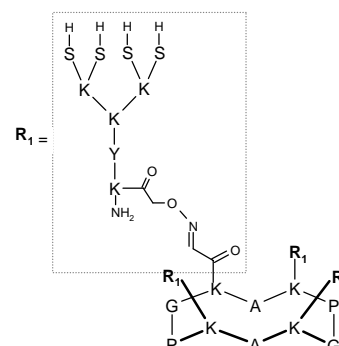
To the crude product 7 was added a solution of 10 mL TFA/CH₂Cl₂/TIS/H₂O (10:8:1:1). After 1 h, the reaction was concentrated under reduced pressure and purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min). Compound 8 was obtained after lyophilization as a white powder (127 mg, $7.4 \cdot 10^{-5}$ mol).

❖ **Yield** : 70% (overall yield from 3)

❖ **RP-HPLC** : RT = 6.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₅₂H₉₀N₁₈O₁₈ (calcd MW = 1255.4 g.mol⁻¹); m/z : [M+H]⁺ = 1255.6, [M+Na]⁺ = 1277.6, [M+K]⁺ = 1293.5

RAFT(S)₁₆ : 9



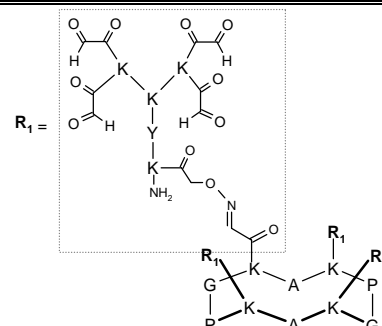
To a solution of compound 6 (5 mg, $4.2 \cdot 10^{-6}$ mol) in 1 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.0) was added the peptide 99 (33 mg, $2.0 \cdot 10^{-5}$ mol). The reaction was stirred for

2 h at r.t. and purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min). Compound **9** was obtained after lyophilization as a white powder (31.9 mg, $4.1 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 96%

❖ **RP-HPLC** : RT = 7.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)

RAFT(CO-CHO)₁₆ : **10**



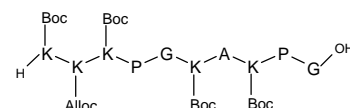
To a solution of compound **9** (31.9 mg, $4.1 \cdot 10^{-6}$ mol) in 8 mL of aqueous solution was added sodium periodate (18.5 mg, $8.6 \cdot 10^{-5}$ mol). The reaction was stirred for 1 h at r.t. and purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min). Compound **10** was isolated as a white powder (20.6 mg, $4.0 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : quantitative (93% overall yield from peptide **6**)

❖ **RP-HPLC** : RT = 8.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)

I.3.2 – Synthesis of two domains-containing RAFTs.

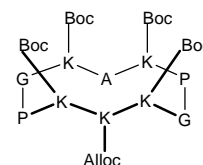
H-K(Boc)-K(Alloc)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G-OH : **11**



The linear decapeptide **11** was assembled on 2-chlorotriylchloride[®] resin (1.030 g, loading of $2.1 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$) using the procedure I.2.1 to I.2.4. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) through nucleophilic substitution was performed following the procedure given by Advanced ChemTech and yielding to a convenient resin loading of $0.7 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$. The peptide was released from the resin following protocol I.2.5. The free linear protected peptide was obtained as a white solid powder (1.451 g) after precipitation, triturating and washing in ether. This crude material was used without further purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 10.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

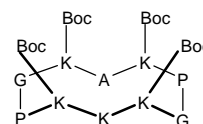
c[-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G-K(Boc)-K(Alloc)-K(Boc)-] : 12



The cyclization reaction was carried out as described in protocol I.2.6 using the crude linear peptide **11** (1.451 g). Precipitation and work-up in ether afforded cyclic peptide **12** as a white solid powder (1.505 g). The crude was dissolved in MeOH (10 mg.mL⁻¹) and purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min).

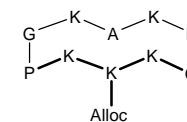
- ❖ **Yield** : 50% (overall yield from first loading of SPPS)
- ❖ **RP-HPLC** : RT = 11.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-P-G-K(Boc)-K(H)-K(Boc)-] : 13



The peptide **13** was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound **10**)

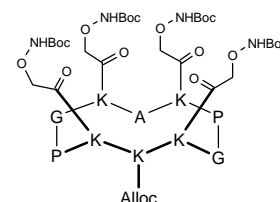
c[-P-G-K(H)-A-K(H)-P-G-K(H)-K(Alloc)-K(H)-] : 14



Boc protecting groups were removed from the cyclic peptide **12** (180.8 mg, 1.2.10⁻⁴ mol) with 50% TFA in DCM (1.2 mM). The mixture was stirred for 1 h at r.t. and concentrated under reduced pressure. The peptide **14** was precipitated, triturated and washed in ether and obtained as a white solid powder (197.9 mg). This crude material was used without further purification.

- ❖ **RP-HPLC** : RT = 5.9 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-A-K(CO-CH₂-ONHBoc)-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-K(Alloc)-K(CO-CH₂-ONHBoc)-] : 15



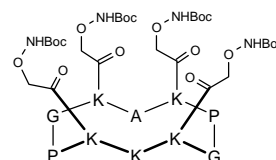
¹ Boturnyn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730-5739.

To a solution of compound **14** (93.6 mg, 6.10^{-5} mol) in 6 mL anhydrous DMF, were added BocNHOCH₂COOSucc **98** (101.8 mg, $3.5.10^{-4}$ mol) and DIPEA to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 5 h at r.t. and treated for 30 min with 10 mL MeOH (inactivation of excess activated ester) before being concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound **15** as a white solid powder (104.8 mg, $5.8.10^{-5}$ mol). This material was clean enough to be further used without purification.

❖ Yield : 97%

❖ RP-HPLC : RT = 10.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-A-K(CO-CH₂-ONHBoc)-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-K(H)-K(CO-CH₂-ONHBoc)-] : **16**

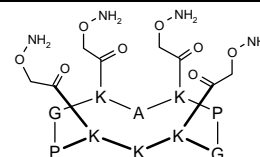


Alloc group was removed using cyclic peptide **15** (104.8 mg, $5.8.10^{-5}$ mol) and following the procedure described in I.2.7.c. Triturating and washing three times with ether afforded compound **16** (92.4 mg, $5.4.10^{-5}$ mol) as a bright brown powder. This material was further used without additional purification.

❖ Yield : 92%

❖ RP-HPLC : RT = 9.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-A-K(CO-CH₂-ONH₂)-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-K(H)-K(CO-CH₂-ONH₂)-] : **17**

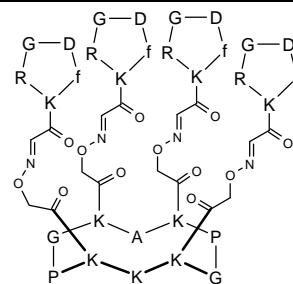


Removal of Boc moieties from compound **16** (92.4 mg, $5.4.10^{-5}$ mol) was carried out in a solution containing 50% TFA, 5% TIS and 5% H₂O in DCM for 1 h at r.t. The solvents were evaporated under reduced pressure and the fully deprotected peptide was dissolved in 5 mL of water. The solution was filtrated and lyophilized. A RP-HPLC (5-60% B in 30 min) was performed to afford pure compound **17** as a white solid powder (13.3 mg, $7.1.10^{-6}$ mol).

❖ Yield : 13%

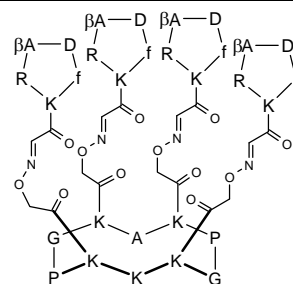
❖ RP-HPLC : RT = 5.6 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ MS (ESI-MS, positive mode) : C₅₅H₉₇N₁₉O₁₈ (calcd MW = 1312.5 g.mol⁻¹); m/z : [M+H]⁺ = 1313.6, [M+2H]²⁺ = 657.2

(H)RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 18

The free aminoxy-containing compound **17** (6.7 mg, $3.5 \cdot 10^{-6}$ mol) was dissolved in 175 μL of a mixture of A and B solvents (1:1). The peptide **38** (13.2 mg, $1.7 \cdot 10^{-5}$ mol) dissolved in 800 μL of the same solvents was added to the latter. The reaction was stirred for 1 h at r.t. Conjugate **18** was isolated after purification by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) as a white solid powder (13.6 mg, $3.1 \cdot 10^{-6}$ mol).

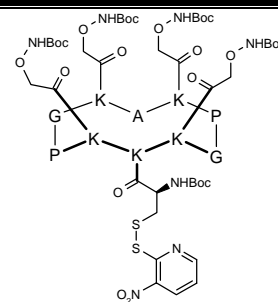
- ❖ **Yield** : 87%
- ❖ **RP-HPLC** : RT = 10 min (C_{18} , 214 and 250 nm, 5-60% B in 15 min)
- ❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{171}H_{253}N_{55}O_{50}$ (calcd MW = $3879.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; m/z : $[M+2H]^{2+} = 1939.7$, $[M+3H]^{3+} = 1293.8$, $[M+4H]^{4+} = 970.6$, $[M+5H]^{5+} = 776.7$

(H)RAFT(c[-R β ADfK-])₄ : 19

The free aminoxy-containing compound **17** (6.7 mg, $3.5 \cdot 10^{-6}$ mol) was dissolved in 175 μL of a mixture of A and B solvents (1:1). The peptide **46** (12.9 mg, $1.6 \cdot 10^{-5}$ mol) dissolved in 800 μL of the same solvents was added to the latter. The reaction was stirred for 2 h at r.t. and immediately purified by RP-HPLC. Conjugate **19** was obtained as a white solid powder (9.5 mg, $2.1 \cdot 10^{-6}$ mol).

- ❖ **Yield** : 60%
- ❖ **RP-HPLC** : RT = 9.9 min (C_{18} , 214 and 250 nm, 5-60% B in 15 min)
- ❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{175}H_{261}N_{55}O_{50}$ (calcd MW = $3935.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; m/z : $[M+3H]^{3+} = 1312.4$, $[M+4H]^{4+} = 984.6$, $[M+5H]^{5+} = 787.9$

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-A-K(CO-CH₂-ONHBoc)-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-K(BocC(NPys))-K(CO-CH₂-ONHBoc)-] : 20

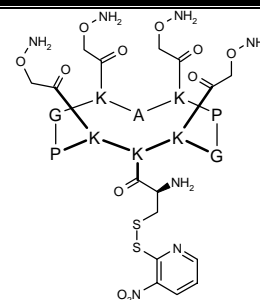


BocCys(NPys) moiety was introduced on the free amino group of crude 16 (88.1 mg, $5.1 \cdot 10^{-5}$ mol) using Boc-Cys(NPys)-OH (27.4 mg, $7.3 \cdot 10^{-5}$ mol) amino acid and following the procedure I.2.8. Precipitation, triturating and washing in ether afforded crude compound 20 (161.2 mg) as a bright yellow powder which was further used without additional purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 11.5 min (C₁₈, 214 and 270 nm, 5-100% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₈₈H₁₄₄N₂₂O₃₁S₂ (calcd MW = 2070.4 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+H]⁺ = 2071.8, [M+2H]²⁺ = 1036.4

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-A-K(CO-CH₂-ONH₂)-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-K(C(NPys))-K(CO-CH₂-ONH₂)-] : 21

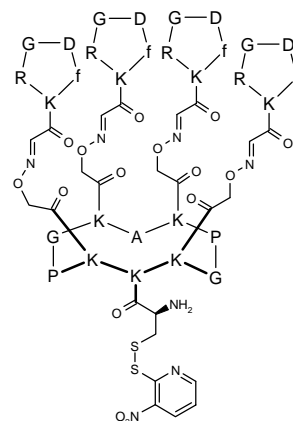


Removal of Boc protecting groups from crude compound 20 (161.2 mg) was carried out in a solution containing 45% TFA, 2.5% TIS and 2.5% H₂O in DCM for 1 h at r.t. The crude was concentrated, precipitated, triturated and washed with ether. Purification by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) afforded pure compound 21 as a slightly yellow powder (51.8 mg, $2.4 \cdot 10^{-5}$ mol) after lyophilization.

❖ **Yield** : 47% (overall yield from compound 16)

❖ **RP-HPLC** : RT = 7.9 min (C₁₈, 214 and 270 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₆₃H₁₀₄N₂₂O₂₁S₂ (calcd MW = 1569.8 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+H]⁺ = 1570.5, [M+2H]²⁺ = 786.7

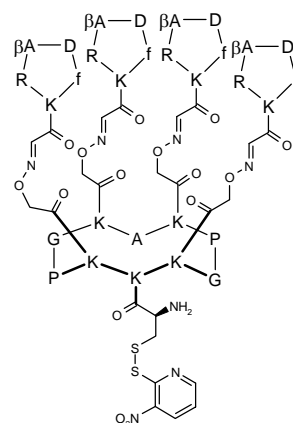
(Cys(NPys))RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 22

The free aminoxy-containing compound **21** (20.2 mg, $9.4 \cdot 10^{-6}$ mol) was dissolved in 1 mL of H₂O/CH₃CN (1:1). The peptide **38** (39.2 mg, $5.1 \cdot 10^{-5}$ mol) dissolved in 2 mL of the same solvents was added to the latter. The reaction was stirred for 50 min at r.t. Conjugate **22** was isolated after purification by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) as a bright yellow solid powder (38.3 mg, $8.1 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 87%

❖ **RP-HPLC** : RT = 10.6 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₁₇₉H₂₆₀N₅₈O₅₃S₂ (calcd MW = 4136.6 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+3H]³⁺ = 1379.6, [M+4H]⁴⁺ = 1035.0, [M+K+3H]⁴⁺ = 1044.6, [M+5H]⁵⁺ = 828.2, [M+K+4H]⁵⁺ = 835.7, [M+K+5H]⁶⁺ = 696.8

(Cys(NPys))RAFT(c[-RβADfK-])₄ : 23

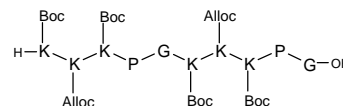
The free aminoxy-containing compound **21** (20.2 mg, $9.4 \cdot 10^{-6}$ mol) was dissolved in 1 mL of H₂O/CH₃CN (1:1). The peptide **46** (39.8 mg, $5.1 \cdot 10^{-5}$ mol) dissolved in 2 mL of the same solvents was added to the latter. The reaction was stirred for 1 h at r.t. Conjugate **23** was isolated after purification by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) as a bright yellow solid powder (34.2 mg, $7.2 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 76%

❖ **RP-HPLC** : RT = 10.5 min (C₁₈, 214 and 250 nm, 5-60% B in 15 min)

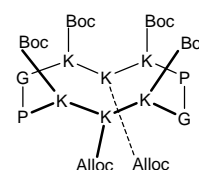
❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{183}H_{268}N_{58}O_{53}S_2$ (calcd MW = 4192.7 g.mol⁻¹) ; m/z : $[M+3H]^{3+} = 1398.5$, $[M+4H]^{4+} = 1049.0$, $[M+K+3H]^{4+} = 1058.3$, $[M+5H]^{5+} = 839.4$, $[M+K+4H]^{5+} = 847.0$, $[M+K+5H]^{6+} = 706.0$

H-K(Boc)-K(Alloc)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-K(Alloc)-K(Boc)-P-G-OH : **24**



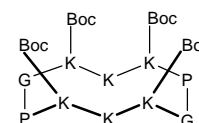
The linear peptide **24** was assembled on SASRIN[®] resin as previously described.¹ (cf. Annexe 1)

c[-P-G-K(Boc)-K(Alloc)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-K(Alloc)-K(Boc)-] : **25**



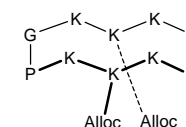
The peptide **25** was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound **9**)

c[-P-G-K(Boc)-K(H)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-K(H)-K(Boc)-] : **26**



The peptide **26** was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound **10**)

c[-P-G-K(H)-K(Alloc)-K(H)-P-G-K(H)-K(Alloc)-K(H)-] : **27**

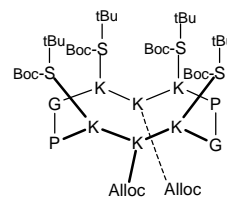


Boc protecting groups from cyclic decapeptide **25** (467.4 mg, 2.8.10⁻⁴ mol) were removed using a solution containing 50% TFA in DCM (100 mL). The reaction mixture was stirred for 30 min at r.t. before being concentrated under reduced pressure. The crude product was precipitated, triturated and washed with ether affording compound **27** as a white solid powder (429.3 mg, 2.5.10⁻⁴ mol). The latter was further used without additional purification.

❖ **Yield** : 89%

❖ **RP-HPLC** : RT = 7.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

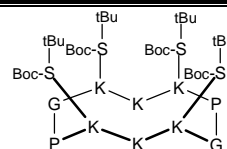
c[-P-G-K(BocS(*t*Bu))-K(Alloc)-K(BocS(*t*Bu))-P-G-K(BocS(*t*Bu))-K(Alloc)-K(BocS(*t*Bu))-] : 28



Boc-Ser(*t*Bu) moieties were introduced on the free amino groups of compound 27 (220.6 mg, $1.3 \cdot 10^{-4}$ mol) using the procedure I.2.8 and affording compound 28 as a sticky solid.

❖ **RP-HPLC** : RT = 15.2 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)

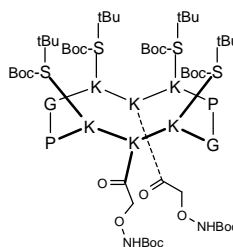
c[-P-G-K(BocS(*t*Bu))-K(H)-K(BocS(*t*Bu))-P-G-K(BocS(*t*Bu))-K(H)-K(BocS(*t*Bu))-] : 29



Alloc groups were removed using the crude compound 28 and following the procedure described in I.2.7.c. Triturating and washing three times with ether afforded compound 29 (353.0 mg) as a bright brown powder which was further used without additional purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 12.0 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)

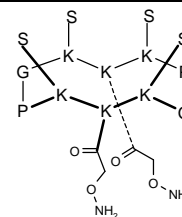
c[-P-G-K(BocS(*t*Bu))-K(CO-CH₂-ONHBoc)-K(BocS(*t*Bu))-P-G-K(BocS(*t*Bu))-K(CO-CH₂-ONHBoc)-K(BocS(*t*Bu))-] : 30



To a solution of crude compound 29 (353.0 mg) in 13 mL anhydrous DMF, were added BocNHOCH₂COOSucc 98 (82.1 mg, $2.9 \cdot 10^{-4}$ mol) and DIPEA to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 1 h at r.t. and treated for 30 min with 15 mL MeOH (inactivation of excess activated ester) before being concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound 30 which was further used without purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 15.3 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-P-G-K(S)-K(CO-CH₂-ONH₂)-K(S)-P-G-K(S)-K(CO-CH₂-ONH₂)-K(S)-] : 31

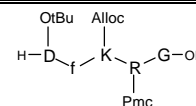


Removal of all protecting groups (Boc and *t*Bu) from crude compound 30 was carried out in a solution containing 95% TFA, 2.5% TIS and 2.5% H₂O for 1 h at r.t. The crude product was concentrated, triturated and washed with ether. The product was then purified RP-HPLC (5-60% B in 30 min) to afford compound 31 as a white powder (69 mg, 3.1.10⁻⁵ mol) after lyophilization.

- ❖ **Yield** : 24% (overall yield from 27)
- ❖ **RP-HPLC** : RT = 7.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)
- ❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₆₆H₁₁₈N₂₂O₂₂ (calcd MW = 1571.8 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+H]⁺ = 1571.9, [M+2H]²⁺ = 786.5, [M+3H]³⁺ = 524.7

I.4. Syntheses of cyclopentapeptide derivatives.

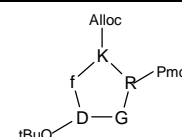
H-D(O*t*Bu)-f-K(Alloc)-R(Pmc)-G-OH : 32



The linear peptide 32 was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (1.005 g, loading of 2.1 mmol.g⁻¹). The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) through nucleophilic substitution was performed following the procedure given by Advanced ChemTech and yielding to a convenient resin loading of 0.8 mmol.g⁻¹. The peptide was released from the resin following protocol I.2.5. The free linear protected peptide was obtained as a white solid powder (980.4 mg) after precipitation, triturating and washing in ether. This crude material was further used without additional purification.

- ❖ **RP-HPLC** : RT = 11.1 min (C₁₈, 214 nm and 250nm, 5-100% B in 15 min)

c[-R(Pmc)-G-D(O*t*Bu)-f-K(Alloc)-] : 33

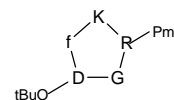


The cyclization reaction was carried out using linear peptide 32 (980.4 mg) as

described in protocol I.2.6. The cyclic peptide **33** was obtained as a white solid powder (1162.5 mg) after precipitation in ether. The crude material was further used without additional purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 11.9 min (C₁₈, 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-R(Pmc)-G-D(OtBu)-f-K(H)-] : 34



Alloc group was removed using cyclic peptide **33** (1162.5 mg) following protocol I.2.7.c. The peptide **34** was obtained as a slightly brown solid powder (819.8 mg) after precipitation in ether. The crude material was further used without purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 10.0 min (C₁₈, 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min)

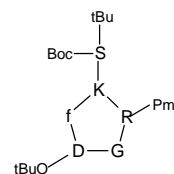
c[-R-G-D-f-K-] : 35



Pmc and OtBu protecting groups were simultaneously removed from the cyclic peptide **34** by treating the latter (16.4 mg) for 1 h in 16.4 mL of TFA/H₂O/TIS (95:2.5:2.5). After concentration under reduced pressure, the peptide **35** was precipitated, triturated and washed in ether. The crude was further used without additional purification.

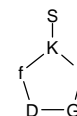
❖ **RP-HPLC** : RT = 5.2 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-R(Pmc)-G-D(OtBu)-f-K(BocS(tBu))-] : 36



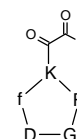
The crude cyclic peptide **34** (412.4 mg) was dissolved in DMF (5 mM) and the pH was adjusted to 8-9 with DIPEA. PyBOP (192.1 mg, 3.7.10⁻⁴ mol) and Boc-Ser(tBu)-OH (78.2 mg, 3.0.10⁻⁴ mol) were added and the reaction mixture was stirred for 45 min at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and the peptide was precipitated, triturated and washed with ether. Crude product **36** was obtained as a slightly brown powder and further used without additional purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 12.9 min (C₁₈, 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-R-G-D-f-K(S)-] : 37

The peptide **36** was fully deprotected following protocol I.2.7.b. The crude was concentrated, dissolved in water, filtrated and lyophilised to afford cyclic peptide **37** as a slightly yellow powder (1.235 g) which was further used without purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 5.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

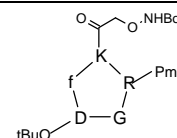
c[-R-G-D-f-K(COCHO)-] : 38

Oxidative cleavage of serine residue from peptide **37** (1.235 g) was carried out following protocol I.2.9. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording pure aldehyde-containing cyclopeptide **38** (63.1 mg, 8.2.10⁻⁵ mol).

❖ **Yield** : 26% (overall yield from peptide **34**)

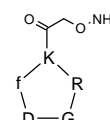
❖ **RP-HPLC** : RT = 5.8 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₂₉H₄₁N₉O₉ (calcd MW = 659.7 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+H]⁺ = 660.1, [M+H₂O+H]⁺ = 678.1, [M+Na]⁺ = 682.1, [M+K]⁺ = 698.1

c[-R(Pmc)-G-D(OtBu)-f-K(CO-CH₂-ONHBoc)-] : 39

To a solution of crude compound **34** (192.0 mg, 2.1.10⁻⁴ mol) in 20 mL anhydrous DMF were added BocNHCH₂COOSucc **98** (63.6 mg, 2.2.10⁻⁴ mol) and DIPEA to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 1 h at r.t. and treated for 30 min with 15 mL MeOH (inactivation of excess activated ester) before being concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound **39** which was further used without purification.

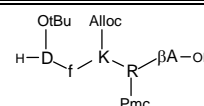
❖ **RP-HPLC** : RT = 12.5 min (C₁₈, 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-R-G-D-f-K(CO-CH₂-ONH₂)-] : 40

The crude peptide **39** was fully deprotected following protocol I.2.7.b. The crude was concentrated, precipitated, triturated and washed in ether and obtained as a slightly brown solid powder (147.1 mg). Purification by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) afforded pure oxyamine-functionalized cyclopentapeptide **40** (51.3 mg, $5.7 \cdot 10^{-5}$ mol).

- ❖ **Yield** : 27% (overall yield from compound **34**)
- ❖ **RP-HPLC** : RT = 6.4 min (C_{18} , 214 nm, 5-100% B in 15 min), RT = 7.2 min (C_{18} , 214 nm, 5-60% B in 15 min)
- ❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{29}H_{44}N_{10}O_9$ (calcd MW = 676.7 $g \cdot mol^{-1}$) ; m/z : $[M+H]^+ = 677.0$

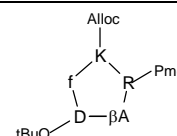
H-D(OtBu)-f-K(Alloc)-R(Pmc)-βA-OH : **41**



The linear peptide **41** was assembled on 2-chlorotritylchloride[®] resin (1.011 g, loading of 2.1 $mmol \cdot g^{-1}$). The anchoring of the first amino acid (Fmoc-βA-OH) through nucleophilic substitution was performed following the procedure given by Advanced ChemTech and yielding to a convenient resin loading of 0.8 $mmol \cdot g^{-1}$. The peptide was released from the resin following protocol I.2.5. The free linear protected peptide was obtained as a white solid powder (942.2 mg) after precipitation, triturating and washing in ether. This crude material was further used without additional purification.

- ❖ **RP-HPLC** : RT = 11.1 min (C_{18} , 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min)

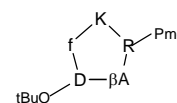
c[-R(Pmc)-βA-D(OtBu)-f-K(Alloc)-] : **42**



The cyclization reaction was carried out using the crude linear peptide **41** (942.2 mg) as described in protocol I.2.6. Precipitation in ether afforded cyclic peptide **42** as a sticky oil. The crude material was further used without additional purification.

- ❖ **RP-HPLC** : RT = 11.9 min (C_{18} , 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-R(Pmc)-βA-D(OtBu)-f-K-] : **43**

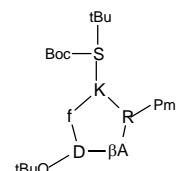


Alloc group was removed using cyclic peptide **42** following protocol I.2.7.c. The

peptide **43** was obtained as a slightly brown solid powder (643.5 mg) after precipitation in ether. The crude material was further used without purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 10.1 min (C₁₈, 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min)

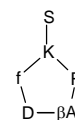
c[-R(Pmc)-βA-D(OtBu)-f-K(BocS(tBu))-] : 44



The crude cyclic peptide **43** (303.9 mg, $3.2 \cdot 10^{-4}$ mol) was dissolved in DMF (5 mM) and the pH was adjusted to 8-9 with DIPEA. PyBOP (194.2 mg, $3.7 \cdot 10^{-4}$ mol) and Boc-Ser(*t*Bu)-OH (92.9.2 mg, $3.5 \cdot 10^{-4}$ mol) were added and the reaction mixture was stirred for 1 h at r.t. The solvent was removed under reduced pressure and the peptide was precipitated, triturated and washed with ether. Crude product **44** was obtained as a sticky solid and further used without purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 12.9 min (C₁₈, 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min)

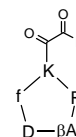
c[-R-βA-D-f-K(S)-] : 45



The peptide **44** was fully deprotected following protocol I.2.7.b. The crude was concentrated, dissolved in water, filtrated and lyophilised to afford cyclic peptide **45** as a sticky yellow solid which was further used without purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 5.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-R-βA-D-f-K(COCHO)-] : 46



Oxidative cleavage of serine residue from peptide **45** was carried out following protocol I.2.9. The product was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording pure aldehyde-containing cyclopentapeptide **46** (43.3 mg, $5.5 \cdot 10^{-5}$ mol) as a white solid powder.

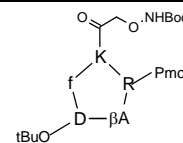
❖ **Yield** : 17% (overall yield from crude compound **43**)

❖ **RP-HPLC** : RT = 5.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min), RT = 6.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B

in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{30}H_{43}N_9O_9$ (calcd MW = 673.7 $g \cdot mol^{-1}$) ; m/z : $[M+H]^+ = 674.1$, $[M+H_2O+H]^+ = 692.1$

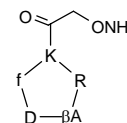
c[-R(Pmc)-βA-D(OtBu)-f-K(CO-CH₂-ONHBoc)-] : 47



To a solution of crude compound 43 (383.0 mg, $4.1 \cdot 10^{-4}$ mol) in 40 mL anhydrous DMF were added BocNHCH₂COOSucc 98 (119 mg, $4.1 \cdot 10^{-4}$ mol) and DIPEA to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 1 h at r.t. and treated for 30 min with 20 mL MeOH (inactivation of excess activated ester) before being concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound 47 which was further used without purification.

❖ **RP-HPLC** : RT = 12.3 min (C_{18} , 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min)

c[-R-βA-D-f-K(CO-CH₂-ONH₂)-] : 48



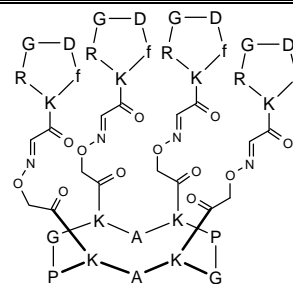
The crude peptide 47 was fully deprotected following protocol I.2.7.b. The crude was concentrated, precipitated, triturated and washed in ether and obtained as a slightly brown solid powder (274.7 mg). Purification by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) afforded pure oxyamine-functionalized cyclopentapeptide 48 (203.4 mg, $2.2 \cdot 10^{-4}$ mol).

❖ **Yield** : 54% (overall yield from compound 43)

❖ **RP-HPLC** : RT = 7.0 min (C_{18} , 214 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{30}H_{46}N_{10}O_9$ (calcd MW = 690.8 $g \cdot mol^{-1}$) ; m/z : $[M+H]^+ = 691.3$, $[M+2H]^{2+} = 346.2$

I.5. Synthesis of multivalent RAFT(c[-RGDfK-])_n ligands and -RβAD- control analogues.

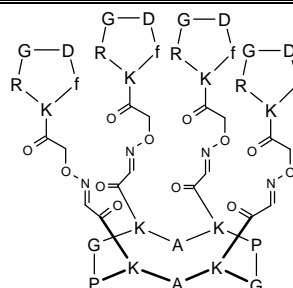
RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 49

To a solution containing the derivative **8** (16.2 mg, $9.5 \cdot 10^{-6}$ mol) in 2.2 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.5)/acetonitrile (2:1) was added the glyoxylyl aldehyde-containing peptide **38** (34.6 mg, $4.5 \cdot 10^{-5}$ mol). The reaction was stirred for 4 h at 25°C. Conjugate **49** was isolated after RP-HPLC purification (5-60% B in 30 min) as a white powder (18.7 mg, $4.4 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 47%

❖ **RP-HPLC** : RT = 11.1 min (C₁₈, 214 nm and 250 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₁₆₈H₂₄₆N₅₄O₅₀ (calcd MW = 3822.2 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+2H]²⁺ = 1912.3, [M+3H]³⁺ = 1275.4, [M+4H]⁴⁺ = 956.5, [M+5H]⁵⁺ = 765.5

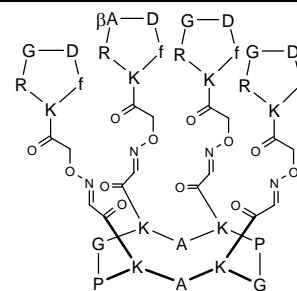
RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 50

To a solution containing the derivative **6** (10.6 mg, $8.9 \cdot 10^{-6}$ mol) in 2.7 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.5)/acetonitrile (2:1) was added the aminoxy-containing peptide **40** (39.0 mg, $43.1 \cdot 10^{-6}$ mol). The reaction was stirred for 3 h at 25°C. Conjugate **50** was isolated after RP-HPLC purification as a white powder (25.7 mg, $6.0 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 67%

❖ **RP-HPLC** : RT = 10.3 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₁₆₈H₂₄₆N₅₄O₅₀ (calcd MW = 3822.2 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+2H]²⁺ = 1912.3, [M+3H]³⁺ = 1274.8, [M+4H]⁴⁺ = 956.2, [M+5H]⁵⁺ = 765.3

RAFT[(c[-RGDfK-])₃ ; (c[-RβADfK-])₁] : 51

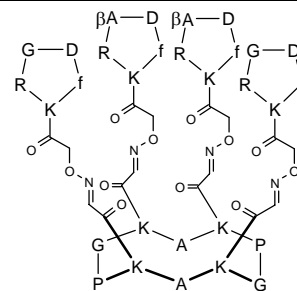
To a solution containing the derivative RAFT(COCHO)₄ **6** (10.0 mg, 8.4.10⁻⁶ mol) in 8 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.5) was added the aminoxy-containing peptide **40** (8.8 mg, 9.7.10⁻⁶ mol). The reaction was stirred for 6 h at 25°C. Conjugates containing 1, 2 and 3 c[-RGDfK-] motifs were isolated using RP-HPLC affording respectively RAFT[(c[-RGDfK-])₁ ; (COCHO)₃] (4.6 mg, 2.3.10⁻⁶ mol, 28%), RAFT[(c[-RGDfK-])₂ ; (COCHO)₂] (5.0 mg, 1.8.10⁻⁶ mol, 21%) and RAFT[(c[-RGDfK-])₃ ; (COCHO)₁] (3.0 mg, 9.10⁻⁷ mol, 11%).

To a solution containing the RAFT[(c[-RGDfK-])₃ ; (COCHO)₁] intermediate (3.0 mg, 9.10⁻⁷ mol) in 0.5 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.5) was added the aminoxy-containing -RβAD- peptide **48** (1.2 mg, 1.4.10⁻⁶ mol). The reaction was stirred for 5 h at 25°C. Conjugate **51** was isolated after RP-HPLC purification as a white powder (2.7 mg, 6.0.10⁻⁷ mol).

❖ **Yield** : 67%

❖ **RP-HPLC** : RT = 14.6 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₁₆₉H₂₄₈N₅₄O₅₀ (calcd MW = 3836.2 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+3H]³⁺ = 1279.9, [M+4H]⁴⁺ = 960.0

RAFT[(c[-RGDfK-])₂ ; (c[-RβADfK-])₂] : 52

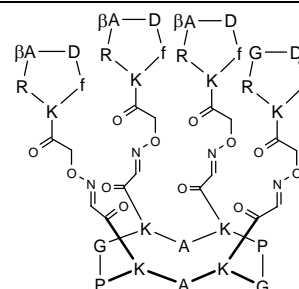
To a solution containing the RAFT[(c[-RGDfK-])₂ ; (COCHO)₂] intermediate (5.0 mg, 1.8.10⁻⁶ mol) in 1 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.5) was added the aminoxy-containing -RβAD- peptide **48** (4.9 mg, 5.4.10⁻⁶ mol). The reaction was stirred for 5 h at 25°C. Conjugate **52** was isolated after RP-HPLC purification as a white powder (5.2 mg, 1.2.10⁻⁶ mol).

❖ **Yield** : 67%

❖ **RP-HPLC** : RT = 14.5 min (C₁₈, 214 nm, 5-40% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{170}H_{250}N_{54}O_{50}$ (calcd MW = $3850.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; m/z : $[M+3H]^{3+} = 1284.7$, $[M+4H]^{4+} = 963.4$

RAFT[(c[-RGDfK-])₁ ; (c[-RβADfK-])₃] : 53



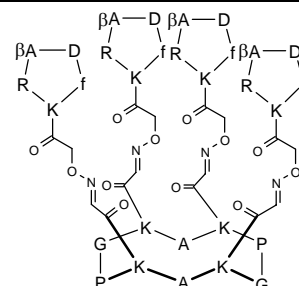
To a solution containing the RAFT[(c[-RGDfK-])₁ ; (COCHO)₃] intermediate (4.6 mg, $2.3 \cdot 10^{-6}$ mol) in 1 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.5) was added the aminoxy-containing -RβAD- peptide **48** (9.6 mg, $10.4 \cdot 10^{-6}$ mol). The reaction was stirred for 5 h at 25°C. Conjugate **53** was isolated after RP-HPLC purification as a white powder (6.1 mg , $1.4 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 61%

❖ **RP-HPLC** : RT = 14.4 min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{171}H_{252}N_{54}O_{50}$ (calcd MW = $3864.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; m/z : $[M+3H]^{3+} = 1289.4$, $[M+4H]^{4+} = 967.0$

RAFT(c[-RβADfK-])₄ : 54

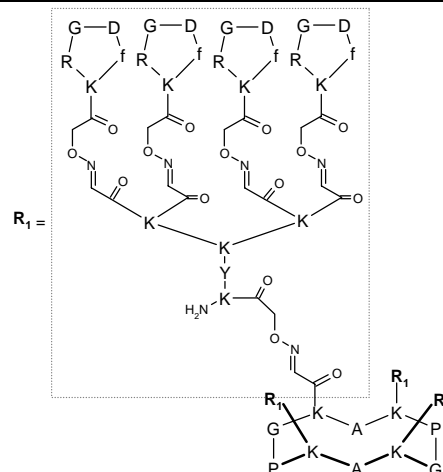


To a solution containing the derivative **6** (9.3 mg, $7.8 \cdot 10^{-6}$ mol) in 2.5 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.5) was added the aminoxy-containing peptide **48** (38.0 mg, $46.8 \cdot 10^{-6}$ mol). The reaction was stirred for 3 h at 25°C. Conjugate **54** was isolated after RP-HPLC purification as a white powder (24.1 mg , $6.2 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 80%

❖ **RP-HPLC** : RT = 14.4 min (C_{18} , 214 nm, 5-40% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{172}H_{254}N_{54}O_{50}$ (calcd MW = $3878.3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; m/z : $[M+3H]^{3+} = 1294.0$, $[M+4H]^{4+} = 970.4$

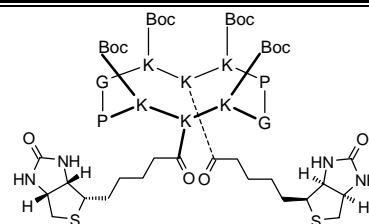
RAFT(c[-RGDfK-])₁₆ : 55

Compound **10** (14.5 mg, $2.9 \cdot 10^{-6}$ mol) was dissolved in 6 mL of a solution containing sodium acetate buffer (0.1M, pH 4.5)/acetonitrile (5:1). The aminoxy-functionalized -RGD-peptide **40** (62,1 mg, $6.9 \cdot 10^{-5}$ mol) was added and the reaction was stirred for 24 h. Conjugate **55** was isolated after RP-HPLC purification as a white powder (42.8 mg , $2.5 \cdot 10^{-6}$ mol).

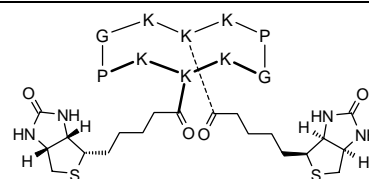
❖ **Yield** : 86%

❖ **RP-HPLC** : RT = 18.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : formule brute (calcd MW = 15614.9 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+8H]⁸⁺ = 1952.5, [M+9H]⁹⁺ = 1735.9, [M+10H]¹⁰⁺ = 1562.5, [M+11H]¹¹⁺ = 1420.5, [M+12H]¹²⁺ = 1302.2, [M+13H]¹³⁺ = 1202.1, [M+14H]¹⁴⁺ = 1116.5

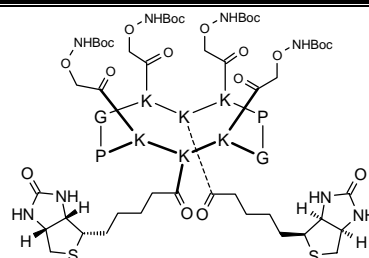
I.6. Synthesis of reporter group-conjugated compounds.**c[-P-G-K(Boc)-K(Biotin)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-K(Biotin)-K(Boc)-] : 56**

The peptide **56** was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound **11**)

c[-P-G-K(H)-K(Biotin)-K(H)-P-G-K(H)-K(Biotin)-K(H)-] : 57

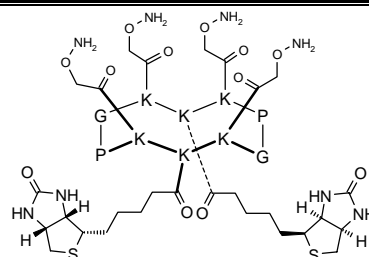
The peptide **57** was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound **13**)

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-K(Biotin)-K(CO-CH₂-ONHBoc)-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-K(Biotin)-K(CO-CH₂-ONHBoc)-] : 58



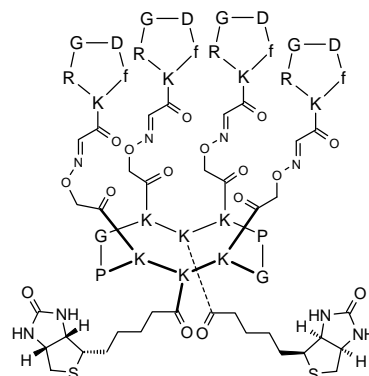
The peptide 58 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 15)

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-K(Biotin)-K(CO-CH₂-ONH₂)-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-K(Biotin)-K(CO-CH₂-ONH₂)-] : 59



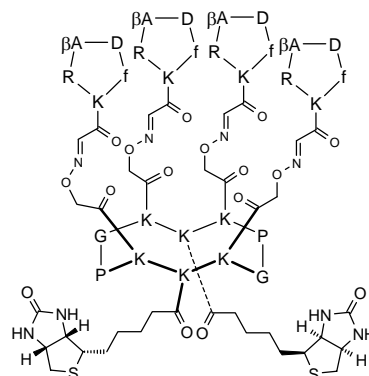
The peptide 59 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 17)

(Biotin)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 60



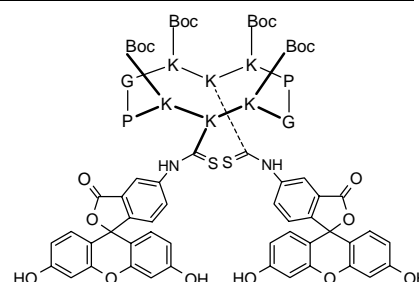
The peptide 60 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 2)

(Biotin)₂RAFT(c[-RβADfK-])₄ : 61



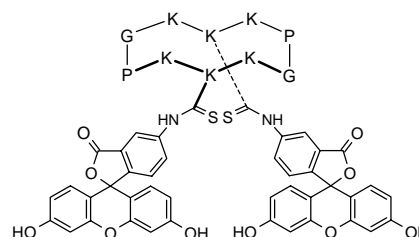
The peptide **61** was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound **3**)

c[-P-G-K(Boc)-K(Fluorescein)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-K(Fluorescein)-K(Boc)-] : **62**



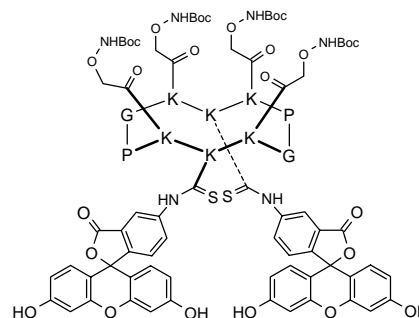
The peptide **62** was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound **12**)

c[-P-G-K(H)-K(Fluorescein)-K(H)-P-G-K(H)-K(Fluorescein)-K(H)-] : **63**



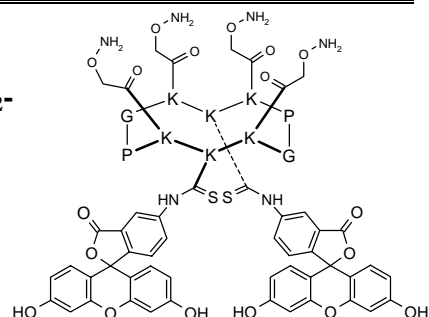
The peptide **63** was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound **14**)

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-K(Fluorescein)-K(CO-CH₂-ONHBoc)-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-K(Fluorescein)-K(CO-CH₂-ONHBoc)-] : **64**



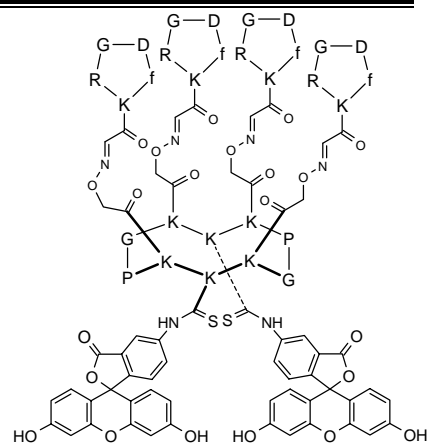
The peptide **64** was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound **16**)

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-K(Fluorescein)-K(CO-CH₂-ONH₂)-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-K(Fluorescein)-K(CO-CH₂-ONH₂)-] : 65



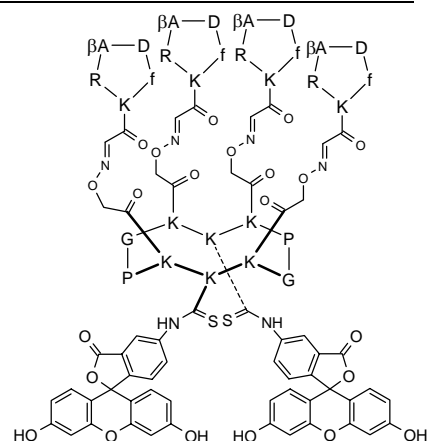
The peptide 65 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 18)

(Fluorescein)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 66



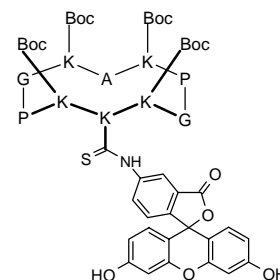
The peptide 66 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 4)

(Fluorescein)₂RAFT(c[-RβADfK-])₄ : 67



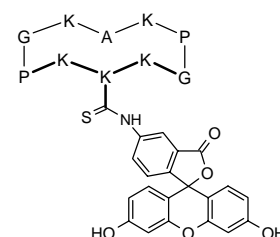
The peptide 67 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 5)

c[-P-G-K(Boc)-K(Fluorescein)-K(Boc)-P-G-K(Boc)-A-K(Boc)-] : 68



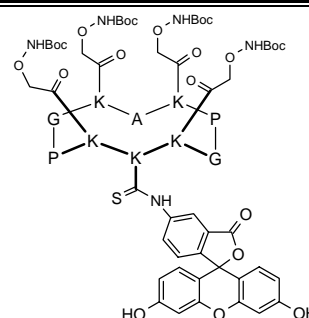
The peptide 68 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 21)

c[-P-G-K(H)-K(Fluorescein)-K(H)-P-G-K(H)-A-K(H)-] : 69



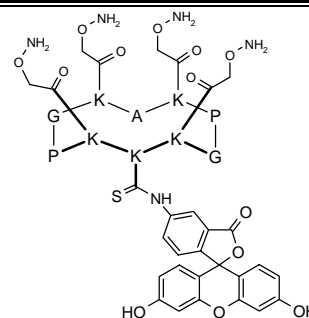
The peptide 69 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 22)

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-K(Fluorescein)-K(CO-CH₂-ONHBoc)-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-A-K(CO-CH₂-ONHBoc)-] : 70

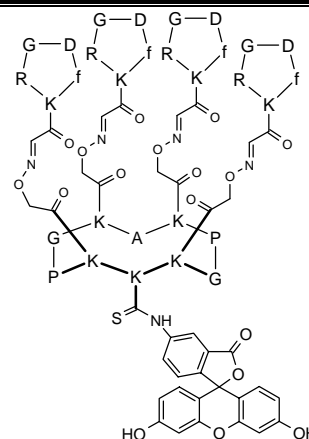


The peptide 70 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 23)

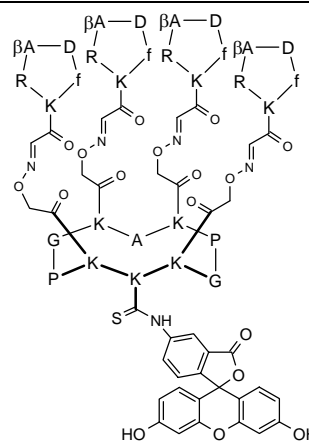
c[-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-K(Fluorescein)-K(CO-CH₂-ONH₂)-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-A-K(CO-CH₂-ONH₂)-] : 71



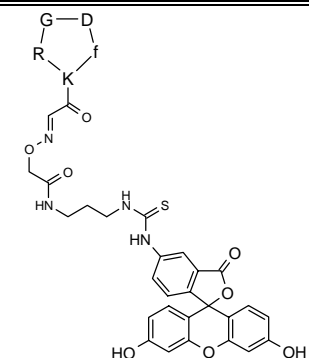
The peptide 71 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 24)

(Fluorescein)RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 72

The peptide 72 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 6)

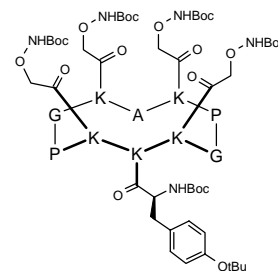
(Fluorescein)RAFT(c[-RβADfK-])₄ : 73

The peptide 73 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 7)

c[-RGDfK(FITC)-] : 74

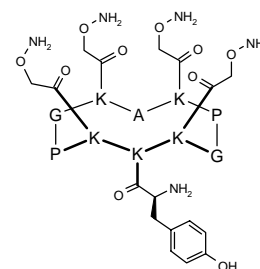
The peptide 74 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 41)

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-K(BocY(tBu))-K(CO-CH₂-ONHBoc)-P-G-K(CO-CH₂-ONHBoc)-A-K(CO-CH₂-ONHBoc)-] : 75



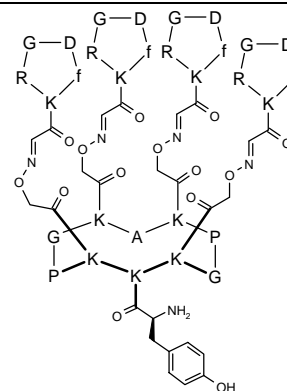
The peptide 75 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 28)

c[-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-K(Y)-K(CO-CH₂-ONH₂)-P-G-K(CO-CH₂-ONH₂)-A-K(CO-CH₂-ONH₂)-] : 76



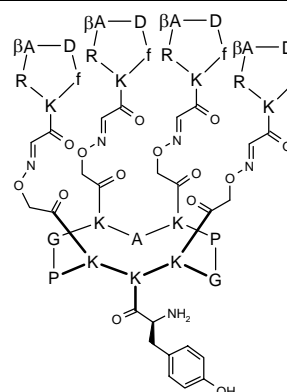
The peptide 76 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 29)

(Tyr)RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 77



The peptide 77 was synthesized as previously described.¹ (cf. Annexe 1, compound 8)

(Tyr)RAFT(c[-RβADfK-])₄ : 78



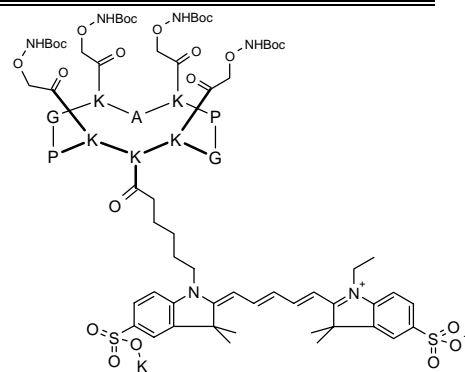
To a solution containing the derivative **76** (15.0 mg, $7.3 \cdot 10^{-6}$ mol) in 1.5 mL of ammonium acetate buffer (0.1 M, pH 4.6)/CH₃CN (2:1) was added the aldehyde-containing peptide **46** (34.5 mg, $4.4 \cdot 10^{-5}$ mol). The reaction was stirred for 16 h at 25°C. Conjugate **78** was isolated after RP-HPLC purification (5-60% B in 30 min) as a white powder (26.7 mg, $5.7 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 78%

❖ **RP-HPLC** : RT = 14.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-40% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₁₈₄H₂₇₀N₅₆O₅₂ (calcd MW = 4098.6 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+2H]²⁺ = 2049.8, [M+3H]³⁺ = 1366.9, [M+4H]⁴⁺ = 1025.5, [M+5H]⁵⁺ = 820.6

(Cy5)RAFT(CO-CH₂-ONHBoc)₄ : **79**

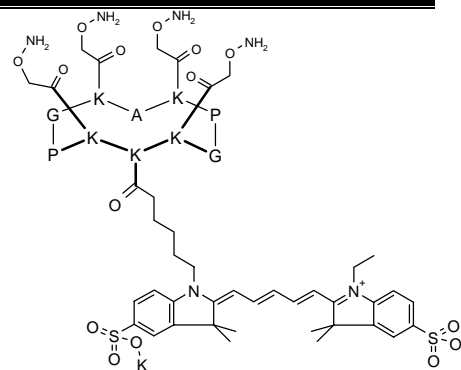


The crude peptide **16** (20.3 mg, $1.1 \cdot 10^{-5}$ mol) was dissolved in 2 mL of anhydrous DMF/DCM (1:1). The pH was adjusted to 9 with DIPEA. 433 μL of a 25 mM solution of Cy5NHS (8.7 mg, $1.1 \cdot 10^{-5}$ mol) in anhydrous DMF/DCM (1:1) were added. The mixture was stirred for 3 h at r.t. The solvents were evaporated under reduced pressure and the peptide was precipitated and washed twice with ether. The compound **79** was obtained as a deep blue solid powder (26.3 mg, $1.1 \cdot 10^{-5}$ mol). The latter was further used without additional purification.

❖ **Yield** : quantitative

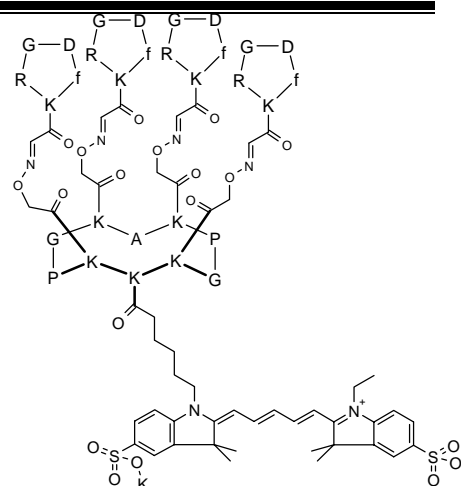
❖ **RP-HPLC** : RT = 9.6 min (C₁₈, 214 and 646 nm, 5-100% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, negative mode)** : C₁₀₈H₁₆₆KN₂₁O₃₃S₂ (calcd MW = 2389.9 g.mol⁻¹) ; m/z : [M-K]⁻ = 2350.3, [M-K-H]²⁻ = 1174.8

(Cy5)RAFT(CO-CH₂-ONH₂)₄ : 80

To the crude product **79** (26.3 mg, $1.1 \cdot 10^{-5}$ mol) was added a solution of 10 mL TFA/CH₂Cl₂/TIS/H₂O (95:100:2.5:2.5). After 1 h, the reaction was concentrated under reduced pressure and the peptide was precipitated and washed twice in ether. The compound **80** was obtained as a deep blue solid powder (26.4 mg, $1.1 \cdot 10^{-5}$ mol). The latter was further used without additional purification.

- ❖ **Yield** : quantitative
- ❖ **RP-HPLC** : RT = 7.2 min (C₁₈, 214 and 646 nm, 5-100% B in 15 min)
- ❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₈₈H₁₃₄KN₂₁O₂₅S₂ (calcd MW = 1989.4 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+H]⁺ = 1989.7, [M-K+2H]⁺ = 1949.7, [M+2H]²⁺ = 994.0, [M-K+3H]²⁺ = 974.4

(Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 81

From **80** (Strategy B)

The crude peptide **80** (17.6 mg, $7.2 \cdot 10^{-6}$ mol) was dissolved in 1.44 mL of ammonium acetate buffer (0.1 M, pH 4.6). 1.2 mL of solution of peptide **38** (44.4 mg, $5.7 \cdot 10^{-5}$ mol) in ammonium acetate buffer (0.1 M, pH 4.6) were added. The mixture was stirred for 24 h and purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min). After lyophilisation, the conjugate **81** was obtained as a deep blue solid powder (3.5 mg, $7 \cdot 10^{-7}$ mol).

- ❖ **Yield** : 10%
- ❖ **RP-HPLC** : RT = 11.4 min (C₁₈, 214 and 646 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{204}H_{290}KN_{57}O_{57}S_2$ (calcd MW = 4556.2 $g \cdot mol^{-1}$) ; m/z : $[M-K+4H]^{3+} = 1506.6$, $[M-K+5H]^{4+} = 1130.2$, $[M-K+6H]^{5+} = 904.3$

From **18** (Strategy C)

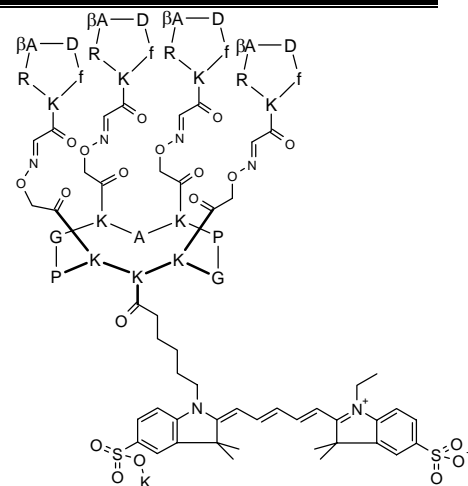
The peptide **18** (12.4 mg, $2.8 \cdot 10^{-6}$ mol) was dissolved in 279 μL anhydrous DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. 280 μL of a 10 mM solution of Cy5NHS (2.2 mg, $2.8 \cdot 10^{-6}$ mol) in anhydrous DMF were added. The mixture was stirred for 4 h and immediately purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min). After lyophilisation, the conjugate **81** was obtained as a deep blue solid powder (8.1 mg, $1.6 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 58%

❖ **RP-HPLC** : RT = 11.3 min (C_{18} , 214 and 646 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{204}H_{290}KN_{57}O_{57}S_2$ (calcd MW = 4556.2 $g \cdot mol^{-1}$) ; m/z : $[M-K+4H]^{3+} = 1506.6$, $[M-K+5H]^{4+} = 1130.3$, $[M-K+6H]^{5+} = 904.4$

(Cy5)RAFT(c[-R β ADfK-])₄ : **82**



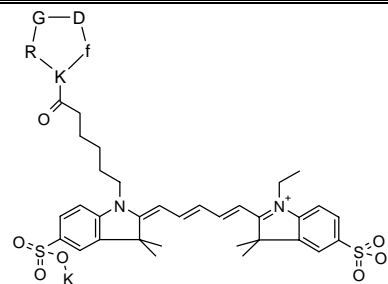
From **19** (Strategy C)

The peptide **19** (4.7 mg, $1.0 \cdot 10^{-6}$ mol) was dissolved in 105 μL anhydrous DMF and the pH was adjusted to 9 with DIPEA. 105 μL of a 10 mM solution of Cy5NHS (0.8 mg, $1.0 \cdot 10^{-6}$ mol) in anhydrous DMF were added. The mixture was stirred for 3 h and immediately purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min). After lyophilization, the conjugate **82** was obtained as a deep blue solid powder (2.2 mg, $0.4 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 43%

❖ **RP-HPLC** : RT = 11.2 min (C_{18} , 214 and 646 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{208}H_{298}KN_{57}O_{57}S_2$ (calcd MW = 4612.3 $g \cdot mol^{-1}$) ; m/z : $[M-K+4H]^{3+} = 1525.4$, $[M-K+5H]^{4+} = 1144.4$, $[M-K+6H]^{5+} = 915.7$

c[-RGDfK(Cy5)-] : 83

The cyclopentapeptide **35** (8.4 mg, $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol) was dissolved in 1 mL anhydrous DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA. 900 μ L of a solution of Cy5NHS (6.9 mg, $8.7 \cdot 10^{-6}$ mol) in anhydrous DMF were added to the latter. The mixture was stirred for 5 h and immediately purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min). After lyophilization, the conjugate **83** was obtained as a deep blue solid powder (6.4 mg, $4.6 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 53%

❖ **RP-HPLC** : RT = 7.7 min (C_{18} , 214 nm and 646 nm, 5-100% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{60}H_{78}KN_{11}O_{14}S_2$ (calcd MW = $1280.6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) ; m/z : $[M-K+2H]^+ = 1242.5$, $[M-K+3H]^{2+} = 621.7$

I.7. Synthesis of drug-conjugated compounds.

I.7.1 – Synthesis of aldehyde- or free thiol-functionnalized cytotoxic molecules.

H-S-G-G-K-L-A-K-L-A-K-K-L-A-K-L-A-K-OH : $H-S-G-G-K-L-A-K-L-A-K-K-L-A-K-L-A-K-OH$ **84**

The linear peptide **84** was assembled on H-Lys(Boc)-2-chlorotrityl[®] resin (500.7 mg, loading of $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$). Lysine residues were introduced using the Fmoc-Lys(Boc)-OH amino acid and the N-terminal serine using Boc-Ser(*t*Bu)-OH. The peptide was simultaneously released from the resin and fully deprotected from Boc and *t*Bu protecting groups by treating the resin with a mixture of 95% TFA, 2.5% TIS and 2.5% H₂O and following the general procedure described in I.2.5. The free linear naked peptide was obtained as a white solid powder (837.6 mg, $3.3 \cdot 10^{-4}$ mol, 83% from initial loading) after precipitation, triturating and washing in ether. The crude was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording pure peptide **84** (326.9 mg, $1.3 \cdot 10^{-4}$ mol).

❖ **Yield** : 32% (from initial loading), 56% (from last experimental loading)

❖ **RP-HPLC** : RT = 8.1 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₇₉H₁₄₉N₂₃O₁₉ (calcd MW = 1725.2 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+H]⁺ = 1726.0, [M+2H]²⁺ = 863.3, [M+3H]³⁺ = 575.9, [M+4H]⁴⁺ = 432.2, [M+5H]⁵⁺ = 345.9

OHC-OC-G-G-K-L-A-K-L-A-K-K-L-A-K-L-A-K-
OH : 85

To a solution containing the compound **84** (159.4 mg, 6.3.10⁻⁵ mol) in 8 mL of aqueous solution was added NaIO₄ (33.5 mg, 1.6.10⁻⁴ mol). The reaction was stirred for 6 h at r.t. and purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) to afford compound **85** as a white solid powder (113.4 mg, 4.8.10⁻⁵ mol).

❖ **Yield** : 76%

❖ **RP-HPLC** : RT = 8.4 min (C₁₈, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₇₈H₁₄₄N₂₂O₁₉ (calcd MW = 1694.2 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+H]⁺ = 1693.8, [M+H₂O+H]⁺ = 1711.8, [M+2H]²⁺ = 847.5, [M+H₂O+2H]²⁺ = 856.8, [M+3H]³⁺ = 565.6, [M+H₂O+3H]³⁺ = 571.4

H-C-G-G-K-L-A-K-L-A-K-K-L-A-K-L-A-K-OH :

86

The synthesis of this compound was achieved by M. Figuet² according to the following procedure.

The linear peptide **86** was assembled on H-Lys(Boc)-2-chlorotrityl[®] resin (500.0 mg, theoretical loading of 0.8 mmol.g⁻¹). Lysine residues were introduced using the Fmoc-Lys(Boc)-OH amino acid and the N-terminal cysteine using Fmoc-Cys(Trt)-OH. After N-terminal Fmoc cleavage, the peptide was simultaneously released from the resin and fully deprotected from Boc and Trt protecting groups by treating the resin with a mixture of 90% TFA, 5% EDT, 2.5% H₂O and 2.5% TIS and following the general procedure described in I.2.5. The peptide was purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min) and obtained after lyophilization as a white solid powder (225 mg, 1.3.10⁻⁴ mol).

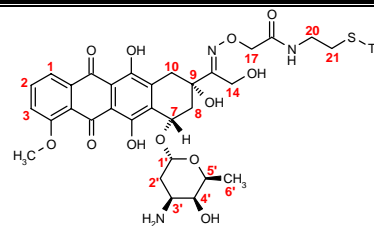
❖ **Yield** : 43%

❖ **RP-HPLC** : RT = 8.7 min (C₁₈, 214 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₇₉H₁₄₉N₂₃O₁₈S (calcd MW = 1741.3 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+2H]²⁺ = 871.6, [M+3H]³⁺ = 581.1, [M+4H]⁴⁺ = 436.2, [M+5H]⁵⁺ = 349.1

² Ph.D. 2003.

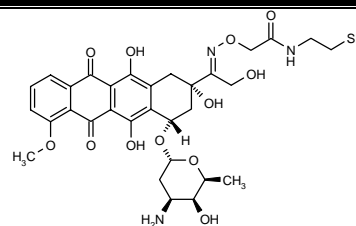
13-[*O*-(acetylamino-*N*-triphenylmethylthioethyl)] oxime doxorubicin : **87**



The doxorubicin hydrochloride (10 mg, $1.7 \cdot 10^{-5}$ mol) was dissolved in 860 μL of a mixture of H_2O and CH_3CN (1:1). 1 mL of a solution of aminoxy-containing compound **101** (8.1 mg, $2.1 \cdot 10^{-5}$ mol) in the same solvents was added to the latter. The mixture was stirred overnight at 30°C and purified by RP-HPLC (5-100% B in 30 min). Compound **87** was obtained after lyophilization as a red solid powder (15.2 mg, $1.5 \cdot 10^{-5}$ mol).

- ❖ **Conversion rate** : 88%
- ❖ **RP-HPLC** : RT = 10.9 min (C_{18} , 214 nm and 480 nm, 5-100% B in 15 min)
- ❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $\text{C}_{50}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{S}$ (calcd MW = 918.0 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; m/z : $[\text{2M}+\text{H}]^+ = 1836.4$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 918.3$
- ❖ **NMR ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)** : δ ppm 1.18 (d, $^3J_{6'-5'} = 6.5$, 3H, $\text{H}_{6'}$), 1.70 (ddd, $^2J_{2'\text{eq}-2'\text{ax}} = 12.5$, $^3J_{2'\text{eq}-3'} = 4$, $^3J_{2'\text{eq}-1'} = 1$, 1H, $\text{H}_{2'\text{eq}}$), 1.89 (td, $^2J_{2'\text{ax}-2'\text{eq}} = 12.5$, $^3J_{2'\text{ax}-3'} = 12.5$, $^3J_{2'\text{ax}-1'} = 3$, 1H, $\text{H}_{2'\text{ax}}$), 2.02 (m, 2H, H_{21}), 2.26 (dd, $^2J_{8a-8b} = 13$, $^3J_{8a-7} = 5$, 1H, H_{8a}), 2.33 (dd, $^2J_{8b-8a} = 13$, $^3J_{8b-7} = 6$, 1H, H_{8b}), 2.65 (m, 1H, H_{20a}), 2.83 (m, 1H, H_{20b}), 2.90 (d, $^2J_{10a-10b} = 17.5$, 1H, H_{10a}), 3.19 (d, $^2J_{10b-10a} = 17.5$, 1H, H_{10b}), 3.43 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 3.53 (dd, $^3J_{4'-3'} = 5$, $^3J_{4'-5'} = 1$, 1H, $\text{H}_{4'}$), 3.97 (s, 3H, OCH_3), 4.10 (qd, $^3J_{5'-6'} = 6.5$, $^3J_{5'-4'} = 1$, 1H, $\text{H}_{5'}$), 4.30 (m, 4H, H_{14} and H_{17}), 4.88 (dd, $^3J_{7-8b} = 6$, $^3J_{7-8a} = 5$, 1H, H_7), 5.27 (dd, $^3J_{1'-2'\text{ax}} = 3$, $^3J_{1'-2'\text{eq}} = 1$, 1H, $\text{H}_{1'}$), 5.34 (s, 1H, OH_9), 5.35 (t, $^3J_{\text{OH}14-14} = 5$, 1H, OH_{14}), 5.45 (d, $^3J_{\text{OH}4'-4'} = 6$, 1H, $\text{OH}_{4'}$), 7.16-7.27 (m, 15H, Trt), 7.66 (dd, $^3J_{3-2} = 8$, $^4J_{3-1} = 2$, 1H, H_3), 7.74 (bs, 2H, OH phenol), 7.95 (m, 2H, H_1 and H_2)
- ❖ **NMR ^{13}C from HSQC (60 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)** : δ ppm 17 ($\text{C}_{6'}$), 28 ($\text{C}_{2'}$), 31 (C_{21}), 33 (C_{10}), 37 (C_{20}), 39 (C_8), 47 (C_3), 53 (C_{17}), 57 (OCH_3), 66 ($\text{C}_{4'}$ and $\text{C}_{5'}$), 71 (C_7), 72 (C_{14}), 99 ($\text{C}_{1'}$), 119 (C_1 and C_2), 120 (C_3), 127 (15C, Trt)

13-[*O*-(acetylamino-*N*-thioethyl)] oxime doxorubicin : **88**



To a solution of compound **87** (15.2 mg, $1.5 \cdot 10^{-5}$ mol) in 33 mL DCM was added ZnBr_2 (910 mg, $4.0 \cdot 10^{-3}$ mol). ZnBr_2 addition was performed in a single time and immediately followed by the dark red coloration of the solution. The mixture was stirred for 15 min at 30°C leading progressively to the formation of two distinct phases. The purple precipitate was separated from the yellow organic phase by filtration. The precipitate was washed successively with H_2O and CH_3CN and finally dissolved by 150 mL CH_3CN containing 9.9% H_2O and 0.1% TFA. The solution was concentrated under reduced pressure and lyophilised to afford compound **88** as a dark red solid (57.6 mg). Purification by RP-HPLC (5-100% B in 30

min) afforded crude **88** as a red solid powder (7.9 mg, $1.0 \cdot 10^{-5}$ mol).

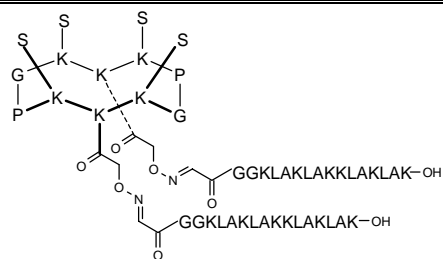
❖ **Yield** : 67%

❖ **RP-HPLC** : RT = 8.1 min (C_{18} , 214 nm and 480 nm, 5-100% B in 15 min), RT = 10.8 min (C_{18} , 214 nm and 480 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{31}H_{37}N_3O_{12}S$ (calcd MW = $675.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$); m/z : $[2M+H]^+ = 1351.3$, $[M+H]^+ = 676.2$

I.7.2 – Double oxime ligation strategy.

(KLA)₂RAFT(S)₄ : 89



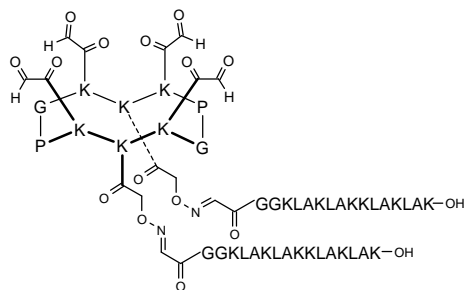
The free aminoxy-containing RAFT **31** (34.5 mg , $1.5 \cdot 10^{-5}$ mol) was dissolved in 3 mL aqueous buffer (0.1 M AcONa, pH 4.6). Glyoxylyl aldehyde-fonctionalized peptide **85** (92 mg , $3.9 \cdot 10^{-5}$ mol) was added to the latter and the reaction mixture was stirred at r.t. After 24 h, a solution of benzyloxyamine (4.7 mg , $2.9 \cdot 10^{-5}$ mol) in 250 μL aqueous buffer (0.1 M AcONa, pH 4.6) was added and the reaction was stirred for another 1 h at r.t. before being purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min). Lyophilization afforded compound **89** (58.0 mg , $8.6 \cdot 10^{-6}$ mol) as a white solid powder.

❖ **Yield** : 56%

❖ **RP-HPLC** : RT = 11.8 min (C_{18} , 214 nm and 250 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{222}H_{402}N_{66}O_{58}$ (calcd MW = $4924.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$); m/z : $[M+4H]^{4+} = 1232.2$, $[M+5H]^{5+} = 985.7$, $[M+6H]^{6+} = 821.5$, $[M+7H]^{7+} = 704.2$

(KLA)₂RAFT(COCHO)₄ : 90



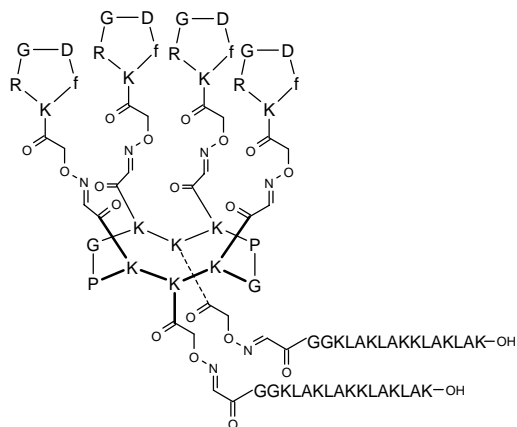
Oxidative cleavage of serine moieties from compound **89** (58.0 mg , $8.6 \cdot 10^{-6}$ mol) was carried out using sodium periodate (7.7 mg , $3.6 \cdot 10^{-5}$ mol) for 1 h at r.t. The reaction mixture was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) to afford glyoxylyl aldehyde-containing

compound **90** as a white powder (51.9 mg, $8.4 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 98% (55% overall yield from **31**)

❖ **RP-HPLC** : RT = 12.1 min (C_{18} , 214 nm and 250 nm, 5-60% B in 15 min)

(KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 91



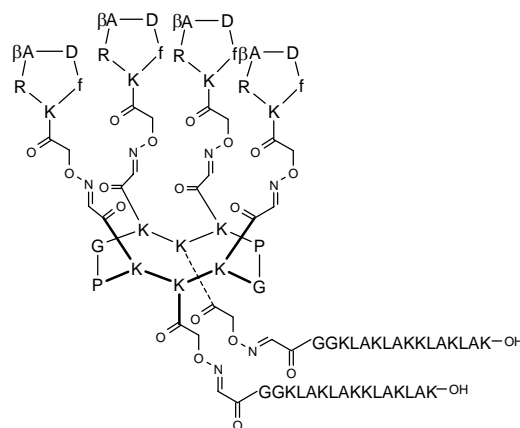
The free aldehyde-containing compound **90** (26.0 mg, $4.2 \cdot 10^{-6}$ mol) was dissolved in 1.5 mL aqueous buffer (50% 0.1 M AcONa, pH 4.6/ 50% CH_3CN). Aminoxy-functionalized cyclopentapeptide **40** (18.1 mg, $2.0 \cdot 10^{-5}$ mol) was added to the latter and the reaction mixture was stirred at r.t. for 24 h. The reaction mixture was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording, after lyophilisation, compound **91** (31.3 mg, $3.4 \cdot 10^{-6}$ mol) as a white solid powder.

❖ **Yield** : 80%

❖ **RP-HPLC** : RT = 8.3 min (C_{18} , 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min), RT = 12.3 min (C_{18} , 214 nm and 250 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{334}H_{550}N_{102}O_{90}$ (calcd MW = $7434.7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; m/z : $[M+6H]^{6+} = 1239.7$, $[M+7H]^{7+} = 1062.9$, $[M+8H]^{8+} = 930.2$, $[M+9H]^{9+} = 826.9$, $[M+10H]^{10+} = 744.2$, $[M+11H]^{11+} = 676.7$, $[M+12H]^{12+} = 620.4$, $[M+13H]^{13+} = 572.6$

(KLA)₂RAFT(c[-RβAdfK-])₄ : 92



The free aldehyde-containing compound **90** (26.0 mg, $4.2 \cdot 10^{-6}$ mol) was dissolved in

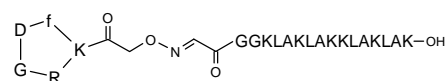
1.5 mL aqueous buffer (50% 0.1 M AcONa, pH 4.6/ 50% CH₃CN). Aminoxy-functionalized cyclopentapeptide **48** (19.1 mg, 2.1.10⁻⁵ mol) was added to the latter and the reaction mixture was stirred at r.t. for 24 h. The reaction mixture was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min) affording, after lyophilisation, compound **92** (28.5 mg, 3.1.10⁻⁶ mol) as a white solid powder.

❖ **Yield** : 73%

❖ **RP-HPLC** : RT = 12.2 min (C₁₈, 214 nm and 250 nm, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₃₃₈H₅₅₈N₁₀₂O₉₀ (calcd MW = 7490.9 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+4H]⁴⁺ = 1873.5, [M+5H]⁵⁺ = 1499.1, [M+6H]⁶⁺ = 1249.5, [M+7H]⁷⁺ = 1071.0, [M+8H]⁸⁺ = 937.4, [M+9H]⁹⁺ = 833.4, [M+10H]¹⁰⁺ = 750.1

c[-RGDfK(KLA)-] : **93**



The free glyoxylyl aldehyde-containing compound **85** (26.0 mg, 1.1.10⁻⁵ mol) was dissolved in 2.2 mL of sodium acetate buffer (0.1 M, pH 4.6). The free aminoxy-containing compound **40** (10.0 mg, 1.1.10⁻⁵ mol) was added to the latter and the solution was stirred for 24 h at r.t. The mixture was purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min). After lyophilization, compound **93** (23.5 mg, 7.5.10⁻⁶ mol) was obtained as a white solid powder.

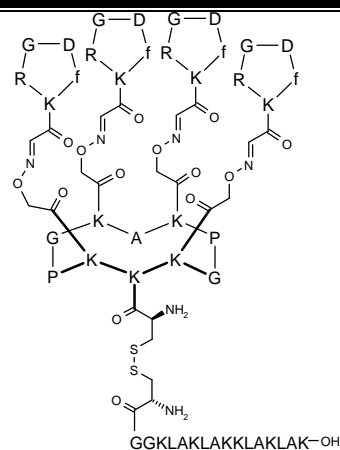
❖ **Yield** : 68%

❖ **RP-HPLC** : RT = 8.7 min (C₁₈, 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₁₀₇H₁₈₆N₃₂O₂₇ (calcd MW = 2352.9 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+2H]²⁺ = 1177.0, [M+3H]³⁺ = 784.9, [M+K+2H]³⁺ = 797.6, [M+2K+H]³⁺ = 810.2, [M+4H]⁴⁺ = 589.0, [M+K+3H]⁴⁺ = 598.4, [M+2K+2H]⁴⁺ = 608.1, [M+5H]⁵⁺ = 471.4, [M+K+4H]⁵⁺ = 479.1, [M+2K+3H]⁵⁺ = 486.7

I.7.3 – Double chemoselective ligation strategy.

(ss-KLA)RAFT(c[-RGDfK-])₄ : **94**



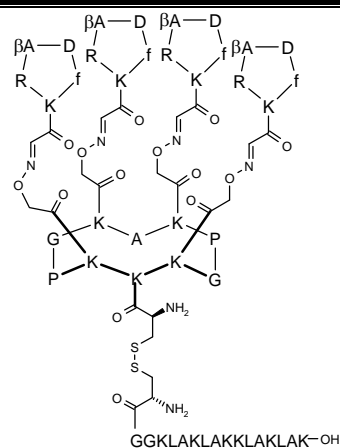
To a solution of compound **22** (6.3 mg, $1.3 \cdot 10^{-6}$ mol) in 135 μ L PBS/DMF (4:1) (10 mM) was added compound **86** (4.9 mg, $1.9 \cdot 10^{-6}$ mol). The reaction mixture immediately became bright yellow. The reaction was stirred for 30 min and immediately purified by RP-HPLC (20-60% B in 40 min). After lyophilisation, the compound **94** was obtained as a white solid powder (2.3 mg, $3.2 \cdot 10^{-7}$ mol).

❖ **Yield** : 25%

❖ **RP-HPLC** : RT = 10.9 min (C_{18} , 214 nm and 250 nm, 5-60% B in 15 min), RT = 22.7 min (C_{18} , 214 nm and 250 nm, 20-60% B in 40 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{253}H_{405}N_{79}O_{69}S_2$ (calcd MW = 5721.7 $g \cdot mol^{-1}$) ; m/z : $[M+4H]^{4+}$ = 1430.8 , $[M+5H]^{5+}$ = 1145.2, $[M+6H]^{6+}$ = 954.4, $[M+7H]^{7+}$ = 818.2, $[M+8H]^{8+}$ = 716.1, $[M+9H]^{9+}$ = 636.7

(ss-KLA)RAFT(c[-R β ADfK-])₄ : **95**

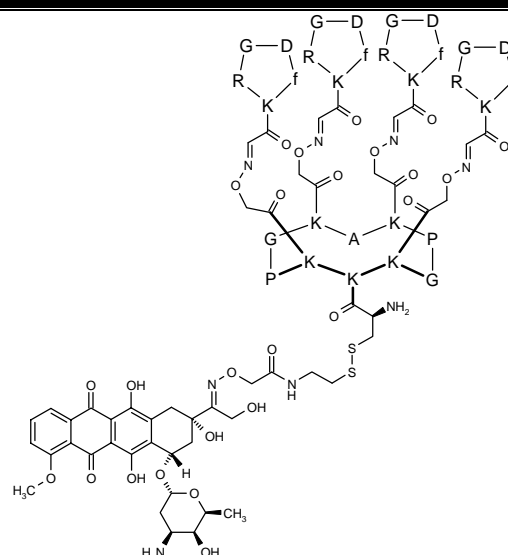


To a solution of compound **23** (5.0 mg, $1.1 \cdot 10^{-6}$ mol) in 200 μ L of a mixture of DMF/phosphate buffer (0.01 M, pH 4.8) (75:25) was added compound **86** (2.8 mg, $1.1 \cdot 10^{-6}$ mol). The reaction mixture immediately became bright yellow. The reaction was stirred for 15 min and immediately purified by RP-HPLC (5-60% B in 30 min). After lyophilisation, the compound **95** was obtained as a white solid powder (6.0 mg, $8.4 \cdot 10^{-7}$ mol).

❖ **Yield** : 76%

❖ **RP-HPLC** : RT = 7.9 min (C_{18} , 214 nm and 250 nm, 5-100% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{257}H_{413}N_{79}O_{69}S_2$ (calcd MW = 5777.8 $g \cdot mol^{-1}$) ; m/z : $[M+4H]^{4+}$ = 1444.9 , $[M+5H]^{5+}$ = 1156.2, $[M+6H]^{6+}$ = 963.7, $[M+7H]^{7+}$ = 826.2, $[M+8H]^{8+}$ = 723.1, $[M+9H]^{9+}$ = 642.8

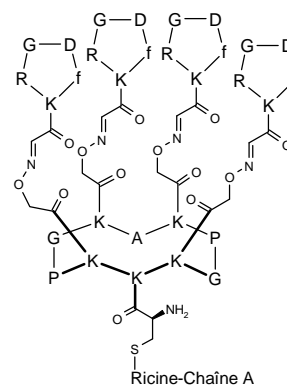
(Dox)RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 96

The NPys-activated thiol-containing compound **22** (8.4 mg, $1.8 \cdot 10^{-6}$ mol) was dissolved in 1.8 mL of a mixture of DMF/phosphate buffer (0.01 M, pH 4.8) (75:25). The mixture of solvents was extemporaneously carefully degassed with argon and deoxygenated. The solution was added on compound **88** (2.0 mg, $2.2 \cdot 10^{-6}$ mol). The mixture was stirred under argon for 1 h at r.t. and purified by gel filtration on Sephadex G15. The fractions containing pure compound **96** were together collected and lyophilised. Compound **96** was finally obtained as a red solid powder (5.6 mg, $1.2 \cdot 10^{-6}$ mol).

❖ **Yield** : 67%

❖ **RP-HPLC** : RT = 11.0 min (C₁₈, 214 nm and 480 m, 5-60% B in 15 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₂₀₅H₂₉₃N₅₉O₆₃S₂ (calcd MW = 4656.1 g.mol⁻¹) ; m/z : [M+4H]⁴⁺ = 1164.6, [M+5H]⁵⁺ = 932.1, [M+Na+4H]⁵⁺ = 936.4, [M+6H]⁶⁺ = 777.0, [M+Na+5H]⁶⁺ = 780.7

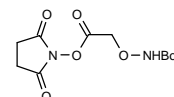
(Ricine-Chaîne A)RAFT(c[-RGDfK-])₄ : 97

To 100 μ L of a solution of 2.3 mg.mL⁻¹ Ricin A chain ($7.7 \cdot 10^{-9}$ mol) in 40% glycerol containing 10 mM phosphate pH 6.0, 0.15 M NaCl, 10 mM galactose and 0.5 mM dithioerythritol (Sigma-Aldrich conditioning solution of deglycosylated Ricin A chain) was added peptide **22** (2.5 mg, $5.3 \cdot 10^{-7}$ mol). The reaction mixture was stirred (the tube was

vortexed several times) and left from 1 day to 1 week at r.t. The mixture was analysed by Electron Spray Ionisation and SELDI-TOF mass spectrometry techniques.

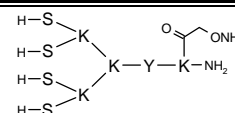
I.8. Miscellaneous.

***N*-Boc-*O*-(carboxymethyl)hydroxylamine succinimide ester : 98**



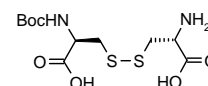
The compound 98 was synthesized according to the procedure described in the literature.³

H-S-K(S)-K(H-S-K(S))-Y-K(CO-CH₂-ONH₂)-NH₂ : 99



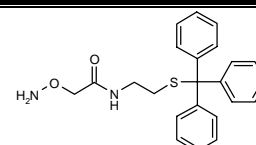
The synthesis of compound 99 was achieved by M. Figuet.²

Boc-C(H-C-OH)-OH : 100



Boc-Cys(NPys)-OH (15.9 mg, $4.2 \cdot 10^{-5}$ mol) was dissolved in 2118 μ L PBS/DMF (4:1) (solution ①). H-Cys-OH (4.2 mg, $3.5 \cdot 10^{-5}$ mol) was dissolved in 1733 μ L of the same solvents (solution ②). Different quantities of solution ② (from 0 to 280 μ L) were added to 200 μ L of solution ①. The volume was adjusted to 500 μ L with PBS/DMF. The reaction was left for 30 min at r.t. and analysed by UV spectroscopy.

***N*-(triphenylmethylthioethyl)aminoxyacetamide : 101**



³ Ide, H.; Akamatsu, K.; Kimura, Y.; Michiue, K.; Makino, K.; Asaeda, A.; Takamori, Y.; Kubo, K. Synthesis and damage specificity of a novel probe for the detection of abasic sites in DNA. *Biochemistry* **1993**, 32, 8276-8283.

The synthesis of compound **101** was achieved by S.D. Edupuganti.⁴

3-nitropyridyl-2-thione : **102**



Boc-Cys(NPys)-OH (25.7 mg, $6.8 \cdot 10^{-5}$ mol) was dissolved in 6.9 mL DMF. 8 mL of a 10 mM solution of H-Cys-OH (9.7 mg, $8.0 \cdot 10^{-5}$ mol) in PBS/DMF (4:1) were added. The addition was immediately followed by the bright yellow coloration of the solution. The mixture was stirred for 1 h at r.t. Solvents were removed under reduced pressure affording a dark yellow solid. Compound **102** was isolated after RP-HPLC purification (5-100% B in 30 min, 410 nm) and obtained after lyophilization as a yellow solid powder (10.1 mg, $6.5 \cdot 10^{-5}$ mol).

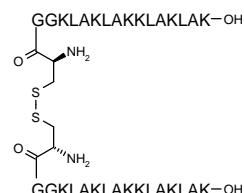
❖ **Yield** : 95%

❖ **RP-HPLC** : RT = 1.3 min (C_{18} , 214 nm and 410 nm, 5-100% B in 15 min), RT = 7.1 min (C_{18} , 214 nm and 410 nm, 20-60% B in 40 min)

❖ **MS (DCI-MS)** : $C_5H_4N_2O_2S$ (calcd MW = $156.2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; positive mode : $[M+H]^+ = 156.9$, $[M+NH_4]^+ = 173.9$; negative mode : $[M]^- = 156$

❖ **UV absorption characteristics** : $\lambda_{\text{max}} = 310 \text{ nm}$ and 410 nm , $\epsilon (410 \text{ nm}) = 1200 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ in PBS/DMF (4:1)

H-C(H-CGGKLAKLAKKLAKLAK-OH)GGKLAKLAKKLAKLAK-OH : **103**

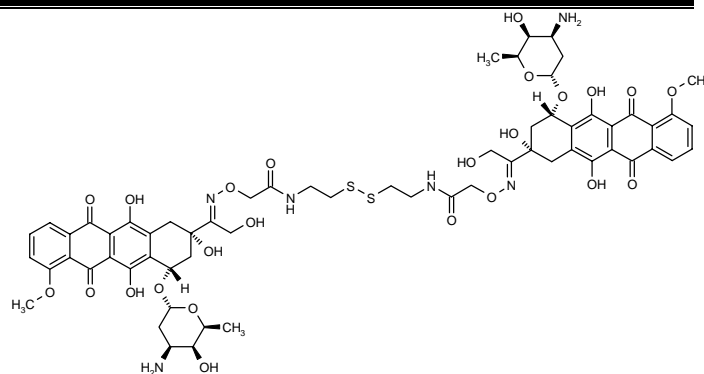


An aliquot of the free cysteine-containing compound **86** was dissolved in PBS at pH 7.2 and left for 1 h at open air.

❖ **RP-HPLC** : RT = 23,6 min (C_{18} , 214 nm, 20-60% B in 40 min)

❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : $C_{158}H_{296}N_{46}O_{36}S_2$ (calcd MW = $3480.5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ; m/z : $[M+5H]^{5+} = 697.0$, $[M+6H]^{6+} = 580.9$, $[M+7H]^{7+} = 498.0$, $[M+8H]^{8+} = 435.8$, $[M+9H]^{9+} = 387.5$, $[M+10H]^{10+} = 348.8$

⁴ Post-doc. 2004.

Dox-ss-Dox : 104

An aliquot of the free thiol-containing compound **88** was dissolved in PBS at pH 7.2 and left for 2 h at open air.

- ❖ **RP-HPLC** : RT = 8.2 min (C₁₈, 214 nm and 480 nm, 5-100% B in 15 min), RT = 11.1 min (C₁₈, 214 nm and 480 nm, 5-60% B in 15 min)
- ❖ **MS (ESI-MS, positive mode)** : C₆₂H₇₂N₆O₂₄S₂ (calcd MW = 1349.4 g.mol⁻¹); m/z : [M+H]⁺ = 1349.5, [M+2H]²⁺ = 675.2

II. Protocoles des tests biologiques.

II.1. Materials and equipments.

II.1.1 – Cell lines and culture conditions.

HEK293(β_3) and HEK293(β_1) cells are subclones of the human embryonic kidney HEK293 cell line, stably transfected by a plasmid encoding the human β_3 and β_1 subunits respectively (kindly provided by J-F. Gourvest, Aventis, France). They were cultured in DMEM enriched with 4.5 g.L⁻¹ glucose and supplemented with 1% glutamine, 10% FCS, penicillin (50 U.mL⁻¹), streptomycin (50 μ g.mL⁻¹) and G418 (700 μ g.mL⁻¹). CHO-3a cell line is a subclone of the Chinese hamster ovary cell line stably transfected by a plasmid encoding the human β_3 subunit (kindly provided by A. Duperray, INSERM U578-IAB, France). They were cultured in DMEM enriched with 4.5 g.L⁻¹ glucose and supplemented with 1% glutamine, 10% FCS, penicillin (50 U.mL⁻¹), streptomycin (50 μ g.mL⁻¹) and G418 (400 μ g.mL⁻¹). BHK(β_3) cell line is a subclone of the baby hamster kidney cell line stably transfected by a plasmid encoding the human β_3 subunit (kindly provided by M. Pfaff, LEDAC-IAB, France). They were cultured in DMEM enriched with 4.5 g.L⁻¹ glucose and supplemented with 1% glutamine, 10% FCS, penicillin (50 U.mL⁻¹), streptomycin (50 μ g.mL⁻¹) and G418 (1,5 mg.mL⁻¹). IGROV1, a human ovarian cancer cell line (kindly provided by L. Poulain, Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse, Caen, France), and Ts/Apc, a mouse mammary carcinoma model, were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 1% glutamine, 10% FCS, penicillin (50 U.mL⁻¹) and streptomycin (50 μ g.mL⁻¹). The A549 human non-small cell lung carcinoma model was purchased from the ATCC. A549 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 1% glutamine, 10% FCS, penicillin (50 U.mL⁻¹) and streptomycin (50 μ g.mL⁻¹). Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, kindly supplied by A. Duperray) were cultured in 199-medium enriched with 50 μ g/mL endothelial cells growth supplement and supplemented with 20% FCS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL), 1% fungizone and 100 μ g/mL heparin. All cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Cell cultures were carried out with the kind help of D. Desplanques.

II.1.2 – FACS analyses.

Flow cytometry experiments were performed on a FACScan (Becton Dickinson, France).

II.1.3 – Fluorescence microscopy.

Fluorescence microscopy was performed on an Olympus BX41 fluorescence microscope. Confocal laser scanning microscopy was performed using a LSM510 confocal laser microscope (Carl Zeiss, France) equipped with an Ar laser (457 nm, 488 nm, 514 nm), two HeNe lasers (543nm and 633nm) and femtosecond Ti/Sa laser, 'Tsunami' Spectra-Physics (wavelength from 690 to 1100 nm).

II.1.4 – Non-invasive *in vivo* imaging.

The fluorescence macroscopic imaging was performed with a cooled CCD Camera (Orca BTL, Hamamatsu). A colored glass filter RG 665, which has a measured optical density >5 at the excitation wavelength 633nm, cuts off all excitation light in the image. When required, animals were illuminated during 100 ms by Light Emitting Diodes equipped with interference filters. The monochromatic illumination level was $50 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$.

II.2. *In vitro* assays.

II.2.1 – Cell Adhesion Assays.

- *Cell adhesion on -RGD- ligand-coated surfaces.*

Streptavidin-coated 96-well culture plates (Labsystem, Helsinki, Finland) were coated extemporaneously by adding 100 μL of a 1 μM solution of each biotinylated peptide diluted in PBS for 1 h at r.t. Non-specific binding sites were saturated with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min at r.t. Trypsined CHO-3a cells were resuspended at a concentration of $10^6 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS containing 1 mM MgCl_2 . One hundred μL /well (10^5 cells) were added to the wells and incubated subsequently for 45 min at 37°C . Wells were rinsed three times with PBS. Adherent cells were then fixed for 15 min with ethanol and stained with

methylene blue in borate buffer. Wells were abundantly rinsed with water, dried overnight and stained cells were resuspended in 100 μL 0.1 N HCl. The number of attached cells was then evaluated by measuring the OD at 630 nm. Each value represents the mean \pm SEM of 8 independent wells.

- *Inhibition of cell adhesion to vitronectin by -RGD- peptides.*

96-well assay plates (Maxisorb NUNC™) were coated for 1 h at r.t. with 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ vitronectin (Collaborative Biomedical) in PBS (100 μL /well) and blocked for 30 min at r.t. with 3% BSA in PBS. Trypsined cells (10^5 cells/condition ; CHO-3a or HEK293(β_3)) were then mixed with different concentrations of peptides in PBS containing 1mM MgCl_2 and immediately added to the vitronectin-coated wells. Cells were incubated for 30 min at 37°C. Wells were then rinsed three times with PBS in order to remove unbound cells. Attached cells were fixed with methanol, stained with methylene blue in borate buffer and quantified by OD reading at 630 nm on a Dynatech MR5000 plate reader or 655 nm on a Biorad plate reader. The activity of peptides could be expressed as IC_{50} values (concentration of peptide necessary to inhibit 50% of cell attachment to the vitronectin substrate) which were determined from inhibition profiles. Each value represents the mean \pm SEM of 3 independent wells.

II.2.2 – FACS experiments.

- *HUVEC apoptosis study.*

6-well tissue culture plates were coated for 1 h at r.t. with 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ vitronectin in PBS and blocked for 30 min at r.t. with 3% BSA in PBS. Trypsined HUVEC were resuspended at $5 \cdot 10^5$ cells. mL^{-1} in their own clarified medium. Solutions of 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ -RGD- peptides (i.e. c[-RGDfK-] **35**, RAFT(c[-RGDfK-])₄ **50** or RAFT(c[-R β ADfK-])₄ **54**) were added to the cells and the mixtures were overlaid on the wells of the vitronectin precoated plates. Spreading of HUVEC was monitored after 6 h coincubation of cells with -RGD- ligands using a transmission light microscope. All the cells from a single well (cells from the supernatant and trypsinized cells) were pooled, washed twice with cold PBS and resuspended at 10^6 cells. mL^{-1} in a binding buffer solution containing 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl_2 precooled at 4°C. 10^5 cells of the latest suspensions were isolated and incubated for 15 min at room temperature with 5 μL FITC-conjugated Annexin V and 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ propidium iodide (according to the protocol provided with the

Annexin V-FITC kit, BD Pharmingen). Suspensions of cells were diluted 5 times with the binding buffer and immediately analysed by flow cytometry using a FACScan (Becton Dickinson). The results are reported as propidium iodide fluorescence (FL2) over FITC fluorescence (FL1) dot plots.

- *$\alpha_V\beta_3$ integrin immunostaining.*

$\alpha_V\beta_3$ integrin expression levels were measured using R-Phycoerythrin-conjugated 23C6 monoclonal antibody (MAb 23C6-RPE ; Becton Dickinson Biosciences) at a 1/100 dilution for 30 min at 4°C on cell suspensions. After rinsing in PBS, the stained cells were analyzed by flow cytometry using a FACScan (Becton Dickinson, France). Non-treated cells were used as control. The results are reported as phycoerythrin fluorescence (FL2) histogram counts.

- *Inhibition of $\alpha_V\beta_3$ integrin specific immunostaining by multivalent RGD-containing RAFTs.*

Adherent HEK293(β_3) cells were resuspended with trypsin, washed once with PBS at r.t. and another time with cold PBS (4°C) containing 1 mM $MgCl_2$. Two million cells in a final volume of 200 μ L were resuspended in 5 μ M precooled RGD-peptide solutions in PBS Mg^{2+} and incubated for 30 min at 4°C. Peptide solutions were removed and pellets rinsed twice with PBS Mg^{2+} . Cells were then resuspended in 200 μ L of a solution of R-Phycoerythrin-conjugated 23C6 monoclonal antibody (MAb RPE-23C6, Becton Dickinson Biosciences) at a 1/100 dilution in PBS Mg^{2+} buffer containing 1% BSA and incubated for 30 min at 4°C. Antibody solution was removed and pellets rinsed twice with PBS Mg^{2+} buffer containing 1% BSA. Cells were fixed (10 min at 4°C with 0.5% paraformaldehyde). Fixation solution was removed and pellets rinsed once with PBS Mg^{2+} at 4°C. Cells were finally analyzed by flow cytometry using a FACScan (Becton Dickinson, France). The results are reported as RPE fluorescence (FL2) histogram counts and expressed as the geometric mean value of FL2 intensity.

For the dose dependant phenomenon study, increasing doses of peptides were studied from 1 nM to 5 μ M and the same general procedure was followed.

For the study of the effect of the number of RGD motifs anchored onto the RAFT scaffold, we used synthetic RAFT(c[-RGDfK-])₁ **53**, RAFT(c[-RGDfK-])₂ **52**, RAFT(c[-

RGDfK-)]₃ **51** and RAFT(c[-RGDfK-])₄ **50** peptides and concentration conditions from 1 nM to 20 μM were studied. The same general procedure was applied.

- *Fixation of FITC-conjugated RGD peptides after pre-incubation of cells with unlabeled peptides.*

HEK293(β₃) cells were resuspended with trypsin and washed twice with cold PBS enriched with 1 mM MgCl₂. One million cells in a final volume of 200 μL were incubated for 30 min at 4°C with saturating concentrations of unlabeled RGD peptides (i.e. 50 μM RAFT(c[-RGDfK-])₄ **50**, 50 μM RAFT(c[-RβADfK-])₄ **54**, 200 μM c[-RGDfK-] **35** or PBS). Peptide solutions were removed and pellets rinsed twice with PBS Mg²⁺. Cells were then resuspended in 200 μL of 2.5 μM FITC-conjugated RGD peptides (i.e. 2,5 μM (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **72**, 2,5 μM (FITC)₁RAFT(c[-RβADfK-])₄ **73**, and 2.5 μM or 10 μM in the case of c[-RGDfK(FITC)-] **74**) and incubated for another 30 min at 4°C. As in the previous step, peptide solutions were removed and pellets rinsed twice with PBS Mg²⁺. Cells were fixed (10 min at 4°C with 0.5% paraformaldehyde) and analyzed by flow cytometry using the FITC-fluorescence channel (FL1).

II.2.3 – Fluorescence microscopy experiments.

- *α_vβ₃ integrin immunostaining.*

Cells were grown for 24 h on 14 mm round cover glasses placed in the wells of a 24-well plate (seeding density of 5.10⁴ cells per well). Cells were carefully rinsed with PBS and fixed for 10 min at r.t. with a 2.5% paraformaldehyde solution containing 4% sucrose. After rinsing, a saturation step was performed using PBS buffer containing 3% BSA for 30 min at r.t. Integrin immunostaining was performed using either the 23C6 monoclonal antibody (MAb 23C6, Pharmingen) at a 1/100 dilution or the LM609 monoclonal antibody (MAb LM609, Chemicon International) at a 1/100 dilution for 30 min at 37°C. Antibody solutions were prepared extemporaneously in PBS buffer containing 3% BSA and 0.1% Triton. After rinsing, cells were incubated for another 30 min at 37°C with a 647-Alexa-conjugated goat anti mouse secondary antibody solution at a 1/500 dilution in PBS buffer containing 3% BSA and 0.1% Triton. Cells were rinsed, mounted in Moeviol, and observed on an inverted confocal microscope (LSM510, Carl Zeiss).

- *Internalization Assays.*

Internalization experiments were performed on adherent HEK293(β_3) cells (5.10^4 cells per well) grown overnight on coverslips, rinsed once with PBS and incubated for 30 min with 2.5 μ M FITC-labeled RGD peptides in PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) (i.e. (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **72**, (FITC)₁RAFT(c[-R β ADfK-])₄ **73**, c[-RGDfK(FITC)-] **74**). Rinsed cells were then fixed with 4% paraformaldehyde containing 5% sucrose and incubated for 5 min in a solution of Hoechst 33342 dye at a 5/1000 dilution. Slides were mounted in Moeviol and examined using an Olympus BX41 fluorescence microscope.

- *Early endosomes colocalization study.*

HEK293(β_3) - 5.10^4 cells per well - were grown on coverslips overnight at 37°C, rinsed and incubated for 30 min at 37°C or 4°C with 2 μ M FITC-labelled RGD-peptide solutions in PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) (i.e. (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **72**, (FITC)₁RAFT(c[-R β ADfK-])₄ **73**, c[-RGDfK(FITC)-] **74**). They were then rinsed and fixed (10 min with 4% paraformaldehyde, 5% sucrose), permeabilized for 30 min at room temperature with 3% BSA containing 0.5% saponin in PBS. Cells were treated with a goat anti-human-EEA1 antibody (Early Endosome Antigen 1 ; Santa Cruz, Le Perray en Yvelines, France) at a 1/200 dilution during 1 h at r.t., rinsed, and incubated for another 1 h at r.t. with a Cy3-labelled donkey anti-goat secondary antibody at a 1/500 dilution. Both antibody solutions were prepared in 3% BSA containing 0.5% saponin in PBS. After being rinsed with PBS, coverslips were mounted in Mowiol. Confocal laser scanning microscopy was performed using a confocal laser microscope (LSM510, Carl Zeiss).

- *$\alpha_v\beta_3$ integrin and FITC-labeled RGD peptides colocalization study.*

HEK293(β_3) cells were grown for 24 h on 4-well Labtek dishes (seeding density of 5.10^4 cells per well). Cells were incubated for 30 min at 37°C with 0.5 μ M FITC-conjugated RGD-peptide solutions (i.e. (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK-])₄ **72**, (FITC)₁RAFT(c[-R β ADfK-])₄ **73** and c[-RGDfK(FITC)-] **74**) in PBS containing 1 mM MgCl_2 . Cells were rinsed with PBS and immediately fixed with methanol (-20°C) for 10 min at 4°C. Cells were rinsed with PBS Mg^{2+} . A saturation step was performed using PBS buffer containing 3% BSA for 30 min at r.t. Integrin immunostaining was performed using the 23C6 monoclonal antibody (MAb 23C6, Pharmingen) at a 1/200 dilution for 1 h at r.t. Antibody solution was prepared extemporaneously in PBS buffer containing 3% BSA and 0.5% Saponine. After rinsing, cells

were incubated for another 1 h at r.t. with a 647-Alexa-conjugated goat anti mouse secondary antibody solution at a 1/500 dilution in PBS buffer containing 3% BSA and 0.5% Saponine. Cells were rinsed and finally observed on an inverted confocal microscope (LSM510, Carl Zeiss).

- *Confocal laser scanning microscopy and FRAP experiments.*

HEK293(β_3) cells were grown for 24 h on 18 mm round cover glasses placed in the wells of a 12-well plate (seeding density of 7.10^4 cells per well). Immediately before running the experiment, cells were incubated for 8 min at r.t. (22°C) in a mixture of R-Phycoerythrin-conjugated LM609 monoclonal antibody (RPE-LM609, Chemicon) at a 1/300 dilution and 0.5 μ M FITC-labeled RGD peptides (i.e. (FITC)₁RAFT(c[-RGDfK])₄ **72**, (FITC)₁RAFT(c[-R β ADfK])₄ **73** and c[-RGDfK(FITC)-] **74**). The incubation with the monovalent peptide, c[-RGDfK(FITC)-] **74**, was performed at either 0.5 μ M or 2 μ M. The antibody and peptide solutions were extemporaneously prepared in HBS (*Hank's Buffer Saline*) enriched with 1 mM MgCl₂. For microscopic observations, coverslips were rinsed once in HBS buffer and disposed on a custom made incubation chamber containing 200 μ L of the FITC-labeled RGD peptide solutions (0.5 μ M of **72** or **73** and 0,5 or 2 μ M of **74**). The confocal imaging and FRAP measurements were carried out at 22°C on an inverted confocal microscope (LSM510, Carl Zeiss) using a 40x water immersion objective of 1.2 numerical aperture. Excitation of FITC and RPE fluorescent labels was performed using 488 nm and 543 nm laser lines respectively. A pinhole adjustment resulted in a 2.5 μ m optical slice used for the visualization of a 25 μ m circular region of the cell apex membrane at scan zoom 4. For FRAP experiments, a 3 μ m circular ROI was uniformly bleached for 2 s with 100% intensity of the 543 nm line (fluorescence bleaching ratio > 90%). The fluorescence recovery was then sampled on the whole region for 170 s every 5 s with 0.1% laser intensity set with AOTF (*Acousto-Optical Tunable Filter*). Thanks to the extremely small excitation power and short acquisition times, no photobleaching was induced during sampling as observed on control cells or on the membrane out of the bleached ROI. Neither lateral nor axial displacement of ROI was observed during FRAP measurements and no recovery of fluorescence was observed on the entirely bleached control cells. Data analysis was performed in assumption that the recovery of fluorescence in ROI was solely due to the two-dimensional cytoplasmic diffusion of

fluorescent species. The diffusion time τd was determined by fitting the normalized fluorescence recovery curves $F(t)$ to the recovery kinetics equation :⁵

$$F(t) = F_0 + [F_\infty - F_0] \cdot \exp\left(\frac{-2\tau d}{t}\right) \cdot \left[I_0\left(\frac{2\tau d}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau d}{t}\right) \right] \quad (1)$$

where t is time, F_0 and F_∞ are initial and final mean fluorescence intensities after photobleaching respectively, I_0 and I_1 are modified Bessel functions. The diffusion time values obtained for each peptide conditions are the mean of 20 individual cells.

II.3. *In vivo* assays.

• *Intra-tumoral administration of -RGD- peptides.*

Female nude mice, 6-8 weeks old from IFFA-Credo (Marcy l'Etoile, France), were maintained under specific pathogen-free conditions. A549 lung carcinoma cells ($20 \cdot 10^6$ cells per mouse) in PBS were injected sub-cutaneously in the back of each animal. When tumour size reached at least $3 \times 3 \text{ mm}^2$, 100 μL of 20 μM RGD-peptides (i.e. RAFT(c[-RGDfK-])₄ **50**, RAFT(c[-R β ADfK-])₄ **54** and c[-RGDfK-] **35**) were administrated twice a week s.c. in or near the tumour site. Antitumour effects were evaluated by tumour size measurements and a final histological examination at the end of the experiment ($n = 9/\text{group}$).

• *Tumour targeting experiments.*

For subcutaneous tumour targeting experiments, 200 μL of a PBS solution containing 50 μg Cy5-labelled RGD-peptides (i.e. 55 μM (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **81**, 54 μM (Cy5)RAFT(c[-R β ADfK-])₄ **82** and 195 μM c[-RGDfK(Cy5)-] **81**) were injected in the tail vein of anaesthetized animals with subcutaneous tumours formed by the rapidly growing and highly angiogenic murine TS/Apc breast carcinoma model.

For scattered deep tumours targeting experiments, $20 \cdot 10^6$ IGROV1 cells were injected intra-peritoneally in nude mice. Three weeks later the mice were treated i.v. with 50 μg / 200 μL of the Cy5 peptide solutions.

⁵ Soumpasis, D. M. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* **1983**, *41*, 95-97. ; Klein, C.; Pillot, T.; Chambaz, J.; Drouet, B. Determination of plasma membrane fluidity with a fluorescent analogue of sphingomyelin by FRAP measurement using a standard confocal microscope. *Brain Res. Protoc.* **2003**, *11*, 46-51.

- *NIR imaging.*

When required, animals were illuminated during 100 ms by Light Emitting Diodes equipped with interference filters. The fluorescence images were acquired with a cooled CCD Camera (Orca BTL, Hamamatsu). Semi-quantitative data were obtained by defining a region of interest (ROI) on the s.c. tumours. A similar ROI was also positioned on the skin of the back of each mouse, very close from the tumour in order to keep illumination homogenous. The number of photons collected into each ROI was then used to calculate the tumour/skin ratios.

- *Immunohistochemistry.*

Frozen tumour sections were fixed in acetone, air dried and endogenous peroxidases blocked using a solution of H₂O₂ (0.3%). After saturation with 5% non-fat milk in PBS for 30 min, the samples were incubated overnight at 4°C with the rat anti-mouse CD31 (PECAM-1 ; Pharmingen) at a 1/3000 dilution in 1% milk. After rinsing, the secondary biotinylated goat anti-rat antibody diluted to 1/500 was added for 1 h at r.t. The staining was performed according to the protocol provided with the ABC complex for 30 min (Dako, Copenhagen). After staining with diaminobenzidine, the slides were counterstained using hematoxylin.

A similar protocol was applied for $\alpha_v\beta_3$ integrin immunostaining. The mouse anti human- $\alpha_v\beta_3$ integrin LM609 (Chemicon, Temecula, CA) was used at a 1/100 dilution and the staining was performed according to the protocol provided with the M.O.M kit (Vector Labs, Burlingame, CA) in order to reduce non-specific signal.

II.4. Evaluation of drug-conjugated RAFT(c[-RGDfK-])₄.

- *Apoptosis induction by (KLA)₂RAFTc[-RGDfK-])₄.*

HEK293(β_3) cells - 5.10⁴ cells per well - were grown for 24 h on 24-well tissue culture plates. The medium was replaced by a fresh solution of complete medium containing 0,5 μ M of peptides (i.e. (KLA)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **91**, (KLA)₂RAFT(c[-R β ADfK-])₄ **92**, c[-RGDfK(KLA)-] **93**, RAFT(c[-RGDfK-])₄ **50** or SGG(KLAKLAK)₂ **84**). The cells were incubated with the peptides for 24 h. All the cells from a single well (cells from the supernatant and trypsinized cells) were pooled, washed twice with cold PBS and resuspended at 10⁶ cells.mL⁻¹ in a binding buffer solution containing 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM

NaCl and 2.5 mM CaCl₂ precooled at 4°C. 10⁵ cells of the latest suspensions were isolated and incubated for 15 min at room temperature with 5 µL FITC-conjugated Annexin V and 5 µg.mL⁻¹ propidium iodide (according to the protocol provided with the Annexin V-FITC kit, BD Pharmingen). Suspensions of cells were diluted 5 times with the binding buffer and immediately analysed by flow cytometry using a FACScan (Becton Dickinson). The results are reported as propidium iodide fluorescence (FL2) over FITC fluorescence (FL1) dot plots.

BIBLIOGRAPHIE

A

Algire, G. H.; Chalkley, H. W. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* **1945**, *41*, 111-124.

Allman, R.; Cowburn, P.; Mason, M. In vitro and in vivo effects of a cyclic peptide with affinity for the $\alpha_v\beta_3$ integrin in human melanoma cells. *Eur. J. Cancer* **2000**, *36*, 410-422.

Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* **1998**, *279*, 377-380.

Arnaout, M. A.; Goodman, S. L.; Xiong, J. P. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 641-651.

Arunachalam, B.; Phan, U. T.; Geuze, H. J.; Cresswell, P. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes : Characterization of a Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 745-750.

Aumailley, M.; Gurrath, M.; Muller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50-54.

B

Ballestrem, C.; Hinz, B.; Imhof, B. A.; Wehrle-Haller, B. Marching at the front and dragging behind: differential $\alpha_v\beta_3$ -integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 1319-1332.

Bamias, A.; Dimopoulos, M. A. Angiogenesis in human cancer : implications in cancer therapy. *Eur. J. Int. Med.* **2003**, *14*, 459-469.

Bergers, G.; Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 401-410.

Boturnyn, D.; Coll, J. L.; Garanger, E.; Favrot, M. C.; Dumy, P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730-5739.

Boturnyn, D.; Dumy, P. A convenient access to $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ integrin ligand conjugates : regioselective solid-phase functionalisation of an RGD based peptide. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2787-2790.

Brooks, P. C.; Clark, R. A.; Cheresh, D. A. Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science* **1994**, *264*, 569-571.

Brooks, P. C.; Montgomery, A. M.; Rosenfeld, M.; Reisfeld, R. A.; Hu, T.; Klier, G.; Cheresh, D. A. Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **1994**, *79*, 1157-1164.

Brooks, P. C.; Silletti, S.; von Schalscha, T. L.; Friedlander, M.; Cheresh, D. A. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* **1998**, *92*, 391-400.

Buerkle, M. A.; Pahernik, S. A.; Sutter, A.; Jonczyk, A.; Messmer, K.; Dellian, M. Inhibition of the α_v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours *in vivo*. *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 788-795.

Burke, P. A.; DeNardo, S. J.; Miers, L. A.; Lamborn, K. R.; Matzku, S.; DeNardo, G. L. Cilengitide targeting of $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4263-4272.

C

Canne, L. E.; Botti, P.; Simon, R. J.; Chen, Y.; Dennis, E. A.; Kent, S. B. H. Chemical Protein Synthesis by Solid Phase Ligation of Unprotected Peptide Segments. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8720-8727.

Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 389-395.

Carmeliet, P.; Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **2000**, *407*, 249-257.

Castel, S.; Pagan, R.; Mitjans, F.; Piulats, J.; Goodman, S.; Jonczyk, A.; Huber, F.; Vilaro, S.; Reina, M. RGD peptides and monoclonal antibodies, antagonists of $\alpha(v)$ -integrin, enter the cells by independent endocytic pathways. *Lab. Invest.* **2001**, *81*, 1615-1626.

Castronovo, V.; Belotti, D. TNP-470 (AGM-1470): mechanisms of action and early clinical development. *Eur. J. Cancer* **1996**, *32A*, 2520-2527.

Cervigny, S. E.; Dumy, P.; Mutter, M. Synthesis of glycopeptides and lipopeptides by chemoselective ligation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1230-1232.

Chen, J.; Zeng, W.; Offord, R.; Rose, K. A novel method for the rational construction of well-defined immunogens: the use of oximation to conjugate cholera toxin B subunit to a peptide-polyoxime complex. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 614-618.

Cooper, A. A.; Stevens, T. H. Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 351-356.

Coste, J.; Le Nguyen, D.; Castro, B. PyBOP : a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.

Coussens, L. M.; Raymond, W. W.; Bergers, G.; Laig-Webster, M.; Behrendtsen, O.; Werb, Z.; Cughey, G. H.; Hanahan, D. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1382-1397.

D

Dawson, P. E.; Kent, S. B. Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923-960.

Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **1994**, *266*, 776-779.

Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Matha, B.; Lohof, E.; Holzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonists. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.

Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444-10450.

Doll, R. The causes of cancer. *Rev. Epidémiol. Santé Publique* **2001**, *49*, 193-200.

Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. A convenient synthesis of cyclic peptides as Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1255-1258.

Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: an NMR and restrained molecular dynamics investigation. *Biopolymers* **1996**, *39*, 297-308.

Dvorak, H. F.; Nagy, J. A.; Feng, D.; Brown, L. F.; Dvorak, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1999**, *237*, 97-132.

E

Ellerby, H. M.; Arap, W.; Ellerby, L. M.; Kain, R.; Andrusiak, R.; Rio, G. D.; Krajewski, S.; Lombardo, C. R.; Rao, R.; Ruoslahti, E.; Bredesen, D. E.; Pasqualini, R. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 1032-1038.

Eskens, F. A.; Dumez, H.; Hoekstra, R.; Perschl, A.; Brindley, C.; Bottcher, S.; Wynendaele, W.; Dreys, J.; Verweij, J.; van Oosterom, A. T. Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ in patients with advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 917-926.

F

Ferlay, J.; Bray, F.; Pisani, P.; Parkin, D. M. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, GLOBOCAN 2002. *IARC Cancer Base, IARC Press Lyon* **2004**, N°5 version 2.0.

Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186.

Folkman, J. Tumor angiogenesis. In : *The Molecular Basis of Cancer* Editors : Mendelson, J.; Howley, P.M.; Israel, M.A.; Liotta, L.A. Philadelphia Saunders **1995**, 206-232.

Fong, T. A.; Shawver, L. K.; Sun, L.; Tang, C.; App, H.; Powell, T. J.; Kim, Y. H.; Schreck, R.; Wang, X.; Risau, W.; Ullrich, A.; Hirth, K. P.; McMahon, G. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 99-106.

Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. Highly efficient synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates: chemoselective oxime and thiazolidine formation. *Chemistry* **2001**, *7*, 3976-3984.

Frisch, S. M.; Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **1994**, *124*, 619-626.

G

Gabizon, A. A. Selective tumor localization and improved therapeutic index of anthracyclines encapsulated in long-circulating liposomes. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 891-896.

Galanis, E.; Vile, R.; Russell, S. J. Delivery systems intended for in vivo gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2001**, *38*, 177-192.

Geoghegan, K. F.; Stroh, J. G. Self-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 138-146.

Gerhardt, H.; Golding, M.; Fruttiger, M.; Ruhrberg, C.; Lundkvist, A.; Abramsson, A.; Jeltsch, M.; Mitchell, C.; Alitalo, K.; Shima, D.; Betsholtz, C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 1163-1177.

Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.

Gewirtz, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunomycin. *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *57*, 727-741.

Giancotti, F. G.; Ruoslahti, E. Integrin signaling. *Science* **1999**, *285*, 1028-1032.

Goldman, E. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* **1907**, *2*, 1236-1240.

Good, D. J.; Polverini, P. J.; Rastinejad, F.; Le Beau, M. M.; Lemons, R. S.; Frazier, W. A.; Bouck, N. P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 6624-6628.

Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Sulyok, G. A.; Kessler, H. Nanomolar small molecule inhibitors for $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_5$, and $\alpha_v\beta_3$ integrins. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045-1051.

Griffioen, A. W.; Molema, G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 237-268.

Grigalvicius, S.; Chierici, S.; Renaudet, O.; Lo-Man, R.; Dériaud, E.; Leclerc, C.; Dumy, P. Chemoselective Assembly and Immunological Evaluation of Multiepitopic Glycoconjugates Bearing Clustered Tn Antigen as Synthetic Anticancer Vaccine. *Bioconjug. Chem.* **2005**, In press.

Gupta, B.; Levchenko, T. S.; Torchilin, V. P. Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 637-651.

Gupta, S. K.; Hassel, T.; Singh, J. P. A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 7799-7803.

Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Aumailley, M.; Timpl, R. Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911-921.

H

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.

Hancock, W. S.; Battersby, J. E. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reaction in solid-phase synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 261-264.

Hashizume, H.; Baluk, P.; Morikawa, S.; McLean, J. W.; Thurston, G.; Roberge, S.; Jain, R. K.; McDonald, D. M. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1363-1380.

Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ integrin for a new cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374-1389.

Haubner, R.; Gratias, R.; Diefenbach, B.; Goodman, S.; Jonczyk, A.; Kessler, H. Structural and Functional Aspects of RGD-Containing Cyclic Pentapeptides as Highly Potent and Selective Integrin $\alpha_v\beta_3$ Antagonists. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461-7472.

Humphries, M. J. Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 311-339.

Hynes, R. O. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 918-921.

I

Ide, A. G.; Baker, N. H.; Warren, S. L. Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma. *Am. J. Radiol.* **1939**, *42*, 891-899.

Ide, H.; Akamatsu, K.; Kimura, Y.; Michiue, K.; Makino, K.; Asaeda, A.; Takamori, Y.; Kubo, K. Synthesis and damage specificity of a novel probe for the detection of abasic sites in DNA. *Biochemistry* **1993**, *32*, 8276-8283.

Ingber, D.; Fujita, T.; Kishimoto, S.; Sudo, K.; Kanamaru, T.; Brem, H.; Folkman, J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* **1990**, *348*, 555-557.

INSERM CépiDC.

International Agency for Research on Cancer (IARC).

J

Jaffar, M.; Williams, K. J.; Stratford, I. J. Bioreductive and gene therapy approaches to hypoxic diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *53*, 217-228.

Jain, R. K.; Koenig, G. C.; Dellian, M.; Fukumura, D.; Munn, L. L.; Melder, R. J. Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Cancer Metastasis Rev.* **1996**, *15*, 195-204.

Javadpour, M. M.; Juban, M. M.; Lo, W. C.; Bishop, S. M.; Alberty, J. B.; Cowell, S. M.; Becker, C. L.; McLaughlin, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3107-3113.

Jencks, W. P. Studies on the mechanism of oxime and semicarbazone formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475-481.

Jones, D. P.; Carlson, J. L.; Mody, V. C.; Cai, J.; Lynn, M. J.; Sternberg, P. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *28*, 625-635.

K

Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino group in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.

Kamber, B.; Riniker, B.; Sieber, P.; Rittel, W. Synthesis of human insulin. III. Preparation of the A(14-21) - B(17-30) fragment. *Helv. Chim. Acta* **1976**, 2830-2840.

Kessler, H.; Diefenbach, B.; Finsinger, D.; Geyer, A.; Gurrath, M.; Goodman, S.; Hölzemann, G.; Haubner, R.; Jonczyk, A.; Muller, G.; Graf von Roedern, E.; Wermuth, J. Design of superactive and selective integrin receptor antagonists containing the RGD sequence. *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *2*, 155-160.

Klein, C.; Pillot, T.; Chambaz, J.; Drouet, B. Determination of plasma membrane fluidity with a fluorescent analogue of sphingomyelin by FRAP measurement using a standard confocal microscope. *Brain Res. Protoc.* **2003**, *11*, 46-51.

Kohli, V.; Blöcker, H.; Köster, H. The triphenylmethyl (trityl) group and its uses in nucleotide chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 2683-2686.

Kohn, E. C.; Liotta, L. A. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1856-1862.

Kok, R. J.; Schraa, A. J.; Bos, E. J.; Moorlag, H. E.; Asgeirsdottir, S. A.; Everts, M.; Meijer, D. K.; Molema, G. Preparation and functional evaluation of RGD-modified proteins as $\alpha_v\beta_3$ integrin directed therapeutics. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 128-135.

L

Langel, U. Cell-penetrating peptides - Processes and Applications. Editor : M.A. Hollinger, CRC Press, Pharmacology & Toxicology Series, Boca Raton, Florida, **2002**.

Langer, M.; Kratz, F.; Rothen-Rutishauser, B.; Wunderli-Allenspach, H.; Beck-Sickinger, A. G. Novel peptide conjugates for tumor-specific chemotherapy. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1341-1348.

Lappi, D. A.; Baird, A. Mitotoxins : growth factor-targeted cytotoxic molecules. *Prog. Growth Factor Res.* **1991**, *2*, 223-236.

Lee, C. C.; Revington, M.; Dunn, S. D.; Petersen, N. O. The lateral diffusion of selectively aggregated peptides in giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1756-1764.

Legler, D. F.; Wiedle, G.; Ross, F. P.; Imhof, B. A. Superactivation of integrin alphavbeta3 by low antagonist concentrations. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 1545-1553.

Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins. Editor : C.W. Rees, CRC Press , Boca Raton, New York, **1997**.

Lollini, P.L.; De Giovanni, C.; Landuzzi, L.; Nicoletti, G.; Fraberti, F.; Cavallo, F.; Giovarelli, M.; Forni, G.; Modica, A.; Modesti, A. Transduction of genes coding for a histocompatibility (MHC) antigen and for its physiological inducer interferon-gamma in the same cell : efficient MHC expression and inhibition of tumour and metastasis growth. *Human Gene Therapy*, **1995**, *6*, 743-752.

Lo-Man, R.; Bay, S.; Vichier-Guerre, S.; Deriaud, E.; Cantacuzene, D.; Leclerc, C. A fully synthetic immunogen carrying a carcinoma-associated carbohydrate for active specific immunotherapy. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1520-1524.

Lord, J. M.; Roberts, L. M.; Robertus, J. D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *Faseb J.* **1994**, *8*, 201-208.

M

Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M. Polyvalent interactions in biological systems : implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.

Martin, K. H.; Slack, J. K.; Boerner, S. A.; Martin, C. C.; Parsons, J. T. Integrin connections map: to infinity and beyond. *Science* **2002**, *296*, 1652-1653.

Maynard, H. D.; Okada, S. Y.; Grubbs, R. H. Inhibition of cell adhesion to fibronectin by oligopeptide-substituted polynorbornenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1275-1279.

Meredith, J. E., Jr.; Fazeli, B.; Schwartz, M. A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell* **1993**, *4*, 953-961.

Mező, G.; Mihala, N.; Andreu, D.; Hudecz, F. Conjugation of epitope peptides with SH group to branched chain polymeric polypeptides via Cys(Npys). *Bioconjug. Chem.* **2000**, *11*, 484-491.

Milenic, D. E. Monoclonal antibody-based therapy strategies: providing options for the cancer patient. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 1749-1764.

Mitjans, F.; Meyer, T.; Fittschen, C.; Goodman, S.; Jonczyk, A.; Marshall, J. F.; Reyes, G.; Piulats, J. In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins. *Int. J. Cancer* **2000**, *87*, 716-723.

Miyamoto, S.; Akiyama, S. K.; Yamada, K. M. Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* **1995**, *267*, 883-885.

Montgomery, A. M.; Reisfeld, R. A.; Cheresch, D. A. Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 8856-8860.

Mori, T. Cancer-specific ligands identified from screening of peptide-display libraries. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 2335-2343.

Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, G.; Tuchscherer, G. Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 11482-11485.

Mutter, M.; Vuilleumier, S. A chemical approach to protein design. Template Assembled Synthetic Protein (TASP). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 535-554.

N

Nagy, A.; Schally, A. V.; Armatis, P.; Szepeshazi, K.; Halmos, G.; Kovacs, M.; Zarandi, M.; Groot, K.; Miyazaki, M.; Jungwirth, A.; Horvath, J. Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 7269-7273.

Nardin, E. H.; Calvo-Calle, J. M.; Oliveira, G. A.; Clavijo, P.; Nussenzweig, R.; Simon, R.; Zeng, W.; Rose, K. Plasmodium falciparum polyoximes: highly immunogenic synthetic vaccines constructed by chemoselective ligation of repeat B-cell epitopes and a universal T-cell epitope of CS protein. *Vaccine* **1998**, *16*, 590-600.

National Cancer Institute.

Neuner, P.; Gallo, P.; Orsatti, L.; Fontana, L.; Monaci, P. An efficient and versatile synthesis of bisPNA-peptide conjugates based on chemoselective oxime formation. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 276-281.

O

O'Reilly, M. S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W. S.; Flynn, E.; Birkhead, J. R.; Olsen, B. R.; Folkman, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **1997**, *88*, 277-285.

O'Reilly, M. S.; Holmgren, L.; Shing, Y.; Chen, C.; Rosenthal, R. A.; Moses, M.; Lane, W. S.; Cao, Y.; Sage, E. H.; Folkman, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **1994**, *79*, 315-328.

P

Park, J. W.; Hong, K.; Carter, P.; Asgari, H.; Guo, L. Y.; Keller, G. A.; Wirth, C.; Shalaby, R.; Kotts, C.; Wood, W. I.; et al. Development of anti-p185HER2 immunoliposomes for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 1327-1331.

- Pastan, I.; Willingham, M.; Fitzgerald, D. J. P. Immunotoxins. *Cell* **1986**, *47*, 641-648.
- Pauli, S. A.; Tang, H.; Wang, J.; Bohlen, P.; Posser, R.; Hartman, T.; Sauer, M. V.; Kitajewski, J.; Zimmermann, R. C. The VEGF/VEGF Receptor 2 Pathway is Critical for Blood Vessel Survival in Corpora Lutea of Pregnancy in the Rodent. *Endocrinology* **2004**.
- Peluso, S.; Dumy, P.; Nkubana, C.; Yokokawa, Y.; Mutter, M. Solid-Phase Strategies for the Assembly of Template-based Protein Mimetics. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7114-7120.
- Peluso, S.; Ruckle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M. Crystal structure of a synthetic cyclodecapeptide for template-assembled synthetic protein design. *ChemBiochem* **2001**, *2*, 432-437.
- Petrovsky, A.; Schellenberger, E.; Josephson, L.; Weissleder, R.; Bogdanov, A., Jr. Near-infrared fluorescent imaging of tumor apoptosis. *Cancer Res* **2003**, *63*, 1936-1942.
- Pfaff, M.; Tangemann, K.; Muller, B.; Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Timpl, R.; Engel, J. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, and $\alpha_5\beta_1$ integrins. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233-20238.
- Plow, E. F.; Haas, T. A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J. W. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785-21788.
- Pooga, M.; Hallbrink, M.; Zorko, M.; Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* **1998**, *12*, 67-77.
- Posnett, D. N.; McGrath, H.; Tam, J. P. A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor beta-chain. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1719-1725.

R

- Rancourt, C.; Rogers, B. E.; Sosnowski, B. A.; Wang, M.; Piche, A.; Pierce, G. F.; Alvarez, R. D.; Siegal, G. P.; Douglas, J. T.; Curiel, D. T. Basic fibroblast growth factor enhancement of adenovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene results in augmented therapeutic benefit in a murine model of ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 2455-2461.
- Rapport de la commission d'orientation sur le cancer **2003**.
- Renaudet, O.; Dumy, P. Chemoselectively template-assembled glycoconjugates as mimics for multivalent presentation of carbohydrates. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243-246.
- Réseau FRANCIM : Réseau Français des Registres de Cancer **2000**.
- Reynolds, L. E.; Wyder, L.; Lively, J. C.; Taverna, D.; Robinson, S. D.; Huang, X.; Sheppard, D.; Hynes, R. O.; Hodivala-Dilke, K. M. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking β_3 integrin or β_3 and β_5 integrins. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 27-34.
- Rose, K. Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.
- Rodriguez, E. C.; Winans, K. A.; King, D. S.; Bertozzi, C. R. A Strategy for the Chemoselective Synthesis of O-Linked Glycopeptides with Native Sugar-Peptide Linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9905-9906.

Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Lewis, R. S.; Murray, B. A.; Wender, P. A. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9506-9507.

S

Saito, G.; Swanson, J. A.; Lee, K. D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 199-215.

Scheibler, L.; Dumy, P.; Boncheva, M.; Leufgen, K.; Mathieu, H. J.; Mutter, M.; Vogel, H. Functionnal Thin Films : Topological Templates for the Chemoselective Ligation Antigenic peptides to Self-Assembled Monolayers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 696-699.

Scheibler, L.; Dumy, P.; Stamou, D.; Duschl, C.; Vogel, H.; Mutter, M. Fonctionnalisation of Gold Surfaces via Topological Templates. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3725-3734.

Schnölzer, M.; Kent, S. B. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease. *Science* **1992**, *256*, 221-225.

Schraa, A. J.; Kok, R. J.; Berendsen, A. D.; Moorlag, H. E.; Bos, E. J.; Meijer, D. K.; de Leij, L. F.; Molema, G. Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *J. Control. Release* **2002**, *83*, 241-251.

Schraa, A. J.; Kok, R. J.; Moorlag, H. E.; Bos, E. J.; Proost, J. H.; Meijer, D. K.; de Leij, L. F.; Molema, G. Targeting of RGD-modified proteins to tumor vasculature: a pharmacokinetic and cellular distribution study. *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 469-475.

Shao, Y.; Kent, S. B. Protein splicing: occurrence, mechanisms and related phenomena. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 187-194.

Shao, J.; Tam, J. P. Unprotected peptides as building blocks for the synthesis of peptide dendrimers with oxime, hydrazone and thiazolidine linkages. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893-3899.

Shen, H.; Mai, J. C.; Qiu, L.; Cao, S.; Robbins, P. D.; Cheng, T. Evaluation of peptide-mediated transduction in human CD34+ cells. *Hum. Gene Ther.* **2004**, *15*, 415-419.

Sieber, P.; Kamber, B.; Eisler, K.; Hartmann, A.; Riniker, B.; Rittel, W. Synthesis of human insulin. II. preparation of the A(1-13) fragment. *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1489-1497.

Soumpasis, D. M. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys. J.* **1983**, *41*, 95-97.

Smith, J. W. Cilengitide Merck. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2003**, *4*, 741-745.

T

Taga, T.; Suzuki, A.; Gonzalez-Gomez, I.; Gilles, F. H.; Stins, M.; Shimada, H.; Barsky, L.; Weinberg, K. I.; Laug, W. E. α_v -Integrin antagonist EMD 121974 induces apoptosis in brain tumor cells growing on vitronectin and tenascin. *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 690-697.

Takahashi, Y.; Kitadai, Y.; Bucana, C. D.; Cleary, K. R.; Ellis, L. M. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3964-3968.

Tam, J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 5409-5413.

Tam, J. P.; Lu, Y. A.; Liu, C. F.; Shao, J. Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 12485-12489.

Tam, J. P.; Yu, Q.; Miao, Z. Orthogonal ligation strategies for peptide and protein. *Biopolymers* **1999**, *51*, 311-332.

Texier, I. F.; Jossierand, V.; Garanger, E.; Razkin, J.; Jin, Z.; Dumy, P.; Favrot, M. C.; Boturyn, D.; Coll, J. L. Luminescent probes for optical *in vivo* imaging. *Proceedings of SPIE* **2005**, *5704*, 16-23.

Thèse M. Figuet, **2003**.

Thumshirn, G.; Hersel, U.; Goodman, S. L.; Kessler, H. Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chemistry* **2003**, *9*, 2717-2725.

Tuchscherer, G.; Dumy, P.; Mutter, M. Protein de Novo Design. *Chimia* **1996**, *50*, 644-648. ; Dumy, P. Cyclic peptides as topological templates in biomimetic chemistry. *Chimia* **1996**, *50*, 640-641.

Tucker, G. C. Alpha v integrin inhibitors and cancer therapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2003**, *4*, 722-731.

V

Valentijn, A. J.; Zouq, N.; Gilmore, A. P. Anoikis. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 421-425.

Vineis, P.; Alavanja, M.; Buffler, P.; Fontham, E.; Franceschi, S.; Gao, Y. T.; Gupta, P. C.; Hackshaw, A.; Matos, E.; Samet, J.; Sitas, F.; Smith, J.; Stayner, L.; Straif, K.; Thun, M. J.; Wichmann, H. E.; Wu, A. H.; Zaridze, D.; Peto, R.; Doll, R. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 99-106.

Vives, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010-16017.

W

Wadia, J. S.; Stan, R. V.; Dowdy, S. F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 310-315.

Weidner, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am. J. Pathol.* **1995**, *147*, 9-19.

Weidner, N.; Semple, J. P.; Welch, W. R.; Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 1-8.

Wu, H.; Seki, T.; Dmitriev, I.; Uil, T.; Kashentseva, E.; Han, T.; Curiel, D. T. Double modification of adenovirus fiber with RGD and polylysine motifs improves coxsackievirus-adenovirus receptor-independent gene transfer efficiency. *Hum. Gene Ther.* **2002**, *13*, 1647-1653.

X

Xiong, J. P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D. L.; Joachimiak, A.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_V\beta_3$. *Science* **2001**, *294*, 339-345.

Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_V\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **2002**, *296*, 151-155.

Z

Zhang, L.; Conejo-Garcia, J. R.; Katsaros, D.; al, e. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 203-213.

Ziche, M.; Donnini, S.; Morbidelli, L. Development of new drugs in angiogenesis. *Curr. Drug Targets* **2004**, *5*, 389-406.

Sites Internet

<http://sc8.vesinet.inserm.fr:1080>

<http://www.cancer.gov>

<http://www-depdb.iarc.fr>

<http://www.gtrv.org>

<http://www.iarc.fr>

<http://www.oncoprof.net/Generale2000>

ANNEXES

ANNEXE 1.

Template Assembled Cyclopeptides as Multimeric System for Integrin Targeting and Endocytosis

D. Boturn, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot, P. Dumy
J. Am. Chem. Soc. ; **2004** ; Vol. 126 (18) ; 5730-5739

.....

Template Assembled Cyclopeptides as Multimeric System for Integrin Targeting and Endocytosis

Didier Boturyn,[†] Jean-Luc Coll,[‡] Elisabeth Garanger,^{†,‡} Marie-Christine Favrot,[‡] and Pascal Dumy^{*,†}

Contribution from the LEDSS, UMR CNRS 5616 and ICMG, FR-2607, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France, and GRCP, INSERM U578, IFR-73, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, France

Received January 6, 2004; E-mail: Pascal.Dumy@ujf-grenoble.fr

Abstract: The $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor plays an important role in human metastasis and tumor-induced angiogenesis. c[-RGDfV-] peptide represents a selective $\alpha_v\beta_3$ integrin ligand that has been extensively used for research, therapy, and diagnosis of neoangiogenesis. We report here the modular synthesis and biological characterization of template assembled cyclopeptides as a multimeric system for targeting and endocytosis of cells expressing $\alpha_v\beta_3$ integrin. c[-RGDfK-] was cleanly assembled in a multivalent mode by chemoselective oxime bond formation to a cyclodecapeptides template labeled by different reporter groups. Binding propensity to the $\alpha_v\beta_3$ receptor and the associated good uptake property displayed by the multivalent molecules demonstrated the interest in the RAFT molecule to design new multimeric system with hitherto unreported properties. These compounds offer an interesting perspective for the reevaluation of integrins as angiogenesis regulators (Hynes, R. O. *Nature Med.* **2003**, *9*, 918–921) as well as for the design of more sophisticated systems such as molecular conjugate vectors.

Introduction

Integrins are heterodimeric transmembrane cell surface receptors that play a central role in cell–cell and cell–extracellular matrix (ECM) adhesion processes.¹ The $\alpha_v\beta_3$ – $\alpha_v\beta_5$ integrin subclass has received special attention as it is expressed in various cell types such as endothelial cells, platelets, osteoclasts, melanoma, and smooth muscle cells. They have a pivotal involvement in pathologies as diverse as osteoporosis, arthritis, retinopathy, tumor-induced angiogenesis, and metastasis formation.² Cells expressing integrins $\alpha_v\beta_3$ – $\alpha_v\beta_5$ interact to the ECM bearing a wide variety of ligands such as fibronectin and vitronectin mainly through the recognition of the ubiquitous triad sequence RGD (Arg–Gly–Asp) that has served as basis for the development of high and selective integrin–peptide ligands. Rational screening of RGD-containing cyclopeptides has led Kessler's group to the discovery of the highly active first-generation peptide c[-RGDfV-] **1** (Figure 1)³ whose *N*-alkylated analogue c[-RGDf(NMe)V-]⁴ is currently investigated in clinical phase II as an angiogenesis inhibitor (Cilengitide, code EMD 12974 Merck KGaA).⁵ Interestingly, other conformationally constrained RGD-containing peptides have been selected in vivo

as selective $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin ligands using phage display peptide libraries.⁶ These highly selective RGD-containing peptides represent key compounds for targeting and tracing $\alpha_v\beta_3$ -expressing tumor cells as well as endothelial cells during neoangiogenesis in the fields of research, therapy, and diagnosis as underlined by the abundant corresponding literature.^{7–10}

Very recently, multivalent $\alpha_v\beta_3$ integrin ligands with an improved affinity have been developed by scaffolding multiple copies of an RGD-containing peptide to a polymer,¹¹ an artificial membrane,¹² as well as a protein¹³ or a peptide.¹⁴ Because the natural functional mode of integrins interaction involves multivalent interactions, this approach could provide not only more effective binding molecules but also systems that could improve the cell targeting and promote cellular uptake through the

[†] Université Joseph Fourier.

[‡] Domaine de la Merci.

- (1) Hynes, R. D. *Cell* **1992**, *69*, 11–25.
- (2) (a) Brooks, P. C.; Clark, R. A. F.; Cheresh, D. A. *Science* **1994**, *264*, 569–571. (b) Giannis, A.; Rübsam, F. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 588–590. (c) For a review, see: Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1375–1389.
- (3) Haubner, R.; Grätias, R.; Diefenbach, B.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461–7472.
- (4) Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Mathä, B.; Lohof, E.; Hölzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033–3040.

- (5) National Cancer Institute clinical trials database online. See <http://clinicaltrials.nci.nih.gov>.
- (6) Pasqualini, R.; Koivunen, E.; Ruoslahti, E. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 542–546.
- (7) Lode, H. N.; Moehler, T.; Xiang, R.; Jonczyk, A.; Gillies, S. D.; Cheresh, D. A.; Reisfeld, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 1591–1596.
- (8) (a) Hood, J. D.; Bednarski, M.; Frausto, R.; Guccione, S.; Reisfeld, R. A.; Xiang, R.; Cheresh, D. A. *Science* **2002**, *296*, 2404–2407. (b) Colin, M.; Maurice, M.; Trugnan, G.; Kornprobst, M.; Harbottle, R. P.; Knight, A.; Cooper, R. G.; Miller, A. D.; Capeau, J.; Coutelle, C.; Brahimi-Horn, M. C. *Gene Ther.* **2000**, *7*, 139–152.
- (9) (a) Arap, W.; Pasqualini, R.; Ruoslahti, E. *Science* **1998**, *279*, 377–380. (b) De Groot, F. M. H.; Broxterman, H. J.; Adams, H. P. H. M.; Van Vliet, A.; Tesser, G. I.; Elderkamp, Y. W.; Schraa, A. J.; Kok, R. J.; Molema, G.; Pinedo, H. M.; Scheeren, H. W. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 901–911.
- (10) (a) DeNardo, S. J.; Burke, P. A.; Leigh, B. R.; O'Donnell, R. T.; Miers, L. A.; Kroger, L. A.; Goodman, S. L.; Matzku, S.; Jonczyk, A.; Lamborn, K. R.; DeNardo, G. L. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2000**, *15*, 71–79. (b) Bitan, G.; Scheibler, L.; Greenberg, Z.; Rosenblatt, M.; Chorev, M. *Biochemistry* **1999**, *38*, 3414–3420.
- (11) Maynard, H. D.; Okada, S. Y.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1275–1279.

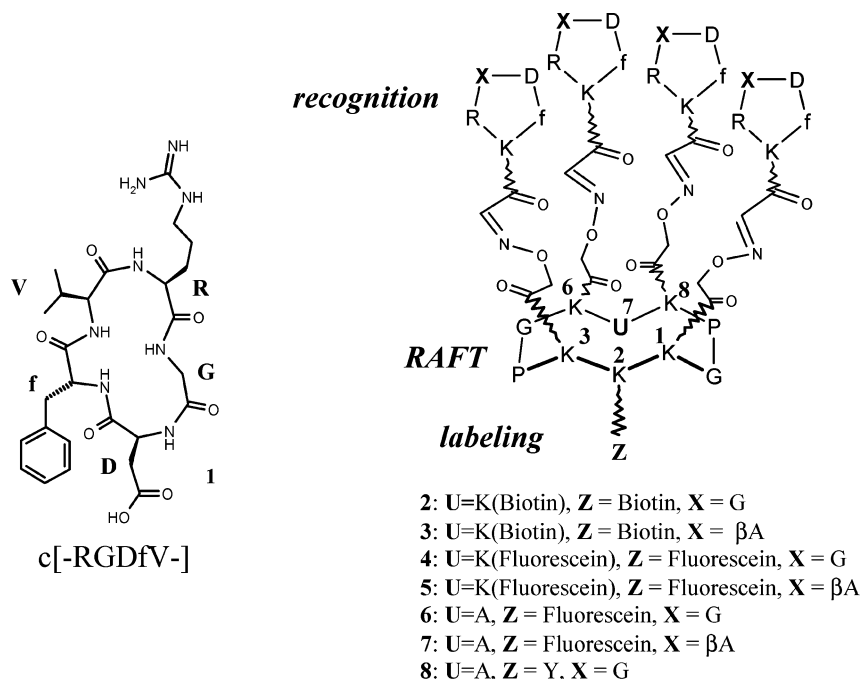


Figure 1. RGD-assembled peptide derivatives **1–8** (f = D-Phe).

integrin-dependent endocytosis pathway thus offering new therapeutic avenues.^{15–17}

There is however still a need for developing more appropriate chemical methods for the preparation of well-defined multivalent ligand architectures that may also incorporate effector molecules such as label groups as tools for biological evaluation or subsequently cytotoxic molecules for therapeutic applications. In this context, we describe herein the modular synthesis of compounds **2–8** based on a cyclic decapeptide scaffold (RAFT) that incorporates and presents in a spatially controlled manner two independent functional domains: a clustered ligand domain for integrin recognition and cell targeting and a labeling domain for detection and characterization of this binding. Preliminary study on the biological activity of the (biotin)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄, **2**, (fluorescein)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄, **4**, and (fluorescein)-RAFT(c[-RGDfK-])₄, **6**, have shown that these multivalent systems fully conserved the recognition and selectivity properties of the cognate monovalent cyclopentapeptide c[-RGDfK-] to cells expressing α_vβ₃ integrin receptors. Most notably, these systems were found to penetrate cells expressing α_vβ₃ integrins by endocytosis in a receptor-dependent manner more effectively than the cognate monovalent ligand. These results underline the effectiveness of this general strategy to provide biological active systems for selectively targeting cells expressing the α_vβ₃ integrin receptors. These molecules offer a wide range of

possibility to characterize the binding interactions to cells expressing the α_vβ₃ integrin as well as the endocytosis process. For instance, biotinylated compounds **2** and **3** were designed to form stable complexes with avidin or streptavidin protein which are commercially available for applications such as surface functionalization or labeling. Fluorescein-containing molecules **4–6** represent useful compounds ready for use in experiments such as fluorescent or confocal microscopy. Compounds **7** and **8** were designed for radiolabeling with ¹²⁵I and are currently used in radiobinding assays as well as in vivo imaging in mice.¹⁸ These molecules represent the first instance of a cyclopeptide presenting an array of cyclopeptides which emphasizes the efficiency of our approach to construct such new architectures for recognition. In addition, the usefulness of the chemical strategy presented here is currently extended to more complex systems presenting elements for cell recognition as well as cytotoxic elements for therapeutic evaluation.¹⁹ It is expected that these bifunctional systems might be useful in the near future as reagents to study and modulate physiologically important integrin-extracellular matrix protein interactions and as drugs for disease-related applications as well as new nonviral targeting systems for drug delivery. In addition, it is worth noting that our approach is not limited to integrin targeting or detection applications. By adapting the corresponding domain on the template, it may be conceptually easily exploited to target different cells or tissues due to the increasing number of selective ligands selected in vivo, and the range of applications may be greatly extended by using the vast repertoire of available organic compounds.

Results

Design. We reasoned that a controlled presentation of RGD moieties in a clustered format may result in more efficient

- (12) (a) Marchi-Artzner, V.; Lorz, B.; Hellerer, U.; Kantelehner, M.; Kessler, H.; Sackmann, E. *Chem.-Eur. J.* **2001**, *7*, 1095–1101. (b) Hu, B.; Finsinger, D.; Peter, K.; Guttenberg, Z.; Bärmann, M.; Kessler, H.; Escherich, A.; Moroder, L.; Böhm, J.; Baumeister, W.; Sui, S.-F.; Sackmann, E. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12284–12294.
- (13) Kok, R. J.; Schraa, A. J.; Bos, E. J.; Moorlag, H. E.; Asgeirsdottir, S. A.; Everts, M.; Meijer, D. K. F.; Molema, G. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 128–135.
- (14) Thumshirn, G.; Hersel, U.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *Chem.-Eur. J.* **2003**, *9*, 2717–2725.
- (15) For a review of multivalent interaction, see: Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- (16) Castel, S.; Pagan, R.; Mitjans, F.; Piulats, J.; Goodman, S.; Jonczyk, A.; Huber, F.; Vilaro, S.; Reina, M. *Lab. Invest.* **2001**, *81*, 1615–1626.
- (17) Maheshwari, G.; Brown, G.; Lauffenburger, D. A.; Wells, A.; Griffith, L. G. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1677–1686.

- (18) Sancey, L.; Boturyn, D.; Vuilleux, J.-P.; Dumy, P.; Fagret, D. Work in progress.
- (19) Dumy, P.; Boturyn, D.; Coll, J. L.; Favrot, M. C. FR/02/11614, PCT/FR03/02773.

clustering of the ligand-bound integrin compared to the same ligand presented individually. The recognition module consists of the c[-RGDfK-] ligand since it is known that an exchange of valine residue in the cognate cyclopentapeptide for lysine has no significant influence on biological activity.³ c[-RGDfK-] can be readily functionalized through the chemistry of its lysine ϵ -amino group as emphasized by various applications such as tumor targeting⁹ or imaging²⁰ and cell adhesion stimulation.²¹ In addition, we reported that a lysine side chain functionalized by aminoxy or glyoxylyl groups²² represents a powerful way to conjugation to a diversity of molecules by chemoselective oxime bond formation.²³ This ligation technique is highly efficient, compatible with a wide variety of chemical functions, and allows the oxime bond formation between unprotected fragments without any coupling reagent and with minimal chemical manipulation.²⁴ Moreover, the oxime linkage presents the further advantage of being stable in vitro and in vivo.²⁵ We selected the regioselectively addressable functionalized template (RAFT) as a suitable scaffold to direct independently and separately the cyclopentapeptide ligands as well as reporter groups (Figure 1). RAFT molecules represent topological cyclic decapeptides containing orthogonally protected attachment sites pointing to opposite faces of the template backbone that are chemically accessible at gram scale.²⁶ These addressable systems can readily exhibit various levels of regioselectivity thanks to an appropriate choice of the residues' side chain protecting groups encompassing the Pro-Gly sequence. They display homogeneous conformation control²⁷ that have been exploited successfully for protein mimic²⁸ or surface functionalization.²⁹ In addition, we recently reported successfully the chemoselective oxime assembly of aminoxy-carbohydrates to the RAFT molecule for the presentation of carbohydrate motifs clusters.³⁰ The modular functionalization with c[-RGDfK-] as an $\alpha\beta_3$ integrin ligand or c[-R β ADfK-] as a nonsense peptide, as well as fluorescein, biotin, or tyrosine molecules (Figure 1), thus provides series of molecules required for integrin targeting studies.

The ligand and technique for its chemical manipulation in hand, a strategy in three steps was devised, whereby the RAFT

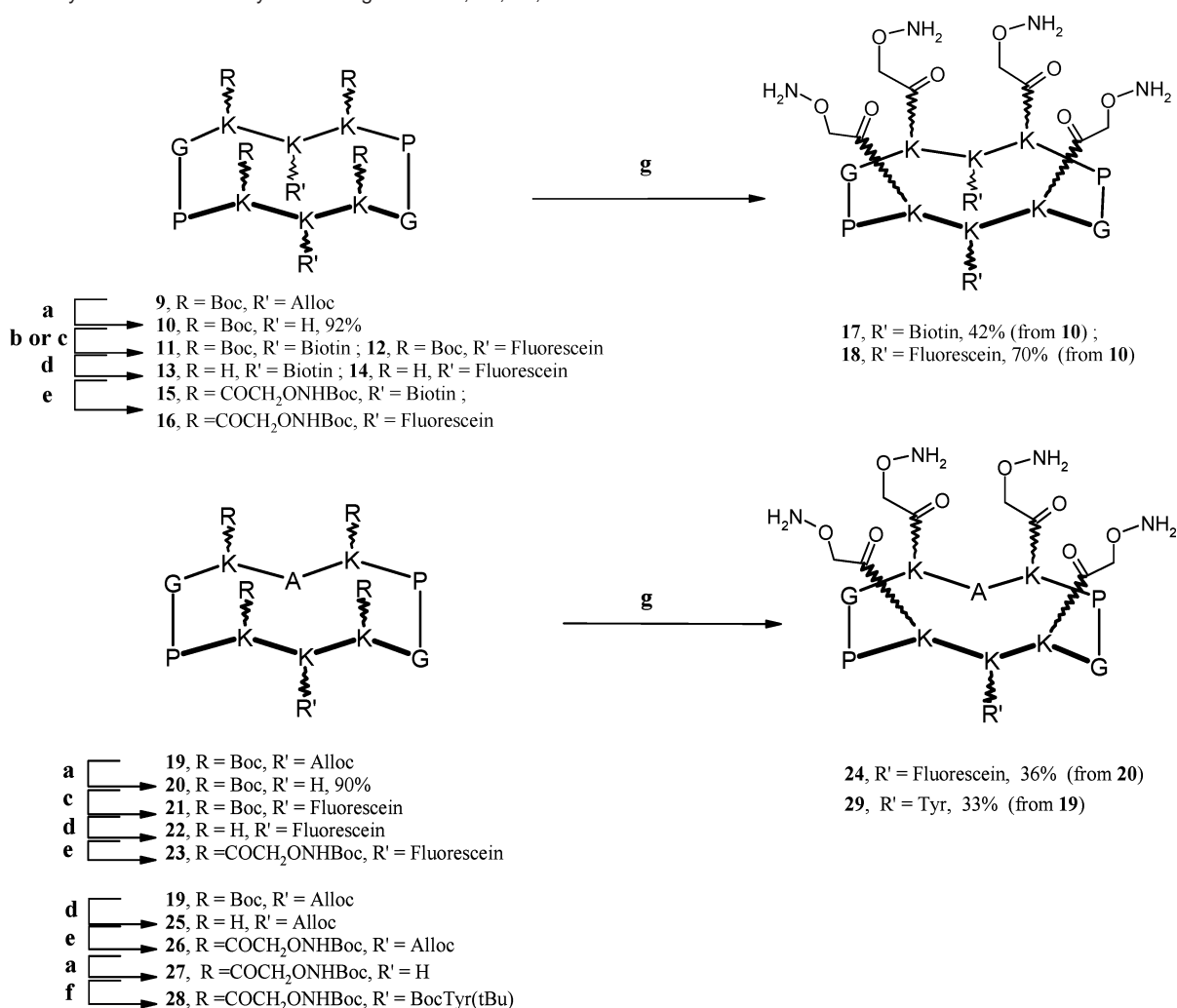
molecules formed the pivotal intermediate: (1) the solid phase peptide synthesis of linear protected peptide fragments, their cyclization in solution to provide the corresponding templates and cyclopentapeptides; (2) the sequential deprotection–functionalization of a lysine side chain with label molecules and subsequently four aminoxy groups on the template's face as well as the functionalization of the lysine side chain on the cyclopentapeptides by a glyoxylyl group; (3) the final oxime ligation of deprotected aminoxy-containing RAFT molecules and *N*⁶-glyoxylyl-lysyl cyclopentapeptides to provide the desired compounds.

RAFT Molecules. The RAFT with two functional domains formed the central intermediate required for a multivalent presentation with an integrin ligand as well as the chemical derivatization with labeling molecules. The convenient choice of lysine side chain protections and their relative positioning within the peptide primary sequence provide cyclodecapeptides **9** and **19** exhibiting two attachment faces (Scheme 1). The Boc and Alloc groups were selected because they are well-documented orthogonal protections and the corresponding protected lysine residues are commercially available. The linear precursor-containing side chain protected peptides, namely H-Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Lys(Boc)-Pro-Gly-OH and H-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Lys(Boc)-Pro-Gly-OH, were obtained using a standard Fmoc/*t*Bu solid-phase chemistry on an acid-labile Sasrin resin by adapting the previously described procedures.^{26,28b} It is worth noting that the mild acid conditions used for the release of the linear protected peptide from this support (e.g., 1% TFA/CH₂Cl₂, 2 min) was required to be compatible with the Boc side chain protection stability. Glycine as the C-terminal end was essential to secure the subsequent cyclization step with the N-terminal lysine α -amino group from epimerization. The corresponding head-to-tail cyclization was performed in DMF under high dilution with PyBOP reagent as reported²⁶ to provide the corresponding RAFT molecules **9** and **19** in quantitative yields. Removal of the Alloc group using the well-established Pd⁰/PhSiH₃ procedure³¹ afforded the desired derivatives **10** and **20** containing one and two free amino groups, respectively, in excellent yields. Acylation of the fluorescein or biotin groups to the latter amine functions was accomplished directly with FITC (isomer I) or PyBOP coupling conditions, respectively. The corresponding labeled derivatives (biotin)₂RAFT(Boc)₄ **11**, (fluorescein)₂RAFT(Boc)₄ **12**, and (fluorescein)RAFT(Boc)₄ **21** were isolated after ether precipitation in sufficient purity to carry out the subsequent step. Compounds **11**, **12**, and **21** were smoothly deprotected with 50% trifluoroacetic acid at room temperature in dichloromethane for 1 h and acylated with the succinimide ester of *N*-Boc-*O*-(carboxymethyl)hydroxylamine³² to yield functionalized templates **15**, **16**, and **23**, respectively. Removal of the Boc groups was achieved by treatment with TFA containing triisopropylsilane (TIS) and water in CH₂Cl₂ (50/5/5/40) for 1 h. RP-HPLC purification provided the key aminoxy intermediates (biotin)₂RAFT(COCH₂ONH₂)₄ **17**, (fluorescein)₂RAFT(COCH₂ONH₂)₄ **18**, and (fluorescein)RAFT(COCH₂ONH₂)₄ **24** in excellent overall yields, 42%, 70%, and 36%, respectively, for four steps (Scheme 1). To introduce a

- (20) Haubner, R.; Wester, H. J.; Weber, W. A.; Mang, C.; Ziegler, S. I.; Goodman, S. L.; Senekowitsch-Schmidtke, R.; Kessler, H.; Schwaiger, M. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1781–1785.
- (21) Kanteleiner, M.; Finsinger, D.; Meyer, J.; Schaffner, P.; Jonczyk, A.; Diefenbach, B.; Nies, B.; Kessler, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 560–562.
- (22) Boturyn, D.; Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2787–2790.
- (23) Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. *Chem.—Eur. J.* **2001**, *7*, 3976–3984.
- (24) (a) Canne, L. E.; Botti, P.; Simon, R. J.; Chen, Y.; Dennis, E. A.; Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8720–8727. (b) Miao, Z.; Tam, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4253–4260. (c) Zhang, L.; Torgerson, T. R.; Liu, X.-Y.; Timmons, S.; Colosia, A. D.; Hawiger, J.; Tam, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 9184–9189. (d) Rose, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30–33.
- (25) Nardin, E. H.; Calvo-Calle, J. M.; Oliveira, G. A.; Clavijo, P.; Nussenzweig, R.; Simon, R.; Zeng, W.; Rose, K. *Vaccine* **1998**, *16*, 590–600.
- (26) Dumy, P.; Eggleston I., Servigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1255–1258.
- (27) (a) Peluso, S.; Ruckle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 432–437. (b) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. *Biopolymers* **1996**, *39*, 297–308.
- (28) (a) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G. *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1587–1591; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 11482–1485. (b) Peluso, S.; Dumy, P.; Nkubana, C.; Yokokawa, Y.; Mutter, M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7114–7120 and references therein.
- (29) (a) Scheibler, L.; Dumy, P.; Stamo, D.; Duschl, C.; Vogel, H.; Mutter, M. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3725. (b) Scheibler, L.; Dumy, P.; Boncheva, M.; Leufgen, K.; Mathieu, H. J.; Mutter, M.; Vogel, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 696–699.
- (30) Renaudet, O.; Dumy, P. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 243–246.

(31) Thieriet, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibé, F.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7275–7278.

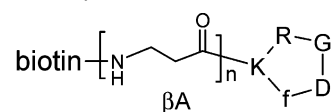
(32) Ide, H.; Akamatsu, K.; Kimura, Y.; Michiue, K.; Makino, K.; Asaeda, A.; Takamori, Y.; Kubo, K. *Biochemistry* **1993**, *32*, 8276–8283.

Scheme 1. Synthesis of Aminoxy-Containing RAFT **17**, **18**, **24**, and **29**^a

^a (a) (PPh₃)₄Pd, PhSiH₃, CH₂Cl₂; (b) PyBOP, biotin, DIEA, DMF; (c) FITC (isomer I); (d) TFA/CH₂Cl₂ 1:1; (e) BocNHOCH₂COOSu, DIEA, DMF; (f) PyBOP, BocY(tBu)OH, DIEA, DMF; (g) TFA/TIS/H₂O/CH₂Cl₂ 50:5:5:40.

tyrosine residue, a reverse functionalization strategy was required to satisfy the use of BocTyr(O*t*Bu)OH: first, removal of the Boc groups of **19** followed by a subsequent acylation with *N*-Boc-*O*-(carboxymethyl)hydroxylamine succinimide ester afforded compound **26**. Then, removal of the Alloc group and PyBOP acylation with BocTyr(O*t*Bu)OH provided Boc/*t*Bu protected template **28**. A total deprotection was accomplished using a concentrated TFA solution containing *p*-cresol, TIS, and water as scavengers providing compound **29** in 33% overall yield (Scheme 1).

Cyclopeptide Ligand and Control Peptide. The exchange of glycine residue for β -alanine in cyclic pentapeptide c[-RGDfK-] is known to totally abolish recognition of the peptide by $\alpha_v\beta_3$ integrin.³ Therefore, c[-R β ADfK-] was used as a negative control in our biological assays. The cyclic pentapeptide c[-RGDfK(S)-] **30** as well as c[-R β ADfK(S)-] **31** derivatives acylated on the lysine side chain with a serine residue were prepared by two-dimensional solid-phase synthesis as described earlier.²² Oxidative cleavage with sodium periodate of the amino-alcohol moiety of serine containing cyclopentapeptides afforded the desired glyoxylyl compounds c[-RGDfK-(COCHO)-] **32** and c[-R β ADfK-(COCHO)-] **33** in quantitative yields. Removal of formaldehyde byproduct and unreacted

Scheme 2. Structure of the Monovalent Biotinylated-RGD Ligands Containing β -Alanine Spacers **34–39**

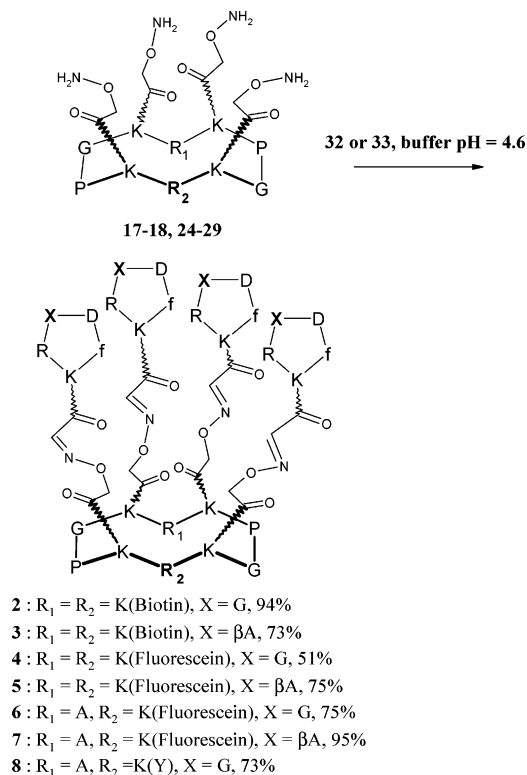
34 :n=0; **35** :n=1; **36** :n=2; **37** :n=3; **38** :n=4; **39** :n=5

periodate was readily accomplished by RP-HPLC purification to give the pure compounds ready for oxime ligation.

Access to monovalent RGD-control peptides bearing a biotin on the lysine side chain, c[-RGDfK([β A]_{*n*}-biotin)-] **34–39** (*n* = 0–5, Scheme 2) was achieved by a combination of SPPS and solution strategies.²² Incorporation of β -alanine (*n* = 0–5) units as a spacer was used to optimize the separation between the ligand and biotin group required for the interaction with the integrin receptor as well as with streptavidin (*vide supra*). Fluorescent cyclopentapeptide c[-RGDfK(fluorescein)-] **41** was obtained by oxime ligation between the *N*^ε-glyoxylyl-lysyl peptide **32** and fluorescein containing oxamine group³³ **40** in acetate solution at pH 4.6 in 77% yield. Acylation at the lysine side chain of protected cyclopentapeptide by succinic anhydride

(33) Trévisiol, E.; Defranco, E.; Lhomme, J.; Laayoun, A.; Cros, P. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6501–6510.

Scheme 3. Synthesis of Compounds 2–8 by Oxime Ligation of Glyoxylyl Cyclopentapeptides to Aminoxy-RAFT Molecules 32 and 33



followed by acid-mediated deprotection provided c[-RGDfK-(COCH₂CH₂CO₂H)-] **42**, as the key compound for attempting direct RGD-peptide anchorage to the template molecule by conventional amide bond formation (vide supra).

Template Presenting Tetravalent Cyclopeptides. Compounds **17**, **18**, **24**, and **29** exhibiting four aminoxy functions provide the key intermediates to assemble by chemoselective oxime formation an array of cyclopentapeptides on the template. (biotin)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **2**, (biotin)₂RAFT(c[-RβADfK-])₄ **3**, (fluorescein)₂RAFT(c[-RGDfK-])₄ **4**, (fluorescein)₂RAFT(c[-RβADfK-])₄ **5**, (fluorescein)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **6**, (fluorescein)RAFT(c[-RβADfK-])₄ **7**, and (tyrosine)RAFT(c[-RGDfK-])₄ **8** were easily obtained by oxime ligation of the appropriate cyclopentapeptide-containing aldehyde, namely c[-RGDfK-(COCHO)-] **32** and c[-RβADfK(COCHO)-] **33**, under classical conditions at pH 4.6 (Scheme 3). This provided labeled molecules with a clustered presentation of the integrin RGD ligand **2**, **4**, **6**, and **8** as well as comparable molecules as negative controls **3**, **5**, and **7**. As inferred by HPLC, the ligation step proceeded cleanly and the reactions were generally complete after 6 h by using a slight 1.5-fold excess of aldehyde compounds relative to the aminoxy-containing template. The yields of the reactions were satisfactory ranging from 51 to 95% after purification steps. In addition, a reaction was carried out using an equimolar ratio of compounds **17** and **32** to probe the putative intermediates formed along the oxime coupling reaction. The HPLC profile (Figure 2) obtained after a 1 h reaction time with these conditions showed the presence of intermediate products.³⁴ They disappeared on further addition of aldehyde

(34) Intermediates were identified and studied by LC-MS technique to be the mono, bis, and tri ligated compounds.

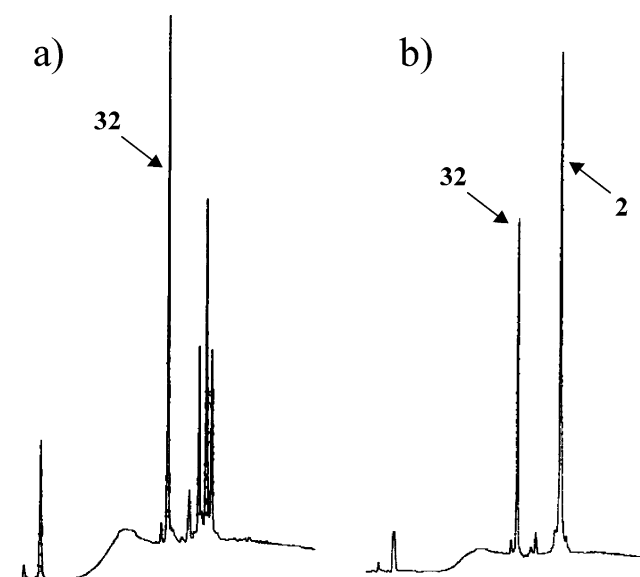


Figure 2. HPLC profiles of (a) a reaction between **17** and 1 equiv of **32** after 1 h and (b) a reaction between **17** and 6 equiv of **32** after 6 h.

compound to provide eventually the HPLC signal corresponding to the desired product. It is important to note that attempts to assemble the cyclopentapeptide by conventional amide formation using protected compounds **42** and template molecule **13** were totally unsuccessful³⁵ thus emphasizing the efficacy of the oxime ligation.

Biological Data. First, oxime-containing compounds **2–8** were incubated in phosphate buffer at pH 7.0 to assess on their stability. Neither hydrolysis nor degradation phenomenon was observed by HPLC even after several days (data not shown) which indicates that these compounds remain fully stable under the biological experimental conditions used in this study.

A. Cell Adhesion Assays. Binding studies of RGD derivatives were first realized on different cell lines (data not shown).³⁶ Among all cell lines investigated, CHO3a was selected as the model for our in vitro experiments because it is a stable transfectant of the chinese hamster ovary (CHO) cell line expressing a good level of α_vβ₃ integrin. To test the functional integrity of the c[-RGDfK-]-containing peptides, we studied first the adhesion of CHO3a cells on a surface coated by biotinylated peptides **2** and **34–39** and second the inhibition of CHO3a attachment to vitronectin-coated wells by the same peptides. Previously, we investigated the importance of the linker length between the control RGD ligand and the biotin moiety. Biotinylated-peptides **34–39** were loaded onto streptavidin-coated 96-well plates. CHO3a cells were then incubated for 45 min at 37 °C, and their ability to adhere on these surfaces was measured after staining (Figure 3). As expected the negative control peptide **3** containing the RβAD sequence did not allow cell adhesion, while the cells adhered normally on a fibronectin-coated surface (FN). Derivatives **34** and **35** containing shorter linkers between RGD and biotin motifs were not able to bridge the streptavidin surface and the cells. Increasing gradually the length of the linker from two up to five, β-alanine (respectively,

(35) This is attributed to tedious solubility problems and presumed steric hindrance imposed by the presence of protecting groups required during the coupling reaction.

(36) HEL, PMA-induced HEL, CHOT, K562, HeLa, and CHO3a were used for preliminary experiments. K562 devoid of α_vβ₃ integrin was used along this work as control.

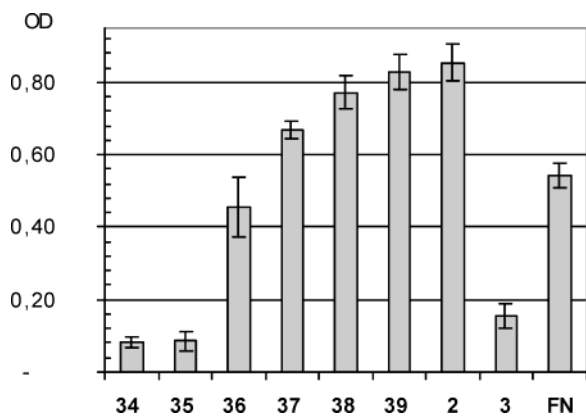


Figure 3. Adhesion assay. Streptavidin-coated 96-well dishes were loaded with $1 \mu\text{M}$ **2**, **3**, and **34–39** peptides. Fibronectin (FN) was directly coated on MaxiSorp 96-well plates at a concentration of $0.5 \mu\text{g}/\text{well}$. CHO3a cells (100 000) were then incubated for 45 min at 37°C in PBS containing 1 mM MgCl_2 and rinsed 3 times, and the remaining adherent cells were fixed, stained with methylene blue, and resuspended in $100 \mu\text{L}$ HCl 0.1 N. The OD at 630 nm was measured. The mean \pm SEM ($n = 8$ for each peptide) of one representative experiment repeated 3 times is presented.

peptides **36**, **37**, **38**, and **39**) was associated with better cell adhesion processes probably due to an increased accessibility of the RGD motifs. Remarkably, a surface coated with the multivalent compound **2** exhibited an adhesion pattern comparable to those displayed by the optimized monovalent RGD ligand.

Next, we compared the multivalent compound's efficiency to compete with vitronectin toward CHO3a adhesion. A suspension of cells was mixed with different concentrations of peptides and allowed to adhere on vitronectin for 45 min at 37°C before being rinsed 3 times in PBS, fixed, and stained. The inhibitory ability of each peptide was quantified by the measuring of its IC_{50} (concentration of peptide necessary to inhibit 50% of the cell attachment). As expected the negative control peptide **3** had no effect on vitronectin-mediated adhesion. In contrast, the monovalent compound **38** as well as the multivalent compound **2** inhibited strongly the attachment of CHO3a on vitronectin-coated wells. An IC_{50} of $0.5 \pm 0.05 \mu\text{M}$ was calculated for compound **2**, while a lower IC_{50} value around $2.5 \mu\text{M}$ was found for **38**.

B. Internalization Assays. Internalization assays were performed directly using fluorescent peptides **4–7** and **41** or after the formation of an FITC-labeled streptavidin complex with the biotinylated peptides **2** and **3**. After a 15 min incubation at 37°C in the presence of $10 \mu\text{M}$ peptides, the CHO3a cells were washed and fixed, and the fluorescence detected directly in the case of **2** or **3** or after permeabilization and amplification. As shown in Figure 4, RGD-containing compound **6** is more

particularly internalized by the CHO3a cells than the control peptide **49**. At 4°C , cellular uptake was inhibited, the peptides being located outside the cell membrane thus suggesting a typical endocytic pathway (Figure 4b). For molecules **2**, **4**, and **6**, similar internalization results were obtained demonstrating that the detection domain does not interfere with the recognition domain. The streptavidin–**2** complex was also internalized pointing out the ability of our system to bring selectively the exogenous protein into cells expressing the $\alpha_v\beta_3$ integrin. The same experiments were also performed on primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) which naturally express the $\alpha_v\beta_3$ integrin and the fluorescence observed using a biphoton confocal microscope (see experimental part). The results also indicate a massive uptake of the multimeric RGD-containing peptides compared to the monovalent cyclopentapeptide. In addition, neither cell binding nor internalization of the multivalent peptides was observed with K562 cells devoid of $\alpha_v\beta_3$ integrin. Internalization experiments were also done on CHO3a cells using peptides **4** and **5** containing two fluorescein residues. The same tendency was broadly observed, namely a higher uptake of the multivalent RGD-containing peptide **4**. It is worthy to note that the use of compound **4** containing two fluorophores is invaluable because this latter ensures directly a sufficient level of fluorescence to allow the observations without method of amplification.

Discussion

Our approach aims at developing multivalent ligands of $\alpha_v\beta_3$ integrins for improving cell targeting. Indeed, the selectivity and efficiency of c[RGDFK] for targeting as well as its capacity to penetrate cells expressing $\alpha_v\beta_3$ was called into question recently thus emphasizing the need for multimeric RGD-containing molecules.¹⁶ This is corroborated by the fact that multivalency is a general strategy used by nature to mediate and control recognition processes.¹⁵ Moreover, the shape of a multivalent ligand controls its activity: its ability to cluster surface receptors can promote a specific biological response via signal transduction.³⁷ Diverse scaffolds have been used to generate multivalent ligands such as linear polymers,³⁸ dendrimers,³⁹ calixarenes,⁴⁰ multiple antigenic peptides (MAP),^{14,41} or globular proteins.⁴² The importance of ligand density in RGD peptide–integrin interactions was assessed by scaffolding several RGD recognition motifs from a polymer chain^{11,17} or after conjugation from a humanized antibody protein.¹³ Although these multidentate compounds were found to be more active in competitive inhibition experiments than the cognate monovalent ligand, the difficulties in predicting and controlling the homogeneity of the protein- or polymer-conjugate remain a problem that may complicate the data interpretation and limit the clinical

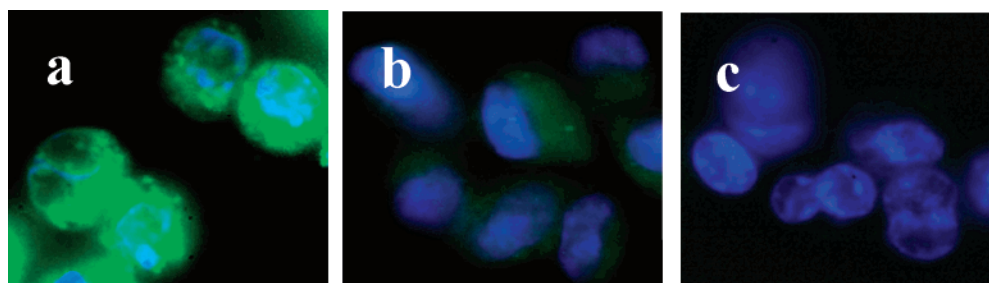


Figure 4. Internalization of RGD-containing peptides: (a) RGD-containing RAFT **6** at 37°C , (b) RGD-containing RAFT **6** at 4°C , (c) RGD-containing peptide **41** at 37°C .

exploitation of these compounds. During the preparation of this work, Kessler et al. reported a modular synthesis of tetravalent RGD molecules that displayed improved binding to the isolated integrin receptor.¹⁴ This approach, based on an MAP-lysine core as scaffold to direct radially the c[-RGDFK-] pendants, represents conceptual progress for controlling the ligand density. However, an MAP system suffers from the lack of conformational control which renders the spatial presentation difficult to manage. Indeed, besides the importance of the ligand density, its local spatial distribution and presentation were shown to be essential for integrin-mediated signal transduction.¹⁷ Here, we chose a decapeptide named RAFT as a pivotal element to assemble $\alpha_v\beta_3$ integrin-peptide ligands in a multivalent mode and different reporter groups. A RAFT molecule having two addressable domains allows functional components to be assembled and directed in well-defined and controlled spatial orientations.²⁷ Separation of each functional domain in space is required in order for them to function in an independent manner. The advantage of such conformational control by related template molecules has been emphasized in the case of carbohydrate-recognition elements and a malaria-epitopes presentation.^{30,43} In particular, an array of ligand molecules can be assembled and directed on one face for the cell-receptor targeting, the other being functionalized by reporter groups or drugs. Therefore, the use of such a RAFT molecule capitalizes in a row the requirement of multimeric ligand presentation to improve ligand-receptor interaction, the presence of label groups for detecting and tracing the corresponding biological activity, and the guarantee of the control of their spatial presentation. In addition, because the assembly is convergent and the domains separated, this allows the synthesis of series of compounds that are required for biological studies by only varying the functionalization at one template face. To address regioselectively the lysine side chains, an appropriate orthogonally protecting group strategy has been devised. The Boc and Alloc protecting groups used in this work are well-documented and exhibit an excellent level of orthogonality. Successive adequate deprotection and coupling reaction cycles by using a combined solid-phase and solution approach provided the key template compounds **17**, **18**, **24**, and **29** containing aminoxy groups (Scheme 1) ready for chemoselective oxime formation. The oxime ligation technique between unprotected molecules functionalized by aminoxy and aldehyde groups was selected because of its high efficiency and chemoselectivity level as well as its in vivo stability.²⁵ Moreover, it requires minimal chemical manipulations in aqueous conditions, since neither coupling reagent nor protecting group is used. This ligation has been used to circumvent inherent chemical incompatibility and proved very effective for the conjugation of various molecules such as peptides,^{24,43} DNA,²³ carbohydrates,⁴⁴ and labels.¹⁴ Recently, it has also been adapted to the RAFT molecule for presenting

clusters of carbohydrate recognition motifs.³⁰ In addition, a preliminary attempt of amide coupling in solution between RGD derivative **42** and template **13** failed in our hands.³⁵ Herein, chemoselective oxime ligation has proved to be very efficient to prepare our conjugated molecules. The target compounds were obtained cleanly without side reactions providing the tetravalent RGD-containing RAFTs **2**, **4**, **6**, and **8** as well as the control peptides **3**, **5**, and **7** in good yields. Binding studies of the RGD derivatives to different cell lines demonstrated that our molecules displayed selectivity for cells expressing $\alpha_v\beta_3$ integrin.³⁶ An adhesion assay with CHO3a cells (Figure 3) shows the importance of an appropriate linker length required between the RGD-binding motif and the biotin for the monovalent RGD peptides: the increase of the spacer length, namely from three to five β -alanine residues, improves the binding efficiency to CHO3a cells. For molecule **2**, the lysine side chains used on the template as well as on the c[-RGDFK] peptide provide a suitable linker length to promote efficient surface and cell attachment. Together, these observations correlate well with those reported on the adhesion of osteoblasts to a surface functionalized with c[-RGDFK] where a minimum linker distance of 3.5 nm was reported.⁴⁵ However, these experiments do not make it possible to conclude from the improvement brought by the multivalent compound compared with the monovalent one. This is certainly due to a ligand density problem; beyond a critical value exhibited on the surface, similar cell attachments occur preventing the differentiation of the compounds. To circumvent this problem, we studied the inhibition of CHO3a adhesion to a vitronectin-coated surface by our multimeric compound **2**. The inhibitory effects of compounds **2** and **38** were similar at high concentration (10 μ M). At lower concentrations ($C < 1 \mu$ M), a significant difference was observed, showing that the binding affinity is increased when several copies of RGD peptide are presented to the integrin receptor (IC₅₀ of $0.5 \pm 0.05 \mu$ M for **2** and 2.5μ M for **38**). This observation is consistent with those obtained with other multivalent c[-RGDFK]-containing systems.^{13,14} Together, these experiments demonstrate the functional activity of our construct. Although the IC₅₀ value of **2** corrected for the number of RGD elements (i.e., 2μ M) is close to that of **38**, this is certainly due to an overvaluation of the effective concentration for inhibition. In fact, it is important to note that a part of the multivalent compound is internalized by the $\alpha_v\beta_3$ expressing cells during the incubation period.⁴⁶ Indeed, internalization of multivalent RGD-containing peptides **2**, **4**, and **6** were visualized at 37 °C in CHO3a and HUVEC cells but very few for the peptide **41** (Figure 4c). No internalization was detected at 4 °C suggesting an energy-dependent process. In addition, neither cell binding nor internalization of the multivalent peptides was observed with cells devoid of the $\alpha_v\beta_3$ integrin. These observations are consistent with an $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor-mediated endocytosis pathway that might have been triggered by integrin clustering resulting from the binding with our multimeric RGD ligands.¹⁹ In addition, these results also suggest that the proximity in space between the c[-RGDFK] moieties is a prerequisite for such biological effects. Interestingly, since the same observations were obtained with com-

(37) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922–14933.

(38) Maynar, H. D.; Okada, S. Y.; Grubbs, R. H. *Macromolecules* **2000**, *33*, 6239–6248.

(39) Perec, C.; Cho, W. D.; Ungar, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10273–10281.

(40) Gutsche, C. D.; Iqbal, M.; Steward, D. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 742–745.

(41) Tam, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86*, 3879–3883.

(42) Arnon, R.; Vanregenmortel, M. H. V. *FASEB J.* **1992**, *6*, 3265–3274.

(43) Rose, K.; Zeng, W.; Brown, L. E.; Jackson, D. C. *Molecular Immunology* **1995**, *32*, 1031–1037.

(44) Forget, D.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7829–7832.

(45) Kantlehner, M.; Schaffner, P.; Finsinger, D.; Meyer, J.; Jonczyk, A.; Diefenbach, B.; Nies, B.; Hölzemann, G.; Goodman, S. L.; Kessler H. *ChemBiochem* **2000**, *1*, 107–114.

(46) Endocytosis of compound **2** occurred after 5 min at 37 °C.

pounds with different detection domains such as **2** or **4**, this strongly supports the idea that the template also serves to prevent the detection and the binding domain to interfere together and thus preserves the cell attachment as well as the endocytosis of the molecules. This feature is important for the future design of more sophisticated molecules. Therefore, the strong binding to specific integrin receptors and the associated good internalization property displayed by the multivalent molecules presented here offer interesting perspectives for *in vivo* studies as well as for the design of more sophisticated systems such as molecular conjugate vectors.¹⁹

Conclusion

All together, the preliminary biological results obtained here validate the concept based on RAFT molecules to incorporate and present in a spatially controlled manner two independent functional domains: a clustered-ligand domain for integrin recognition and cell targeting and a labeling domain for detection and characterization of this event. The strategy described is based on solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. It is very flexible, modular, and adapted to the synthesis of a series of compounds such as those presented here. The multimeric RGD-containing compounds **2**, **4**, **6**, and **8** are currently used for studying integrin clustering as well as *in vivo* experiments, and the corresponding results will be reported in due time.⁴⁷ Since the role of this integrin needs reevaluation as regulators of angiogenesis,⁴⁸ it is expected that these bifunctional systems might be useful in the near future as reagents to study and modulate physiologically important integrin-extracellular matrix protein interactions and as drugs for disease-related applications as well as new nonviral targeting systems for drug delivery.¹⁹ In addition, as demonstrated earlier,³⁰ it is worth noting that our approach is not limited to integrin ligand or for detection applications. By adapting the corresponding domain on the template, it may be conceptually exploited easily to target different cells or tissues due to the increasing number of selective ligands selected *in vivo*⁴⁹ and the range of applications such as drug delivery may be greatly extended by using the vast repertoire of available organic compounds.

Experimental Section

Materials. Protected amino acids, Sasrin, and ChloroTrityl resins were obtained from Advanced ChemTech Europe (Brussels, Belgium), Bachem Biochimie SARL (Voivins-Le-Bretonneux, France), and France Biochem S.A. (Meudon, France). PyBOP was purchased from France Biochem, and other reagents were purchased from Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and Acros (Noisy-Le-Grand, France). RP-HPLC analyses were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller, a Waters 2487 Dual absorbance detector, and a Waters in-line degasser. The analytical column (Nucleosil 120 Å 3 μm C₁₈ particles, 30 × 4.6 mm²) was operated at 1.3 mL/min, and the preparative column (Delta-Pak 300 Å 15 μm C₁₈ particles, 200 × 25 mm²), at 22 mL/min, with UV monitoring at 214 and 250 nm. Solvent B consisted of 0.09% TFA in 90% acetonitrile, and solvent A, of 0.09% TFA. Mass spectra were obtained by electron spray ionization (ES-MS) on a VG Platform II (Micromass).

General Procedure for Solid-Phase Peptide Synthesis. Assembly of all protected peptides was carried out using Fmoc/*t*Bu strategy

manually in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit or automatically on a synthesizer (348 Ω synthesizer, Advance ChemTech). Coupling reactions were performed using, relative to the resin loading, 1.5–2 equiv of *N*-α-Fmoc-protected amino acid activated *in situ* with 1.5–2 equiv of PyBOP and 3–4 equiv of DIEA in DMF (10 mL/g resin) for 30 min. Manual syntheses were controlled by Kaiser and/or TNBS tests. *N*-α-Fmoc protecting groups were removed by treatment with a piperidine/DMF solution (1:4) (10 mL/g resin) for 10 min. The process was repeated 3 times, and the completeness of deprotection was verified by the UV absorption of the piperidine washings at 299 nm.

Synthetic linear peptides were recovered directly upon acid cleavage (1% TFA in CH₂Cl₂). The resins were treated for 3 min repeatedly until the resin beads became dark purple. The combined washings were concentrated under reduced pressure, and white solid peptides were obtained by precipitation from ether. They were analyzed by RP-HPLC and, if necessary, purified on a preparative column.

General Procedure for Cyclization Reactions. All linear peptides (0.5 mM) were dissolved in DMF, and the pH was adjusted to 8–9 by addition of DIEA. PyBOP (1.2 equiv) was added, and the solution was stirred at room temperature for 1 h as described.^{22,26} Solvent was removed under reduced pressure, and the residue dissolved in the minimum of CH₂Cl₂. Ether was added to precipitate the peptide. Then it was triturated and washed 3 times with ether to yield crude material without further purification.

c[Lys(Boc)-Lys-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Lys-Lys(Boc)-Pro-Gly] 10. The linear peptide H-Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Lys(Boc)-Pro-Gly-OH was assembled on Sasrin resin (1 g) affording 1.068 g (0.6 mmol) of a white solid powder. The cyclization reaction was carried out using linear peptide (490 mg, 0.3 mmol) as described above. Alloc groups were removed using cyclic peptide **9** (450 mg, 0.27 mmol) dissolved in 30 mL of dry DCM under argon by adding phenylsilane (2.0 g, 18.5 mmol) for 3 min and then Pd(PPh₃)₄ (62.4 mg, 54 μmol) for 1 h at room temperature.³¹ The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was dissolved in the minimum of a solution containing a mixture of CH₂Cl₂ and CH₃-OH (1:1). Ether was added to precipitate the crude product. Then it was triturated and washed 3 times with ether. The materials were dissolved in a solution containing 50% CH₃CN in water and lyophilized to afford the product **10** as a white powder (366 mg, 0.25 mmol, 92%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 1477.9, found 1477.4.

c[Lys-Lys(Biotin)-Lys-Pro-Gly-Lys-Lys(Biotin)-Lys-Pro-Gly] 13. Biotin (22.9 mg, 93.6 μmol), PyBOP (48.7 mg, 93.6 μmol), and DIEA were added to a solution containing the compound **10** (58 mg, 39 μmol) in 10 mL of DMF to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 1 h at room temperature and then concentrated under diminished pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound **11** as a white powder (33 mg, 22.3 μmol, 57%).

Removal of Boc moieties was carried out in a solution containing 50% TFA in DCM for 1 h at room temperature. The crude product was concentrated, triturated, and washed with ether to yield compound **13** as a white powder (32 mg, 21 μmol, 94%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 1530.0, found 1530.0.

c[Lys(-COCH₂ONHBoc)-Lys(Biotin)-Lys(-COCH₂ONHBoc)-Pro-Gly-Lys(-COCH₂ONHBoc)-Lys(Biotin)-Lys(-COCH₂ONHBoc)-Pro-Gly] 15. BocNHCH₂COSu³² (26.5 mg, 92.0 μmol) and DIEA were added to a solution of compound **13** (32 mg, 21 μmol) in 4 mL of DMF to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 10 min at room temperature and then concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound **15** as a white powder (40 mg, 18 μmol, 86%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 2222.7, found 2221.6.

c[Lys(-COCH₂ONH₂)-Lys(Biotin)-Lys(-COCH₂ONH₂)-Pro-Gly-Lys(-COCH₂ONH₂)-Lys(Biotin)-Lys(-COCH₂ONH₂)-Pro-Gly] 17. Removal of Boc moieties from compound **15** (40 mg, 18 μmol) was carried out in a solution containing 50% TFA/5% TIS/5% H₂O in DCM

(47) Coll, J.-L.; Garanger, E.; Boturyn, D.; Dumy, P.; Favrot M. C. Work in progress.

(48) Hynes, R. O. *Nature Med.* **2003**, *9*, 918–921.

(49) Monaci, P.; Bartoli, F.; Zenzo, G. D.; Nuzzo, M.; Urbanelli, L. *Tumor Targeting* **1999**, *4*, 129–124 and references therein.

for 1 h at room temperature. The crude product was concentrated, triturated, and washed with ether. The product was then purified by RP-HPLC to afford compound **17** as a white powder (30 mg, 16.3 μ mol, 91%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 1822.2, found 1821.8.

c[Lys(-COCH₂ONH₂)-Lys(Fluorescein)-Lys(-COCH₂ONH₂)-Pro-Gly-Lys(-COCH₂ONH₂)-Lys(Fluorescein)-Lys(-COCH₂ONH₂)-Pro-Gly] 18. To a solution containing compound **10** (10 mg, 6.8 μ mol) in 1.5 mL of DMF was added FITC (8 mg, 18.5 μ mol). The reaction was stirred for 1 h at room temperature and then concentrated under diminished pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound **12** as a white powder. Removal of Boc moieties was carried out in a solution containing 50% TFA in DCM for 1 h at room temperature. The crude product was concentrated, triturated, and washed with ether to yield compound **14** as a white powder. Then, BocNHCH₂COSu³² (10.0 mg, 35.0 μ mol) and DIEA were added to a solution containing compound **14** in 2.5 mL of DMF to adjust the pH at 8.0. The reaction was stirred for 1 h at room temperature and then concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated and washed with ether to yield compound **16** as a white powder. Removal of Boc moieties from compound **16** was carried out in a solution containing 50% TFA/5% TIS/5% H₂O in DCM for 1 h at room temperature. The crude product was concentrated, triturated, and washed with ether. The product was then purified by RP-HPLC to afford compound **18** as a yellow powder (10.2 mg, 4.8 μ mol, 70% overall yield). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 2148.4, found 2148.0.

c[Lys(Boc)-Lys-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly] 20. The linear peptide H-Lys(Boc)-Lys(Alloc)-Lys(Boc)-Pro-Gly-Lys(Boc)-Ala-Lys(Boc)-Pro-Gly-OH was assembled on Sasrin resin (300 mg) affording 255 mg (0.18 mmol) of a white solid powder. The cyclization reaction and Alloc group removal were accomplished using the procedure described above to yield the product **20** as a white powder (227 mg, 0.16 mmol, 90%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 1420.8, found 1420.4.

c[Lys(-COCH₂ONH₂)-Lys(Fluorescein)-Lys(-COCH₂ONH₂)-Pro-Gly-Lys(-COCH₂ONH₂)-Ala-Lys(-COCH₂ONH₂)-Pro-Gly] 24. Starting with compound **20** (138.5 mg, 97.5 μ mol), compound **24** was isolated after a purification by RP-HPLC as a yellow powder using the procedure described to yield the product **18** (25.7 mg, 15.1 μ mol, 36% overall yield). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 1701.9, found 1702.0.

c[Lys(-COCH₂ONH₂)-Lys(-Tyrosin)-Lys(-COCH₂ONH₂)-Pro-Gly-Lys(-COCH₂ONH₂)-Ala-Lys(-COCH₂ONH₂)-Pro-Gly] 29. Starting with compound **19** (52.3 mg, 34.7 μ mol), compound **29** was isolated after a purification by RP-HPLC as a white powder using the procedure described to yield the product **17** (17 mg, 11.5 μ mol, 33% overall yield). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 1475.7, found 1475.2.

Peptide Derivatives 32, 34–39. The compounds **32** and **34–39** were prepared as described in the literature by a combination of SPPS and solution strategy.²²

Peptide Derivatives 33. Using the same procedure,²² the linear peptide H-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys[Boc-Ser(*t*Bu)]-Arg(Pmc)- β Ala-OH was assembled on ChloroTrityl resin (150 mg) affording 72.8 mg (60.6 μ mol) of a white solid powder. The cyclization reaction was carried out following the procedures described above. Full deprotection was carried out using a solution containing 10 mL of TFA/CH₂Cl₂ (95:5) at room temperature during 2 h. The product **31** was isolated after removal of solvents under reduced pressure and precipitation from ether. A serine oxidation of derivative **31** (10⁻² M) by an aqueous solution containing 3 equiv of NaIO₄ afforded the aldehyde component **33**. The product was directly purified by RP-HPLC to yield compound **33** as a white powder (24 mg, 35.6 μ mol, overall yield 60%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) [M + H₃O]⁺ calcd 692.8, found 692.3.

c[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(Fluorescein)] 41. To a solution containing the derivative **32** (4 mg, 6.5 μ mol) in 2 mL of sodium acetate buffer

(0.1 mM, pH 4.0) was added the fluorescein derivative **40** (11 mg, 20 μ mol) prepared as described.³³ The reaction was stirred for 24 h at 25 °C. Conjugate **41** was isolated after a purification by RP-HPLC as a yellow powder (5.4 mg, 5 μ mol, 77%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 1178.3, found 1177.7.

c[Arg(Pmc)-Gly-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys(-CO(CH₂)₂CO₂H)] 42. Succinimic anhydride (10 mg, 100 μ mol) and DIEA (20 μ L, 115 μ mol) were added at room temperature to a solution containing the c[Arg-(Pmc)-Gly-Asp(*t*Bu)-D-Phe-Lys] (73 mg, 78.7 μ mol)²² in 5 mL of DMF. The reaction was stirred for 1 h, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was washed with ether, and compound **42** was isolated after purification by RP-HPLC as a white powder (80 mg, 77.9 μ mol, 99%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 1026.2, found 1026.7.

Peptide Conjugate 2. To a solution containing the derivative **17** (10 mg, 5.5 μ mol) in 2 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.0)/acetonitrile (1:1) was added the peptide **32** (22.5 mg, 33.5 μ mol). The reaction was stirred for 3 h at 25 °C. Conjugate **2** was isolated after a purification by RP-HPLC as a white powder (22.6 mg, 5.1 μ mol, 94%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 4390.0, found 4389.6.

Peptide Conjugate 3. To a solution containing the derivative **17** (3.5 mg, 1.5 μ mol) in 3 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.0)/acetonitrile (1:1) was added the peptide **33** (15 mg, 16.7 μ mol). The reaction was stirred for 6 h at 25 °C. Conjugate **3** was isolated after purification by RP-HPLC as a white powder (5.5 mg, 1.1 μ mol, 73%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 4445.1, found 4444.1.

Peptide Conjugate 4. To a solution containing the derivative **18** (21.5 mg, 10 μ mol) in 10 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.0) was added the peptide **32** (32 mg, 48 μ mol). The reaction was stirred for 6 h at 25 °C. Conjugate **4** was isolated after purification by RP-HPLC as a yellow powder (24 mg, 5.1 μ mol, 51%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 4715.1, found 4715.3.

Peptide Conjugate 5. To a solution containing the derivative **18** (5.8 mg, 2.7 μ mol) in 7 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.0) was added the peptide **33** (14.8 mg, 22 μ mol). The reaction was stirred for 6 h at 25 °C. Conjugate **5** was isolated after purification by RP-HPLC as a yellow powder (8.5 mg, 1.8 μ mol, 75%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 4771.2, found 4770.8.

Peptide Conjugate 6. To a solution containing the derivative **24** (10 mg, 5.9 μ mol) in 2 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.0)/acetonitrile (1:1) was added the peptide **32** (23 mg, 35 μ mol). The reaction was stirred for 2 h at 25 °C. Conjugate **6** was isolated after purification by RP-HPLC as a yellow powder (18.8 mg, 4.4 μ mol, 75%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 4268.7, found 4269.0.

Peptide Conjugate 7. To a solution containing the derivative **24** (7.8 mg, 4.6 μ mol) in 1 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.0) was added the peptide **33** (21.7 mg, 32.2 μ mol). The reaction was stirred for 15 min at 25 °C. Conjugate **7** was isolated after purification by RP-HPLC as a yellow powder (16.8 mg, 3.9 μ mol, 95%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 4324.8, found 4324.7.

Peptide Conjugate 8. To a solution containing the derivative **29** (4.4 mg, 3 μ mol) in 2 mL of sodium acetate buffer (0.1 mM, pH 4.6)/acetonitrile (5:1) was added the peptide **32** (15.7 mg, 23.8 μ mol). The reaction was stirred for 2 h at 25 °C. Conjugate **8** was isolated after purification by RP-HPLC as a white powder (10.3 mg, 2.2 μ mol, 73%). Mass spectrum (ES-MS, positive mode) calcd 4042.4, found 4042.0.

Sample Preparation. Peptides were dissolved in phosphate buffer saline (PBS, 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KCl) at a final concentration of 1 mM.

Cell Culture. CHO3a cells (kind gift from Dr A. Duperray, Institut Albert Bonniot, Grenoble) are stable transfectants of the chinese hamster ovary (CHO) cell line. The clone was obtained by transfection of a human β_3 integrin encoding plasmid. Cells were cultured as adherent monolayers in a DMEM 1640 medium supplemented with 10% (v/v)

heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and Geneticin (G418: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . All products were purchased from Gibco (Cergy Pontoise, France). HUVEC were cultured in medium 199 supplemented with 20% FCS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ heparin, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ECGs (gift of Dr A. Duperray).

Adhesion Assay. Streptavidin-coated 96-well culture plates (Lab-system, Helsinki, Finland) were coated extemporaneously by adding 100 μL of a 1 μM solution of each biotinylated peptide diluted in PBS for 1 h at room temperature (rt). Nonspecific binding sites were saturated with 3% bovine serum albumin in PBS for 30 min at rt. Trypsinized CHO3a cells were resuspended at a concentration of 10^6 cells/mL in PBS containing 1 mM MgCl_2 . 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ (10^5 cells) were added to the wells and incubated subsequently for 45 min at 37 °C. Wells were rinsed 3 times with PBS. Adherent cells were then fixed for 15 min with ethanol and stained with methylene blue in borate buffer. Wells were abundantly rinsed with water and dried overnight, and stained cells were resuspended in 100 μL of 0.1 N HCl. The number of attached cells was then evaluated by measuring the OD at 630 nm. Each value represents the mean \pm SEM of eight independent wells.

Competitive Adhesion Assay. MaxiSorp immunoplates (Nunc) were incubated with 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ of a solution of vitronectin (Becton Dickinson, Meylan, France) at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS. After 1 h at rt, the solution was replaced by a 3% BSA solution in PBS for another 1 h.

Trypsinized CHO3a cells ($10^5/\text{well}$) were then mixed with the indicated concentrations of peptides in PBS containing 1mM MgCl_2 and incubated for 45 min at 37 °C on the vitronectin-coated wells. The wells were then rinsed, and cells were fixed and stained as described for the adhesion assay. Each value represents the mean \pm SEM of four independent wells.

Internalization Assay. Trypsinized CHO3a cells were washed in PBS and incubated with 10 μM of FITC-labeled peptides in PBS 1mM MgCl_2 for 45 min at 37 °C or 4 °C. After being rinsed once in PBS and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde, cells were incubated for 5 min in a solution of Hoescht 33342 to stain the DNA. Cell suspensions were mounted in Moeviol (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), and slides examined using an Olympus AX 70 epifluorescence microscope (60 \times lens).

Acknowledgment. We thank the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and the Institut Universitaire de France (IUF) for supporting this work. We also acknowledge La Ligue Nationale contre le Cancer for specific financial support to E.G.

Supporting Information Available: This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA049926N

ANNEXE 2.**Principaux chiffres du cancer en France en 2000**Source : Rapport de la commission d'orientation sur le cancer **2003**.**NOUVEAUX CAS DE CANCERS EN FRANCE EN 2000**

Localisation du cancer	Hommes	Femmes	Total
Sein	-	41 845	41 845
Prostate	40 209	-	40 209
Colon-rectum	19 431	16 826	36 257
Poumon	23 152	4 591	27 743
Lèvre-bouche-pharynx	12 990	2 395	15 385
Vessie	8 986	1 785	10 771
Lymphome malin non Hodgkinien	5 527	4 381	9 908
Rein	5 306	2 987	8 293
Mélanome de la peau	3 066	4 165	7 231
Estomac	4 520	2 606	7 126
Leucémies	3 609	2 634	6 243
Foie	5 014	962	5 976
Système nerveux central	2 697	2 602	5 299
Corps de l'utérus	-	5 064	5 064
Œsophage	4 040	928	4 968
Pancréas	2 701	2 186	4 887
Ovaire	-	4 488	4 488
Larynx	3 865	361	4 226
Thyroïde	821	2 890	3 711
Myélome multiple et maladies immunoprolifératives	1 942	1 645	3 587
Col de l'utérus	-	3 387	3 387
Maladie de Hodgkin	736	631	1 367
Mésothéliome	671	200	871
Total	161 025	117 228	278 253

MORTALITE PAR CANCER EN FRANCE EN 2000

(Principales localisations)

Localisation	Hommes	Femmes	Total
Poumon	22 649	4 515	27 164
Colon-rectum	8 505	7 468	15 973
Sein	-	11 637	11 637
Prostate	10 004	-	10 004
Foie	6 287	1 569	7 856
Pancréas	3 728	3 453	7 191
Lymphome malin non Hodgkinien	2 664	2 579	5 243
Leucémies	2 547	2 548	5 095
Lèvre-bouche-pharynx	4 341	749	5 090
Total	92 311	57 734	150 045

ANNEXE 3.

Étiologie des cancers

.....

La recherche des causes des cancers et l'identification des substances et expositions cancérogènes sont fondamentales pour justifier des actions de prévention. Les agents responsables des cancers (agents mutagènes) sont répertoriés parmi trois grandes classes :¹

- Les substances chimiques :

L'exposition aux agents chimiques cancérogènes peut être d'origine environnementale (substances naturelles ou polluants générés par l'activité industrielle) ou professionnelle (e.g. amiante, benzène, chlorure de vinyle). La plupart sont consommées par l'homme (tabac, alcool, alimentation, médicaments).

- Les radiations :

Ce sont essentiellement les rayonnements UV émis par le soleil (UV-B les plus nocifs) et les rayonnements ionisants comme les rayons X, les rayons γ et les rayons neutroniques. Ces derniers se répartissent principalement entre la radioactivité naturelle, le radon des habitations, l'irradiation médicale et les drames nucléaires (bombardements atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki, accident nucléaire de Tchernobyl).

- Les virus :

Ils comprennent, d'une part, les virus à ARN comme les rétrovirus (HTLV, *Human T Leukemia Virus* ; HIV, *Virus d'immunodéficience humaine*), les flavivirus (HCV, *Virus de l'Hépatite C*) ou les deltavirus (HDV, *Virus de l'Hépatite D*) et, d'autre part, les virus à ADN dont les papovavirus (HPV, *Virus du Papillome Humain* ; SV-40, *Simian Virus-40*), les adénovirus (Human Adenovirus 12), les herpesvirus (EBV, *Virus d'Epstein Barr*, CMV, *Cytomegalovirus*), les hepdavirus (HBV, *Virus de l'Hépatite B*) et les poxvirus (virus du fibrome de Shope).

¹ <http://www.iarc.fr>.

En France, la mortalité par cancer est majoritairement attribuée au tabac (24%), à l'alcool (11%), aux infections (15% pour les causes infectieuses d'origine virale et 0,5% pour celles d'origine non-virale), aux stéroïdes sexuels (12%) et aux radiations (5%).² Les chiffres plus récents publiés dans le dernier rapport de la Commission d'orientation sur le cancer tendent à augmenter la part du tabac (30%) et font figurer les causes professionnelles (4%) et la pollution (2%).³

Le rôle de l'alimentation est important mais très mal mesuré. C'est l'une des causes possibles de cancer qui pourrait expliquer les différences observées dans la fréquence des cancers entre différents pays, sous-populations ou dans des populations spécifiques comme les populations migrantes. Les alimentations riches en graisses et aliments fumés ou salés ont tendance à augmenter les risques de divers cancers, tandis que les alimentations riches en fruits ou légumes tendent à les diminuer.

Les effets du tabac et de l'alcool sont à l'inverse très bien mesurés. Dans le cas de l'alcool, s'il ne semble pas y avoir d'effet selon le type de boisson, le risque de cancer est directement corrélé à la dose absorbée.² Le tabac est largement incriminé dans de nombreux cancers. Il lui est imputé en moyenne chaque année 59 000 décès chez les hommes et 7 400 chez les femmes. Il augmente principalement les risques de cancer du poumon ($\times 15-30$), du larynx ($\times 10$), de la bouche et du pharynx ($\times 4-5$), de l'œsophage ($\times 2-5$), des voies urinaires ($\times 3$) et du pancréas ($\times 2-4$).⁴ Dans le cas du cancer du poumon, il a été montré une relation de proportionnalité entre le risque de développer un cancer, la dose (coefficient 1 : dose double, risque double) et la durée (coefficient 10 : durée double, risque multiplié par 20).

Les infections virales à l'origine des cancers sont principalement représentées par les virus du papillome humain (HPV), largement impliqué dans le développement des cancers du col utérin, et de l'hépatite B (HBV), responsable des cancers primitifs du foie (carcinomes hépatocellulaires), responsables à eux seuls de 80% de l'étiologie virale des cancers.

La part des facteurs génétiques est importante, mais n'a été mise en évidence jusqu'à aujourd'hui que pour des localisations cancéreuses spécifiques. Les anomalies génétiques héréditaires jouent un rôle incontestable dans les formes familiales des cancers du sein et de l'ovaire (gènes BRCA-1, -2, -3), du colon (gènes impliqués dans la transmission de la

² Doll, R. The causes of cancer. *Rev. Epidémiol. Santé Publique* **2001**, 49, 193-200.

³ Rapport de la commission d'orientation sur le cancer **2003**.

⁴ Vineis, P.; Alavanja, M.; Buffler, P.; Fontham, E.; Franceschi, S.; Gao, Y. T.; Gupta, P. C.; Hackshaw, A.; Matos, E.; Samet, J.; Sitas, F.; Smith, J.; Stayner, L.; Straif, K.; Thun, M. J.; Wichmann, H. E.; Wu, A. H.; Zaridze, D.; Peto, R.; Doll, R. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, 96, 99-106.

polypose recto-colique) et de la prostate. La fréquence de ces cancers atteint environ 10% de l'ensemble des cancers de ces organes.

Conception, Synthèse et Caractérisation de Nouveaux Systèmes de Guidage et de Vectorisation Pour la Cancérologie.

Sur-exprimée par les cellules endothéliales des néo-vaisseaux tumoraux, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ constitue une cible judicieuse pour atteindre les foyers tumoraux et empêcher la vascularisation des tumeurs. À ces fins, nos travaux ont été consacrés à la conception, à la synthèse et à la caractérisation biologique de nouveaux vecteurs synthétiques ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le squelette du vecteur est un cyclodécapeptide RAFT, présentant deux faces d'adressage indépendantes, permettant la séparation dans l'espace du domaine des ligands, assurant le ciblage du vecteur, de celui supportant les molécules à vectoriser. La fonction de ciblage est assurée par la présentation de quatre motifs cyclopentapeptidiques c[-RGDfK-], ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, greffés sur la face supérieure du RAFT. L'architecture multivalente a été synthétisée de manière convergente par formation de liens éthers d'oxime, stables *in vitro* et *in vivo*, grâce à des réactions chimiosélectives hautement efficaces. La conjugaison du vecteur RAFT(c[-RGDfK-])₄ à diverses molécules de détection (biotine, fluorescéine, cyanine 5) a permis d'étudier ses propriétés biologiques *in vitro* et *in vivo*. Son interaction avec les cellules HEK293(β_3) induit le clustering des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et conduit à un phénomène d'endocytose récepteur-dépendante. Chez un modèle animal murin, le vecteur (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄, administré par voie systémique, détecte des tumeurs localisées ou métastatiques. Pour accroître son efficacité anti-tumorale, nous avons conjugué notre vecteur à différentes drogues cytotoxiques. Le peptide (KLAKLAK)₂, la doxorubicine et la chaîne A de la ricine ont été couplés par des liens disulfures favorisant leur libération intracellulaire.

Mots clés : Néo-angiogenèse tumorale, vectorisation non-virale, cyclodécapeptide RAFT, ligand -RGD-, multivalence, liaisons éthers d'oxime, liaisons disulfures

Design, Synthesis and Characterisation of New Systems of Guidance and Vectorisation for Cancerology.

Proliferating endothelial cells, but not quiescent endothelial cells, over-express the $\alpha_v\beta_3$ integrin. This receptor has thus become an attractive target to reach tumour neo-angiogenesis and to prevent tumour progression and metastasis. For this purposes, we designed and studied a new bi-functional synthetic vector named RAFT(c[-RGDfK-])₄. The core of the vector is composed of a cyclic decapeptide scaffold (RAFT) presenting two distinct domains. These allow the spatial separation of both functions of the vector and prevent the molecules from the lower face to interfere with the targeting functions. Multivalent presentation of *cyclo*[-RGDfK-] peptides provides the targeting duty and ensure multivalent interactions of the vector with the target receptors. Convergent synthesis of RAFT(c[-RGDfK-])₄ was achieved through efficient chemoselective oxime ligations. Conjugation of the vector with diverse detection molecules (biotin, fluorescein, cyanin 5) allowed its biological evaluation *in vitro* and *in vivo*. RAFT(c[-RGDfK-])₄ proved to induce $\alpha_v\beta_3$ integrin clustering on HEK293(β_3) cells. Its cellular uptake was shown to occur through a receptor-mediated endocytosis. When administered systemically to immuno-deficient mice, (Cy5)RAFT(c[-RGDfK-])₄ detected solid tumours as well as disseminated metastasis. In order to increase its therapeutic efficacy, we conjugated RAFT(c[-RGDfK-])₄ to various cytotoxic drugs. (KLAKLAK)₂ peptide, doxorubicin and A chain of ricin were linked through disulfide bridge allowing their release into the targeted cells.

Keywords : Tumour neo-angiogenesis, non-viral vectorisation, cyclodecapeptide scaffold RAFT, -RGD-ligand, multivalency, oxime ligation, disulfide bridge

Discipline : Chimie-Biologie

Laboratoire d'Études Dynamiques et Structurales
de la Sélectivité – UJF-CNRS UMR 5616
Équipe Ingénierie Moléculaire et Chimie des
Composés Bio-organiques – 301 rue de la chimie
– BP 53 – 38041 GRENOBLE Cedex 9

Groupe de Recherche sur le Cancer du Poumon
INSERM U578
Équipe Thérapie Génique du Cancer – Institut
Albert Bonniot – Rond Point de la Chantourne –
38706 La Tronche Cedex