



HAL
open science

Ligations chimiques : synthèse d'inhibiteurs extracellulaires de la signalisation HGF/SF-MET

Soizic Besret

► **To cite this version:**

Soizic Besret. Ligations chimiques : synthèse d'inhibiteurs extracellulaires de la signalisation HGF/SF-MET. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S003 . tel-00630962

HAL Id: tel-00630962

<https://theses.hal.science/tel-00630962>

Submitted on 11 Oct 2011

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

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

Université Lille 2 Droit et Santé

École doctorale Biologie-Santé

THESE

Présentée en vue de l'obtention du Doctorat de l'Université de Lille 2

Par Soizic BESRET

Discipline : chimie organique

Spécialité : Sciences du médicament

<p>Ligations chimiques</p> <p>Synthèse d'inhibiteurs extracellulaires</p> <p>de la signalisation HGF/SF-MET</p>
--

Membres du Jury

Directeurs de thèse : Dr Oleg MELNYK, Pr Patricia MELNYK

Rapporteurs : Dr Gilles SUBRA

Dr Didier BOTURYN

Examineurs : Dr Michèle BAUDY-FLOCH

Pr Nicolas INGUIMBERT

Dr Oleg MELNYK

PLAN GÉNÉRAL

REMERCIEMENTS	4
ABRÉVIATIONS	5
ACIDES AMINÉS	8
INTRODUCTION	9
PARTIE 1	
LIGATIONS CHIMIQUES	11
A°) Recherches bibliographiques	14
1°) Les peptides : utilisations en thérapeutique	14
2°) Les ligations natives	24
3°) Les ligations non natives	34
B°) Ligation thiocarbamate	43
1°) Hypothèses de travail	43
2°) Synthèse de peptides éthyl- et phénylthiocarbamate	43
3°) Ligation thiocarbamate	45
C°) Ligation AzaGly	67
1°) Hypothèses de travail	69
2°) Voie A : réaction entre un peptide thioester et un hydrazinocarbonyl-peptide	72
3°) Voie B : réaction entre un peptide phénylthiocarbamate et un peptide hydrazide	81
4°) Application de la ligation azaGly à la préparation de lipopeptides	88
D°) Partie expérimentale	94
Généralités	94
1°) Ligation thiocarbamate	99
2°) Ligation azaGly	107
PARTIE 2	
INHIBITION EXTRACELLULAIRE DE LA SIGNALISATION HGF/SF-MET	117
A°) Le cancer et les traitements existants	121
1°) Les traitements locaux	122
2°) Les traitements généraux	124
B°) Le facteur de croissance HGF/SF et le RTK MET	135
1°) Présentation	135
2°) Rôles d'HGF/SF et de MET dans le développement normal et tumoral.....	146
3°) Stratégies d'inhibition de la signalisation HGF/SF-MET	151
C°) Résultats préliminaires	159
1°) Criblage des polysaccharides grâce à la technologie biopuces	160
2°) Evaluation de l'activité biologique des polysaccharides sélectionnés	163
D°) Synthèse d'inhibiteurs extracellulaires de la signalisation HGF/SF-MET	167
1°) Synthèse de la première série de conjugués par ligation thiocarbamate	168
2°) Synthèse de la seconde série de conjugués par ligation thiocarbamate.....	190
3°) Synthèse de la troisième série de conjugués par ligation thiocarbamate.....	220
4°) Synthèse de la quatrième série de conjugués par ligation thioéther	237

5°) Synthèse de la cinquième série de composés	253
<i>E°) Partie expérimentale</i>	260
1°) Synthèse de la première série de conjugués par ligation thiocarbamate	260
2°) Synthèse de la seconde série de conjugués par ligation thiocarbamate.....	266
3°) Synthèse de la troisième série de conjugués par ligation thiocarbamate.....	280
4°) Synthèse de la quatrième série de conjugués par ligation thioéther	287
5°) Synthèse de la cinquième série de composés	293

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, le Professeur Patricia Melnyk et le Docteur Oleg Melnyk pour m'avoir permis de réaliser ce travail et pour m'avoir guidée tout au long de ma thèse.

Je remercie également l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté de juger ce travail : Gilles Subra, Didier Boturyn, Michèle Baudy Floch et Nicolas Inguibert.

Je tiens à remercier tous ceux avec qui j'ai travaillé pendant ces années pour leur gentillesse et leur aide : Annick, Aurélie, Fatima, Manu, Nathalie, Reda, Julien, Hervé, JP, Laurent, Rémi, Christophe et Vianney ainsi que tous les chimistes de la Dent 2. Je souhaite également remercier l'équipe des biologistes et en particulier Véronique Fafeur, Gauthier Goormachtigh et Myriam.

Je souhaite adresser un grand merci à tout mon entourage et particulièrement Fabrice qui a toujours été présent pour moi (pour le meilleur et pour le pire), ainsi que toute ma « petite » famille : ma mère, Gérard, Loïs, Julie, Maëline, Vianney, Ludivine et les trois loulous, Fred et Savinien. J'ai également une pensée pour mes amis les plus proches parmi lesquels Aurélie, Marine, Alexis, Ben, Mimi et tous ceux que j'aurais pu oublier de citer. Je vous remercie tous infiniment pour votre écoute et votre soutien pendant ces (très) longues années d'études mais également pour les bons moments passés ensemble.

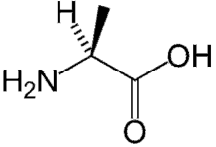
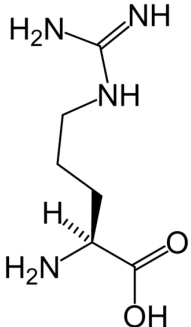
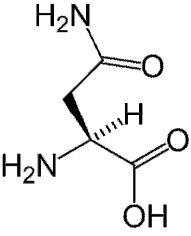
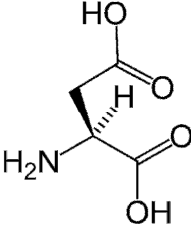
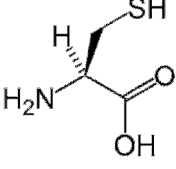
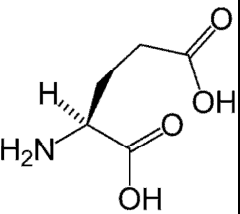
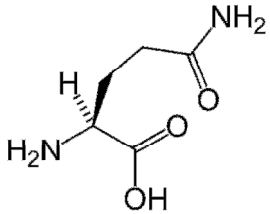
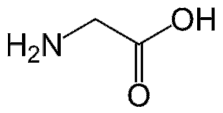
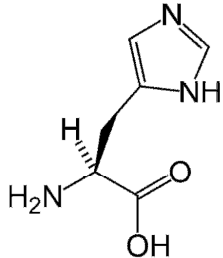
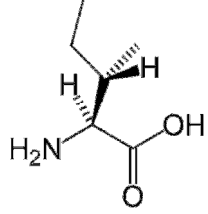
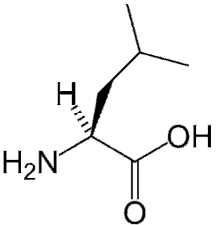
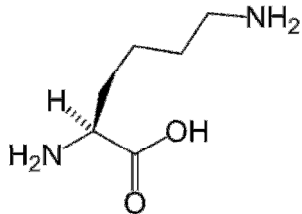
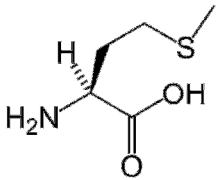
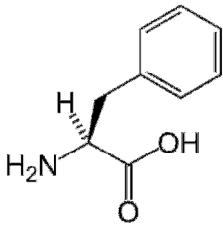
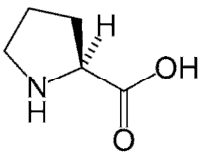
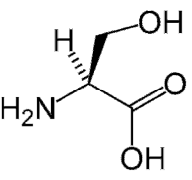
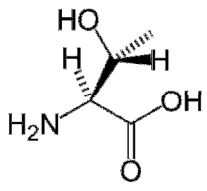
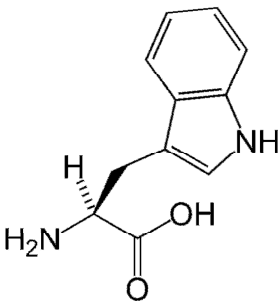
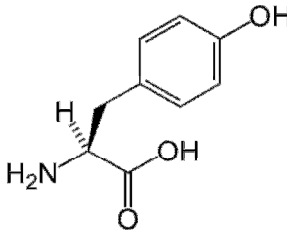
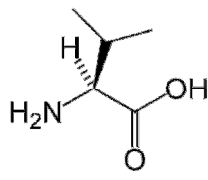
ABRÉVIATIONS

AAEDS	acide 2-amino-éthane-1,1-disulfonique
AcOH	acide acétique
α-CN	acide alpha cyano-4-hydroxycinnamique
BHT	2,6-di- <i>t</i> -butyl-4-méthylphénol
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
BPNPC	bis(para-nitrophényl)carbonate
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDI	carbonyldiimidazole
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
COSY	COrrelation SpectroscopY
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
DHB	acide dihydroxybenzoïque
DIC	N, N'-diisopropylcarbodiimide
DIEA	N, N-diisopropyléthylamine
DMCBSu	Dextran MéthylCarboxylate Benzylamide Sulfate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	N, N-diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	Densité Optique
EDT	1,2-éthanedithiol
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Et₂O	éther diéthylique
Et₃N	triéthylamine
Fmoc	9-fluorénylméthoxycarbonyl
GAG	glycosaminoglycane
HBTU	2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium hexafluorophosphate
HER 1	Human Epidermal Receptor 1
HF	acide fluorhydrique

HGF/SF	Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor
HGFR	Hepatocyte Growth Factor Receptor
hGH	human Growth Hormone
HMBA	HydroxyMethyl Benzoic Acid
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HS	Héparanes Sulfates
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HSPG	Héparanes Sulfates ProtéoGlycanes
IPT	Integrins, Plexins, Transcription factor
IR	insulin receptor
KDR	Kinase insert Domain containing Receptor
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LHRH	Luteinizing-Hormone-Releasing Hormone
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight
MAP	Multiple Antigenic Peptide
MEC	matrice extracellulaire
MeOH	méthanol
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MNNG	N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
MRS	Met Related Sequence
Mtt	4-méthyltrityl
MTT	3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide
NCL	Native Chemical Ligation
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NMM	N-méthylmorpholine
NMP	N-méthyl-2-pyrrolidone
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF-BB	Platelet-Derived Growth Factor-BB
PEG	polyéthylène glycol
PhSCOCI	phénylchlorothioformiate
PSI	Plexines, Sémaphorines, Intégrines
PyBrop	hexafluorophosphate de bromo-tris-pyrrolidinophosphonium
Rdt	rendement
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire

RP-HPLC	Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography
RTK	Récepteur à activité Tyrosine Kinase
SPH	Serine Protease Homology
SPPS	synthèse peptidique en phase solide
TBAF	fluorure de tétrabutylammonium
TBTU	2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium tétrafluoroborate
<i>t</i>-Bu	<i>tert</i> -butyle
TCEP-HCl	tris(2-carboxyéthyl)phosphine hydrochloride
TEAA	triéthylammonium acétate
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TIS	triisopropylsilane
TNBS	acide 2,4,6 trinitrobenzènesulfonique
TNF	Tumor Necrosis Factor
TOCSY	TOtal Correlation SpectroscopY
TPR	Translocated Promoter Region
UV	ultra-violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

ACIDES AMINÉS

 <p>Alanine (Ala, A)</p>	 <p>Arginine (Arg, R)</p>	 <p>Asparagine (Asn, N)</p>	 <p>Acide aspartique (Asp, D)</p>	 <p>Cystéine (Cys, C)</p>
 <p>Acide glutamique (Glu, E)</p>	 <p>Glutamine (Gln, Q)</p>	 <p>Glycine (Gly, G)</p>	 <p>Histidine (His, H)</p>	 <p>Isoleucine (Ile, I)</p>
 <p>Leucine (Leu, L)</p>	 <p>Lysine (Lys, K)</p>	 <p>Méthionine (Met, M)</p>	 <p>Phénylalanine (Phe, F)</p>	 <p>Proline (Pro, P)</p>
 <p>Sérine (Ser, S)</p>	 <p>Thréonine (Thr, T)</p>	 <p>Tryptophane (Trp, W)</p>	 <p>Tyrosine (Tyr, Y)</p>	 <p>Valine (Val, V)</p>

INTRODUCTION

Le cancer est une maladie multifactorielle qui constitue une cause majeure de mortalité dans le monde et qui peut toucher la plupart des organes. Selon le rapport Globocan 2008¹, les cancers les plus fréquemment diagnostiqués sont ceux du poumon (12,7%), du sein (10,9%) et colorectal (9,8%), alors que le risque de décès est plus élevé dans le cas du cancer du poumon (18,2%), de l'estomac (9,7%) et colorectal (8,1%). Le traitement dépend alors d'un certain nombre de paramètres tels que la localisation, ou encore le stade d'avancement, ... Il est en effet possible de traiter localement, par exemple à l'aide de la chirurgie, et/ou de manière générale, grâce à la chimiothérapie. Parmi les composés utilisés en thérapie anticancéreuse, on retrouve à la fois des molécules de faible poids moléculaire, mais également des protéines (anticorps), des peptides... Ces derniers constituent une famille de biomolécules dont l'utilisation dans différents domaines thérapeutiques (diabète, sida) s'est fortement développée ces dernières années. Le défi pour les chimistes consiste alors à accéder aux peptides grâce à de nouvelles méthodes fiables et efficaces et c'est dans cette direction que nous avons orienté la première partie de notre travail.

Dans la partie bibliographique de ce travail, nous nous sommes intéressés aux avantages et aux inconvénients de l'utilisation des peptides dans le développement de molécules à visée thérapeutique, ainsi que les principales méthodes de synthèse permettant de les produire. Parmi les voies synthétiques existantes, la synthèse peptidique en phase solide constitue une voie majeure d'accès aux peptides. L'autre voie, appelée ligation peptidique, dont nous étudierons ensuite quelques exemples et applications, consiste à assembler chimiosélectivement des fragments peptidiques déprotégés et préalablement purifiés en solution aqueuse. Dans certains cas, ces ligations permettent de conserver l'intégrité du lien amide et prennent alors le nom de ligations natives. Dans d'autres cas, l'assemblage de fragments peptidiques permet d'obtenir des liens chimiques autres que natif et font alors appel à différentes chimies impliquant ou non des dérivés soufrés.

Les méthodes de ligation constituent une approche intéressante pour la production de peptides d'intérêt thérapeutique, et viennent en complément des approches d'assemblage récurrentes en solution ou en phase solide. Dans ce contexte, nous avons développé deux méthodes de ligations non natives efficaces et complémentaires de celles existant et dont les

¹ <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>

résultats ont été publiés au cours de cette thèse et constituent le point central de la première partie de ce manuscrit. La première méthode de ligation développée a été baptisée la ligation thiocarbamate² : elle met en jeu un cystéinyl-peptide et un peptide phénylthiocarbamate et abouti à la formation d'un peptide alkylthiocarbamate. La seconde a été appelée ligation azaGly³, car elle permet la synthèse d'azapeptides incorporant un résidu azaGly. Sa mise au point a nécessité l'étude de deux voies de synthèse : la première fait intervenir un peptide thioester et un hydrazinocarbonyl-peptide alors que la seconde nécessite l'utilisation de peptides hydrazide et phénylthiocarbamate.

Dans la seconde partie de ce travail de thèse, nous avons appliqué certaines méthodes de ligations peptidiques, et en particulier la ligation thiocarbamate, à la synthèse d'inhibiteurs extracellulaires de la signalisation HGF/SF-MET, cible cellulaire potentielle d'une thérapie anticancéreuse. L'HGF/SF (**H**epatocyte **G**rowth **F**actor/**S**catter **F**actor) est le ligand du récepteur à activité tyrosine kinase MET, initialement découvert comme un oncogène. La dérégulation de la signalisation HGF/SF-MET conduit à la progression tumorale (carcinomes, sarcomes, maladies du sang,...), notamment en favorisant l'invasion et la métastase. Des stratégies thérapeutiques visant à atténuer la signalisation aberrante de MET sont en cours de développement. Certaines ciblent l'activité tyrosine kinase du récepteur, comme les inhibiteurs du site de fixation de l'ATP. D'autres ciblent le ligand HGF/SF ou la partie extracellulaire de MET (anticorps neutralisants, leurres de l'HGF/SF ou de la partie extracellulaire de MET). Dans ce travail, nous avons choisi d'interférer avec la signalisation HGF/SF-MET en ciblant le domaine extracellulaire du récepteur MET. Dans cette optique, nous avons conçu et synthétisé une chimiothèque de peptides par ligation chimique. Ces molécules ont été testées pour leur capacité à lier le domaine extracellulaire du récepteur MET lors de tests au format biopuce ou à inhiber la signalisation HGF/SF-MET lors de tests cellulaires.

² Besret S, Ollivier N, Blanpain A, Melnyk O. Thiocarbamate-linked peptides by chemoselective peptide ligation. *J. Pept. Sci.* **2008**. 14, 1244-1250

³ Ollivier N, Besret S, Blanpain A, Melnyk O. Silver-catalyzed azaGly ligation. Application to the synthesis of azapeptides and of lipid-peptide conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2009**. 20, 1397-1403

PARTIE 1
LIGATIONS CHIMIQUES

A°) Recherches bibliographiques	14
1°) Les peptides : utilisations en thérapeutique	14
1.1°) Les peptides et le développement de nouveaux médicaments	14
1.2°) Peptides provenant de sources naturelles	16
1.3°) Peptides sélectionnés par phage display.....	17
1.4°) Conception <i>in silico</i> de peptides d'intérêt thérapeutique	18
1.5°) La synthèse peptidique	18
2°) Les ligations natives	24
2.1°) La ligation de Dawson et de Kent	24
2.1.1°) NCL en présence d'une sélénocystéine.....	25
2.1.2°) Ligation de type NCL et élimination de la fonction thiol par désulfuration	26
2.1.3°) NCL à l'aide d'auxiliaires de ligation	28
2.1.4°) Ligation de type NCL suivie de la transformation du thiol par méthylation	31
2.2°) La ligation de Staudinger	32
2.3°) La ligation de Bode	33
3°) Les ligations non natives	34
3.1°) Les ligations ne faisant pas intervenir de dérivés soufrés	34
3.1.1°) La ligation hydrazone	34
3.1.2°) La ligation oxime.....	35
3.1.3°) La « click-chemistry » : formation de 1,2,3-triazole.....	36
3.2°) Les ligations faisant intervenir des dérivés soufrés.....	37
3.2.1°) La ligation thioéther	37
3.2.2°) La ligation thioester.....	38
3.2.3°) La ligation disulfure	38
3.2.4°) La ligation thiazolidine.....	40
3.2.5°) Les ligations « pseudoproline ».....	41
B°) Ligation thiocarbamate.....	43
1°) Hypothèses de travail.....	43
2°) Synthèse de peptides éthyl- et phénylthiocarbamate	43
3°) Ligation thiocarbamate	45
3.1°) Ligation entre le cystéinyl-peptide 3 et le peptide éthylthiocarbamate 1	45
3.2°) Ligation entre le cystéinyl-peptide 3 et le peptide phénylthiocarbamate 2.....	47
3.3°) Analyses complémentaires	51
3.3.1°) Essai de dimérisation du peptide 5	51
3.3.2°) Essai de S-alkylation par l'iodoacétamide du peptide 5.....	54
3.3.3°) Analyses RMN	56
3.4°) Ligation thiocarbamate : applications	58
3.4.1°) Synthèse d'un cyclopeptide.....	58
3.4.2°) Synthèse de MAPs	61
C°) Ligation AzaGly	67
1°) Hypothèses de travail.....	69
2°) Voie A : réaction entre un peptide thioester et un hydrazinocarbonyl-peptide.....	72
2.1°) Préparation des peptides thioesters 22 et 23.....	72

2.2°) Preuve de concept : ligation azaGly entre le peptide thioester 22 et le semicarbazide commercial 24	75
2.3°) Préparation des hydrazinocarbonyl-peptides 26 et 27	76
2.4°) Ligation azaGly entre le peptide 23 et les peptides 26 et 27	77
3°) Voie B : réaction entre un peptide phénylthiocarbamate et un peptide hydrazide	81
3.1°) Préparation du peptide phénylthiocarbamate 2	82
3.2°) Preuve de concept : ligation azaGly entre l'acétylhydrazine commerciale 33 et le peptide 2	82
3.3°) Préparation de peptides hydrazides 35 et 36	83
3.4°) Ligation azaGly entre les peptides 35 et 36 et le peptide 2	85
4°) Application de la ligation azaGly à la préparation de lipopeptides	88
D°) Partie expérimentale.....	94
Généralités	94
1°) Ligation thiocarbamate	99
1.1°) Synthèse des peptides	99
1.2°) Ligations	104
2°) Ligation azaGly.....	107
2.1°) Voie A	107
2.1.1°) Synthèse des peptides	107
2.1.2°) Ligations	110
2.2°) Voie B.....	111
2.2.1°) Synthèse des peptides	111
2.2.2°) Ligations	112
2.3°) Préparation d'azaGlylipopeptides	114
2.3.1°) Synthèse des hydrazinolipides	114
2.3.2°) Ligations	115

A°) Recherches bibliographiques

1°) Les peptides : utilisations en thérapeutique

1.1°) Les peptides et le développement de nouveaux médicaments

Les peptides offrent plusieurs avantages par rapport aux molécules de faible poids moléculaire, généralement inférieur à 500 g/mol, qui constituent la plupart des médicaments traditionnels⁴. En effet, ils peuvent être parfois plus efficaces, plus spécifiques que les petites molécules synthétiques. Ensuite, leur dégradation rapide dans l'organisme par les peptidases (intestinales, rénales, hépatiques et sériques) génère des acides aminés, ce qui les rend en général faiblement toxiques. Un inconvénient majeur est leur temps de demi-vie dans le corps humain qui peut être relativement court (de quelques minutes à plusieurs heures). A l'inverse, ce temps de demi-vie court permet de limiter leur accumulation dans l'organisme et leurs effets secondaires⁵. Parmi les peptides médicaments actuellement sur le marché, on peut citer, entre autres, l'insuline (Actrapid[®], Novo Nordisk A/S) ou la cyclosporine (Neoral[®], Novartis Pharma SA).

La sensibilité des peptides face aux peptidases est un inconvénient majeur quand on cherche à obtenir des molécules thérapeutiques de durée d'action prolongée et administrables par voie orale. Différentes stratégies⁶ sont envisageables afin d'améliorer leur résistance aux peptidases comme :

* les modifications des extrémités du peptide telles que la N-acétylation et la C-amidation⁷. Par exemple, l'Enfuvirtide (Fuséon[®], Roche), le premier inhibiteur de fusion dans le traitement du VIH, est un peptide synthétique de 36 acides aminés qui est à la fois N-acétylé et amide⁸.

⁴ Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**. 23, 3-25

⁵ Loffet A. Peptides as drugs : is there a market ? *J. Pep. Sci.* **2002**. 8, 1-7

⁶ Werle M, Bernkop-Schnürch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids*. **2006**. 30, 351-367

⁷ Brinckerhoff LH, Kalashnikov VV, Thompson LW, Yamshchikov GV, Pierce RA, Galavotti HS, Engelhard VH, Slingluff CL. Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-127-35 peptide: implications for peptide vaccines. *Int. J. Cancer*. **1999**. 83, 326-334

⁸ Raffi F. Enfuvirtide, premier inhibiteur de fusion dans le traitement de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine : mécanisme d'action et pharmacocinétique. *Médecine et maladies infectieuses*. **2004**. 34, 3-7

* le recours à des acides aminés de la série D ou non naturels ;

* la cyclisation des peptides par formation d'un pont disulfure ou d'une liaison covalente entre les extrémités N et C-terminales, ou entre deux résidus au sein de la séquence. A titre d'exemple, ces modifications à partir de la somatostatine, hormone régulant la sécrétion de nombreuses autres hormones pancréatiques, intestinales et hypophysaires, ont amené à la conception de l'octréotide (Sandostatine[®], Novartis Pharma SA). Ce peptide est cyclisé grâce à un pont disulfure, ce qui contribue à augmenter son temps de demi-vie plasmatique. A l'heure actuelle, l'octréotide est utilisé pour traiter divers troubles gastro-intestinaux et endocriniens⁹.

Il existe d'autres stratégies comme :

* la fixation de **P**oly(**E**thylène **G**lycol) au peptide encore appelée la PEGylation, méthode de plus en plus utilisée dans le cadre du développement de peptides ou de protéines « médicaments ». Par exemple, un PEG a été conjugué à l'interféron α -2b pour donner un dérivé appelé ViraféronPEG (Schering Plough Europe) employé dans le traitement de l'hépatite C¹⁰ ;

* la liaison du peptide à une protéine porteuse. C'est notamment le cas de l'albumine, protéine naturellement présente dans le sérum qui participe au transport d'hormones, d'acides aminés et des médicaments. A titre d'exemple, la protéine de fusion entre l'albumine et l'interféron α -2b a abouti à l'albinterféron α -2b, qui est actuellement en phase III d'étude clinique dans le traitement de l'hépatite C¹¹.

* la préparation de peptidomimétiques, pour lesquels une ou plusieurs liaisons peptidiques sont remplacées par un lien non peptidique. Par exemple, si le carbone α de l'acide aminé au sein du peptide est substitué par un atome d'azote, on obtient un azapeptide¹². En cancérologie, le Zoladex[®], un aza-analogue de la LHRH (**L**uteinizing-**H**ormone-**R**eleasing **H**ormone), est commercialisé par AstraZeneca pour le traitement des cancers métastasés du sein ou de la prostate.

Les peptides semblent donc des molécules prometteuses pour le développement de nouvelles classes de médicaments. Les peptides biologiquement actifs et étudiés pour leur potentiel thérapeutique proviennent principalement :

⁹ Harris AG. Somatostatin and somatostatin analogues: pharmacokinetics and pharmacodynamic effects. *Gut*. **1994**. 35, S1-S4

¹⁰ Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug discovery. *Drug Disc. Today*. **2005**. 10, 1451-1458

¹¹ Subramaniam GM, Fiscella M, Lamoué-Smith A, Zeuzem S, McHutchison JG. Albinterferon α -2b: a genetic fusion protein for the treatment of chronic hepatitis C. *Nature Biotech*. **2007**. 25, 1411-1419

¹² Zega A, Urleb U. Azapeptides. *Acta Chim Slov*. **2002**. 49, 649-662

- * de sources naturelles ;
- * d'une sélection par la technique de phage display ;
- * d'une conception *in silico*.

Ces différentes possibilités seront illustrées dans les paragraphes suivants.

1.2°) Peptides provenant de sources naturelles

Des peptides bioactifs peuvent être isolés de nombreuses sources comme les animaux, les plantes, les microorganismes ou les insectes.

Le premier peptide bioactif découvert est l'insuline. Cette hormone de 51 acides aminés est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas et exerce un effet hypoglycémiant. Elle participe à la régulation des substrats énergétiques, tel que le glucose. L'insuline est administrée par voie intraveineuse ou sous cutanée dans le cadre du traitement du diabète.

L'identification d'une protéine intervenant dans un processus biologique « clé » et la compréhension des mécanismes biomoléculaires peuvent servir à la mise au point de peptides médicaments. C'est le cas de l'Enfuvirtide : ce peptide synthétique mime une unité répétée de la glycoprotéine gp41 impliquée dans la fusion du VIH avec sa cellule hôte. Ce médicament, produit par synthèse chimique totale, est administré par voie sous cutanée dans le traitement du VIH¹³.

Plus récemment, de nombreux peptides d'origine naturelle ont été étudiés et modifiés pour une utilisation potentielle en chimiothérapie anticancéreuse¹⁴. C'est le cas d'un peptide, nommé AFPep (**A**lpha**F**etoprotein**P**eptide), qui mime le site actif de l' α -fétoprotéine. Cette dernière, produite pendant la grossesse, aurait un rôle préventif sur la croissance de certains cancers du sein hormono-dépendants¹⁵. Administré par voie orale, l'AFPep semble efficace dans la prévention et le traitement du cancer du sein dans des modèles animaux¹⁶. D'après une autre étude plus récente toujours sur des modèles animaux, il participerait, en synergie avec le Tamoxifen (Nolvadex[®], AstraZeneca), à la réduction de la croissance de certains types de

¹³ Poveda E, Briz V, Soriano V. Enfuvirtide, the first fusion inhibitor to treat HIV infection. *AIDS Rev.* **2005**. 7, 139-147

¹⁴ Bhutia SK, Maiti TK. Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends Biotechnol.* **2008**. 26, 210-217

¹⁵ Bennett JA, Zhu SJ, Pagano-Mirarchi A, Kellom TA, Jacobson HI. A-fetoprotein derived from a human hepatoma prevents growth of estrogen-dependent human breast cancer xenografts. *Clin. Cancer Res.* **1998**. 4, 2877-2884

¹⁶ Bennett JA, DeFreest L, Anaka I, Saadati H, Balulad S, Jacobson HI, Andersen TT. AFPep: an anti-breast cancer peptide that is orally active. *Breast Cancer Res. Treat.* **2006**. 98, 133-141

cancers du sein, et il aurait également la propriété d'atténuer les effets secondaires du Tamoxifen¹⁷.

1.3°) Peptides sélectionnés par phage display

La technique de phage display permet de générer et de sélectionner dans une librairie de séquences aléatoires, celles qui sont les plus affines pour une cible (protéine, peptide, ADN, récepteur...). La sélection se fait par la présentation (« display ») de ces molécules par des phages, qui sont des virus n'infectant que certaines bactéries.

Après clonage et transfection de l'ADN codant les peptides, ils sont exprimés par les phages, puis présentés à leur surface. Ces derniers se fixent à la cible, sont isolés par affinité puis amplifiés par infection bactérienne, ce qui permet de multiplier les phages. A l'issue de plusieurs cycles de sélection/amplification, les phages sont séquencés afin de déterminer la séquence peptidique présentée à la surface des clones sélectionnés. Les phages ou les peptides obtenus par synthèse peuvent être ensuite testés pour leur activité biologique.

Diverses protéines constituant des cibles thérapeutiques potentielles ont été ainsi testées pour leur affinité vis-à-vis de polypeptides présentés à la surface de phages. C'est le cas de récepteurs membranaires comme le PDGF (**P**latelet-**D**erived **G**rowth **F**actor), mais également de facteurs de croissance, tel que l'EGF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor)¹⁸.

De même, plusieurs auteurs décrivent l'identification de peptides affins pour le récepteur MET ou son ligand l'HGF/SF (**H**epatocyte **G**rowth **F**actor/**S**catter **F**actor). Par exemple, Tam et coll ont isolé un peptide capable de se lier à la chaîne β de l'HGF/SF et d'inhiber sa liaison à MET¹⁹. D'autre part, des peptides affins pour le domaine extracellulaire de MET ont été sélectionnés et leurs séquences ont été largement utilisées dans le cadre de ce travail de recherche²⁰. L'ensemble de ces données bibliographiques montrent que le développement d'inhibiteurs peptidiques de la signalisation HGF/SF-MET sur la base de peptides sélectionnés par la technique de phage display est envisageable.

¹⁷ Andersen TT, Georgekutty J, DeFreest LA, Amaratunga G, Narendran A, Lemanski N, Jacobson HI, Bennett JA. An α -fetoprotein-derived peptide reduces the uterine hyperplasia and increases the antitumor effect of tamoxifen. *Br. J. Cancer*. **2007**. 97, 327–333

¹⁸ Clackson T, Wells JA. *In vitro* selection from protein and peptide libraries. *Trends Biotechnol*. **1994**. 12, 173-184

¹⁹ Tam EM, Runyon ST, Santell L, Quan C, Yao X, Kirchofer D, Skelton NJ, Lazarus RA. Noncompetitive inhibition of hepatocyte growth factor-dependent Met signalling by a phage-derived peptide. *J. Mol. Biol*. **2009**. 385, 79-90

²⁰ Zhao P, Grabinski T, Gao C, Skinner RS, Giambernardi T, Su Y, Hudson E, Resau J, Gross M, Vande Woude GF, Hay R, Cao B. Identification of a met-binding peptide from a phage display library. *Clin. Cancer Res*. **2007**. 13. 6049-6055

1.4°) Conception *in silico* de peptides d'intérêt thérapeutique

Grâce aux nombreuses informations disponibles sur les mécanismes d'action en biologie et sur les données structurales des protéines (RMN, radiocristallographie) et aux outils de modélisation moléculaire, les chercheurs ont la possibilité de concevoir des peptides potentiellement actifs. Dans ce contexte, la conception *de novo* consiste à construire rationnellement un peptide grâce aux données structurales du complexe formé par la cible et son ligand, ou par une enzyme et son substrat. L'enjeu est ensuite de synthétiser la molécule conçue *in silico* et d'évaluer son activité inhibitrice réelle. De nombreuses publications font état de l'utilisation de cette stratégie dans la conception de peptides d'intérêt thérapeutique^{21,22}.

Nous venons de voir les principales stratégies utilisées pour identifier des peptides d'intérêt thérapeutique. Une fois le peptide identifié, et à condition que sa structure le permette, la manière la plus directe de le produire puis de le faire évoluer de façon à optimiser ses propriétés, est la synthèse chimique qui peut être effectuée soit sur un support solide, soit en solution. Nous allons d'abord décrire le principe de la synthèse peptidique en phase solide, puis les concepts de base de la ligation chimique, qui permet un assemblage convergent des structures peptidiques.

1.5°) La synthèse peptidique

Historiquement, la synthèse des peptides a débuté par des techniques en solution. Cette stratégie générait fréquemment des produits difficiles à purifier à cause de réactions incomplètes et/ou de l'insolubilité des intermédiaires. Aujourd'hui, la synthèse totale en solution reste la technique la plus employée pour la production à large échelle de principes actifs de nature peptidique²³. Cependant, la synthèse en solution de peptides complexes reste un défi en raison du nombre important d'étapes nécessaires à l'assemblage du peptide.

Ces limitations ont conduit au développement de la synthèse peptidique en phase solide ou SPPS (**S**olid **P**hase **P**eptide **S**ynthesis), qui a été initiée par Bruce Merrifield au

²¹ Klepeis JL, Floudas CA, Morikis D, Tsokos CG, Lambris JD. Design of peptide analogues with improved activity using a novel *de novo* protein design approach. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2004**. 43, 3817-3826

²² Lins L, Charlotaux B, Heinen C, Thomas A, Brasseur R. « *De novo* » design of peptides with specific lipid-binding properties. *Biophys. J.* **2006**. 90, 470-479

²³ Bray BL. Large-scale manufacture of peptide therapeutics by chemical synthesis. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2003**. 2, 587-593

début des années 60²⁴. Son idée fut d'utiliser un polymère de type polystyrène à la fois insoluble, inerte et stable dans les solvants utilisés pour la synthèse peptidique. Ce polymère, appelé « résine », porte une fonction chimique, qui permet l'ancrage du dernier résidu de la séquence peptidique, la synthèse s'effectuant de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale. Le support solide utilisé par Merrifield, appelé aujourd'hui résine de Merrifield, présente des groupements chlorobenzyle sur une matrice polystyrène réticulé par du divinylbenzène. Le groupement acide carboxylique du dernier acide aminé de la séquence est mis en réaction avec le groupement chlorobenzyle pour générer une fonction ester. Des cycles de déprotection/couplage d'acides aminés, une déprotection des chaînes latérales et la séparation du peptide de la matrice ont permis de réaliser la synthèse simple et rapide d'un tétrapeptide portant une fonction acide carboxylique au niveau de l'extrémité C-terminale. La répétition des étapes de couplage d'acides aminés protégés à une chaîne peptidique en élongation, puis la séparation du produit final du support solide sont les principes de base de la synthèse peptidique en phase solide, sur laquelle de nombreuses variantes sont venues s'ajouter²⁵.

²⁴ Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**. 85, 2149-2154

²⁵ Atherton E, Sheppard RC. Solid phase peptide synthesis: a practical approach, IRL Press, Oxford, **1989**

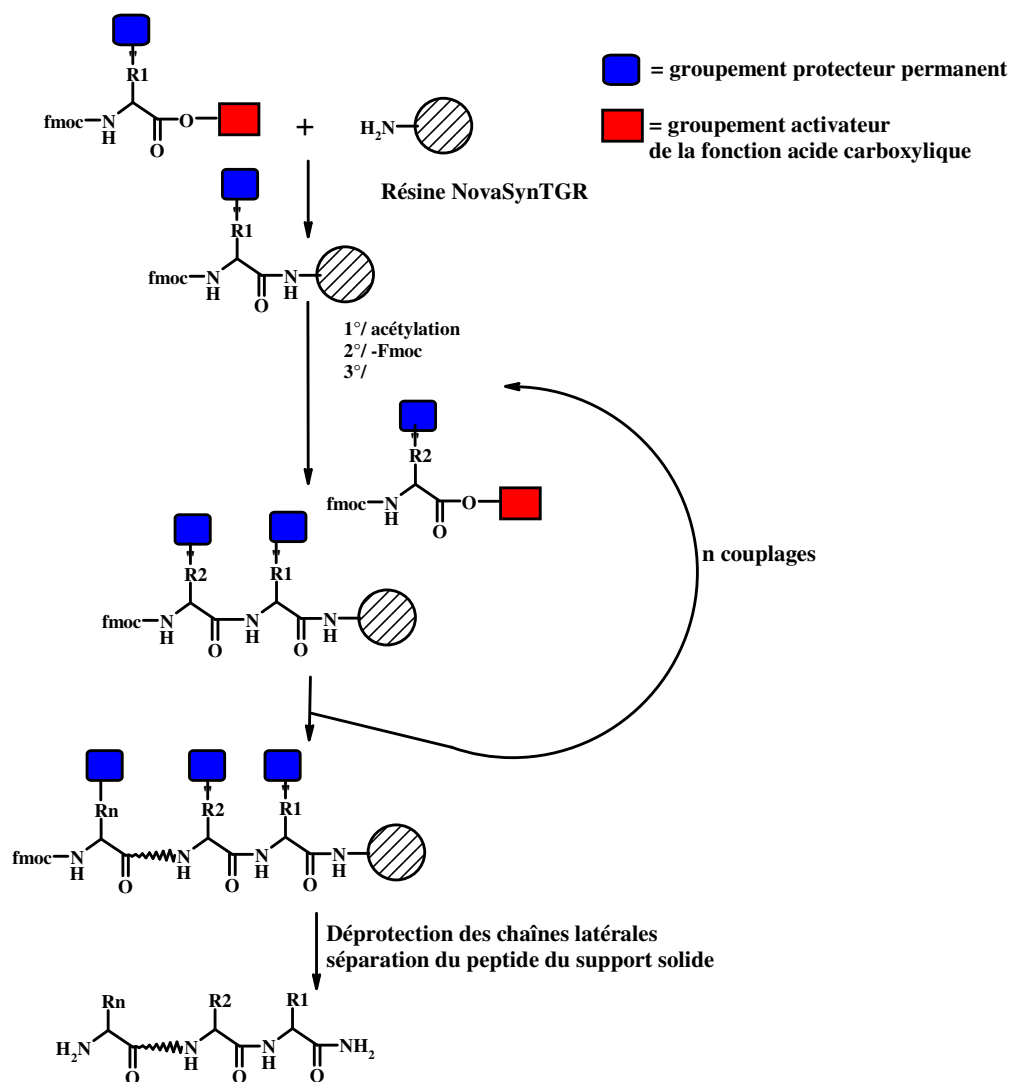


Figure 1 : Synthèse peptidique en phase solide en prenant pour exemple une résine NovaSyn TGR[®] (pour sa description plus détaillée voir Figure 2)

Dans la stratégie générale décrite à la Figure 1, les acides aminés sont protégés sur l'amine α (protection temporaire) et sur la chaîne latérale (protection permanente) pour limiter les réactions secondaires. La fonction acide carboxylique est activée pour que le lien peptidique puisse se former. L'amine α est déprotégée et le résidu suivant peut, de façon similaire au précédent, être ajouté à la peptidyl-résine. Plusieurs couplages successifs du même acide aminé sont envisageables afin d'améliorer le rendement de formation du lien peptidique en cas de couplage difficile. Les amines résiduelles peuvent être acétylées pour ne pas réagir lors du cycle suivant et être à l'origine de la formation de séquences dites à délétion.

Par rapport aux méthodes de synthèse en solution, les avantages sont multiples. A chaque étape de l'élongation du peptide, l'excès de réactifs (acides aminés, agents de couplage) ainsi que la possibilité de multiplier les couplages permettent d'accéder à des rendements moyens par cycle élevés, et de pouvoir ainsi synthétiser des peptides de grande taille. De plus, après chaque couplage, cet excès de réactifs est éliminé par des filtrations et des lavages de la peptidyl-résine. Un autre avantage important de la SPPS réside dans l'automatisation possible du procédé, étant donné le caractère répétitif de la synthèse et la possibilité d'éliminer les réactifs par des lavages.

Depuis cette découverte, de nombreux support solides ont été développés et sont disponibles commercialement²⁶. Ils offrent la possibilité de faire varier la fonction obtenue à l'extrémité C-terminale du peptide après sa séparation de la résine. Leur composition a été adaptée pour favoriser leur solvataion par une grande variété de solvants organiques, minimiser l'agrégation des chaînes peptidiques en croissance et favoriser la formation des liaisons peptidiques.

Pour synthétiser les peptides présentés dans ce manuscrit, deux résines commercialisées par la société Novabiochem ont été utilisées (Figure 2).

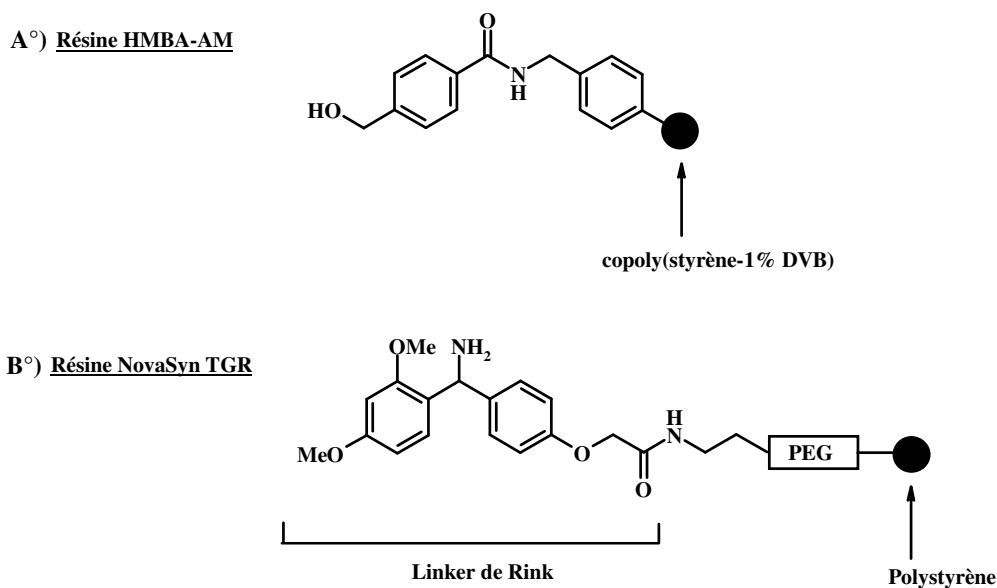


Figure 2 : Structures chimiques des résines :

A°) HMBA-AM

B°) NovaSyn TGR[®]

²⁶ Yu Z, Bradley M. Solid supports for combinatorial chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002.** 6, 347-352

La résine HMBA-AM est composée d'un acide 4-hydroxyméthylbenzoïque (ou **H**ydroxy**M**éthyl **B**enzoic **A**cid) lié par une liaison amide à une matrice PolyStyrène (PS) réticulée par 1% de DiVinylBenzène (DVB). Nous avons utilisé ce support solide pour préparer des peptides présentant une fonction hydrazide en C-terminal, grâce à l'hydrazinolyse du lien ester entre le peptide et la résine²⁷.

La résine de type NovaSyn TGR[®] est composée du linker de Rink²⁸ et d'un copolymère PEG-PS fonctionnalisé. Cette résine permet, après traitement avec une solution contenant majoritairement de l'acide trifluoroacétique (TFA), de libérer un peptide présentant une extrémité C-terminale carboxamide. Cette modification est généralement introduite dans le but d'augmenter la résistance du peptide face aux dégradations enzymatiques, mais peut être également présente dans certains peptides d'origine naturelle.

Suite à la découverte de Merrifield, de nombreux progrès ont été effectués concernant les groupements protecteurs temporaires et permanents. A ce jour, sont essentiellement utilisées les stratégies Boc/benzyle²⁹ et Fmoc/*t*-butyle³⁰. Elles diffèrent par le choix du groupement protecteur temporaire (Boc ou Fmoc) et les groupements protecteurs permanents (benzyle ou *t*-butyle respectivement) (Figure 3).

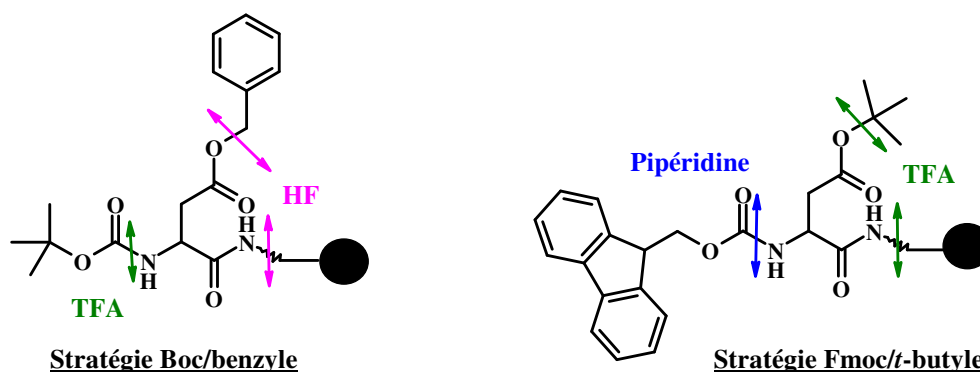


Figure 3 : Stratégies de synthèse en SPPS

²⁷ Mellor SL, Wellings DA, Fehrentz JA, Paris M, Martinez J, Ede NJ, Bray AM, Evans DJ, Bloomberg GB. Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach. *Oxford University Press*. **2000**. 147-148

²⁸ Rink H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxydiphenyl-methylester resin. *Tet. Lett.* **1987**. 28, 3787-3790

²⁹ Anderson G, McGregor AC. *t*-butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**. 79, 6180-6183

³⁰ Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res.* **1990**. 35, 161-214

Dans la première stratégie, le groupement Boc est éliminé à l'issue de chaque couplage par une solution de TFA et le peptide est libéré de son support grâce à un traitement à l'acide fluorhydrique (HF)³¹, dangereux et nécessitant l'utilisation d'un appareillage Teflon[®] extrêmement coûteux.

Dans la stratégie Fmoc/*t*-butyle, le groupement Fmoc est éliminé à chaque cycle en milieu basique, par exemple avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF³². Un traitement par une solution de TFA permet de déprotéger ses chaînes latérales et de séparer le peptide de son support solide³³.

La SPPS a permis d'élargir les possibilités de synthèse à des peptides de séquences plus longues qu'en solution. Néanmoins, comme pour toute synthèse linéaire, plus le nombre de résidus augmente, plus le rendement global de la synthèse diminue. Par exemple, la synthèse linéaire d'un peptide de 100 résidus, dans laquelle chaque étape réactionnelle se déroule avec un rendement moyen de 98%, conduira théoriquement à un rendement final d'élongation de $0,98^{100} \times 100 = 13\%$. Il est également possible de produire des peptides par ligation, c'est-à-dire, d'assembler de manière convergente et chimiosélective en solution aqueuse des fragments peptidiques déprotégés et préalablement purifiés. Dans le cas d'une synthèse convergente de deux fragments de 50 résidus chacun, le rendement théorique sera alors de $0,98^{50} \times 100 = 36\%$ moins les pertes dues à la ligation des deux fragments. Il faut également tenir compte des pertes dues à la purification, qui seront nettement plus élevées pour la synthèse linéaire d'un fragment de 100 acides aminés, que pour la purification de fragments de taille plus réduite. Aujourd'hui, la synthèse de longs peptides par ligation a montré sa supériorité sur les méthodes d'assemblage pas à pas. Ces méthodes peuvent conduire à la synthèse de protéines possédant environ 150 à 200 acides aminés.

Dans le prochain paragraphe, nous nous intéresserons aux méthodes permettant d'obtenir un lien amide au site de jonction des deux peptides, et qui, pour cette raison, sont appelées les ligations natives.

³¹ Pennington MW. HF cleavage and deprotection procedures for peptides synthesized using a Boc/Bzl strategy. *Methods Mol. Biol.* **1994**. 35, 41-62

³² Fields GB. Methods for removing the Fmoc group. *Methods Mol Biol.* **1994**. 35, 17-27

³³ Guy CA, Fields G B. Trifluoroacetic acid cleavage and deprotection of resin-bound peptides following synthesis by Fmoc chemistry. *Methods Enzymol.* **1997**. 289, 67-83

2°) Les ligations natives

2.1°) La ligation de Dawson et de Kent

La ligation de Dawson et de Kent, encore appelée NCL (Native Chemical Ligation), a été mise au point dans les années 90³⁴ et a fait l'objet de nombreuses revues^{35, 36}. Le lien peptidique est le résultat d'une attaque nucléophile de la fonction thiol d'un cystéinyl-peptide sur le carbonyle du thioester d'un second peptide. Cette première étape, favorisée en présence d'un bon groupement partant, est suivie du réarrangement spontané de l'intermédiaire de transthioestérification en un lien amide plus stable (Figure 4).

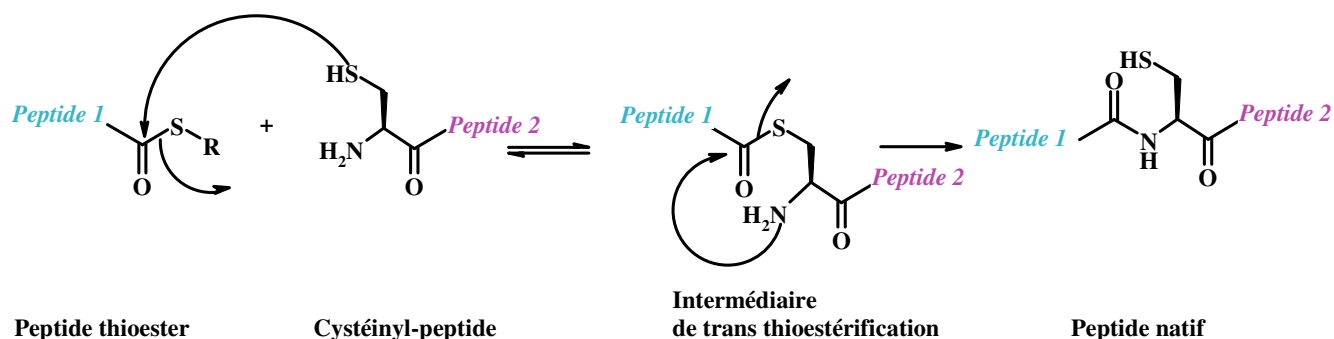


Figure 4 : Ligation de Dawson et de Kent

D'un point de vue expérimental, la réaction se déroule à température ambiante dans un tampon aqueux de type phosphate de sodium et à un pH proche de la neutralité. Des précautions sont nécessaires afin de limiter la formation de produits secondaires : le milieu réactionnel doit être placé sous atmosphère inerte pour éviter la formation de disulfures et il doit comporter un excès de thiols, généralement le thiophénol, le benzylmercaptan³⁷ ou le (4-carboxyméthyl)thiophénol (MPAA), qui à la différence des deux premiers n'est pas odorant³⁸. Ces derniers jouent à la fois un rôle de réducteurs et permettent d'augmenter la réactivité en formant des phénylthioesters par échange de thiols (Figure 5).

³⁴ Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SBH. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*. **1994**. 266, 776-779

³⁵ Hackeng TM, Griffin JH, Dawson PE. Protein synthesis by native chemical ligation : expanded scope by using straightforward methodology. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1999**. 96, 10068-10073

³⁶ Hackenberger CP, Schwarzer D. Chemoselective ligation and modification strategies for peptides and proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**. 47, 10030-10074

³⁷ Dawson PE, Churchill MJ, Ghadiri MR, Kent SBH. Modulation of reactivity in native chemical ligation through the use of thiol additives. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**. 119, 4325-4329

³⁸ Johnson ECB, Kent SBH. Insights into the mechanism and catalysis of the native chemical ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**. 128, 6640-6646

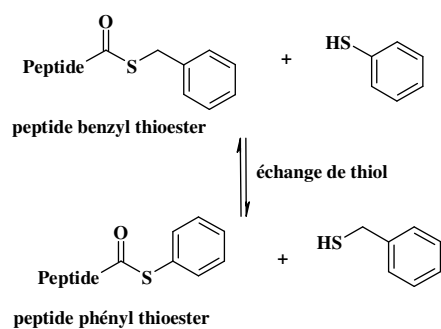


Figure 5 : Echange de thiol lors de la ligation native

L'un des inconvénients de la NCL est la nécessité de disposer de peptides thioesters. A l'origine, ils ont été produits principalement en utilisant la stratégie Boc/benzyle. Leur synthèse selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle est compliquée par l'instabilité du lien thioester en milieu basique, notamment dans les conditions de déprotection du groupement Fmoc. Néanmoins, la mise au point de stratégies de synthèse de peptides thioester utilisant la stratégie Fmoc/*t*-butyle est un domaine de recherche extrêmement dynamique^{39, 40, 41}.

De nombreux exemples de la littérature montrent que la NCL peut s'appliquer à la synthèse de protéines d'intérêt biologique. A titre d'exemple, elle a permis la synthèse de l'Interleukine 8, protéine de 72 acides aminés produite par les cellules épithéliales lors d'une agression d'origine microbiologique ou chimique⁴².

Différentes réactions de type NCL dérivent de la ligation de Dawson et de Kent et c'est ce que nous allons évoquer dans les prochains paragraphes.

2.1.1°) NCL en présence d'une sélénocystéine

La sélénocystéine est un analogue de la cystéine qui se prête bien à la réaction de NCL. Cet acide aminé rare entre dans la composition de sélénoprotéines telles que certaines enzymes du métabolisme⁴³. Dans la littérature, une ligation de type NCL entre des peptides

³⁹ Kimmerlin T, Seebach D. « 100 years of peptide synthesis”: ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies. *J. Peptide Res.* **2005.** 65, 229-260

⁴⁰ Nakamura K, Kanao T, Uesugi T, Hara T, Sato T, Kawakami T, Aimoto S. Synthesis of peptide thioesters via an *N,S* acyl shift reaction under mild acidic conditions on an *N*-4,5-dimethoxy-2-mercaptobenzyl auxiliary group. *J. Pept. Sci.* **2009.** 15, 731-737

⁴¹ Ollivier N, Behr JB, El-Mahdi O, Blanpain A, Melnyk O. Fmoc solid phase synthesis of peptides thioesters using an intramolecular *N,S* acyl shift. *Org. Lett.* **2005.** 7, 2647

⁴² Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SBH. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science.* **1994.** 266, 776-779

⁴³ Gladyshev VN, Kryukov GV. Evolution of selenocysteine-containing proteins : significance of identification and functional characterization of selenoproteins. *BioFactors.* **2001.** 14, 87-92

thioesters et sélénocystéine a été également décrite selon un mécanisme réactionnel similaire à celui de la ligation de Dawson et de Kent⁴⁴ (Figure 6).

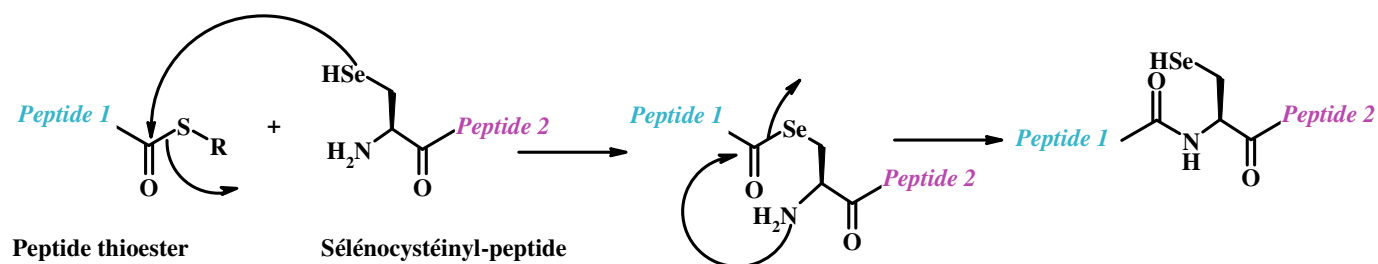


Figure 6 : NCL en présence d'une sélénocystéine

La réaction de NCL a fait ensuite l'objet de nombreuses adaptations, comme nous le verrons par la suite, permettant d'introduire d'autres résidus que la cystéine au point de ligation. En effet, une étude menée par MacCaldon et coll montre que sur 1021 protéines synthétiques, la cystéine n'est présente qu'à une fréquence de 1,7%, à la différence de l'alanine qui est l'un des résidus les plus fréquemment retrouvé dans les protéines⁴⁵.

La rareté des cystéines dans les protéines a stimulé l'utilisation de la NCL pour d'autres acides aminés tels que la glycine⁴⁶, la phénylalanine⁴⁷, la valine⁴⁸, l'alanine³⁴, pour ne citer que quelques exemples. Le principe est toujours le même : un acide aminé, grâce à sa fonction thiol, permet la ligation de type NCL, puis une réaction (désulfuration, élimination d'un auxiliaire, méthylation) permet d'éliminer ou de transformer la fonction thiol et d'accéder ainsi au produit final souhaité.

2.1.2°) Ligation de type NCL et élimination de la fonction thiol par désulfuration

Une approche alternative pour permettre la synthèse par la NCL de protéines comportant des alanines mais dépourvues de cystéine consiste à réaliser la ligation avec une

⁴⁴ Hondal RJ, Nilsson BL, Raines RT. Selenocysteine in native chemical ligation and expressed protein ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**. 123, 5140-5141

⁴⁵ MacCaldon P, Argos P. Oligopeptide biases in protein sequences and their use in predicting protein coding regions in nucleotide sequences. *Proteins*. **1988**. 4, 99-122

⁴⁶ Botti P, Carrasco MR, Kent SBH. Native chemical ligation using removable N^α-(1-phenyl-2-mercaptoethyl) auxiliaries. *Tet. Lett.* **2001**. 42, 1831-1833

⁴⁷ Crich D, Banerjee A. Native Chemical Ligation at Phenylalanine. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**. 129, 10064-10065

⁴⁸ Haase C, Rohde H, Seitz O. Native Chemical Ligation at Valine. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**. 47, 6807-6810

cystéine puis à la modifier chimiquement en alanine grâce à une réaction de désulfuration en présence, par exemple, du Nickel de Raney⁴⁹ (Figure 7).

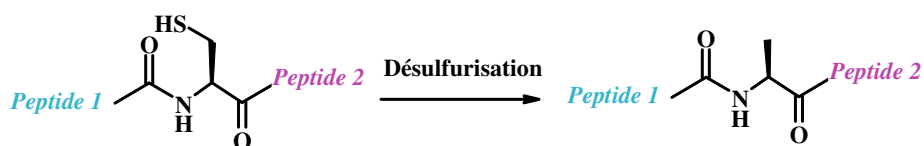


Figure 7 : NCL suivie de la désulfuration de la cystéine

Le même principe a été utilisé par la suite pour obtenir une phénylalanine et une valine au site de ligation. Pour aboutir à la phénylalanine, les auteurs de ces travaux ont d'abord préparé, grâce à une synthèse multi-étapes, une β -mercaptophénylalanine, qui a été introduite sur l'amine α d'un fragment peptidique. Ce résidu modifié est d'abord réduit *in situ* et le thiol libéré peut réagir ensuite avec un fragment thioester pour former le lien amide selon le mécanisme de la NCL. La dernière étape de la réaction consiste en une désulfuration afin d'obtenir la phénylalanine au site de la ligation (Figure 8).

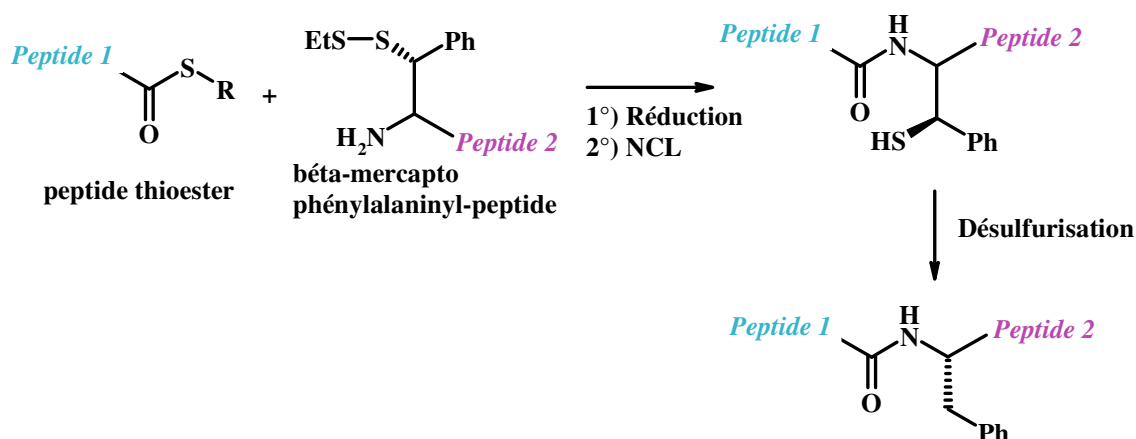


Figure 8 : NCL suivie de la désulfuration de la β -mercaptophénylalanine

Afin d'obtenir une valine au point de ligation, il est possible d'introduire à l'extrémité N-terminale une cystéine modifiée, la β,β -diméthylcystéine, lors de la SPPS. Suite à la ligation de type NCL, cet acide aminé est désulfuré pour obtenir une valine⁵⁰ (Figure 9).

⁴⁹ Yan LZ, Dawson PE. Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**. 123, 526-533

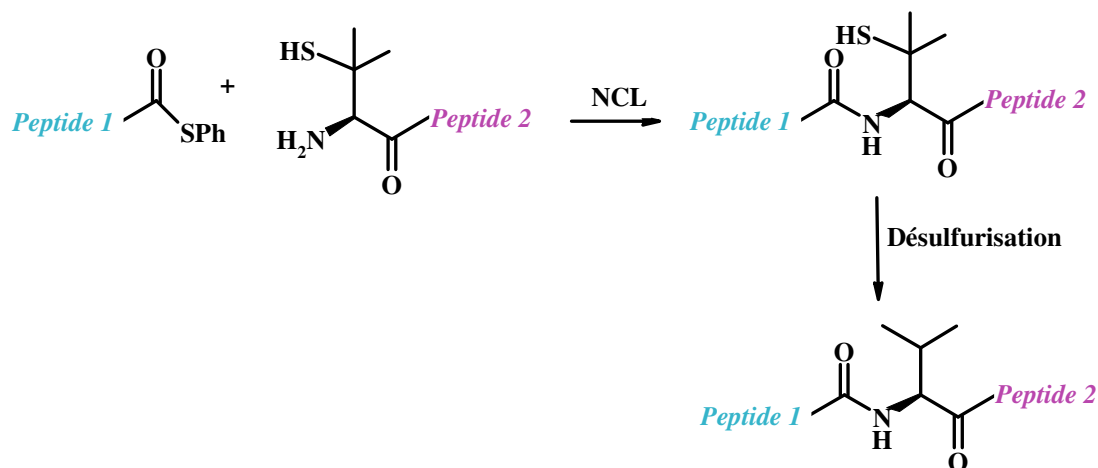


Figure 9 : NCL suivie de la désulfuration de la β,β -diméthylcystéine

Des stratégies dérivées de la NCL permettent également d'introduire au site de ligation d'autres résidus grâce à des structures appelées « auxiliaires de ligation ». Certaines de ces méthodes seront exposées dans le prochain paragraphe.

2.1.3°) NCL à l'aide d'auxiliaires de ligation

Dans le but d'élargir les possibilités de la NCL à un nombre plus important de peptides et de protéines, des méthodes de ligation ont été récemment mises au point afin de préparer des peptides ne comportant pas de cystéine mais une ou plusieurs glycine(s).

Ces synthèses sont possibles grâce à l'utilisation d'auxiliaires de ligation dits « amovibles ». En effet, ils ne sont nécessaires que pour apporter le thiol intervenant dans la NCL, qui réagit avec le groupement carbonyle d'un second peptide thioester. Comme lors de la NCL, l'intermédiaire de transthioestérification subit un réarrangement intramoléculaire afin de former le lien amide et la dernière étape consiste en l'élimination de l'auxiliaire.

Ces auxiliaires de ligation peuvent être introduits au niveau de l'amine α du peptide à l'issue de la SPPS. A titre d'exemple, Botti et coll ont utilisé des auxiliaires de type 1-phényléthanthiol⁵¹. Suite à la ligation avec un peptide thioester puis à l'élimination de l'auxiliaire en milieu acide (en présence d'HF ou de TFA), un peptide comportant une glycine au site de ligation est finalement obtenu (Figure 10).

⁵⁰ Wan Q, Danishefsky SJ. Free-radical-based, specific desulfurization of cysteine: a powerful advance in the synthesis of polypeptides and glycopeptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**.46, 9248-9252

⁵¹ Botti P, Carrasco MR, Kent SBH. Native chemical ligation using removable N^α-(1-phenyl-2-mercaptoethyl) auxiliaries. *Tet. Lett.* **2001**. 42, 1831-1833

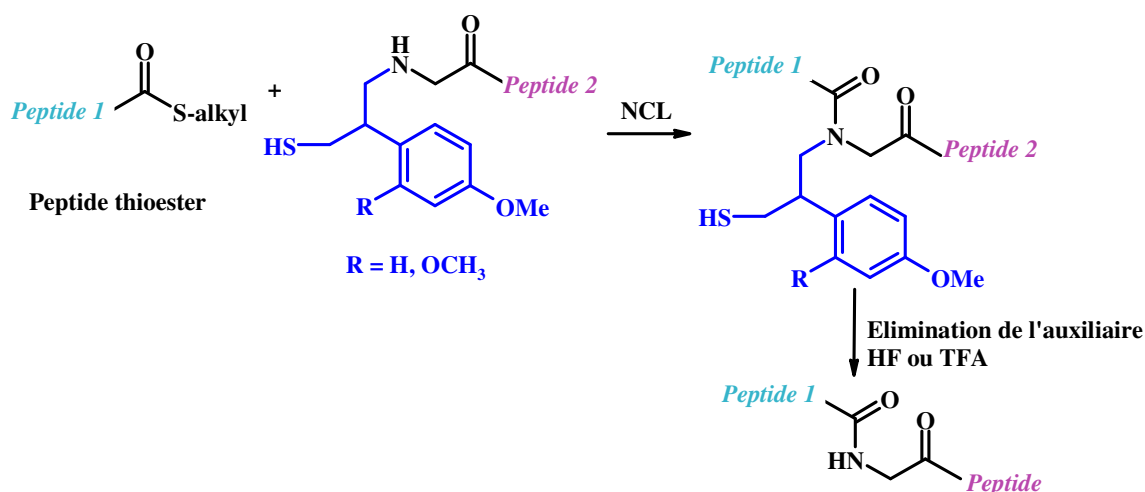


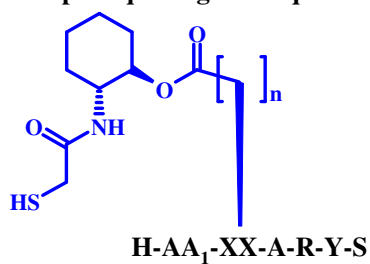
Figure 10 : NCL à l'aide d'un auxiliaire amovible positionné sur l'amine α du peptide

Néanmoins, en introduisant l'auxiliaire au niveau de l'extrémité N-terminale du peptide, l'encombrement stérique de l'intermédiaire de transthioestérification est accru. D'autre part, la nucléophilie de l'amine est nettement réduite, du fait de l'effet électroattracteur du groupement benzyle. Enfin, le réarrangement s'opère via un intermédiaire à 6 chaînons, et non pas à 5 chaînons comme dans la NCL avec les cystéinyl-peptides. Ces facteurs rendent l'étape de réarrangement généralement plus lente. Cette méthode est donc principalement décrite pour des peptides comportant un premier résidu peu encombré, ce qui est le cas de la glycine.

Pour contourner cette limitation, d'autres stratégies ont été développées : elles font appel à des auxiliaires de NCL couplés sur la chaîne latérale du second acide aminé d'un peptide. Par exemple, Lutsky et coll ont mis au point une stratégie dans laquelle l'auxiliaire de ligation (qui est ici de type cyclohexane) est introduit grâce à un lien ester sur la chaîne latérale d'un acide aspartique, glutamique ou d'une sérine⁵². Les différents peptides portant cet auxiliaire de NCL et préparés dans le cadre de leurs travaux de recherche sont présentés à la Figure 11.

⁵² Lutsky MY, Nepomniaschiy N, Brik A. Peptide ligation *via* side-chain auxiliary. *Chem. Comm.* **2008.** 10, 1229-1231

A° Auxiliaire de NCL sur la chaîne latérale de l'acide aspartique et glutamique



AA₁ = Gly, Ala, Asp, His
 n = 1, XX = Asp
 n = 2, XX = Glu

B° Auxiliaire de NCL sur la chaîne latérale de la sérine

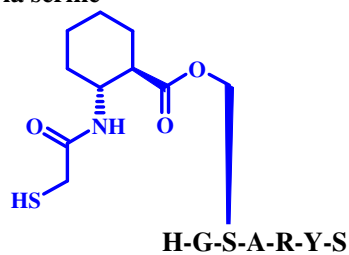


Figure 11 : Peptides portant un auxiliaire de liaison sur la chaîne latérale des acides aspartique et glutamique (A) et de la sérine (B)

Pour évaluer l'efficacité de leur méthode avec des résidus plus ou moins encombrés, ils ont fait varier le résidu voisin de celui portant l'auxiliaire (qui peut être une glycine, une alanine, une histidine ou encore un acide aspartique), ainsi le dernier résidu du peptide thioester. Après la ligation, l'auxiliaire de ligation est éliminé, cette fois-ci, dans des conditions basiques (Figure 12).

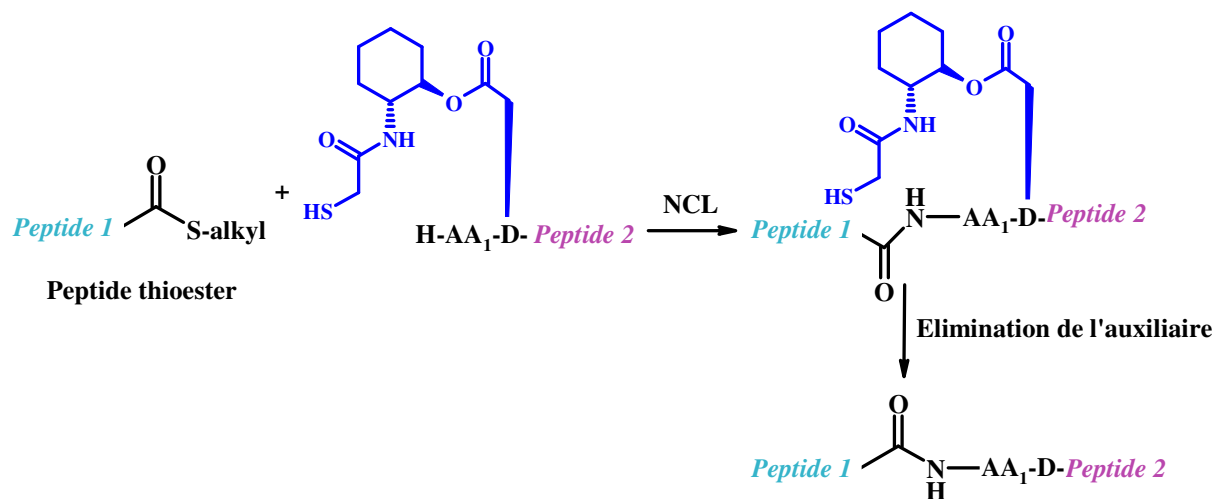


Figure 12 : NCL à l'aide d'un auxiliaire de liaison positionné sur la chaîne latérale du peptide

Les rendements de synthèse relativement bons (aux alentours de 60%) ont prouvé que leur stratégie de ligation est suffisamment efficace pour introduire une variété de résidus au site de jonction entre les deux peptides.

2.1.4°) Ligation de type NCL suivie de la transformation du thiol par méthylation

La NCL peut également s'effectuer avec un autre analogue de la cystéine comme l'homocystéine dont la chaîne latérale est plus longue d'un carbone par rapport à celle de la cystéine. Quand la protéine à synthétiser ne possède pas de cystéine mais une ou plusieurs méthionine(s), il est possible tout d'abord de lier les deux fragments peptidiques au niveau d'une homocystéine, puis de la méthyler sélectivement grâce au paranitrobenzène méthyl sulfonate pour obtenir une méthionine au site de jonction⁵³ (Figure 13).

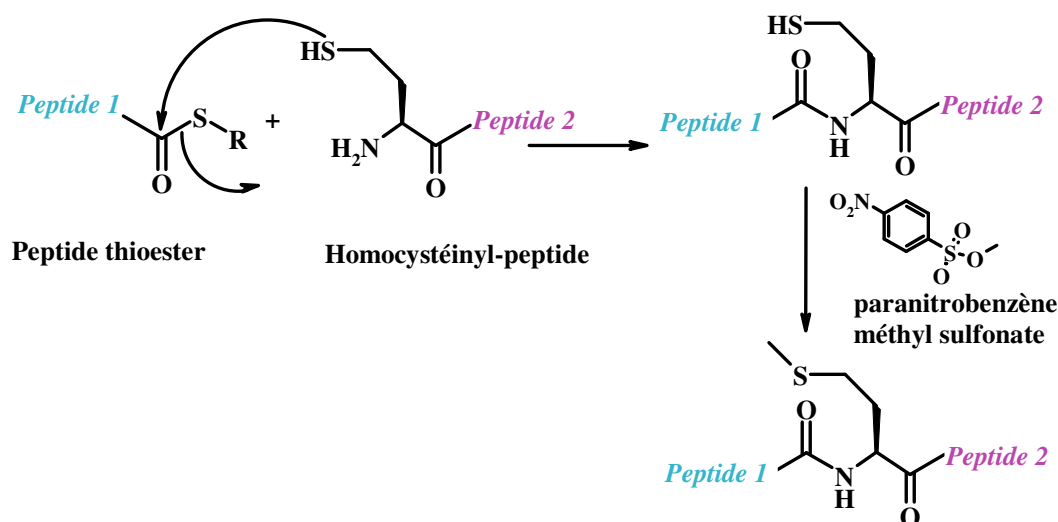


Figure 13 : NCL en présence d'une homocystéine suivie de sa méthylation

Les limitations de la NCL et de ses variantes ont stimulé la découverte de nouvelles chimies de ligation native, en particulier la ligation Staudinger et Bode. Cependant, aucune de ces deux réactions n'arrive à un niveau d'efficacité comparable à celui de la NCL qui reste la réaction de ligation native la plus employée pour la synthèse de polypeptides.

⁵³ Tam JP, Yu Q. Methionine ligation strategy in the biomimetic synthesis of parathyroid hormones. *Biopol.* **1998.** 46, 319-327

2.2°) La ligation de Staudinger

La ligation de Staudinger est une réaction qui s'effectue en deux étapes entre un peptide thioester et un azido-peptide⁵⁴ (Figure 14).

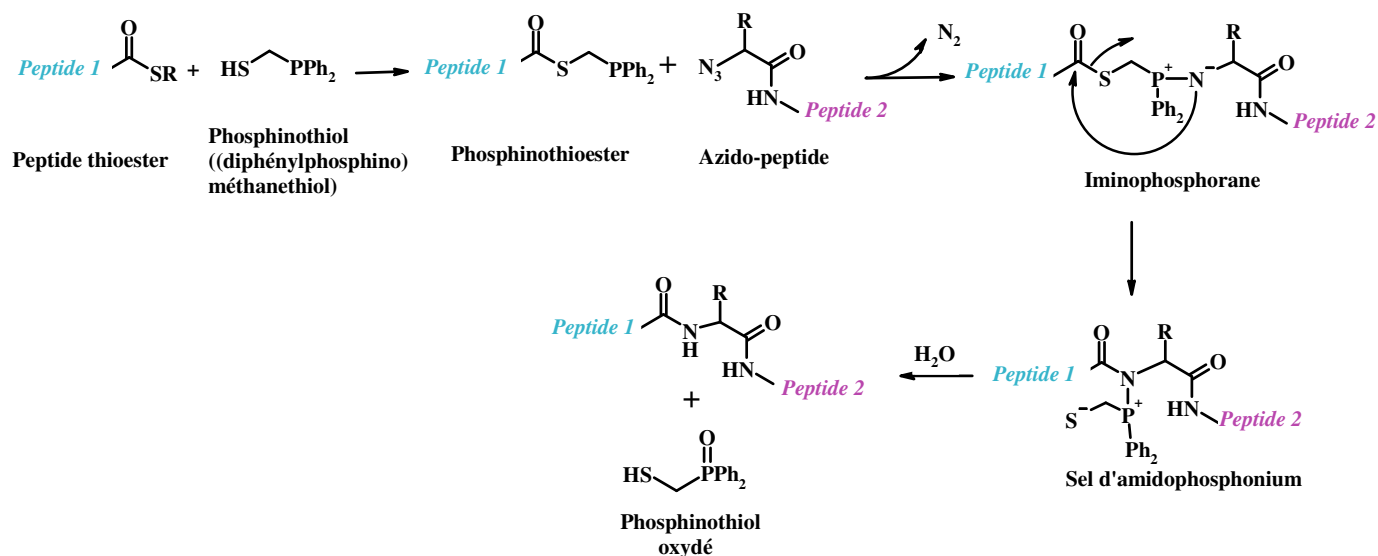


Figure 14 : Ligation de Staudinger

Tout d'abord, le phosphinothiol (ici, le (diphénylphosphino)méthanethiol) est mis en réaction avec le peptide thioester et génère un fragment phosphinothioester. Ensuite, ce dernier réagit avec l'azido-peptide pour former un iminophosphorane qui se réarrange puis est hydrolysé pour obtenir le peptide natif et phosphinothiol oxydé. Grâce à une étude de la réaction en fonction du pH, il a été démontré que cette réaction se déroule de manière optimale dans un tampon phosphate de sodium à un pH proche de 8⁵⁵.

Cette méthode de ligation présente différentes limitations. En effet, comme pour la NCL, elle implique de disposer de peptides thioesters. La synthèse du phosphinothiol peut également poser problème. De plus, l'encombrement stérique de l'azido-peptide joue un rôle non négligeable dans le déroulement de la ligation. En effet, hormis la glycine et l'alanine, un effet stérique très important a été observé avec les autres résidus se traduisant par un rendement de synthèse très faible.

⁵⁴ Saxon E, Bertozzi CR. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science*. 2000. 287, 2007-2010

⁵⁵ Tam A, Soellner MB, Raines RT. Water-soluble phosphinothiols for traceless Staudinger ligation and integration with expressed protein ligation. *J. Am. Chem. Soc.* 2007. 129, 11421-11430

Plus récemment, une autre méthode, qui ne met pas en jeu de peptide thioester a été développée : il s'agit de la ligation de Bode.

2.3°) La ligation de Bode

La ligation de Bode se déroule entre des peptides portant respectivement des fonctions α -cétoacide et hydroxylamine⁵⁶ (Figure 15).

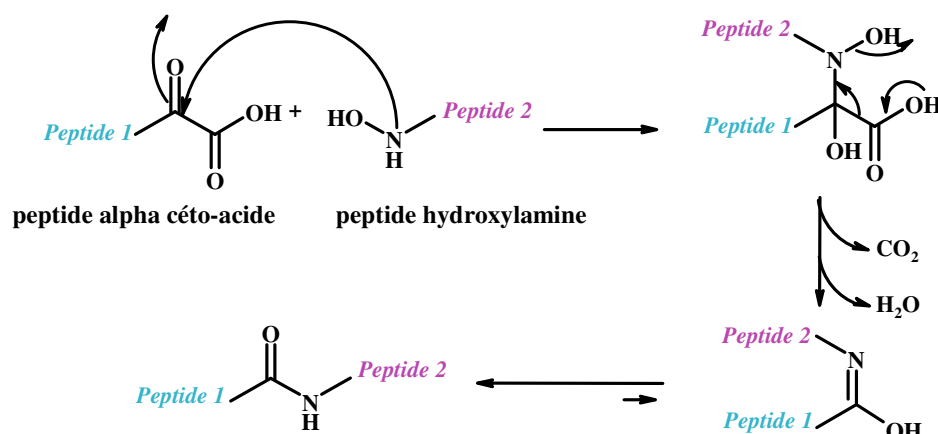


Figure 15 : Ligation de Bode

Elle peut avoir lieu en milieu organique (dans le DMF) ou aqueux (tampon acétate à pH 4). En l'absence de cystéine, il n'est pas nécessaire de prendre de précautions particulières comme pour la NCL, ce qui simplifie la mise en œuvre de la réaction.

Toutefois, certaines étapes de la synthèse peuvent poser problème. En effet, la préparation du peptide α -cétoacide nécessite des étapes de synthèse en solution relativement complexes⁵⁷. D'autre part, le rendement final varie en fonction de l'effet stérique des acides aminés situés au point de jonction⁵⁸.

Ces précédentes méthodes de ligation ont été développées et appliquées à la synthèse convergente de protéines afin de permettre de conserver le lien peptidique initialement présent. Néanmoins, ce lien natif n'est pas toujours primordial pour l'activité biologique de la

⁵⁶ Bode JW, Fox RM, Baucom KD. Chemoselective amide ligations by decarboxylative condensations of N-alkylhydroxylamines and α -ketoacids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**. 45, 1248-1252

⁵⁷ Ju L, Lippert AR, Bode JW. Stereoretentive synthesis and chemoselective amide-forming ligations of C-terminal peptide α -ketoacids. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**. 130, 4253-4255

⁵⁸ Sanki AK, Talan RS, Sucheck SJ. Synthesis of small glycopeptides by decarboxylative condensation and insight into the reaction mechanism. *J. Org. Chem.* **2009**. 74, 1886-1896

protéine et à cause de sa sensibilité aux endoprotéases, il peut même s'avérer préjudiciable au devenir du peptide lorsqu'il est utilisé dans un cadre thérapeutique.

Des méthodes de ligation dites non natives, qui aboutissent à la formation d'une liaison autre que peptidique, ont ainsi été développées pour permettre la synthèse de structures moléculaires complexes ou des protéines comprenant un lien non natif. Certaines d'entre elles seront détaillées dans le paragraphe suivant.

3°) Les ligations non natives

Dans cette partie, les ligations permettant la formation d'un lien non peptidique seront plus largement détaillées. Elles sont classées en deux sous-groupes en fonction de l'intervention d'un thiol nucléophile ou non.

3.1°) Les ligations ne faisant pas intervenir de dérivés soufrés

3.1.1°) La ligation hydrazone

La ligation peptidique par formation d'une liaison hydrazone est la première des méthodes de ligation à avoir été décrite⁵⁹. Le lien hydrazone se forme suite à la condensation entre un aldéhyde et une hydrazine ou un dérivé d'hydrazide suivie d'une déshydratation (Figure 16).

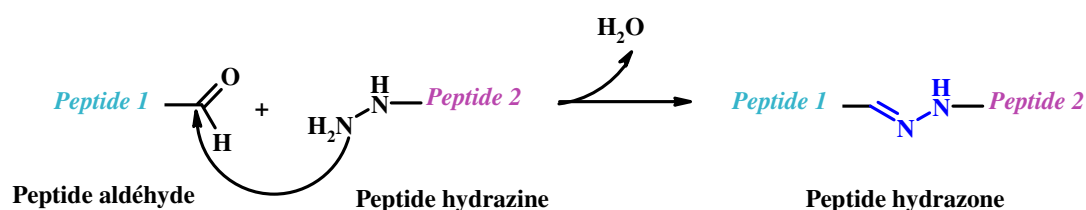


Figure 16 : Ligation hydrazone

La réaction s'effectue généralement dans un tampon aqueux (type acétate de sodium/acide acétique) à pH 4,6. L'hydrazone formée peut être réduite par le NaBH₃CN pour donner un lien plus stable.

⁵⁹ King TP, Zhao SW, Lam T. Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkage. *Biochem.* 1986. 25, 5774-5779

Un analogue d'un facteur de croissance hématopoïétique, le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) a été préparé grâce à cette ligation par Gaertner et coll⁶⁰. La protéine a tout d'abord été hydrolysée enzymatiquement pour obtenir deux fragments. Après la fonctionnalisation de leurs extrémités, respectivement en aldéhyde et en hydroxylamine, ils ont été condensés par la ligation hydrazone pour produire l'analogue présentant un lien non natif.

3.1.2°) La ligation oxime

Mise au point par Rose dans les années 90, cette réaction entre un groupement aldéhyde et une hydroxylamine O-substituée a permis de synthétiser des dendrimères dont l'une des applications est la préparation de vaccins⁶¹. Le mécanisme réactionnel est présenté à la Figure 17.

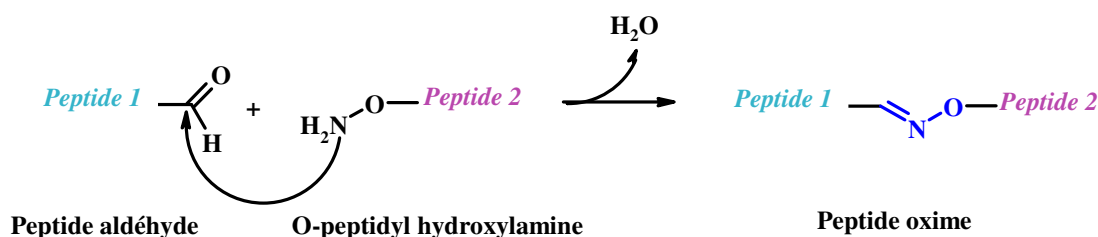


Figure 17 : Ligation oxime

La réaction s'effectue dans les mêmes conditions que la ligation hydrazone, c'est-à-dire dans un tampon aqueux (type acétate de sodium/acide acétique) à pH 4,6. Le pKa d'un groupement hydroxylamine O-substitué étant proche de cette valeur, le groupement O-NH₂ est alors nucléophile à la différence des amines α et ε du peptide. Le lien oxime est aussi plus stable qu'une imine. Ces deux facteurs contribuent à rendre la réaction chimiosélective. De plus, il a été montré que dans certaines biomolécules, le lien oxime est stable dans un tampon phosphate de sodium dans une gamme de pH variant de 4 à 7⁶².

⁶⁰ Gaertner HF, Rose K, Cotton R, Timms D, Camble R, Offord RE. Construction of protein analogues by site-specific condensation of unprotected fragments. *Bioconjugate Chem.* **1992**. 3, 262-268

⁶¹ Rose K. Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**. 116, 30-33

⁶² Forget D, Renaudet O, Defrancq E, Dumy P. Efficient preparation of carbohydrate-oligonucleotide conjugates (COCs) using oxime bond formation. *Tet. Lett.* **2001**. 42, 7829-7832

Cette ligation a montré une grande utilité et efficacité dans de nombreux domaines comme par exemple lors de la synthèse de glycopeptides⁶³. Forget et coll l'ont également utilisée pour effectuer de manière efficace la synthèse de conjugués entre d'une part un oligonucléotide et d'autre part un cyclopeptide, la fluoescéine et le mannose⁶⁴.

3.1.3°) La « click-chemistry » : formation de 1,2,3-triazole

La cycloaddition-1,3-dipolaire de Huisgen est une réaction de condensation entre un alcyne et un azoture aboutissant à la formation d'un hétérocycle 1,2,3-triazole. La réaction est catalysée en présence de cuivre I⁶⁵. En fonctionnalisant les extrémités respectives de deux peptides, elle peut s'appliquer à la ligation peptidique⁶⁶ (Figure 18).

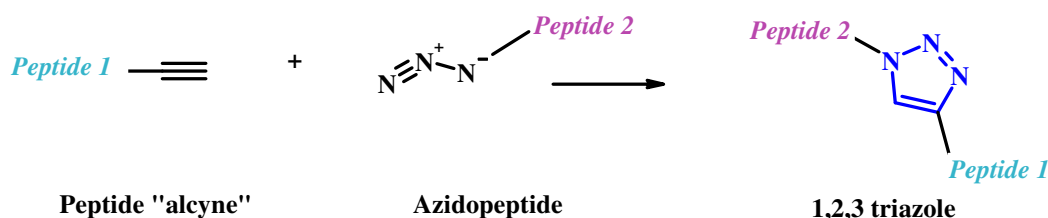


Figure 18 : Ligation avec formation de 1,2,3 triazole

Les fonctions azoture et alcyne sont toutes deux facilement introduites et sont quasiment inertes en l'absence de Cu(I). Ce dernier, catalyseur de cette réaction, conduit à la formation d'un seul régioisomère, contrairement à la réaction activée thermiquement. Par contre, il peut être à l'origine de réactions secondaires telles que l'oxydation de la cystéine, de la méthionine ou encore de l'histidine. Il est important d'éliminer les résidus de Cu(I) après la réaction qui est un élément toxique.

Bock et coll ont utilisé cette réaction pour préparer efficacement un cyclotétrapeptide dont la synthèse s'avérait jusque là difficile par les méthodes de cyclisation existantes⁶⁷. Le produit obtenu est un mime d'un inhibiteur de tyrosinase, enzyme impliquée dans le

⁶³ Lees A, Sen G, LopezAcosta A. Versatile and efficient synthesis of protein-polysaccharide conjugate vaccines using aminoxy reagents and oxime chemistry. *Vaccine*. **2006**. 24, 716-729

⁶⁴ Forget D, Renaudet O, Boturyn D, Defrancq E, Dumy P. 3'-oligonucleotides conjugation via chemoselective oxime bond formation. *Tet. Lett.* **2001**. 42, 9171-9174

⁶⁵ Rostovstev VV, Green LG, Fokin VV, Sharpless KB. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**. 41, 2596-2599

⁶⁶ Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazole on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes by azides. *J. Org. Chem.* **2002**. 67, 3057-3064

⁶⁷ Bock VD, Perciaccante R, Jansen TP, Hiemstra H, Van Maarseveen JH. Click chemistry as a route to cyclic tetrapeptide analogues: synthesis of cyclo-[Pro-Val-ψ(triazole)-Pro-Tyr]. *Org. Lett.* **2006**. 8, 919-922

brunissement des fruits et légumes ainsi que dans différents troubles dermatologiques chez l'homme. Par la suite, la même équipe a montré que les 1,2,3-triazoles pouvaient être considérés comme des bioisostères de la liaison peptidique⁶⁸.

3.2°) Les ligations faisant intervenir des dérivés soufrés

3.2.1°) La ligation thioéther

La ligation thioéther fait intervenir la fonction thiol d'un cystéinyl-peptide et le groupement bromoacétyle ou chloroacétyle porté par l'amine α ou par la chaîne latérale d'un second fragment peptidique (Figure 19).

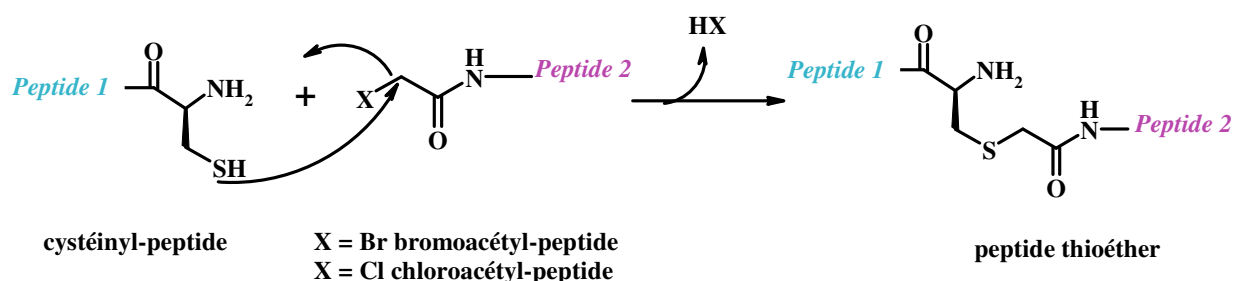


Figure 19 : Ligation thioéther

Comme pour la NCL, le milieu réactionnel doit être idéalement à un pH compris entre 6 et 8, pour permettre l'activation de la fonction thiol sous forme de thiolate, et sous atmosphère inerte afin de limiter l'oxydation du cystéinyl-peptide.

Muir et coll ont utilisé cette ligation pour préparer un fragment d'une protéine de la famille des intégrines, qui sont des récepteurs d'adhésion cellulaire, fortement impliqués dans la migration, la différenciation et la survie des cellules⁶⁹. Par la suite, Futaki et coll ont montré l'intérêt de l'introduction du lien thioether afin d'augmenter la stabilité de protéines synthétiques⁷⁰.

Nous avons utilisé cette ligation dans ce travail de thèse pour synthétiser une partie des conjugués de notre chimiothèque d'inhibiteurs potentiels de la signalisation HGF/SF-MET.

⁶⁸ Bock VD, Speijer D, Hiemstra H, van Maarseveen JH. 1,2,3-triazoles as peptide bond isosteres: synthesis and biological evaluation of cyclotetrapeptide mimics. *Org. Biomol. Chem.* **2007**. 5, 971-975

⁶⁹ Muir TW, Williams MJ, Ginsberg MH, Kent SBH. Design and chemical synthesis of a neoprotein structural model for the cytoplasmic domain of a multisubunit cell-surface receptor: integrin α IIb β 3 (Platelet GPIIb-IIIa). *Biochem.* **1994**. 33, 7701-7708

⁷⁰ Futaki S, Ishikawa T, Niwa M, Kitagawa K, Yagami T. Embodying a stable α -helical protein structure through efficient chemical ligation via thioether formation. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**. 5, 1883-1891

3.2.2°) La ligation thioester

Cette ligation permet la formation d'un lien thioester suite à la réaction entre un peptide thioacide et un bromoacétyl-peptide (Figure 20). Elle se déroule dans un tampon aqueux à un pH compris entre 3 et 7.

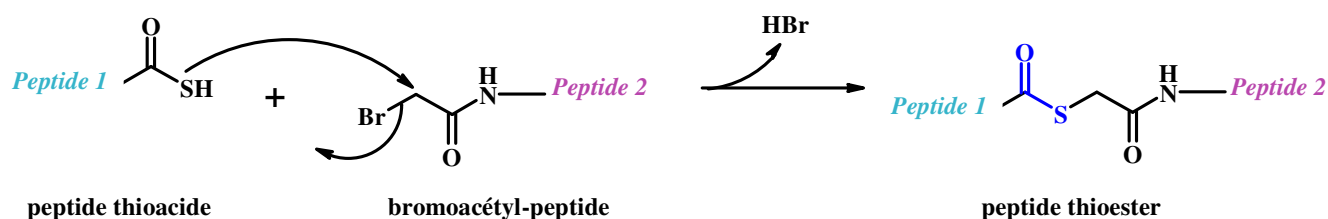


Figure 20 : Ligation thioester

Grâce à la mise au point de cette réaction, Williams et coll ont effectué la synthèse d'un domaine de 94 résidus d'une protéine appartenant à la famille des fibronectines, maillon clé de l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire ce qui constitue un facteur de limitation de la prolifération tumorale⁷¹. Ces auteurs ont montré que le repliement de la protéine synthétique était alors comparable à celui de la protéine native produite de façon recombinante.

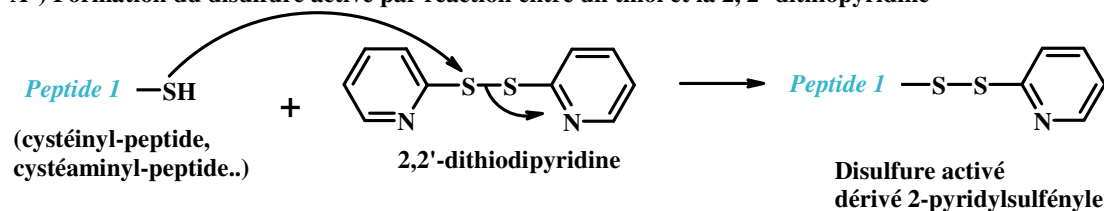
3.2.3°) La ligation disulfure

La ligation disulfure nécessite, dans un premier temps, la synthèse d'un fragment disulfure activé. Nous présenterons deux méthodes de préparation de cet intermédiaire sélectionnées parmi celles qui ont été décrites à ce jour. L'une de ces méthodes consiste à activer la fonction thiol d'un peptide par réaction avec la 2,2'-dithiopyridine : on obtient alors un dérivé 2-pyridylsulfényle. Il est également possible d'introduire, lors de la SPPS, un disulfure activé dans un peptide par le biais de dérivés de la cystéine, comme par exemple la Boc 3-nitro-2-pyridinesulfényle-cystéine encore appelée cystéine(NPYS)⁷² (Figure 21).

⁷¹ Williams MJ, Muir TW, Ginsberg MH, Kent SBH. Total chemical synthesis of a folded β -sandwich protein domain: an analog of the tenth fibronectin type 3 module. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**. 116, 10797-10798

⁷² Baleux F, Buboï P. Novel version of multiple antigenic peptide allowing incorporation on a cysteine functionalized lysine tree. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1997**. 40, 7-12

A°) Formation du disulfure activé par réaction entre un thiol et la 2, 2'-dithiopyridine



B°) Formation du disulfure activé par incorporation de la Cys(NPYS)

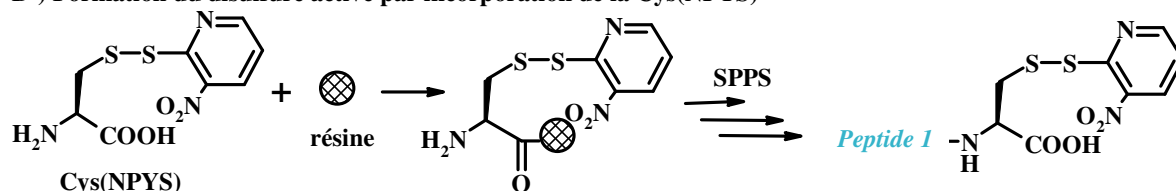


Figure 21 : Formation du disulfure activé :

A°) par réaction d'un cystéinyl-peptide avec la 2,2'-dithiopyridine

B°) par incorporation de la Cys(NPYS) lors de la SPPS

Le disulfure activé réagit, dans un second temps, avec le thiol de la cystéine d'un second fragment peptidique. Cet échange de thiol conduit au produit de ligation (Figure 22).

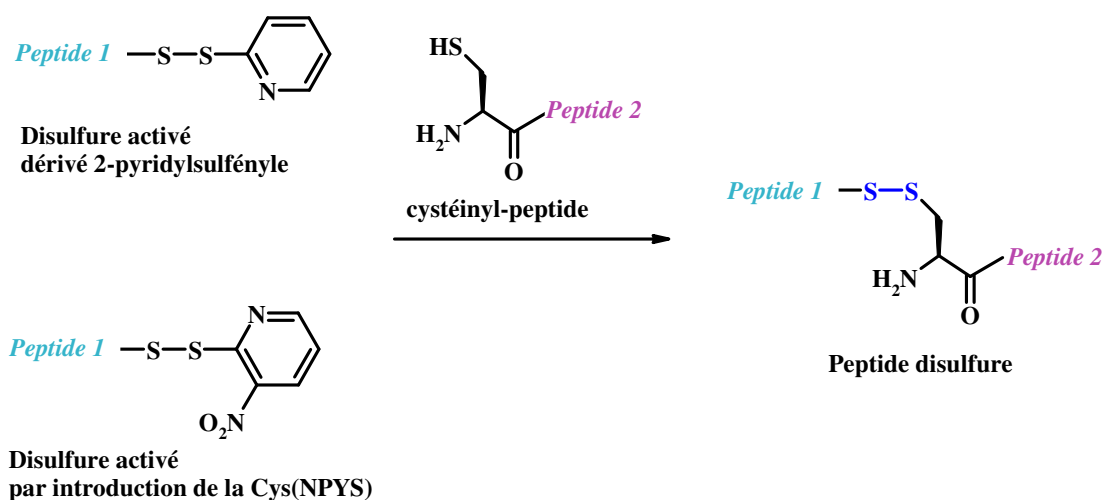


Figure 22 : Ligation disulfure

La méthode de ligation faisant intervenir le dérivé 2-pyridylsulfényle a été utilisée lors de la synthèse d'un analogue de la protéase du VIH-1⁷³. Cette protéine de 200 acides aminés a été assemblée séquentiellement grâce aux ligations thioester et disulfure. L'enzyme a

⁷³ Baca M, Muir TW, Schnölzer M, Kent SBH. Chemical ligation of cysteine-containing peptides: synthesis of a 22 kDa tethered dimer of HIV-1 protease. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**. 117, 1881-1887

conservé l'activité de la protéine native malgré la présence de deux liens non natifs dans sa structure.

3.2.4°) La ligation thiazolidine

La ligation thiazolidine a été développée par Liu et coll⁷⁴ et elle permet la condensation d'un aldéhyde, en général un α -oxo aldéhyde, avec un cystéinyl-peptide (Figure 23).

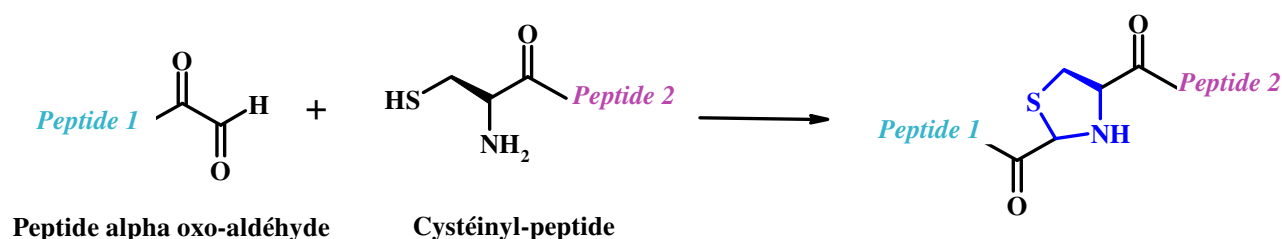


Figure 23 : Ligation thiazolidine

Cette ligation peut s'effectuer à une large gamme de pH comprise entre 1 et 8 aussi bien en milieu aqueux qu'organique. Elle est relativement délicate à mettre en œuvre dans la mesure où l'oxydation du cystéinyl-peptide et l'instabilité du peptide aldéhyde peuvent parfois être à l'origine d'une baisse de rendement.

Cette stratégie de ligation a été utilisée pour la conception et la synthèse de dendrimères. Par exemple, trois cystéinyl-peptides mimes de différents domaines de la protéine de fusion gp41 du VIH ont été greffés à une structure de type dendrimère fonctionnalisé par trois fonctions α -oxo aldéhyde⁷⁵ (Figure 24).

⁷⁴ Liu CF, Rao C, Tam JP. Orthogonal ligation of unprotected segments through pseudoproline formation for the synthesis of HIV-1 protease analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**. 118, 307-312

⁷⁵ Tam JP, Yu Q. A facile ligation approach to prepare three-helix bundles of HIV fusion-state protein mimetics. *Org. Lett.* **2002**. 4, 4167-4170

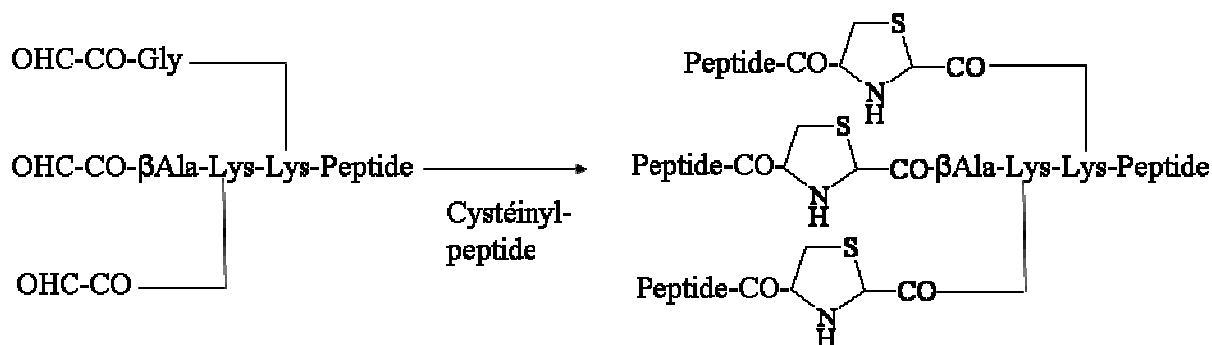


Figure 24 : Application de la ligation thiazolidine à la synthèse de dendrimère

3.2.5°) Les ligations « pseudoproline »

Il existe deux types de ligations aboutissant à la formation de pseudoprolines⁷⁶ : la ligation thiapseudoproline et la ligation oxapseudoproline^{77,78} (Figure 25).

La réaction a lieu entre un peptide glycol aldéhyde et :

- * un cystéinyl-peptide pour aboutir à la formation d'une thiapseudoproline ;
- * un résidu sérine ou thréonine pour obtenir une oxapseudoproline.

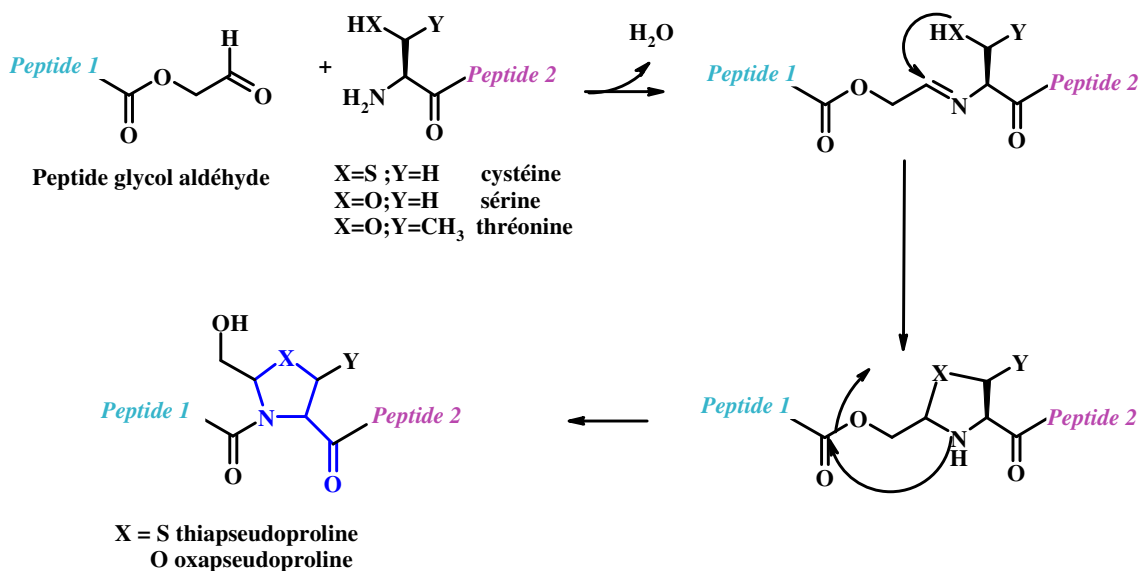


Figure 25 : Ligations « pseudoproline »

⁷⁶ Liu CF, Tam JP. Peptide segment ligation strategy without the use of protecting groups. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1994**. 91, 6584-6588

⁷⁷ Tam JP, Miao Z. Stereospecific pseudoproline ligation of N-terminal serine, threonine, or cysteine-containing unprotected peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**. 121, 9013-9022

⁷⁸ Liu CF, Rao C, Tam JP. Orthogonal ligation of unprotected segments through pseudoproline formation for the synthesis of HIV-1 protease analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**. 118, 307-312

La ligation thiapseudoproline s'effectue de préférence en milieu aqueux à un pH compris entre 4 et 6. L'utilisation d'un mélange pyridine/acide acétique pour la ligation oxapseudoproline permet d'obtenir des rendements satisfaisants, de limiter la formation de produits secondaires et de solubiliser les fragments peptidiques.

Ces méthodes de ligations non natives présentent un intérêt certain quand le lien peptidique n'est pas indispensable à l'activité de la protéine. La mise au point de nouvelles réactions de ligation est toujours d'actualité, pour enrichir les possibilités de synthèse de macromolécules, mais également pour faire varier la nature du lien chimique liant les fragments peptidiques entre eux.

Nous avons vu à diverses reprises que le lien non natif ne gêne pas le repliement et/ou l'activité biologique de la protéine modifiée. D'autres travaux, effectués au sein du laboratoire par Bonnet et coll au début des années 2000⁷⁹, ont montré l'importance de la nature chimique du lien entre les deux éléments sur l'activité et/ou la toxicité des produits de ligation. Dans ces travaux, des lipopeptides ont été préparés selon différentes méthodes de ligation que nous avons précédemment évoquées : thioéther, hydrazone, disulfure et thiazolidine. Seules les structures comportant le lien thiazolidine ont présenté une cytotoxicité faible et une bonne activité biologique, alors que les autres se sont révélées soit inactives soit cytotoxiques. Les tests d'activité cellulaire ont ainsi prouvé, qu'en fonction de la chimie de ligation mise en œuvre, l'activité et/ou la toxicité du conjugué étaient différentes, ce qui amène à penser qu'il est indispensable de disposer de différentes chimies de ligation lorsque l'on souhaite préparer des peptides dans un but thérapeutique.

Dans ce contexte, nous avons choisi de développer une nouvelle ligation complémentaire de celles décrites à ce jour, appelée la ligation thiocarbamate. Celle-ci met en jeu un cystéinyl-peptide et un peptide phénylthiocarbamate dont la préparation a également été mise au point à l'occasion de ce projet. Par la suite, nous avons appliqué cette ligation, qui s'est révélée d'une grande efficacité, à la préparation de conjugués capables de lier le domaine extracellulaire du récepteur MET.

⁷⁹ Bonnet D, Thiam K, Loing E, Melnyk O, Gras-Masse H. Synthesis by chemoselective ligation and biological evaluation of novel cell-permeable PKC- ζ pseudosubstrate lipopeptides. *J. Med. Chem.* **2001**. 44, 468-471

B°) Ligation thiocarbamate

1°) Hypothèses de travail

Afin de mettre au point cette nouvelle méthode de ligation, la réactivité entre les peptides éthyl- et phénylthiocarbamate et un cystéinyl-peptide a été étudiée. Le groupement thiol du résidu cystéine peut réagir avec le carbonyle du thiocarbamate pour former un intermédiaire thiocarbamate. Une question importante était alors d'explorer la stabilité de l'intermédiaire thiocarbamate, et en particulier sa capacité à subir ou non un réarrangement en lien urée dans différentes conditions expérimentales. Ce réarrangement, s'il a lieu, est comparable à celui qui se produit lors de la NCL⁸⁰ (Figure 26).

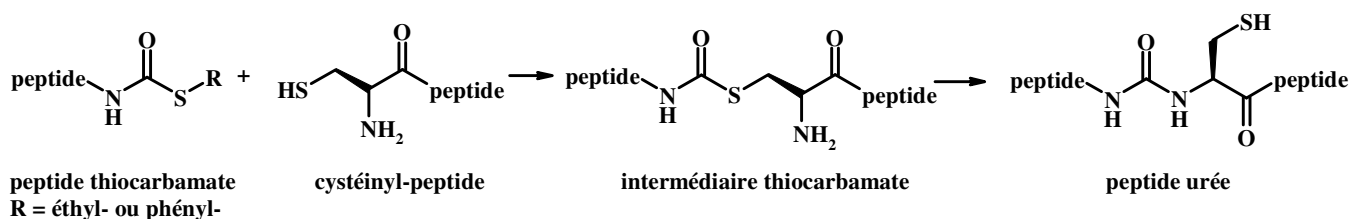


Figure 26 : Hypothèses de travail de la ligation thiocarbamate

2°) Synthèse de peptides éthyl- et phénylthiocarbamate

La première partie de ce travail a consisté à mettre au point la synthèse des peptides thiocarbamates en utilisant des réactifs commerciaux, l'éthylthiochloroformate ou le phénylthiochloroformate, et les techniques classiques de synthèse peptidique en stratégie Fmoc/*t*-butyle. Nous avons ensuite étudié leur réactivité vis-à-vis de cystéinyl-peptides.

Les peptides éthyl- et phénylthiocarbamate ont été préparés intégralement sur support solide (Figure 27).

⁸⁰ Besret S, Ollivier N, Blanpain A, Melnyk O. Thiocarbamate-linked peptides by chemoselective peptide ligation. *J. Pept. Sci.* **2008**. 14, 1244-1250

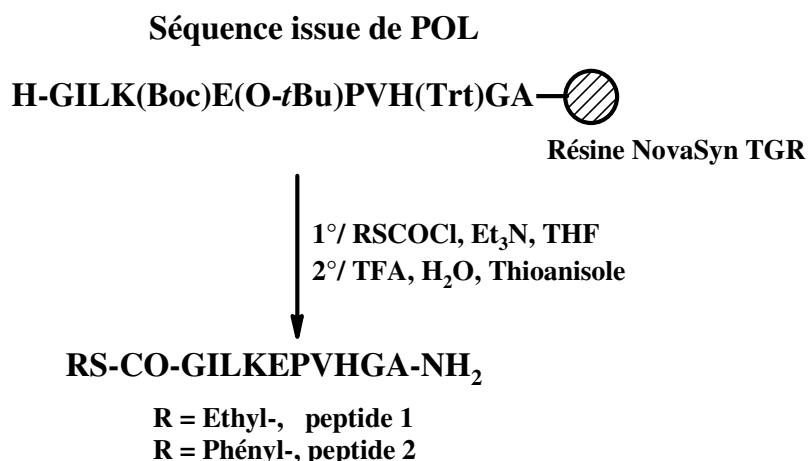


Figure 27 : Synthèse des peptides thiocarbamate 1 et 2

La séquence POL, issue de la séquence de la polymérase de HIV-1, a été choisie dans la mesure où elle comportait des résidus nucléophiles comme la lysine et l’histidine et constituait donc un bon modèle pour évaluer la chimiosélectivité de notre stratégie de synthèse. Le peptide POL ne pose généralement aucun problème d’élargissement ou de solubilité.

La synthèse du peptide s’est effectuée selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle à l’aide d’une résine NovaSyn TGR[®]. L’incorporation des groupements éthyl- ou phénylthiocarbonyle a été effectuée grâce à deux réactifs commerciaux, qui sont respectivement l’éthyl- ou le phénylthiochloroformate. Ces derniers réagissent avec l’amine α du peptide en présence de THF et de triéthylamine préalablement distillés⁸¹. La déprotection des chaînes latérales du peptide et sa séparation du support solide permettent d’accéder aux peptides thiocarbamate 1 et 2 respectivement. Après purification par RP-HPLC préparative, nous avons obtenu un rendement de 45% pour le peptide 1 et de 55% pour le peptide 2.

L’identité de ces peptides a été confirmée par des analyses MALDI-TOF. Leur pureté, contrôlée grâce à des analyses par RP-HPLC et par électrophorèse capillaire, s’est avérée, pour les deux peptides et les deux techniques d’analyse, supérieure à 98%. Les peptides 1 et 2 se sont révélés stables lors de leur purification et leur stockage à -20°C.

⁸¹ Eden JM, Higginbottom M, Hill DR, Horwell DC, Hunter JC, Martin K, Pritchard MC, Rahman SS, Richardson RS, Roberts E. Rationally designed “dipeptoid” analogues of cholecystokinin (CCK): N-terminal structure-affinity relationships of α-methyl-tryptophan derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **1993**. 28, 37-45

3°) Ligation thiocarbamate

La synthèse du peptide modèle **3** a été réalisée de manière classique par SPPS automatisée à l'aide d'une résine Novasyn TGR[®]. Sa séquence, également issue de la protéine POL de HIV-1 est : H-CILKEPVHGV-NH₂.

Dans une première approche, les peptides **1** et **3** ont été mis en réaction dans des conditions expérimentales proches de celles de la NCL. La ligation a été effectuée dans un tampon phosphate de sodium à 100 mM et à un pH proche de 7,5 et en présence d'un thiol (ici, le thiophénol) sous argon (Figure 28). Lors des essais préliminaires, le cystéinyl-peptide **3** se trouvait à la concentration finale de 2 mM et les deux peptides de départ ont été ajoutés en quantité équimolaire. L'évolution de la composition du milieu réactionnel en fonction du temps a été suivie par RP-HPLC analytique et par des analyses MALDI-TOF.

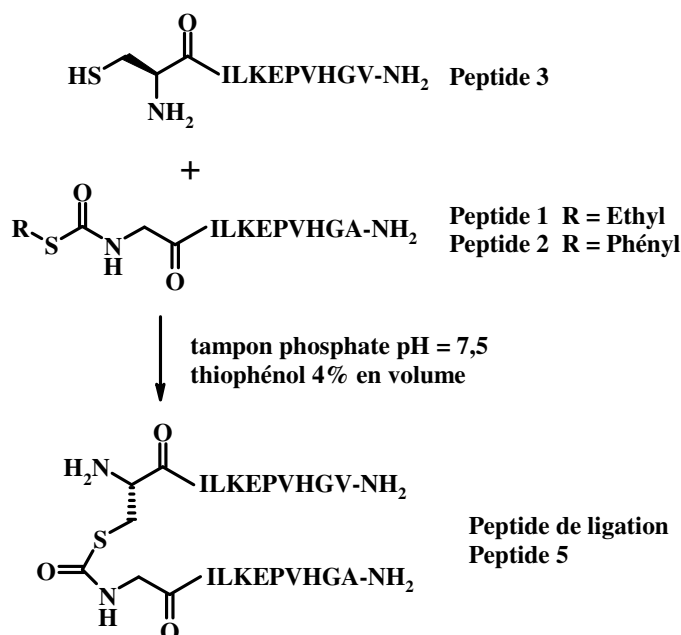


Figure 28 : Ligations entre le cystéinyl-peptide 3 et les peptides éthylthiocarbamate 1 et phénylthiocarbamate 2

3.1°) Ligation entre le cystéinyl-peptide 3 et le peptide éthylthiocarbamate 1

Nous avons tout d'abord mis en contact le peptide **3** avec le peptide éthylthiocarbamate **1**. L'analyse du milieu réactionnel par RP-HPLC et par MALDI-TOF a

montré une absence totale de réaction de transthioestérification. Nous avons constaté que le peptide 1 restait intact au cours du temps, alors que le peptide 4, produit de l'oxydation du peptide 3, se formait progressivement (Figure 29).

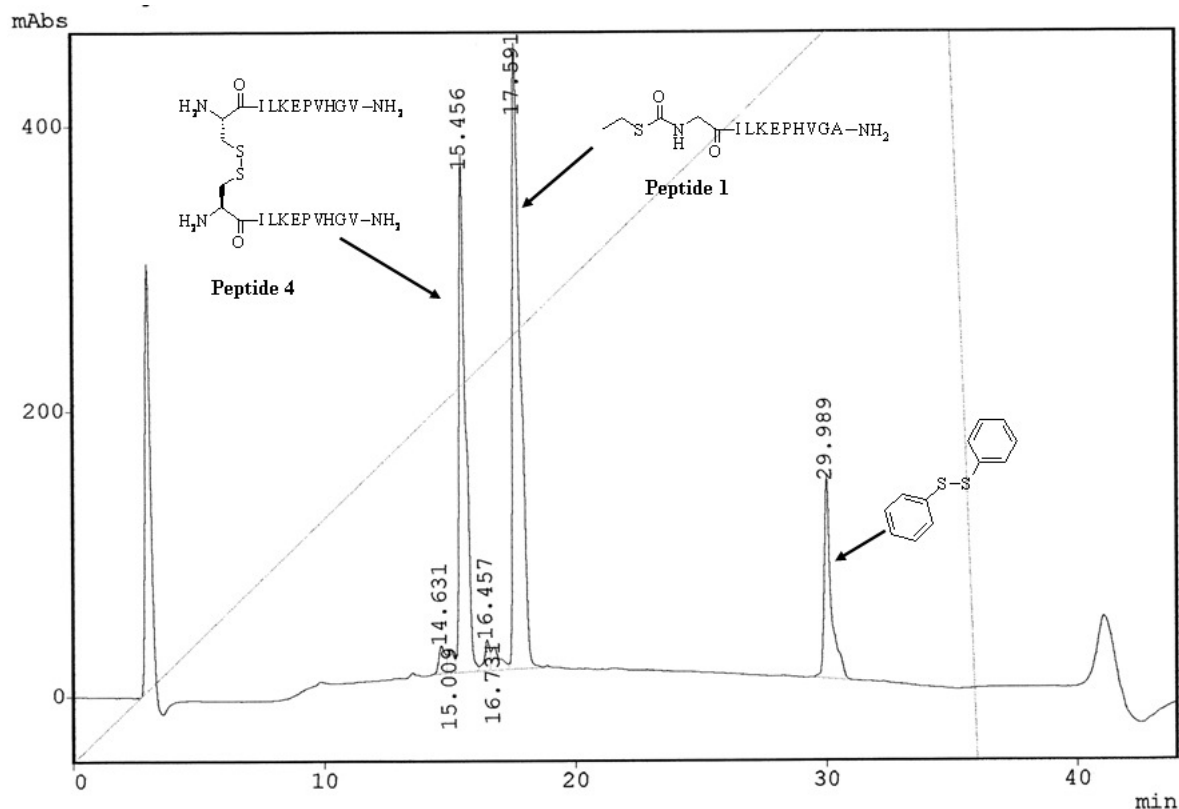


Figure 29 : Chromatogramme RP-HPLC de la ligature thiocarbamate entre le cystéinyl-peptide 3 et le peptide éthylthiocarbamate 1 ($t = 24h$) (0-100% B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil, 215 nm)

Nous avons alors émis l'hypothèse que le groupe éthylsulfényle ne permettait pas d'activer suffisamment le groupement thiocarbamate pour que la réaction de transthioestérification puisse avoir lieu, contrairement à ce qui se produit avec les thioesters d'alkyle dans la NCL. La bonne stabilité du lien alkylthiocarbamate observée dans cette expérience suggérait également l'intérêt de ce lien pour la préparation de conjugués.

Nous avons donc abandonné l'étude du dérivé éthylthiocarbamate 1 et exploré la réactivité du dérivé phénylthiocarbamate 2.

3.2°) Ligation entre le cystéinyl-peptide **3** et le peptide phénylthiocarbamate **2**

A la différence du peptide éthylthiocarbamate **1**, la ligation entre les peptides **2** et **3** a abouti à la formation du peptide **5**, en accord avec la plus grande réactivité des dérivés phénylthiocarbonyles par rapport aux dérivés alkylthiocarbonyles vis-à-vis des réactions de transthioestérification⁸².

Dans un premier temps, la concentration du peptide **3** a été fixée, comme précédemment, à 2mM. La réaction entre les peptides **2** et **3** a alors abouti à la formation de trois produits dont le produit de ligation (Figure 30).

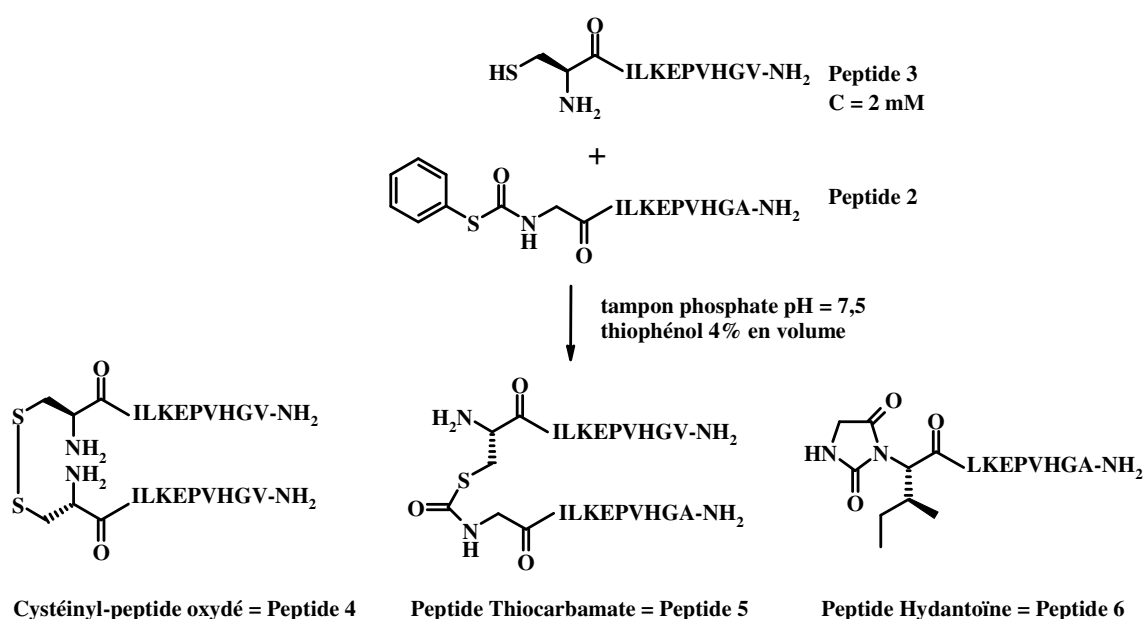


Figure 30 : Ligation thiocarbamate : produits observés lors du premier essai de ligation entre le peptide phénylthiocarbamate **2 et le cystéinyl-peptide **3** (2 mM)**

Un suivi par RP-HPLC et MALDI-TOF du milieu réactionnel en fonction du temps à permis de déterminer la proportion de chacun d'entre eux (chromatogramme RP-HPLC non représenté) :

- * le produit de ligation, le peptide thiocarbamate **5** (31%) ;
- * le peptide hydantoïne **6** (31%), produit d'une cyclisation intramoléculaire du peptide phénylthiocarbamate **2** ;

⁸² Hupe DJ, Jencks WP. Nonlinear structure-reactivity correlations. Acyl transfer between sulphur and oxygen nucleophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**. 99, 451-464.

* le peptide **4**, dont la formation n'a pu être évitée malgré les précautions prises pour limiter l'entrée d'oxygène dans le mélange réactionnel. La quantité formée est relativement importante car elle constitue le dernier tiers observé par RP-HPLC (28%).

Pour diminuer la formation de ces produits secondaires, la concentration du peptide **3** a été augmentée à 10 mM. En concentrant le milieu réactionnel, nous espérons favoriser la formation du produit de ligation **5**, formé par un processus intermoléculaire, relativement au peptide hydantoïne **6**, formé par cyclisation intramoléculaire. Nous avons observé dans ces conditions la formation du peptide **5** à hauteur de 37%, mais sans éviter celle des produits secondaires **4** (20%) et **6** (28%). Le chromatogramme RP-HPLC du milieu réactionnel au bout de 24 heures de réaction est présenté Figure 31.

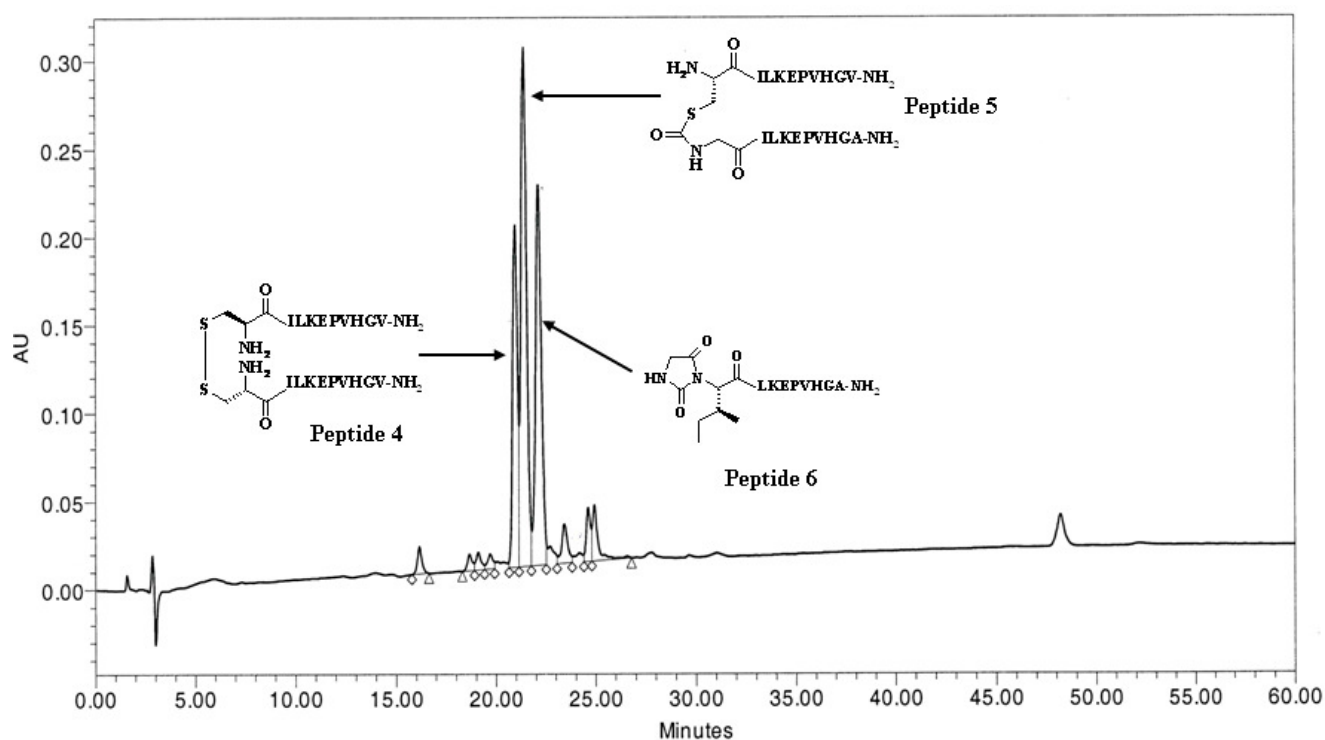


Figure 31 : Chromatogramme RP-HPLC du milieu réactionnel de la ligation thiocarbamate entre le peptide phénylthiocarbamate 2 et le cystéinyl-peptide 3 (10 mM)

(t = 24h)

(0-100% B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil, 215 nm)

Ces résultats préliminaires nous ont semblés très encourageants et nous ont ensuite conduits à effectuer la réaction à une concentration de 50 mM en cystéinyl-peptide **3** dans un

tampon deux fois plus concentré (200 mM) et à une échelle plus importante (10 mg du peptide **3**). Au bout de 24 heures de réaction, nous avons observé, grâce à une analyse par RP-HPLC, qu'il se forme 88% de produit de ligation **5**, très peu de dimérisation du cystéinyl-peptide **3** et seulement 3% de peptide **6** (Figure 32).

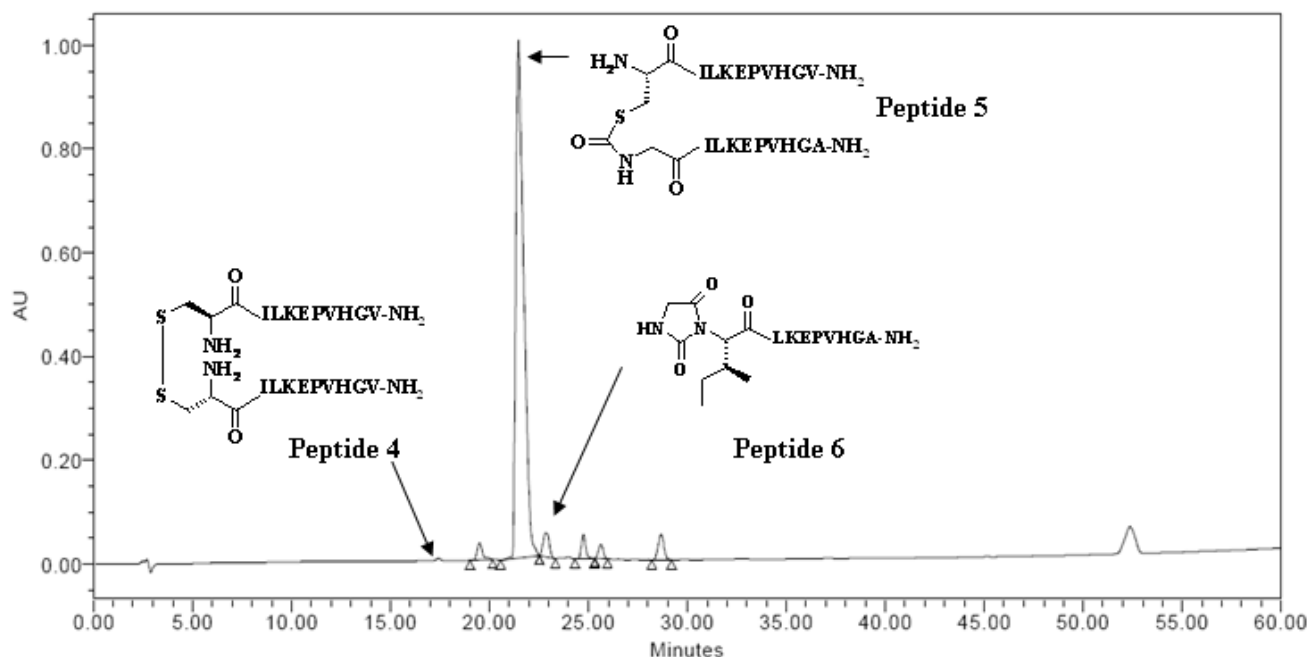


Figure 32 : Chromatogramme RP-HPLC du milieu réactionnel de la ligation thiocarbamate entre le peptide phénylthiocarbamate **2 et le cystéinyl-peptide **3** (50 mM) ($t = 24h$) (0-100% B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil, 215 nm)**

Dans ces conditions expérimentales, le peptide **5** a finalement été isolé par RP-HPLC préparative avec un rendement de 66% et une pureté de 94%.

Afin de confirmer le mécanisme de la réaction, une expérience contrôle a été également menée entre un séryl-peptide **7**, analogue du peptide **3**, et le peptide phénylthiocarbamate **2**. La concentration du peptide **7** a été fixée à 50 mM pour se placer dans les conditions optimales de la ligation thiocarbamate (Figure 33).

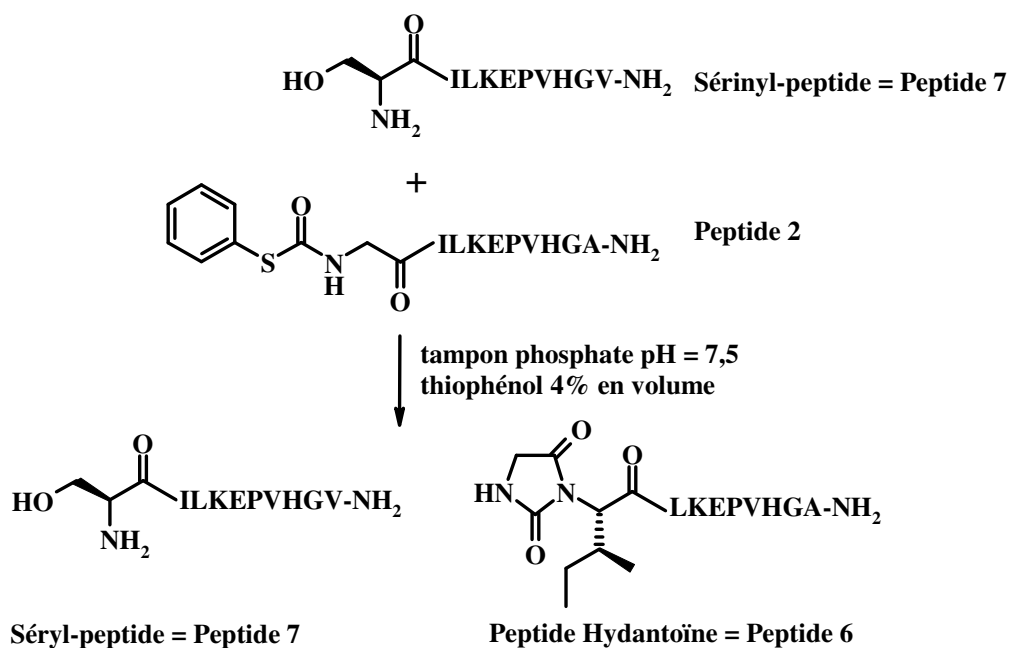


Figure 33 : Ligation thiocarbamate : produits observés lors de l'essai de ligation entre le sérinyl-peptide 7 (50 mM) et le peptide phénylthiocarbamate 2

Un suivi du milieu réactionnel par RP-HPLC et par MALDI-TOF a montré que, dans ces conditions, le sérinyl-peptide 7 reste intact alors que le peptide phénylthiocarbamate 2 s'hydrolyse et forme le peptide hydantoïne 6 (Figure 34).

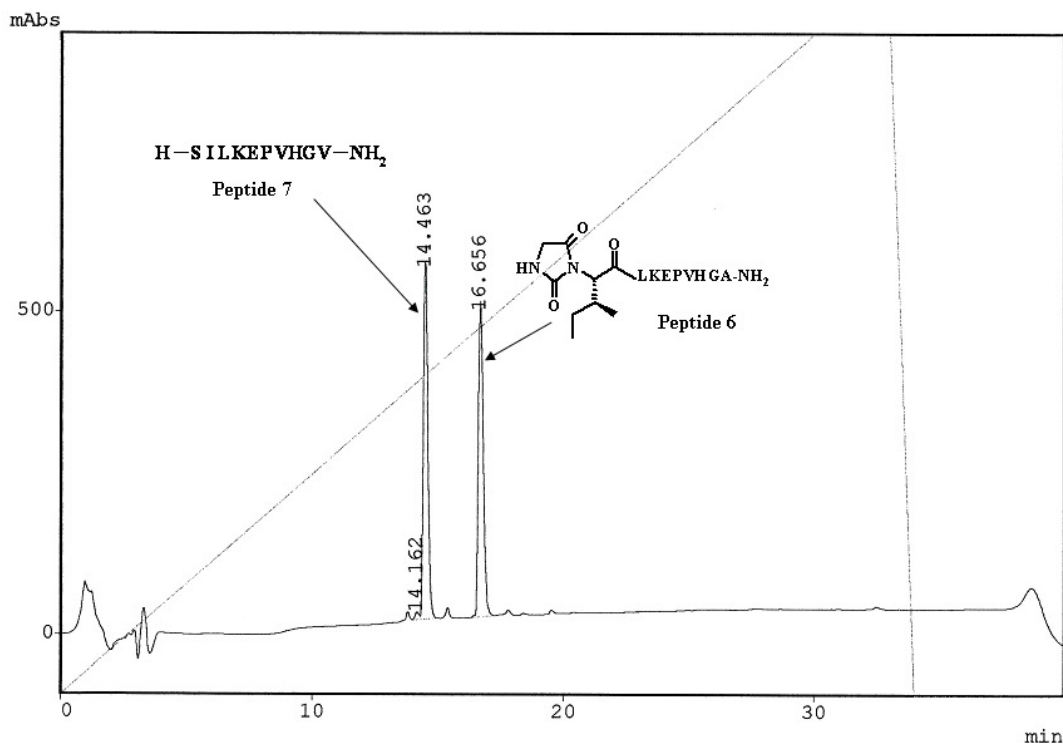


Figure 34 : Chromatogramme RP-HPLC du milieu réactionnel de la ligation thiocarbamate entre le peptide 7 (50 mM) et le peptide 2 (t=24h) (0-100% B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil, 215 nm)

Nous avons conclu de cette expérience que le mécanisme de la réaction fait intervenir un cystéinyl-peptide, qui est absolument indispensable pour que la ligation thiocarbamate puisse avoir lieu.

3.3°) Analyses complémentaires

Les figures précédentes montrent la formation d'un produit de transthioestérification entre les peptides 2 et 3. Pour arriver à cette conclusion, c'est-à-dire à l'absence de réarrangement en lien urée, et confirmer la stabilité et la structure du peptide 5, différentes expériences ont été réalisées.

3.3.1°) Essai de dimérisation du peptide 5

Tout d'abord, le réarrangement du peptide 5 et la formation d'un lien urée devrait conduire à l'exposition d'un thiol libre. Ce groupement thiol devrait pouvoir former un pont disulfure par oxydation en milieu basique (Figure 35).

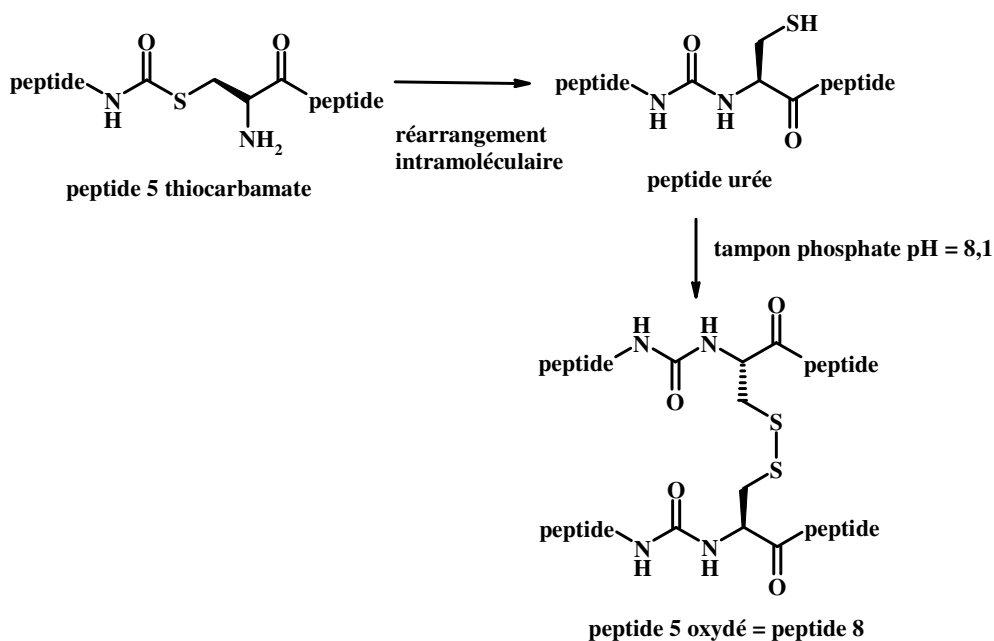


Figure 35 : Structures chimiques hypothétiques du peptide 5 et de sa dimérisation en peptide 8 par oxydation

Le peptide 5 a donc été placé dans un tampon phosphate de sodium (200 mM, pH 8,1) à température ambiante et à l'air libre. La composition du milieu réactionnel a été analysée par LC-MS deux heures plus tard (Figure 36).

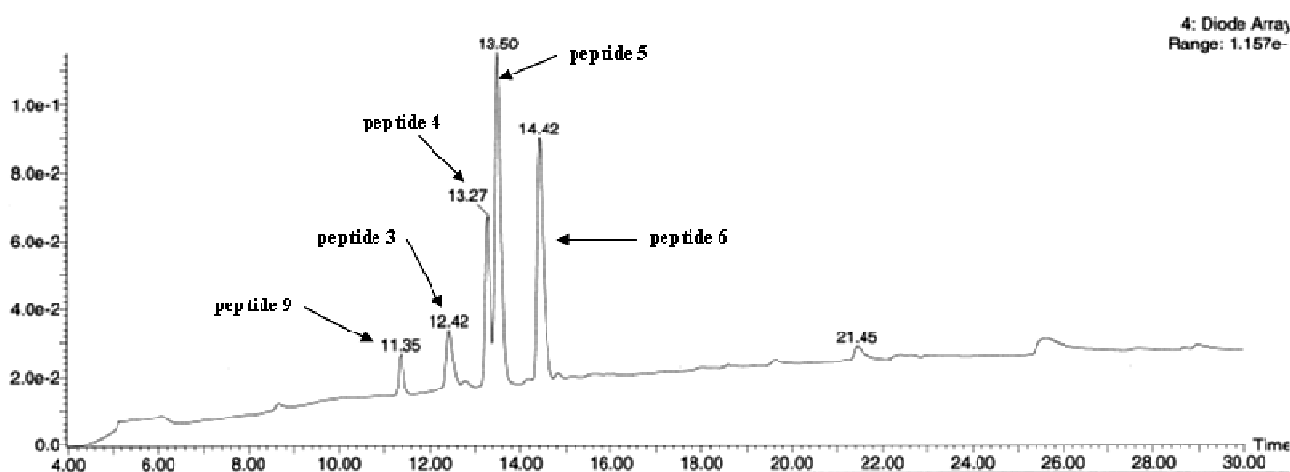


Figure 36 : Chromatogramme RP-HPLC du milieu réactionnel obtenu lors de l'essai de la dimérisation du peptide 5 (t = 2h) (0-100% B en 30 min, RT, C18 Nucléosil, 215 nm)

Nous n'avons pas constaté d'oxydation du peptide thiocarbamate **5** en peptide **8**. Cette expérience suggère plutôt que le lien thiocarbamate s'est hydrolysé et a libéré d'une part le peptide **3** qui s'est oxydé pour former le peptide **4** ainsi que le peptide **9**. Un autre mode de dégradation conduit à la formation de l'hydantoïne **6**. De plus, le traitement du milieu réactionnel par une phosphine hydrosoluble, la TCEP (chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine), a conduit à la disparition du peptide **4**, produit d'oxydation du peptide **3** (résultats non représentés). L'ensemble de ces structures peptidiques sont rappelées à la Figure 37.

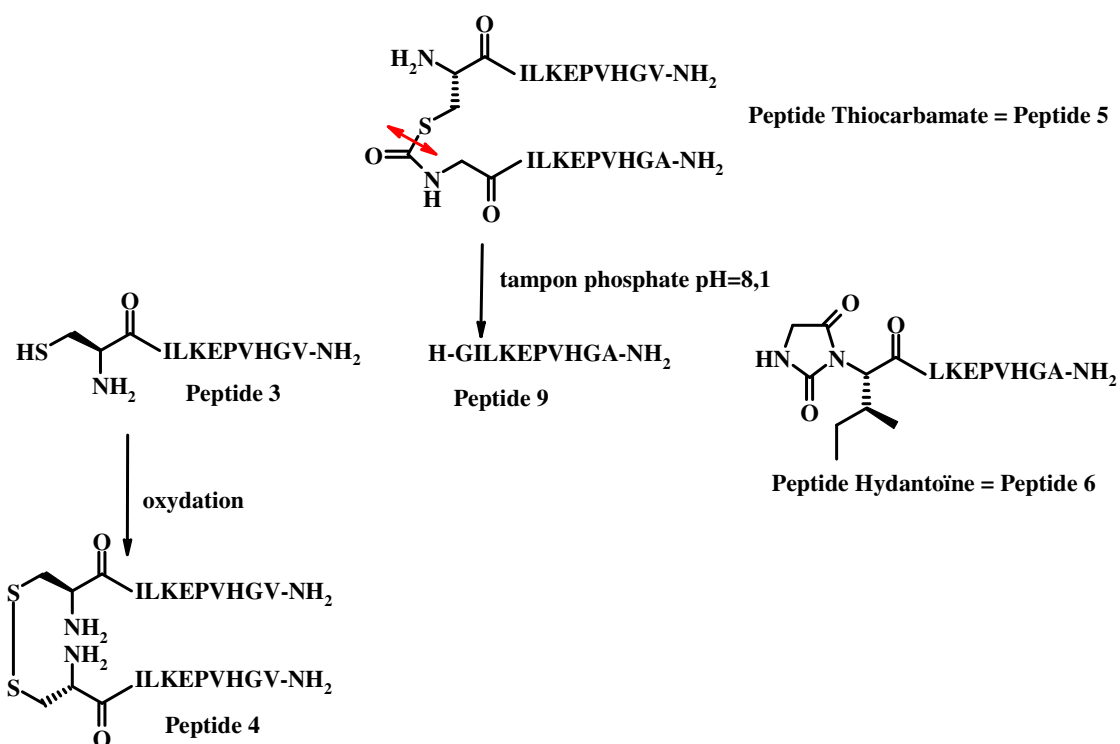


Figure 37 : Structures chimiques des peptides obtenus lors de l'essai de dimérisation du peptide 5

Ces résultats, qui montrent l'absence probable d'une fonction thiol sur le produit de ligation, sont donc en faveur de la structure thiocarbamate du peptide **5**.

3.3.2°) Essai de S-alkylation par l'iodoacétamide du peptide 5

Un autre moyen de mettre en évidence un thiol libre de cystéine est de l'alkyler grâce à l'iodoacétamide⁸³. Grâce à son efficacité, cette réaction a été fréquemment utilisée pour identifier les cystéines liées par pont disulfure dans les protéines, en mettant en œuvre une réduction partielle des ponts disulfure suivi d'une alkylation des thiols libres⁸⁴.

Le peptide 5 a donc été mis en réaction avec l'iodoacétamide dans un tampon bicarbonate de sodium (100 mM, pH 8,5). Le milieu réactionnel a été analysé par LC-MS afin d'observer si le peptide 10 se formait (Figure 38).

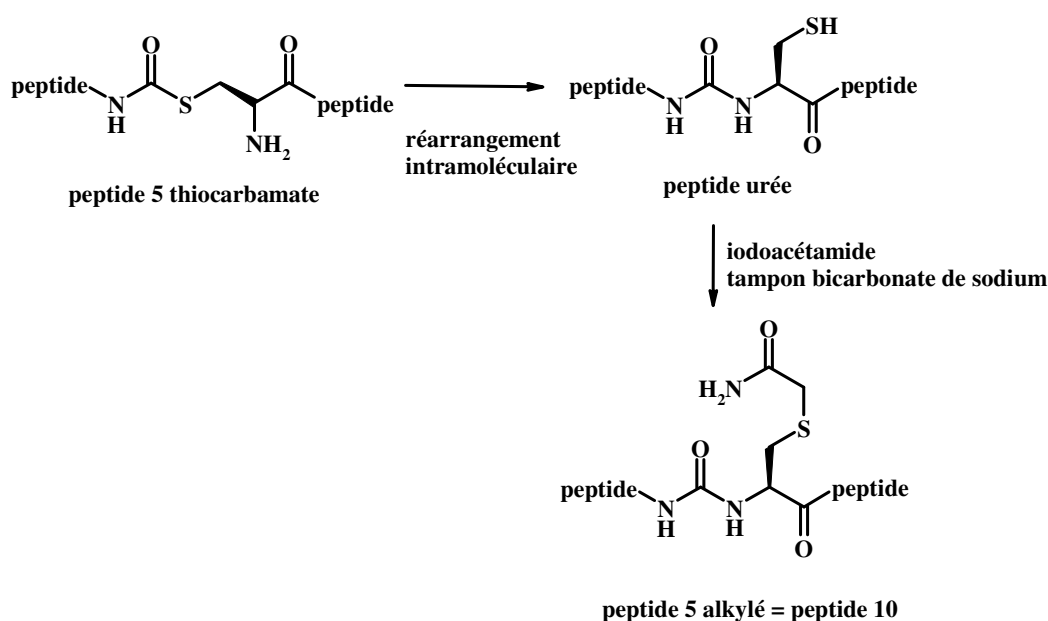


Figure 38 : Structures chimiques hypothétiques du peptide 5 et de son alkylation par l'iodoacétamide en peptide 10

Après trois heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel a été analysé par LC-MS (Figure 39).

⁸³ Smythe CV. The reaction of iodoacetate and of iodoacetamide with various sulfhydryl groups, with urease, and with yeast preparations. *J. Biol. Chem.* **1936**. 114. 601-612

⁸⁴ Sechi S, Chait BT. Modification of cysteine residues by protein alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal. Chem.* **1998**. 70, 5150-5158

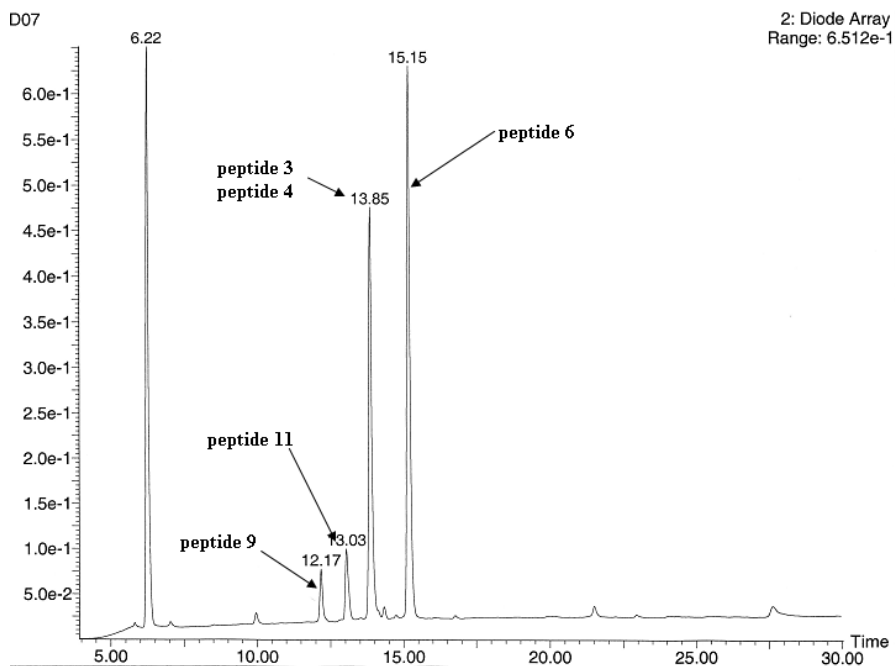


Figure 39 : Chromatogramme RP-HPLC du milieu réactionnel du peptide 5 en présence d'iodoacétamide ($t = 3h$) (0-100% B en 30 min, RT, C18 Nucléosil, 215 nm)

Nous avons observé la formation des peptides 3, 4, 6, 9 ainsi que la formation du peptide 11 résultant de l'alkylation du peptide 3 par l'iodoacétamide. Nous n'avons pas pu détecter la formation du peptide 10, issu de l'alkylation de l'urée 5 par l'iodoacétamide. Ces données sont encore une fois en faveur de la structure 5 de type thiocarbamate. Les différentes structures de ces peptides sont regroupées à la Figure 40.

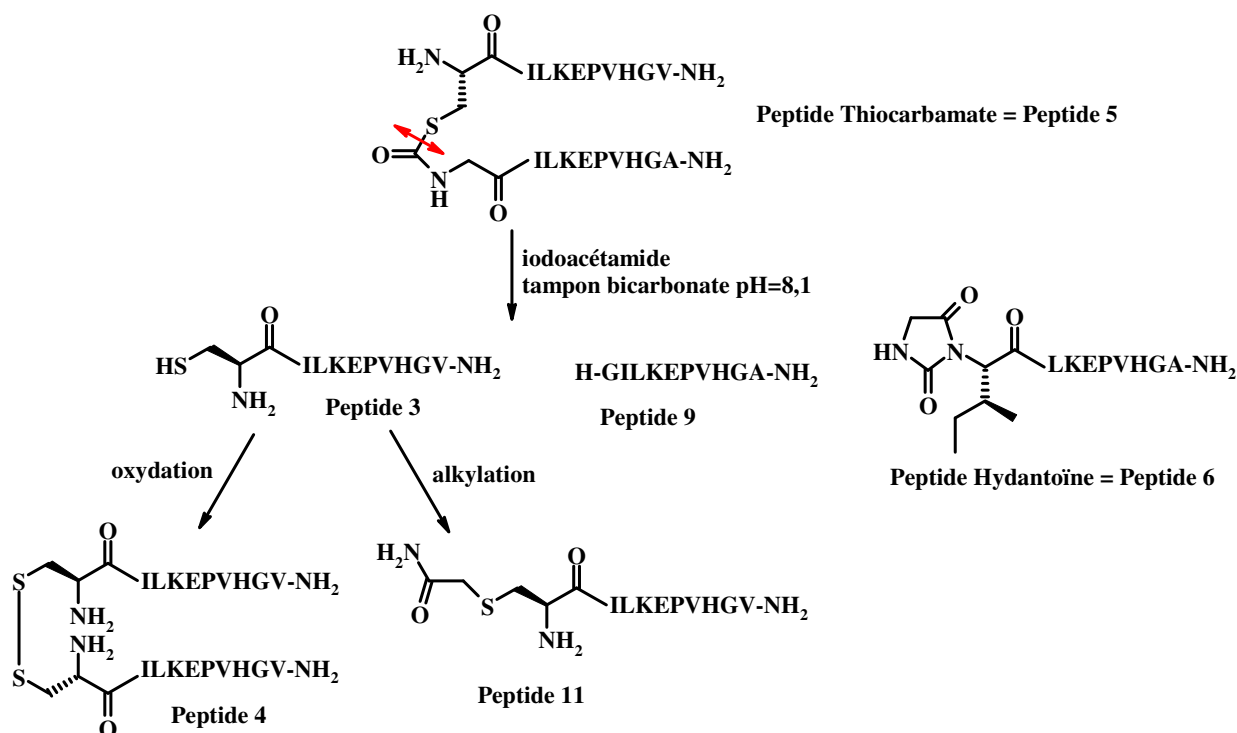


Figure 40 : Structures chimiques obtenues lors de l'essai de S-alkylation du peptide 5 par l'iodoacétamide

3.3.3°) Analyses RMN

A la suite de ces expériences, nous avons voulu confirmer la structure du peptide 5 par des analyses de RMN. Le poids moléculaire élevé du peptide 5 ayant considérablement compliqué cette analyse, deux tripeptides 12 et 13 ont été préparés selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle. En absence de purification par RP-HPLC préparative, les rendements des peptides 12 et 13 se sont avérés très satisfaisants (respectivement de 74% et de 77%) et ceci avec des taux de pureté assez élevés (globalement supérieurs à 93% aussi bien par RP-HPLC que par CZE). La ligation thiocarbamate a ensuite permis d'obtenir le peptide 14 avec un rendement de 71% après purification et une pureté supérieure à 98% quel que soit le moyen d'analyse (Figure 41).

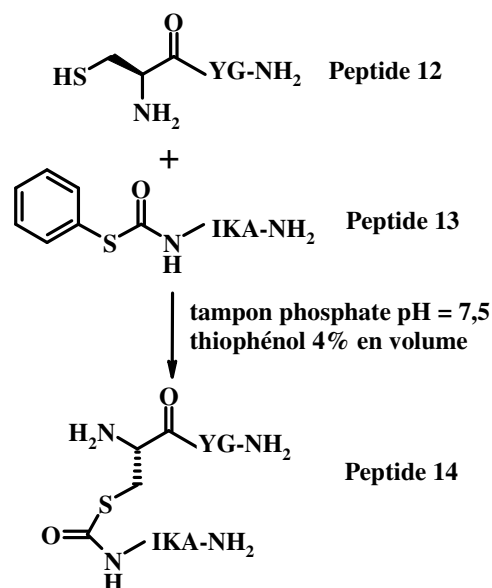


Figure 41 : Ligation thiocarbamate entre les tripeptides 12 et 13

Le peptide **14** a été analysé par RMN ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, HSQC, HMBC et une attention particulière a été portée au lien entre la cystéine et l'isoleucine (Figure 42).

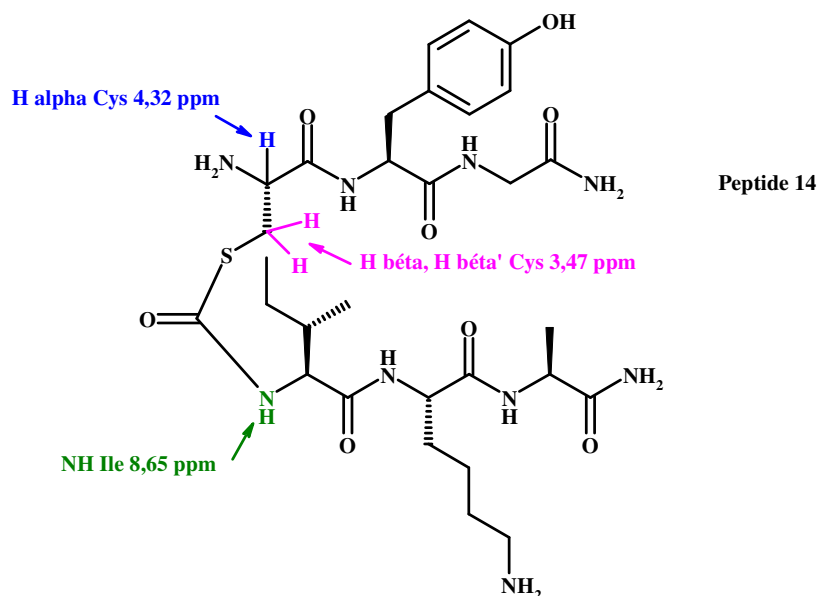


Figure 42 : Formule chimique développée du peptide 14

Le proton amide de l'Ile apparaît sous la forme d'un doublet à 8,65 ppm. Les protons du groupement amine de la Cys sont échangés rapidement comme attendu dans le peptide **14**. Les protons α et β de la Cys du peptide **12** ont un déplacement chimique de 4,41 ppm et 3,18-

3,27 ppm, alors que ceux du peptide **14** sont situés à 4,32 ppm (triplet) et 3,47 ppm (multiplet). Ce décalage vers les champs faibles entre les protons β des cystéines est en faveur de la structure thiocarbamate **14**, puisque, dans ce cas, les protons β subissent l'effet électroattracteur du carbonyle porté par l'atome de soufre. Surtout, ces spectres ne correspondent pas à celui d'une urée, pour laquelle deux protons NH liés au même groupement carbonyle sont attendus.

Cette analyse par RMN confirme l'étude de réactivité décrite précédemment. Clairement, la ligation entre un cystéinyl-peptide et un peptide phénylthiocarbamate aboutit à la formation d'un lien thiocarbamate entre les deux peptides. Il n'y a pas ensuite de réarrangement en lien urée via un intermédiaire à 5 chaînons, contrairement à ce qui est observé dans le cas de la NCL.

La ligation thiocarbamate a été appliquée à différents cas de figure afin d'explorer son utilité et de définir éventuellement ses limites. Nous avons en particulier examiné la synthèse de cyclopeptides et de structures dendrimériques. C'est ce que nous allons exposer dans le prochain paragraphe.

3.4°) Ligation thiocarbamate : applications

3.4.1°) Synthèse d'un cyclopeptide

La cyclisation est une stratégie souvent employée pour améliorer les propriétés pharmacologiques de peptides bioactifs. Nous pouvons pour illustrer ces propos citer un analogue cyclique de la somatostatine, l'octréotide (Sandostatine[®]). C'est en effet un moyen de contraindre la conformation adoptée par la chaîne peptidique, et des effets spectaculaires sur la sélectivité et l'affinité peuvent être observés. Un autre cas bien connu est le cyclopeptide RGD développé par Kessler⁸⁵. Ce peptide constitue la séquence consensus de liaison aux intégrines, récepteurs membranaires intervenant dans les interactions entre les cellules ou entre les cellules et la matrice extracellulaire. Le motif RGD a été introduit au sein des séquences de penta- et hexapeptides cycliques par Gurrath et coll⁸⁶. L'affinité et la sélectivité de certains de ces peptides vis-à-vis de leur cible ont été ainsi augmentées par rapport aux peptides linéaires correspondants. La contrainte conformationnelle induite par la

⁸⁵ Kessler H. Conformation and Biological Activity of Cyclic Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**. 21, 512-523

⁸⁶ Gurrath M, Müller 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

cyclisation permet aussi parfois de rendre les cyclopeptides plus résistants vis-à-vis de la dégradation par les protéases⁸⁷.

Dans ce contexte, nous avons voulu évaluer l'utilité de la ligation thiocarbamate pour la synthèse de peptides cycliques. Nous avons donc fait réagir de façon intramoléculaire un groupement phénylthiocarbamate et la fonction thiol d'une cystéine. Pour ce faire, le peptide **15**, dont la séquence dérive de nouveau de la protéine POL, a été préparé par synthèse automatisée en phase solide. Il porte un groupement phénylthiocarbamate sur l'amine ε de la lysine et une cystéine protégée par un groupement S-(*t*-butylsulfényle) (Figure 43).

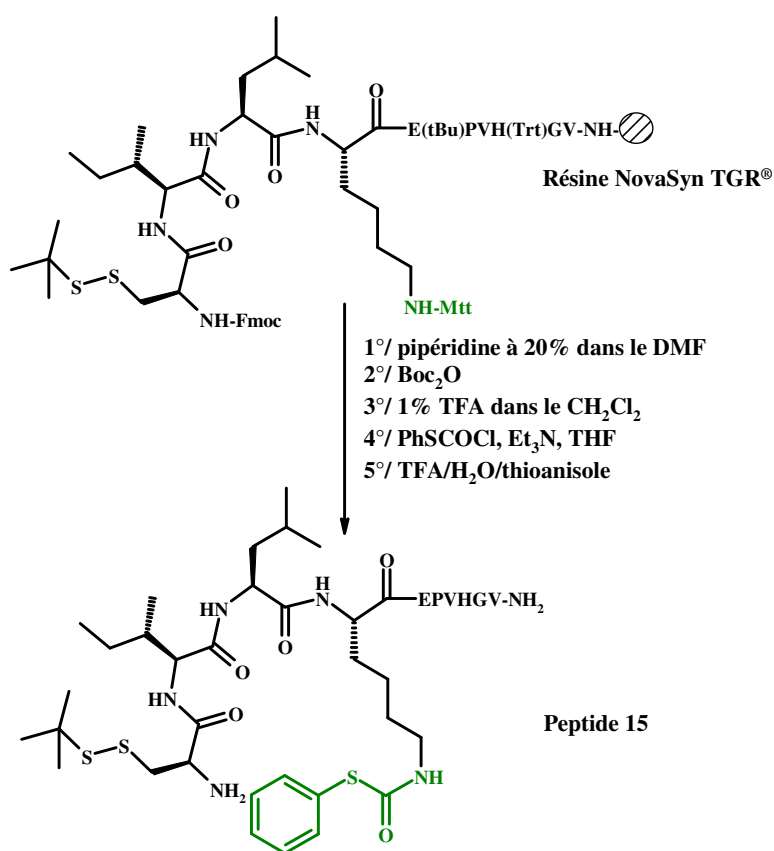


Figure 43 : Synthèse du peptide 15

Dans un premier temps, la séquence peptidique a été assemblée sur une résine NovaSyn TGR[®]. La lysine a été protégée au niveau de son amine ε par un groupement acido-labile, le 4-**méthyltrityl-** (Mtt), de façon à pouvoir effectuer une déprotection sélective sur le support solide et ainsi introduire le groupement phénylthiocarbonyl. La cystéine, quant à

⁸⁷ Veber DF, Freidinger RM. The design of metabolically-stable peptide analogs. *Trends in Neur.* **1985.** 8, 392-396

elle, a été introduite sous la forme S-(*t*-butylsulfényle). Ce groupement est stable dans les conditions de déprotection et de coupure du peptide en milieu acide. Nous avons souhaité produire un peptide phénylthiocarbamate protégé au niveau de la cystéine pour éviter une réaction de transthioestérification intra- ou intermoléculaire prématurée ainsi que l'oxydation partielle de la cystéine durant l'isolement du produit.

Après l'étape d'élongation du peptide, le groupement Fmoc, protecteur de l'amine α de la cystéine, a été remplacé par un groupement Boc. En effet, le groupement phénylthiocarbamate n'étant pas compatible avec un traitement à la pipéridine, l'amine α de la cystéine devait être protégée par un groupement labile en milieu acide, de préférence dans les conditions de déprotection et de coupure du peptide de la résine. Le protocole d'élimination sélective du Mtt, mis en place au laboratoire⁸⁸, a consisté en des courts lavages (deux minutes) de la peptidyl-résine par d'une solution de TFA à 1% dans le CH₂Cl₂. Le filtrat de chaque lavage, repris dans un mélange H₂O/THF/THF contenant du BHT (2,6-di-*t*-butyl-4-méthylphénol ou hydroxytoluène butylé), a été analysé par RP-HPLC à l'aide d'un gradient court (10 minutes) afin d'évaluer la quantité de Mtt-OH libérée à chaque lavage, relativement à une référence interne, le BHT. L'amine ϵ a ensuite été neutralisée par une solution de DIEA à 5% dans le CH₂Cl₂. La fonction phénylthiocarbonyle nécessaire à la ligation thiocarbamate a été introduite selon le protocole précédemment décrit. La déprotection des groupements protecteurs permanents et la séparation du peptide de son support a permis d'isoler le peptide **15** avec un rendement de 17% après purification par RP-HPLC préparative.

La cyclisation du peptide **15** en cyclopeptide **16** a été effectuée à une concentration en peptide de 0,1 mM afin de favoriser la réaction intramoléculaire. La réaction s'est également déroulée sous argon à température ambiante et dans un tampon phosphate de sodium (200 mM, pH 7,5). Le thiophénol a permis de déprotéger *in situ* la cystéine et de conserver le thiol sous forme réduite (Figure 44).

⁸⁸ Bourel L, Carion O, Gras-masse H, Melnyk O. The deprotection of Lys(Mtt) revisited. *J. Pept. Sci.* **2000**. 6. 264-270

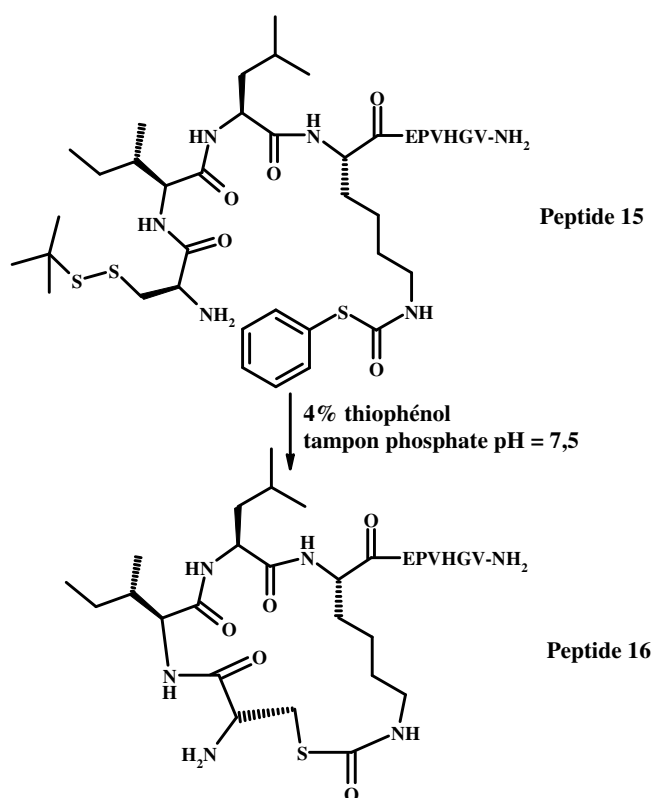


Figure 44 : Cyclisation du peptide 15 en peptide 16 par la ligation thiocarbamate

Ce dernier a été purifié et isolé avec un rendement de 66%. Sa pureté déterminée par RP-HPLC et électrophorèse capillaire est de 91% et 98% respectivement.

3.4.2°) Synthèse de MAPs

La méthode a ensuite été employée pour la synthèse de **M**ultiple **A**ntigenic **P**eptides (MAPs). Ce sont des dendrimères ramifiés de lysines qui présentent un nombre plus ou moins important de copies d'un peptide. Les MAPs sont entre autres utilisés pour générer des anticorps dirigés contre les peptides qui y sont greffés⁸⁹. Leurs applications sont nombreuses : produits de diagnostique, mimes de protéines, agents antiviraux et anticancéreux⁹⁰. Nomizu et coll ont montré que des formes multimériques d'un peptide inhibiteur de la croissance tumorale et de métastases conduisent à une potentialisation de ses effets *in vivo*⁹¹.

Les MAPs peuvent être synthétisés par les méthodes conventionnelles de la SPSS. Cependant, la masse moléculaire de ces structures augmente rapidement avec la valence du

⁸⁹ Posnett DN, McGrath H, Tam JP. A novel method for producing anti-peptide antibodies. *J. Biol. Chem.* **1988**. 263, 1719-1725

⁹⁰ Sadler K, Tam JP. Peptide dendrimers: applications and synthesis. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**. 90, 195-229

⁹¹ Nomizu M, Yamamura K, Kleinman HK, Yamada Y. Multimeric forms of Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) peptide enhance the inhibition of tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **1993**. 53, 3459-3461

dendrimère, si bien qu'il est rapidement difficile d'obtenir par SPPS des MAPs homogènes, même lorsque la taille du peptide présenté à la surface du dendrimère est modeste. En effet, un MAP octavalent présentant un décapeptide correspond en difficulté de synthèse à un peptide de 80 acides aminés.

C'est la raison pour laquelle les méthodes de ligation ont été appliquées très tôt à la synthèse de ces structures complexes. Selon cette stratégie, le dendrimère de lysines est assemblé par SPPS selon les stratégies classiques. Les amines α et ϵ des lysines exposées à la surface du dendrimère sont ensuite fonctionnalisées de façon adéquate. La liaison du peptide à la surface du MAPs se fait par ligation chimique (Figure 45).

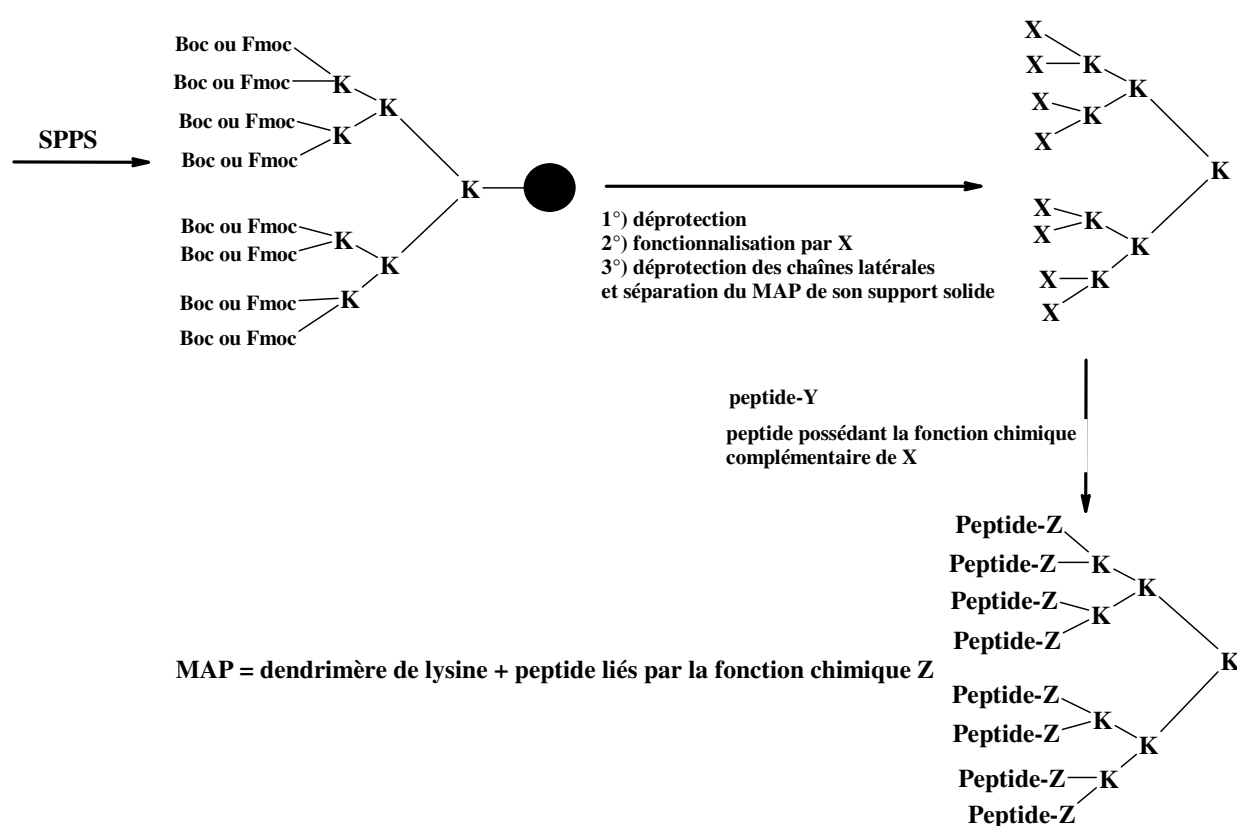


Figure 45 : Synthèse de MAPs par la ligation chimique

Par exemple, des MAPs comportant des liens oxime, hydrazone ou thiazolidine ont été préparés par Shao et coll⁹². Des MAPs ont également été préparés grâce à la ligation

⁹² Shao J, Tam JP. 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

thioéther⁹³. De façon générale, il est important que le peptide greffé à la surface du MAP soit préalablement purifié pour garantir l'homogénéité du produit final.

Afin d'évaluer le potentiel de la ligation thiocarbamate lors de la synthèse de MAPs, nous avons envisagé la synthèse de MAPs di- et tétravalents portant des groupements phénylthiocarbamate comme décrit à la Figure 46.

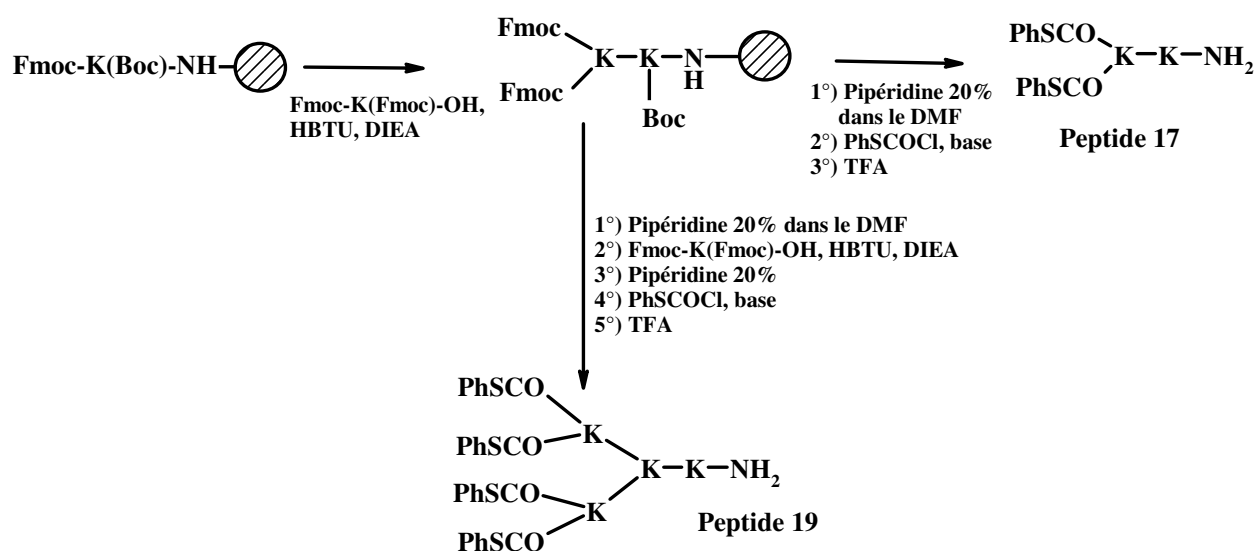


Figure 46 : Synthèse des dendrimères de lysines divalents et tétravalents et fonctionnalisation en groupement phénylthiocarbamate (peptides 17 et 19)

Le dendrimère divalent de lysines a été préparé sur une résine NovaSyn TGR[®]. La Fmoc-K(Boc)-OH a été ancrée sur le support solide, puis, après la déprotection du groupement Fmoc, la Fmoc-K(Fmoc)-OH a été couplée sur l'amine α . La fonctionnalisation par la fonction phénylthiocarbamate des amines α et ϵ a été effectuée en appliquant les conditions précédemment mises au point, c'est-à-dire, en présence du phénylthiochloroformate (4 équivalents) et de la triéthylamine (4 équivalents) dans le THF préalablement distillés.

Néanmoins, la déprotection finale et la séparation du peptide **17** de son support n'a pas conduit à la formation du produit désiré **17**. Le produit majoritaire a pu être identifié comme étant l'hydantoïne **18**, dont le mécanisme de formation hypothétique se trouve décrit à la Figure 47.

⁹³ Mahale SD, Pereira J, Natraj U, Iyer KSN. Comparison of antibodies raised against the peptide 10-24 of chicken riboflavin carrier protein (cRCP) by classical and multiple antigen peptide (MAP) approaches. *J. Immunol. Meth.* **1996**. 190, 215-219

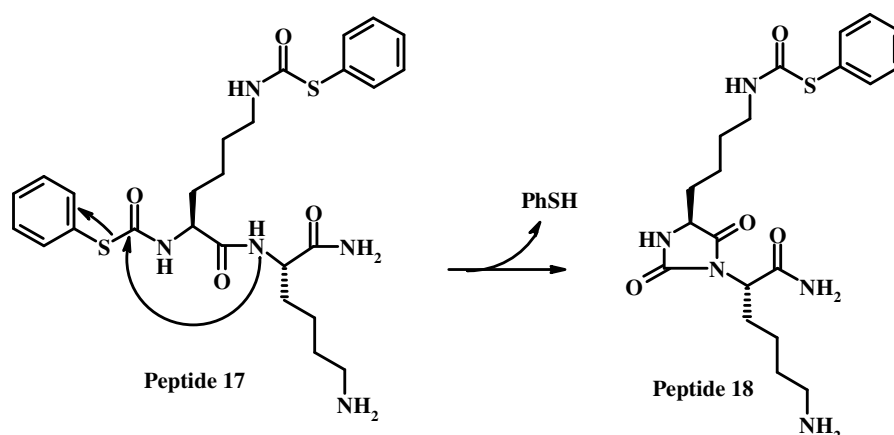


Figure 47 : Mécanisme de formation du peptide 18 à partir du peptide 17

Pour diminuer la formation de ce produit secondaire, nous avons fait varier :

- * le temps de réaction : il a été ramené à 30 minutes au lieu de deux heures afin de limiter le contact entre la base et le groupement phénylthiocarbamate.

- * la nature de la base : la triéthylamine ($pK_a = 10,7$) a été substituée par des bases plus faibles comme la *N*-méthylmorpholine (NMM) ($pK_a = 7,4$) ou la pyridine ($pK_a = 5,2$).

L'utilisation de la pyridine a permis d'isoler le peptide **17** avec un rendement modeste de 24%. Nous avons observé de nouveau la formation de l'hydantoin **18** ainsi que des sous-produits témoignant d'une réaction incomplète avec le phénylthiochloroformate. Par contre, en présence de la NMM, le peptide **17** a été obtenu avec un rendement supérieur (42%), une pureté du peptide final par RP-HPLC et par électrophorèse capillaire supérieures à 88%.

Ces conditions réactionnelles optimales (temps de réaction de 30 minutes, en présence de NMM) ont ensuite été utilisées pour réaliser la synthèse de la structure tétravalente **19**. Cette molécule a pu être isolée avec un rendement de 13% après purification par RP-HPLC. Sa pureté déterminée par RP-HPLC et par électrophorèse capillaire est supérieure à 84%.

Les ligations entre les peptides **17** et **19** et le cystéinyl-peptide **3** ont ensuite été réalisées (Figure 48).

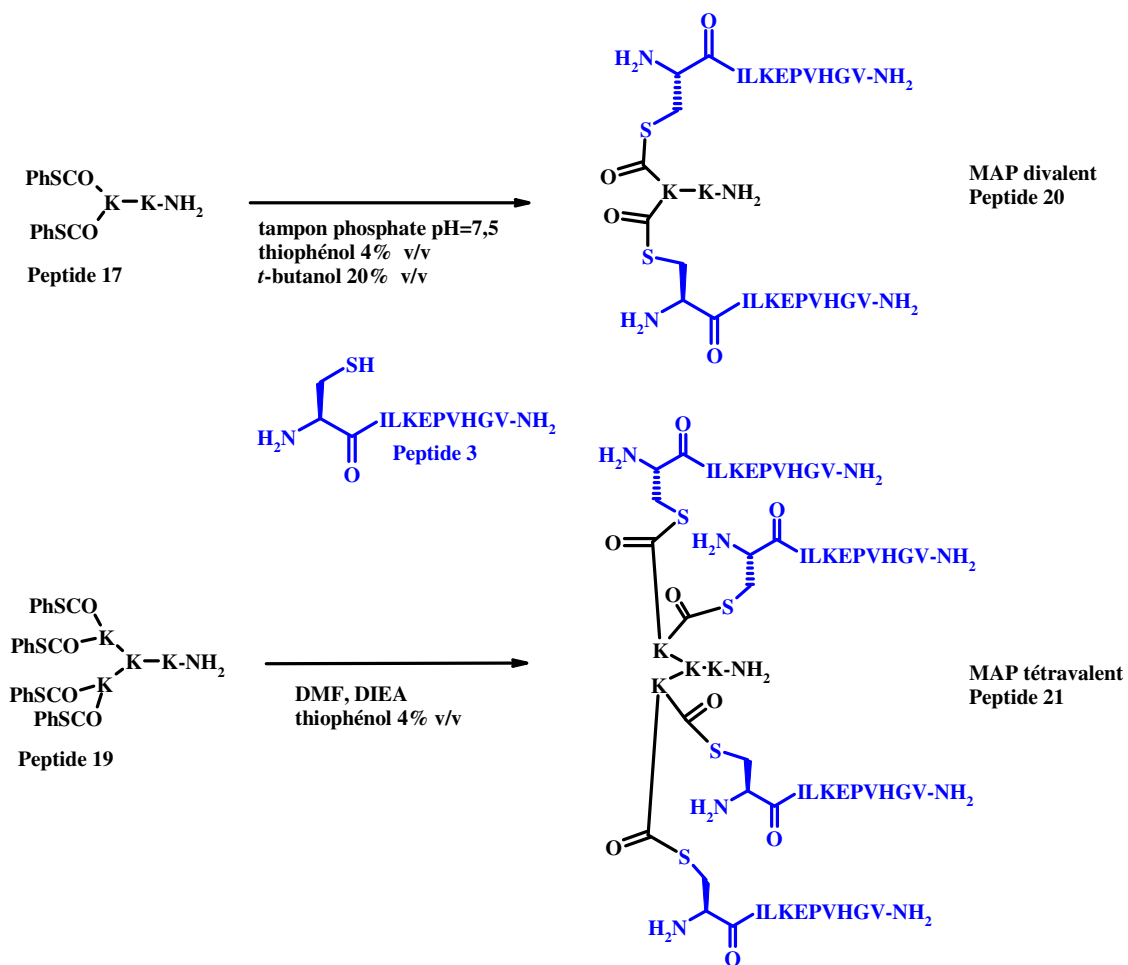


Figure 48 : Synthèse des MAPs 20 et 21

Afin de limiter la formation des produits secondaires, la concentration du peptide 3 a été fixée à 50 mM. Des problèmes de solubilité du peptide 17 en milieu aqueux (tampon phosphate (200 mM, pH 7,5)) nous ont incités à ajouter le *t*-butanol (20% en volume) comme co-solvant. Dans ces conditions, le peptide 20 a été isolé avec un rendement de 30% après purification alors que la formation du peptide 21 n'a pas été possible. La faible solubilité du MAP 19 en milieu aqueux ou partiellement aqueux (comme en présence de *t*-butanol) nous a conduits à effectuer la ligation en milieu totalement organique. En particulier, la synthèse du MAP 21 a été possible en effectuant la réaction dans le DMF en présence de thiophénol et de DIEA. La structure 21 a été ainsi obtenue avec un rendement de 23% après purification.

Pour conclure sur cette partie de mon travail, la ligation thiocarbamate est une nouvelle réaction de ligation prometteuse. Les précurseurs phénylthiocarbamate sont faciles à préparer par les techniques classiques de synthèse en phase solide, si on choisit

judicieusement les conditions expérimentales permettant de minimiser la formation de sous-produits, notamment de type hydantoïne. Le phénylthiochloroformate est disponible commercialement, ce qui facilite l'accès aux peptides phénylthiocarbamate. Cette réaction fait partie de la famille des ligations dites non natives dans la mesure où un lien thiocarbamate se forme à la place de la liaison amide. Elle nous a permis de préparer différentes structures (linéaires, cycliques ou des dendrimères) avec des rendements satisfaisants. Dans la suite de ce manuscrit, nous verrons que j'ai utilisé largement cette ligation thiocarbamate pour préparer de nouveaux conjugués potentiellement capables de lier le domaine extracellulaire du récepteur MET. Nous avons profité de ce travail pour optimiser les conditions de la ligation thiocarbamate et montrer son efficacité pour la synthèse de structures complexes.

C°) Ligation AzaGly

Les azapeptides sont des analogues peptidiques dans lesquels le carbone α d'un ou plusieurs résidu(s) est remplacé par un atome d'azote⁹⁴. Cette modification du squelette provoque la perte de chiralité de l'acide aminé concerné et réduit la flexibilité du peptide linéaire parent. Cette modification permet de générer localement un coude béta ou « β -turn », ce qui a un impact important sur la conformation adoptée par la chaîne peptidique⁹⁵. Un coude béta est introduit par l'enchaînement de quatre acides aminés formant ainsi un pseudocycle à dix chaînons stabilisé par une liaison hydrogène intramoléculaire (Figure 49).

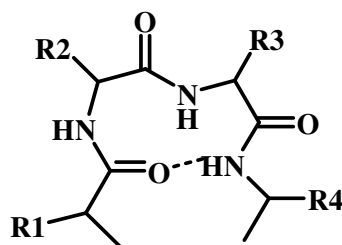


Figure 49 : Structure schématique d'un coude béta

La restriction conformationnelle induite en substituant un résidu d'acide α aminé par un aza amino acide peut parfois permettre d'augmenter de manière spectaculaire la sélectivité du peptide vis-à-vis de sa cible, d'affecter l'absorption, le transport, la distribution et la stabilité dans l'organisme⁹⁶. A titre d'exemple, Hess et coll ont été les premiers à remplacer un acide aminé par un aza amino acide dans la séquence d'un peptide naturel. Ils ont alors obtenus un dérivé modifié de l'angiotensine II avec une durée d'action plus longue⁹⁷.

Les azapeptides possèdent un intérêt grandissant en thérapeutique⁹⁸. Par exemple, ils ont été utilisés dans le développement d'inhibiteurs d'une protéase à sérine, la thrombine⁹⁹ ainsi que d'une autre protéase à sérine participant à la réplication du virus de l'hépatite C¹⁰⁰. De plus, d'un point de vue clinique, un azapeptide, l'atazanavir sulphate (Reyataz[®], Bristol-

⁹⁴ Gante J. Azapeptides. *Synthesis*. **1989**. 405-413

⁹⁵ Thormann M., Hofmann H.J. Conformational properties of azapeptides. *J. Mol. Struct.* **1999**, 469, 63-76

⁹⁶ Zega A, Urleb U. Azapeptides. *Acta Chim Slov.* **2002**. 49, 649-662

⁹⁷ Hess HJ, Moreland WT, Laubach GD. N-[2-isopropyl-3-(L-aspartyl-arginyl)-carbazoyl]-L-tyrosyl-L-valyl-L-prolyl-L-phenylalanine, an isostere of bovine angiotensin II. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**. 85, 4040-4041

⁹⁸ Zega A. Azapeptides as pharmacological agents. *Curr. Med. Chem.* **2005**. 12, 589-597

⁹⁹ Mlinsek G, Friedrich R, Solmajer T. Thrombin inhibitors with novel azaphenylalanine scaffolds and a new P1 binding pocket functionality : structural analysis of binding. *Acta Chim Slov.* **2008**. 55, 739-751

¹⁰⁰ Venkatraman S, Wu W, Shih NY, Njoroge G. Potent aza-peptide derived inhibitors of HCV NS3 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**. 19, 4760-4763

Myers Squibb) est utilisé dans le traitement contre le VIH-1 en association avec d'autres agents antirétroviraux¹⁰¹. Dans ce contexte, la mise au point de nouvelles méthodes de synthèse d'azapeptides est un enjeu majeur.

Afin de mener à bien ce travail de thèse, nous voulions disposer d'une méthode efficace de synthèse d'azapeptides pour pouvoir, par la suite, l'appliquer dans le cadre de notre projet d'identification d'inhibiteurs extracellulaires du récepteur MET. Les objectifs de ce projet sont la synthèse d'une librairie de peptides capables de lier le domaine extracellulaire de MET et d'inhiber l'activation du récepteur en présence de son ligand HGF/SF. Après cette phase de sélection, nous savions que nous allions être inévitablement confrontés au besoin d'augmenter l'affinité et/ou la spécificité du peptide pour sa cible, ainsi que sa stabilité dans les fluides biologiques. Une manière d'aborder ce problème est de préparer des structures peptidomimétiques, comme les azapeptides, à partir des peptides natifs sélectionnés.

Notre attention s'est portée tout particulièrement sur la substitution du résidu glycine par l'azaglycine (azaGly). C'est l'un des acides aminés qui est le plus souvent rencontré dans les peptides et les protéines à une fréquence estimée à 7,2% par McCaldon et coll¹⁰². La flexibilité de ce résidu est due à l'absence de chaîne latérale sur le carbone α , ce qui ne génère pas d'encombrement stérique.

Dans la littérature, la substitution d'une glycine par une azaGly présente un intérêt thérapeutique majeur. Par exemple, le peptide Z-Arg-Leu-Arg-azaGly-Ile-Val-OMe est l'inhibiteur le plus puissant et le plus sélectif d'une protéase à cystéine, la cathépsine B identifié à ce jour¹⁰³. Cette protéine lysosomiale peut être dérégulée dans différentes tumeurs (prostate, colorectale, du cerveau...)¹⁰⁴. Nous nous sommes donc intéressés à la mise au point d'une ligation azaGly, pour accéder à ces structures de manière convergente. C'est ce que nous allons exposer dans le paragraphe suivant.

¹⁰¹ Raja A, Lebbos J, Kirkpatrick P. Atazanavir sulphate. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2003**. 2, 857-858

¹⁰² MacCaldon P, Argos P. Oligopeptide biases in protein sequences and their use in predicting protein coding regions in nucleotide sequences. *Proteins*. **1988**. 4, 99-122

¹⁰³ Wiczerzak E, Rodziewicz-Motowidlo S, Jankowska E, Gieldon A, Ciarkowski J. An enormously active and selective azapeptide inhibitor of cathepsin B. *J. Pept. Sci.* **2007**. 13, 536-543

¹⁰⁴ Yan S, Sloane BF. Molecular regulation of human cathepsin B : implication in pathologies. *Biol. Chem.* **2003**. 384, 845-854

1°) Hypothèses de travail

La Figure 50 décrit la structure générale d'un peptide contenant un résidu azaGly encore appelé azaGlypeptide, dont la synthèse convergente peut être envisagée de deux façons. La première stratégie, appelée ici voie A, met en jeu une réaction entre un peptide thioester et un hydrazinocarboxyl-peptide. La seconde stratégie, la voie B, fait intervenir un peptide phénylthiocarbamate et un peptide hydrazide¹⁰⁵ (Figure 50).

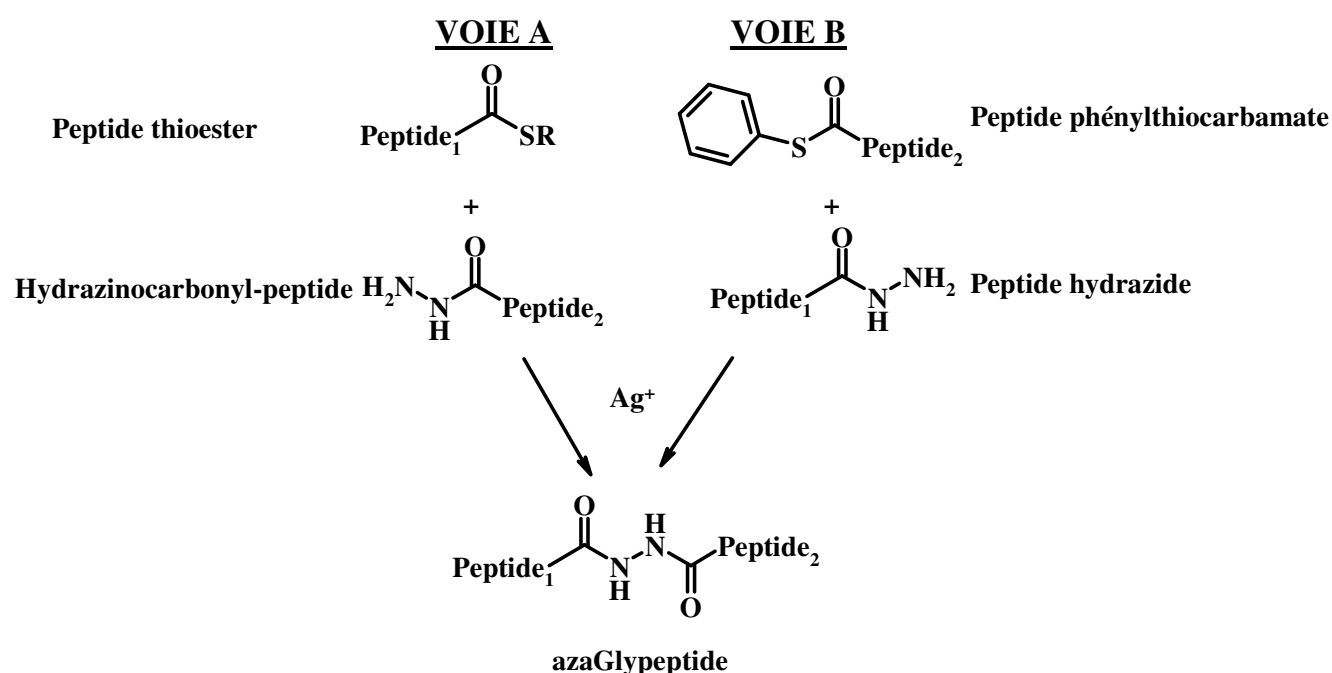


Figure 50 : Hypothèses de travail pour la ligation azaGly

Pour les deux voies de synthèse, la présence d'ions argent, sous forme de deux équivalents de nitrate d'argent, a été nécessaire afin d'activer le groupement alkyl- ou arylthiocarbonyle^{106,107,108}. En plus de l'activation du groupement alkyl- ou arylthiocarbonyle, les ions argent sont supposés favoriser, par un phénomène de chélation, le rapprochement entre les fonctions réactives des deux peptides, comme schématisé à la Figure 51.

¹⁰⁵ Ollivier N, Besret S, Blanpain A, Melnyk O. Silver-catalyzed azaGly ligation. Application to the synthesis of azapeptides and of lipid-peptide conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2009**. 20, 1397-1403

¹⁰⁶ Zhang L, Tam JP. Metal ion-assisted peptide cyclization. *Tet. Lett.* **1997**. 38, 4375-4378

¹⁰⁷ Blake J. Peptide segment coupling in aqueous medium: silver ion activation of the thiolcarboxyl group. *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1981**. 17, 273-274

¹⁰⁸ Aimoto S. Polypeptide synthesis by the thioester method. *Biopol.* **1999**. 51, 247-265

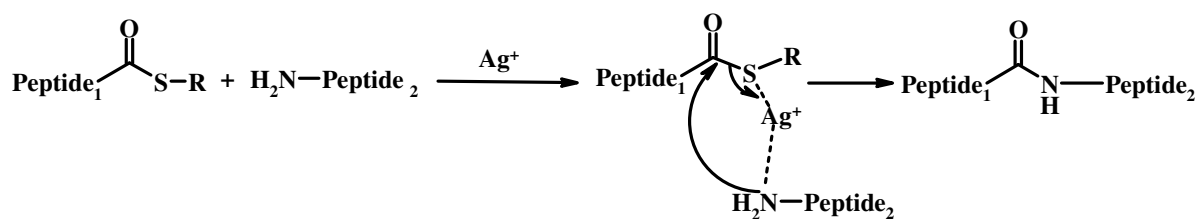


Figure 51 : Mécanisme supposé de l'activation par les ions argent

Ce phénomène a lieu de manière préférentielle lorsque la réaction se déroule dans un solvant faiblement polaire, propriété exploitée par Zhang et coll pour la synthèse de peptides cycliques.

Les pKa de l'acétylhydrazine et du semicarbazide sont respectivement de 3,24¹⁰⁹ et de 3,65¹¹⁰. La réaction de ligation était donc potentiellement réalisable à un pH inférieur à 5, conditions dans lesquelles les amines ε des lysines du peptide sont protonnées (pKa = 10,28). Dans ces conditions, nous pouvions espérer une protection des amines ε des lysines par protonation, et ainsi une chimiosélectivité pour les deux stratégies d'assemblage définies dans la Figure 50.

Nous avons décidé d'effectuer les réactions dans un mélange *t*-butanol/H₂O pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les premiers essais ont montré un taux d'hydrolyse important des peptides thioesters en milieu aqueux sous l'action du sel d'argent. Cette réaction secondaire a conduit de nombreux auteurs à effectuer l'activation de thioesters en présence de sel d'argent en milieu organique, comme le DMF¹¹¹. Dans notre cas, il était également important de garder une proportion suffisante d'eau de façon à pouvoir contrôler précisément le pH de la réaction, dont dépend de manière cruciale la chimiosélectivité. De plus, ce même mélange *t*-butanol/H₂O a été employé avec succès au laboratoire pour la mise au point d'une réaction chimiosélective d'acylation d'hydrazinopeptides, dont le rendement dépendait également de manière importante du pH¹¹². La similitude entre ces travaux et notre projet de ligation azaGly laissait penser que ce mélange de solvants pourrait constituer une bonne base pour effectuer les premiers essais.

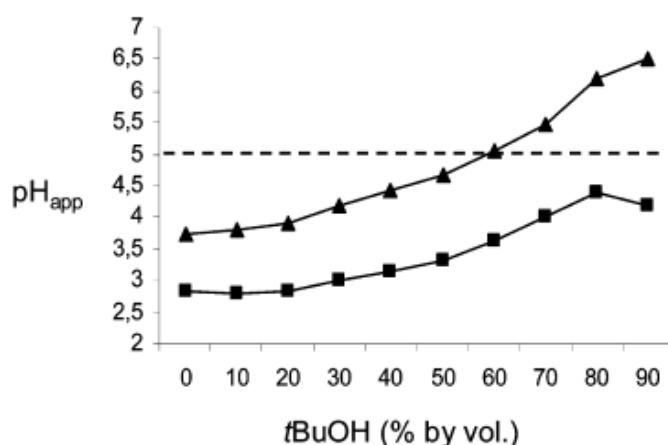
¹⁰⁹ Lindegren CR, Niemann C. The apparent ionisation constants of acetylhydrazide and glycylylhydrazide. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**. 71, 1504

¹¹⁰ Conant JB, Bartlett PD. A quantitative study of semicarbazone formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**. 54, 2881-2899

¹¹¹ Kaljuste K, Tam JP. A novel on-resin synthesis of C-terminally aminated peptides. *Tet. Lett.* **1998**. 39, 9327-9330

¹¹² Bonnet D, Rommens C, Gras-Masse H, Melnyk O. Chemoselective acylation of hydrazinopeptides : a novel method for the derivatization of peptides with sensitive fatty acids. *Tet. Lett.* **2000**. 41, 45-48

L'addition d'un solvant organique à un tampon aqueux conduit à un changement du pH apparent. Ceci est dû au fait que le solvant organique diminue la polarité du milieu, et ainsi défavorise l'ionisation des acides (leur pKa augmente). L'effet global est qu'en général l'ajout d'un solvant organique à un tampon mène à une augmentation du pH apparent¹¹³. Dans la mise au point de la ligation azaGly, si l'on ne prenait pas en compte ce phénomène, le risque était d'avoir une diminution importante de la chimiosélectivité puisqu'une augmentation du pH apparent du milieu conduit à démasquer les amines ε. Nous avons donc documenté l'effet de la concentration de *t*-butanol sur le pH apparent d'un tampon acétate de sodium/acide acétique ou d'une solution d'acide acétique. Les résultats sont présentés à la Figure 52.



**Figure 52 : Effet de la concentration de *t*-butanol sur le pH apparent d'un tampon acétate de sodium/acide acétique 40 mM pH = 3,7 (▲)
d'une solution d'acide acétique à 40 mM (■)
(Figure tirée de l'article de Besret 2008)**

Ces données montrent que le pH apparent d'un tampon acétate de sodium/acide acétique initialement à un pH de 3,7 augmente de manière significative avec la concentration de *t*-butanol. A partir de 60% de *t*-butanol en volume, le pH apparent dépasse la valeur seuil de 5, au delà de laquelle il y a un risque important de démasquer partiellement les amines ε. A l'inverse, en présence d'une solution à 40 mM en acide acétique et quel que soit le pourcentage de *t*-butanol, le pH apparent reste toujours inférieur à 5.

¹¹³ Mukerjee P, Ostrow JD. Effects of added diméthylsulfoxyde on pKa values of uncharged organic acids and pH values of aqueous buffers. *Tet. Lett.* **1998**. 39, 423-426

Nous avons choisi de travailler dans le mélange *t*-butanol/acide acétique à 40 mM (80/20 ; v/v) pour toutes les raisons énoncées précédemment de façon à minimiser l'hydrolyse des peptides thioester ou phénylthiocarbamate et favoriser la formation du complexe.

2°) Voie A : réaction entre un peptide thioester et un hydrazinocarbonyl-peptide

La première voie synthétique permettant d'obtenir un azaGlypeptide met en jeu la réaction entre un peptide thioester et un hydrazinocarbonyl-peptide (Figure 53).

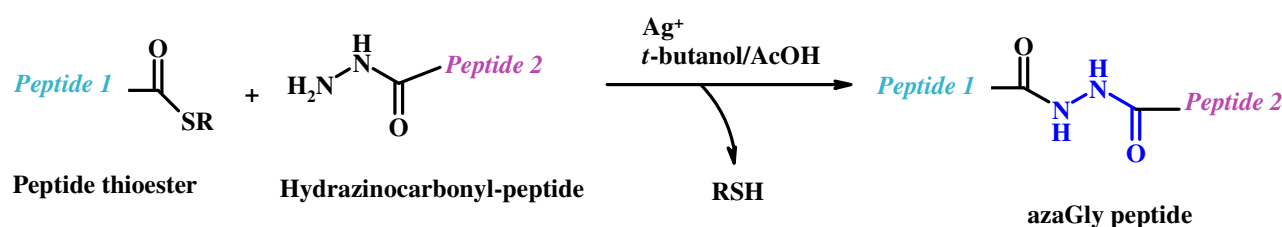


Figure 53 : Ligation azaGly par réaction entre un peptide thioester et un hydrazinocarbonyl-peptide

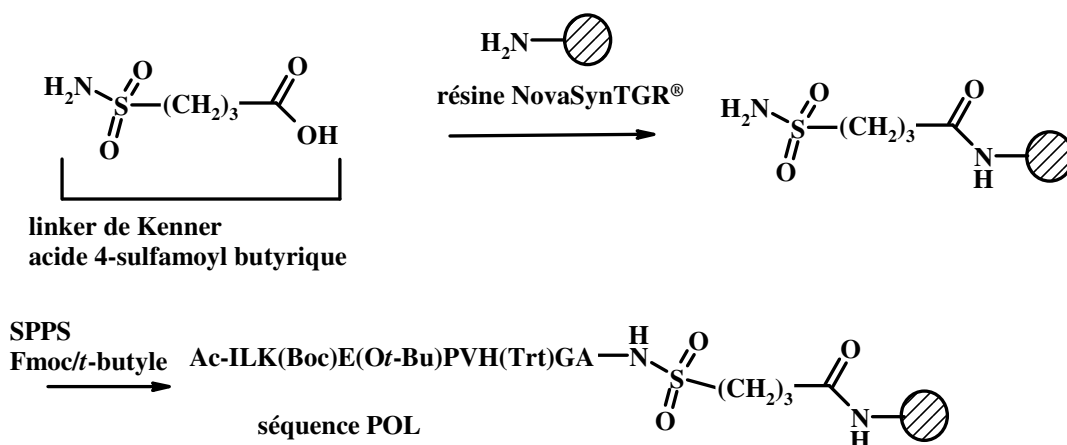
2.1°) Préparation des peptides thioesters 22 et 23

Les peptides thioesters ont été préparés grâce au linker de Kenner¹¹⁴ et une stratégie mise au point au laboratoire¹¹⁵ impliquant un réarrangement intramoléculaire de type *N,S* acyl shift (Figure 54).

La synthèse des peptides thioesters a débuté par la fonctionnalisation de la résine NovaSyn TGR[®] par l'acide 4-sulfamoyl-butérique, encore appelé linker de Kenner. L'élongation du peptide, dont la séquence provient de la protéine POL, a ensuite été effectuée selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle en utilisant les protocoles standards de la SPPS.

¹¹⁴ Kenner GW, McDermott JR, Sheppard RC. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 12, 636-637

¹¹⁵ Ollivier N, Behr JB, El-Mahdi O, Blanpain A, Melnyk O. Fmoc solid-phase synthesis of peptide thioesters using an intramolecular *N,S*-acyl shift. *Org. Lett.* **2005**, 7, 2647-2650



**Figure 54 : Couplage du linker de Kenner sur la résine NovaSynTGR®
et élongation du peptide par la SPPS**

En parallèle, deux alcools bromés, le 2-bromoéthanol et le 3-bromopropanol, ont été mis en réaction avec le thiolate potassique de triisopropylsilane dans le THF¹¹⁶. Cette étape nous a permis d'obtenir deux thiols protégés dérivés du 2-mercaptoéthanol et 3-mercaptoopropanol (Figure 55).

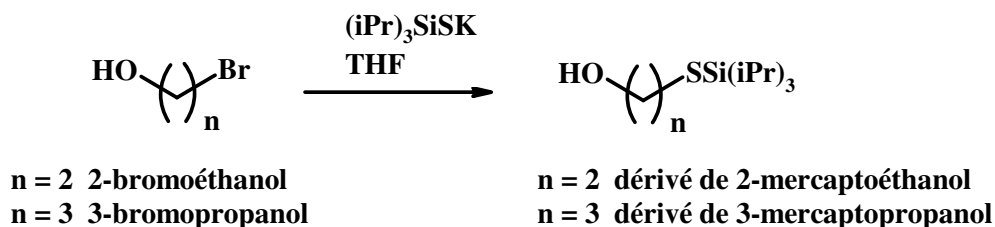


Figure 55 : Réaction du 2-bromoéthanol et du 3-bromopropanol avec le thiolate potassique de triisopropylsilane

Ces dérivés protégés ont été utilisés pour effectuer l'alkylation en phase solide du groupement sulfonamide par une réaction de Mitsunobu¹¹⁷. Cette réaction a été réalisée en présence du diéthylazodicarboxylate (DEAD) et de la triphénylphosphine (PPh₃) dans le THF préalablement distillé (Figure 56).

¹¹⁶ Miranda EI, Diaz MJ, Rosado I, Soderquist JA. Thiols, unsymmetrical sulfides and thioacetals from the new reagent: triisopropylsilane thiol. *Tet. Lett.* **1994**, 35, 3221-3224

¹¹⁷ Willoughby CA, Hutchins SM, Rosauer KG, Dhar MJ, Chapman KT, Chicchi GG, Sadowski S, Weinberg DH, Patel S, Malkowitz L, DiSalvo J, Pacholok SG, Cheng K. Combinatorial synthesis of 3-(amidoalkyl) and 3-(aminoalkyl)-2-arylindole derivatives: discovery of potent ligands for a variety of G-protein coupled receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 93-96

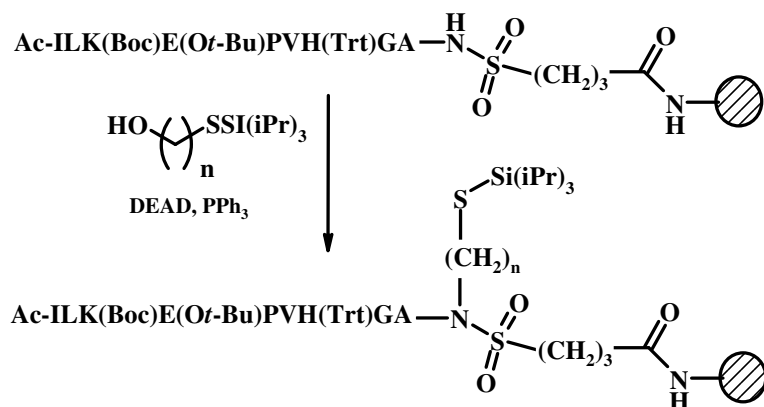


Figure 56 : Alkylation du sulfonamide grâce à une réaction de Mitsunobu

Le TBAF (fluorure de tétrabutylammonium) nous a ensuite permis d'éliminer le triisopropylsilane masquant la fonction thiol. Pour limiter l'augmentation du pH et l'hydrolyse du peptide thioester dues au caractère basique du TBAF, de l'acide acétique a été ajouté pour tamponner le milieu réactionnel. Suite à cette déprotection, on démasque un thiol nucléophile qui se retrouve à proximité du groupement carbonyle du dernier résidu de la séquence peptidique. On se trouve ainsi dans une configuration favorable (cycle à 5 ou 6 chaînons) pour assister à un réarrangement intramoléculaire spontané. A la suite de ce réarrangement, qualifié de *N,S*-acyl shift, le peptide thioester reste lié au support solide. L'action du TFA sur la peptidyl-résine a ensuite permis de déprotéger les chaînes latérales des acides aminés et de libérer le peptide thioester de son support solide (Figure 57).

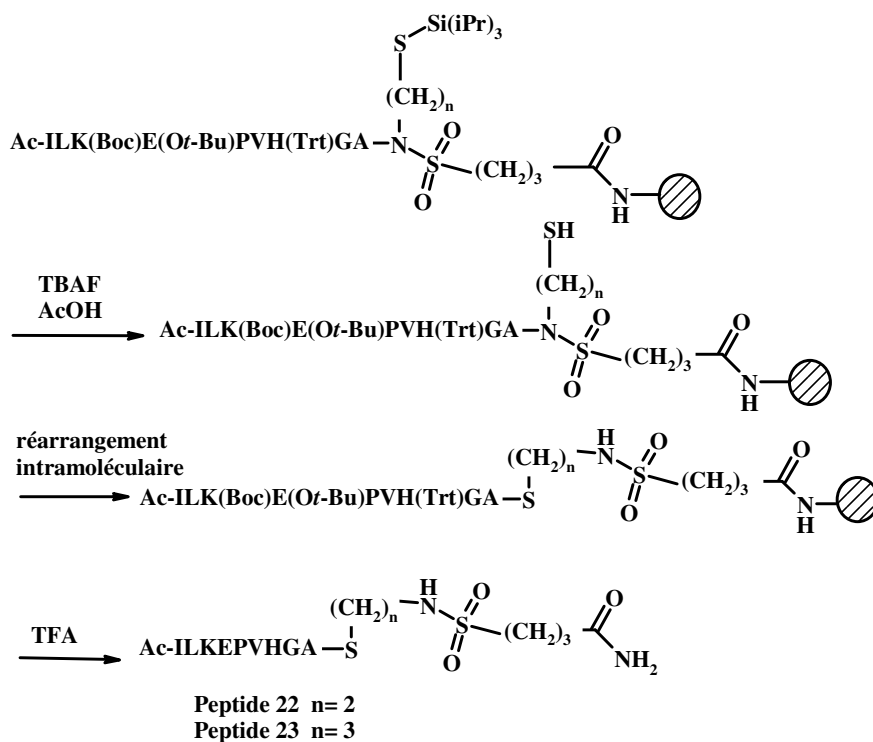


Figure 57 : Déprotection du thiol suivie du réarrangement intramoléculaire

Cette méthode nous a permis de préparer les peptides thioesters 22 et 23. Les rendements de synthèse ont été respectivement de 23% et de 22%. Leur pureté par RP-HPLC et par électrophorèse capillaire est supérieure à 99%.

Afin de mettre au point la ligation azaGly, ils ont été mis en réaction dans un premier temps avec le semicarbazide 24, disponible commercialement sous forme de chlorhydrate.

2.2°) Preuve de concept : ligation azaGly entre le peptide thioester 22 et le semicarbazide commercial 24

Une première réaction de ligation du semicarbazide commercial 24 (sous la forme d'un chlorhydrate) avec le peptide thioester 22 n'a pas permis d'obtenir l'azaGlypeptide 25. Nous avons alors supposé que les ions chlorures précipitaient les ions argent qui ne pouvaient plus jouer alors leur rôle de catalyseur.

Pour vérifier cette hypothèse, les ions chlorures du semicarbazide 24 ont été échangés par des ions acétate grâce à une résine échangeuse d'ions. Après cet échange, la réaction entre le semicarbazide 24 et le peptide thioester 22 a abouti avec succès à la formation de l'azaGlypeptide 25 avec un rendement de 46% (Figure 58).

Le *t*-butylcarbазate et le CDI (carbonyldiimidazole), deux réactifs commerciaux, ont été mis en réaction dans le DMF afin d'obtenir un composé dissymétrique, le *N*-Boc-hydrazine carbonylimidazole, qui, sans purification intermédiaire, a été mis en réaction avec la peptidyl-résine. Après déprotection des chaînes latérales et la séparation des peptides de la résine, les peptides **26** et **27** ont été obtenus. Ils diffèrent par la nature du premier résidu de la séquence, respectivement une glycine ou une isoleucine, ce qui nous a permis d'étudier l'impact de l'encombrement stérique au point de ligation dans le rendement de la réaction.

Les hydrazinocarbonyl-peptides **26** et **27** se sont avérés stables lors de la déprotection finale et la séparation du peptide du support solide par une solution concentrée de TFA mais ils se sont hydrolysés partiellement avec perte du groupement hydrazinocarbonyl lors de leur purification par RP-HPLC préparative dans un mélange H₂O/Acétonitrile contenant 0,05% de TFA à pH 2. Cette constatation nous a alors amenés à remplacer le TFA par un tampon d'acétate triéthylammonium (TEAA) dont le pH est de 6,5, ce qui a permis d'obtenir de façon satisfaisante les peptides **26** et **27**. En effet, les rendements de synthèse après purification des peptides sont respectivement de 54% et de 66%.

2.4°) Ligation azaGly entre le peptide 23 et les peptides 26 et 27

Les ligations azaGly ont ensuite été effectuées dans les conditions optimales mises au point précédemment, à savoir dans un mélange *t*-butanol/acide acétique (80/20, v/v) en présence de deux équivalents de sel d'argent (Figure 60).

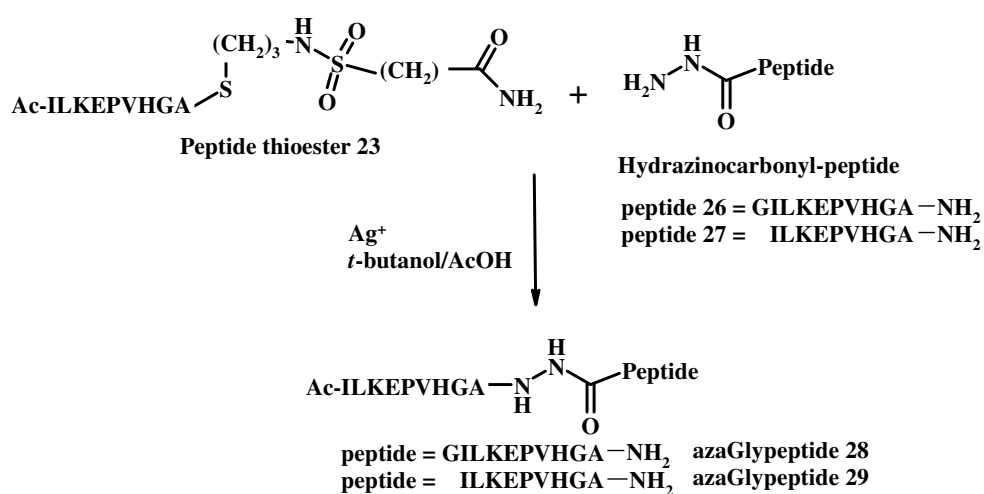


Figure 60 : Synthèse des azaGlypeptides 28 et 29

La ligation entre le peptide thioester **23** et les peptides hydrazinocarbonyle **26** et **27** a permis d'isoler respectivement les azaGlypeptides **28** et **29**, qui ont été obtenus respectivement avec un rendement de 28% et 34% après purification.

Lors de ces ligations, nous avons pu observer l'apparition de différents produits secondaires : le peptide **30**, résultat de l'hydrolyse du peptide **23**, ainsi que les peptides **31** et **32**, provenant quant à eux de l'hydrolyse des peptides hydrazinocarbonyles **26** et **27** respectivement (Figure 61).

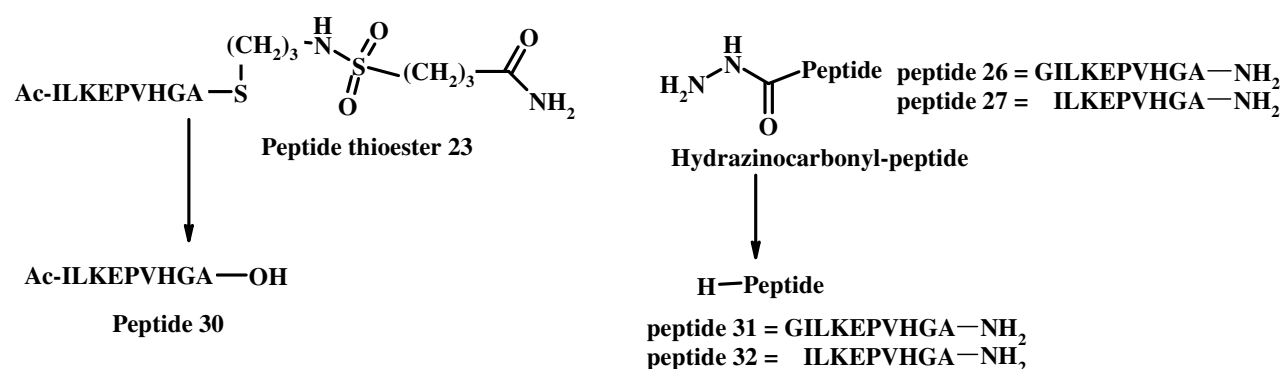


Figure 61 : Produits d'hydrolyse observés lors de la ligation azaGly

Afin d'évaluer l'importance de l'hydrolyse des peptides de départ par rapport à la formation de l'azaGlypeptide, nous présentons, à la Figure 62, le pourcentage (rendement RP-HPLC) de l'azaGlypeptide **28** et du pourcentage d'hydrolyse du peptide thioester **23** et de l'hydrazinocarbonyl-peptides **26** en fonction du temps.

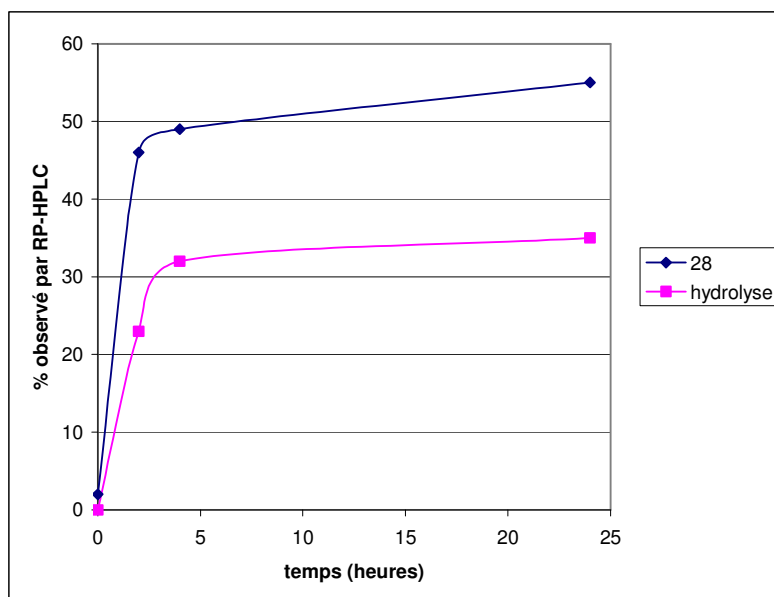


Figure 62 : Pourcentages (rendement RP-HPLC) d'azaGlypeptide 28 et d'hydrolyse des peptides de départ en fonction du temps
 (Conditions des analyses RP-HPLC : 0-100% B en 30 min, RT, C18 Nucléosil, 215 nm)

Malgré l'optimisation des conditions réactionnelles, nous n'avons pas pu réduire l'hydrolyse du peptide thioester en dessous de 35%. Les rendements de synthèse satisfaisants prouvent que la ligation permet malgré tout d'obtenir de façon efficace des azapeptides.

La ligation azaGly étant une nouvelle méthode de ligation, nous devons confirmer sa chimiosélectivité, c'est-à-dire, s'assurer qu'elle s'opère bien au niveau des extrémités des peptides et non au niveau des amines ε des lysines. Pour ce faire, nous avons soumis les azapeptides 25, 28 et 29 à une digestion par la trypsine, endopeptidase qui hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau d'un résidu basique (notamment la lysine et l'arginine).

Les fragments peptidiques attendus à l'issue de cette digestion enzymatique sont présentés à la Figure 63. Ces fragments ont été observés effectivement lors d'une analyse MALDI-TOF du milieu réactionnel. Le Tableau 1 regroupe les masses monoisotopiques calculées et observées des différents fragments peptidiques.

Fragments peptidiques résultant de la digestion trypsique

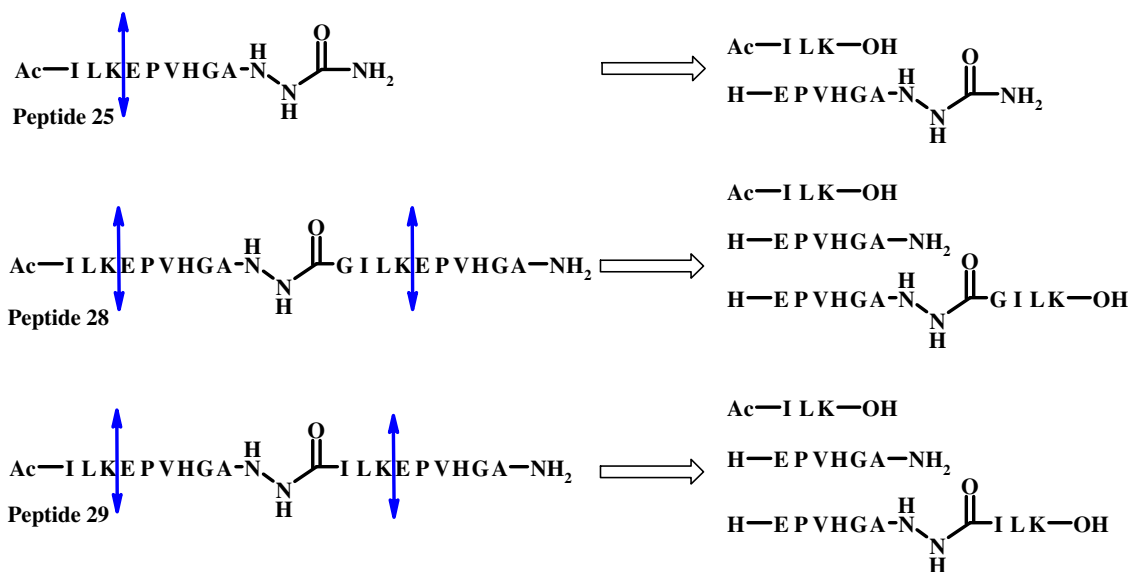


Figure 63 : Structures des fragments peptidiques attendus après digestion trypsique et identifiés par analyse MALDI-TOF du milieu réactionnel

Peptide 25	$[M+H]^+$ calculée	$[M+H]^+$ observée
Ac-ILK-OH	415.29	415.30
H-EPVHGA-NH-NH-CO-NH ₂	666.33	666.33
Peptide 28	$[M+H]^+$ calculée	$[M+H]^+$ observée
Ac-ILK-OH	415.29	415.31
H-EPVHGA-NH ₂	608.31	608.33
H-EPVHGA-NH-NH-CO-GILK-OH	1078.60	1078.61
Peptide 29	$[M+H]^+$ calculée	$[M+H]^+$ observée
Ac-ILK-OH	415.29	415.29
H-EPVHGA-NH ₂	608.31	608.32
H-EPVHGA-NH-NH-CO-ILK-OH	1021.58	1021.57

Tableau 1 : Masses monoisotopiques calculées et observées des fragments peptidiques (conditions d'analyse MALDI-TOF : α -CN mode réflectron positif)

Les structures des différents fragments détectés témoignent que la ligation azaGly a bien eu lieu au niveau des extrémités des peptides. En absence d'autres types de fragments,

qui pourraient provenir notamment des réactions secondaires impliquant les amines ϵ des lysines, nous pouvons conclure que cette première stratégie de ligation azaGly est chimiosélective.

Une autre étape importante lors du développement d'une nouvelle méthode de ligation consiste à déterminer le taux de racémisation survenant lors de la ligation, notamment au niveau de l'alanine connectée au résidu azaGly. Les azapeptides **28** et **29** ont été soumis à une hydrolyse acide par le DCl 6N dans le D₂O¹¹⁸. Puis, une analyse GC-MS chirale a montré qu'il y a, malheureusement, respectivement 30% et 39% de racémisation de l'alanine voisine de l'azaGly. Cette voie de synthèse des azapeptides provoque la racémisation du résidu situé en amont de l'azaGly et a lieu probablement lors de l'activation du thioester par le sel d'argent. Ce constat nous a amenés à développer et à étudier une autre voie de synthèse des azapeptides, appelée voie B dans ce manuscrit, détaillée dans le prochain paragraphe.

3°) Voie B : réaction entre un peptide phénylthiocarbamate et un peptide hydrazide

Cette seconde méthode, permettant d'obtenir un azaGly peptide, met en jeu un peptide portant un groupement phénylthiocarbonyle sur l'amine α terminale et un peptide hydrazide en C-terminal (Figure 64).

¹¹⁸ Amelung W, Brodowski S. In vitro quantification of hydrolysis-induced racemization of amino acid enantiomers in environmental samples using deuterium labeling and electron-impact ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 3239-46

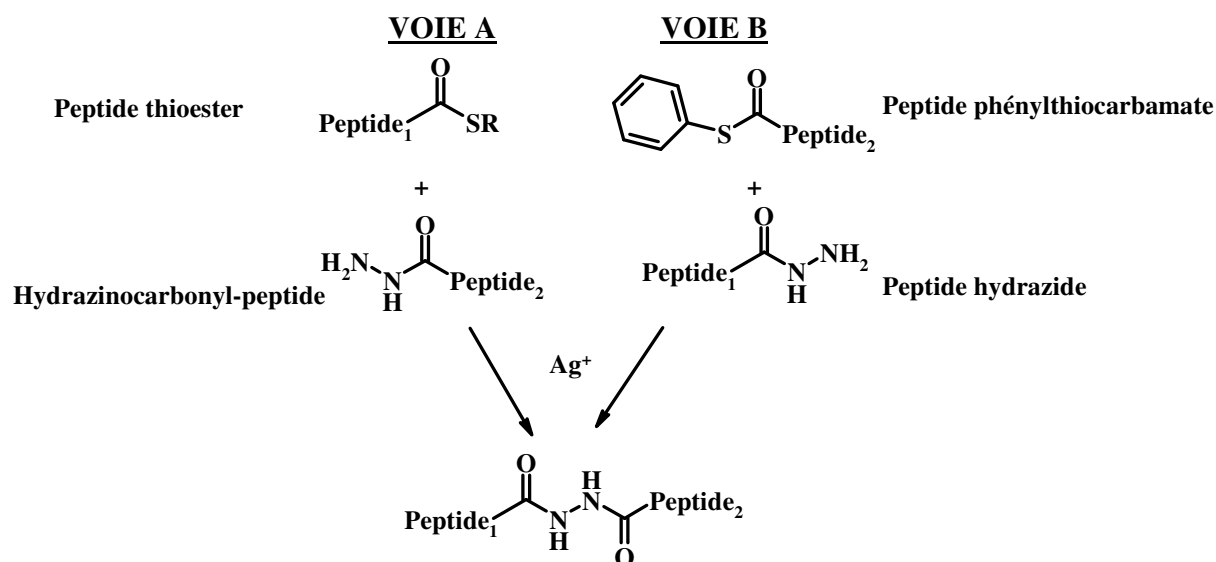


Figure 64 : Rappel des voies de synthèse des azaGlypeptides

3.1°) Préparation du peptide phénylthiocarbamate 2

Afin de disposer rapidement d'un peptide phénylthiocarbamate, nous avons choisi le peptide 2, dont la synthèse a été mise au point au laboratoire lors de la mise au point de la ligation thiocarbamate. Le peptide 2 s'est avéré alors particulièrement réactif vis-à-vis de l'action de nucléophile d'un thiol de cystéine. De plus, sa synthèse, relativement aisée, nous a permis d'en disposer en quantité importante (proche de 200 mg) et avec un taux de pureté élevé (supérieur à 98% aussi bien en RP-HPLC qu'en électrophorèse capillaire).

Pour mettre au point cette seconde voie de synthèse des azapeptides, nous avons décidé tout d'abord de tester la réactivité du peptide 2 en présence d'un réactif commercial, l'acétylhydrazide.

3.2°) Preuve de concept : ligation azaGly entre l'acétylhydrazine commerciale 33 et le peptide 2

Une ligation « preuve de concept » a été effectuée entre une molécule commerciale, l'acétylhydrazine (33) et le peptide 2. Cette réaction s'est déroulée dans les conditions mises au point précédemment, à savoir dans un mélange *t*-butanol/AcOH (80/20 ; v/v) avec un sel d'argent (2 équivalents) comme catalyseur. Cette première ligation a abouti à la formation de l'azaGlypeptide 34 (Figure 65).

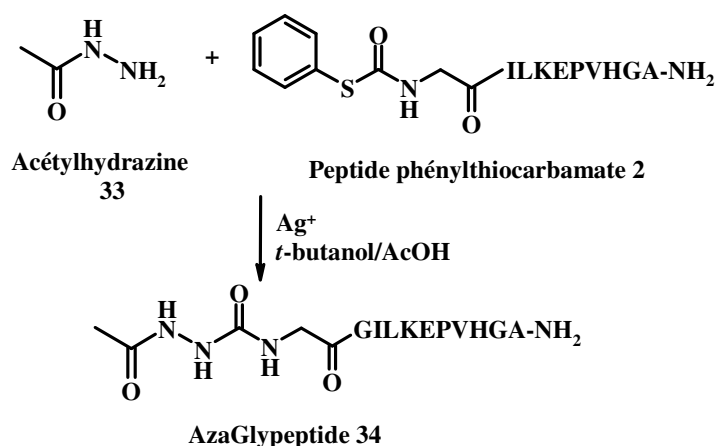


Figure 65 : Ligation entre l'acétylhydrazine 33 et le peptide 2

Après purification du milieu réactionnel par RP-HPLC préparative, l'azaGlypeptide **34** a été isolé avec un rendement (43%) et une pureté (supérieure à 98% quel que soit le type d'analyse) très satisfaisants. Ces résultats préliminaires encourageants montrent qu'il est possible d'obtenir un azaGlypeptide en faisant réagir un hydrazide et un phénylthiocarbonyl-peptide. L'étape suivante dans la mise au point de la ligation a été de faire réagir ce peptide **2** avec des peptides hydrazides. Nous détaillerons largement leur préparation dans le prochain paragraphe.

3.3°) Préparation de peptides hydrazides 35 et 36

Nous avons choisi d'utiliser une résine de type NovaSynTG HMBA, décrite plus largement Figure 2. Cette résine est connue pour permettre, en fonction du nucléophile choisi pour la séparation du peptide de son support solide, d'accéder à des peptides amides, alcools, et hydrazides entre autres. Dans notre cas, une hydrazinolyse nous a permis d'aboutir à une fonction hydrazide à l'extrémité C-terminale des peptides **35** et **36**.

Ces deux peptides diffèrent uniquement par la nature du premier résidu de la séquence : l'un étant une glycine (peptide **35**) et l'autre une alanine (peptide **36**). Nous avons décidé de préparer ces deux peptides afin d'évaluer l'efficacité de la méthode en fonction de l'encombrement stérique du site de ligation (Figure 66).

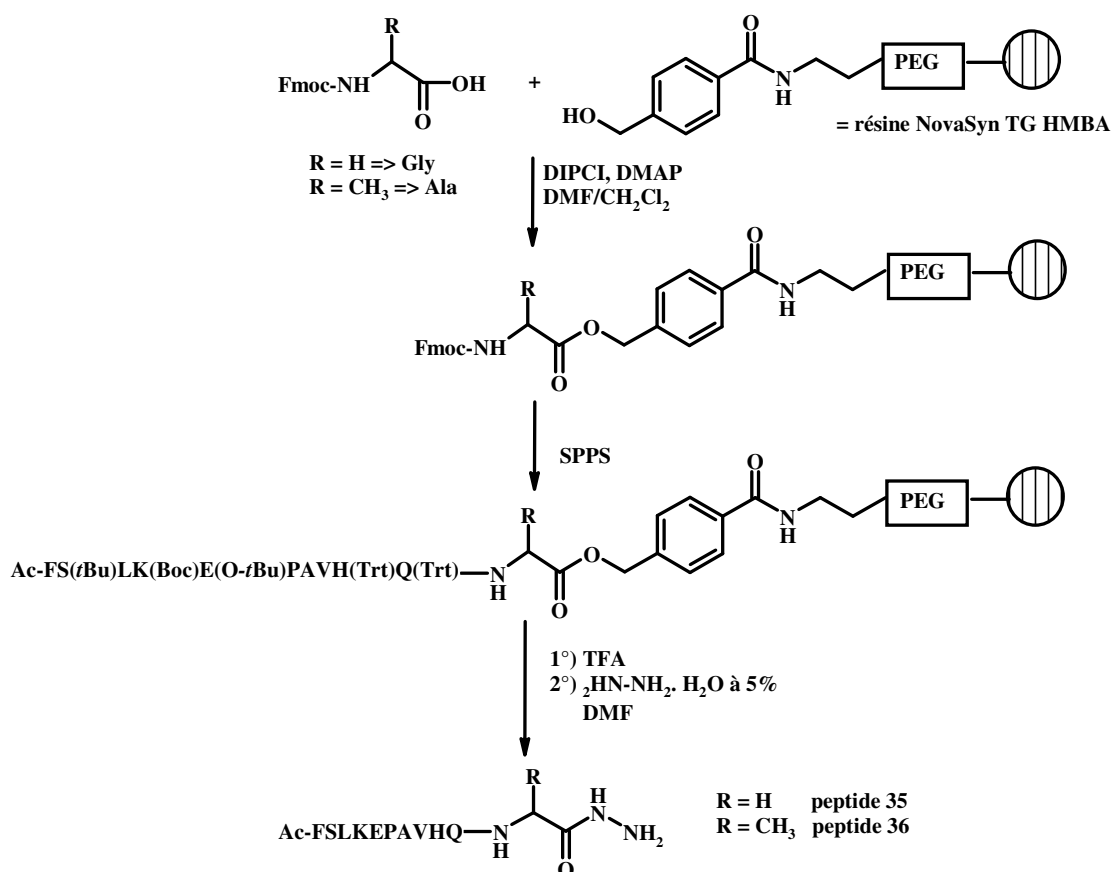


Figure 66 : Préparation des peptides hydrazides 35 et 36

Le premier résidu a été couplé sur le support solide grâce à l'activation de la fonction acide carboxylique par le diisopropylcarbodiimide (DIPC1) et la 4-*N,N'*-diméthylaminopyridine (DMAP) solubilisés dans un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$. L'élongation des peptides **35** et **36** a été réalisée par la SPPS selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle (Figure 26) sur une résine NovaSynTG HMBA. Les chaînes latérales du peptide ont ensuite été déprotégées grâce à un traitement par une solution concentrée de TFA. Le peptide a été libéré de son support suite à l'hydrazinolyse du lien ester en ajoutant sur la peptidyl-résine une solution d'hydrate d'hydrazine à 5% dans le DMF ¹¹⁹. Les rendements de synthèse sont assez faibles, 31% et 6% respectivement.

Nous avons supposé que le temps d'hydrazinolyse (une heure) pouvait être à l'origine de ce faible rendement de synthèse des peptides hydrazides. En effet, lors de travaux ultérieurs au laboratoire, il est clairement apparu qu'en augmentant le temps de contact entre

¹¹⁹ Mellor SL, Wellings DA, Fehrentz JA, Paris M, Martinez J, Ede NJ, Bray AM, Evans DJ, Bloomberg GB. Fmoc solid phase peptide synthesis : a practical approach. *Oxford University Press*. **2000**. 147-148

la résine et la solution d'hydrazinolyse à plusieurs heures voire une nuit, le rendement était supérieur à celui que nous avons obtenu. Néanmoins, malgré ces rendements décevants, nous disposons de suffisamment de peptides hydrazide pour mener à bien les ligations.

3.4°) Ligation azaGly entre les peptides 35 et 36 et le peptide 2

Une ligation azaGly a ensuite été mise en œuvre entre les peptides hydrazides **35** et **36** et le peptide phénylthiocarbonyle **2** afin d'obtenir respectivement les azaGlypeptides **37** et **38** (Figure 67).

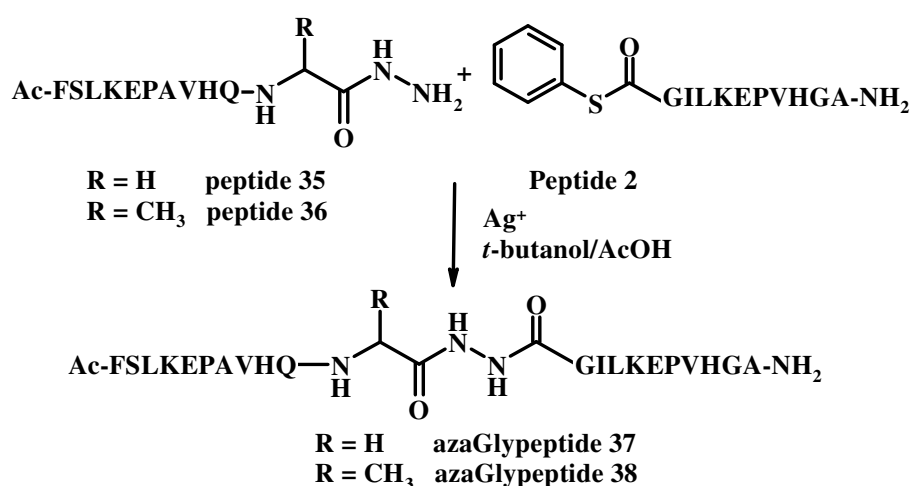


Figure 67 : Ligation azaGly : synthèse des azaGlypeptides 37 et 38

Les conditions expérimentales de la première voie de synthèse, à savoir un mélange *t*-butanol/AcOH (80/20 ; v/v) avec l'argent comme catalyseur, ont permis de préparer avec succès ces deux peptides. En effet, les rendements après purification sont respectivement de 48% et de 41%. Leur caractérisation par RP-HPLC et par électrophorèse capillaire a montré qu'ils possèdent un taux de pureté supérieur à 90%.

Lors de ces ligations, nous avons pu observer l'apparition d'un produit secondaire majeur, le peptide **9**, résultat de l'hydrolyse du peptide **2**. Afin d'évaluer l'importance de l'hydrolyse du peptide **2** par rapport à celle de la formation de l'azaGlypeptide, nous présentons, à la Figure 68, le pourcentage observé par RP-HPLC de l'azaGlypeptide **38** et de **9** en fonction du temps.

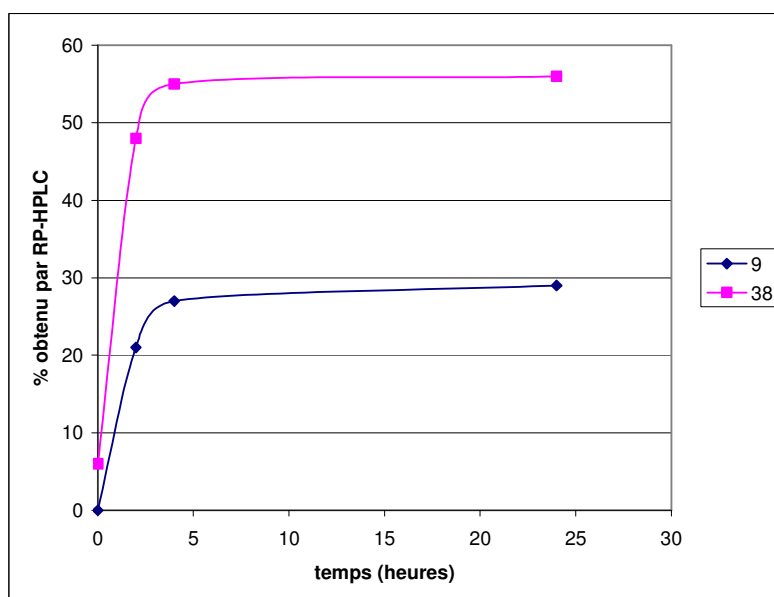


Figure 68 : Pourcentages (rendements RP-HPLC) d'azaGlypeptide 38 et du peptide 9 en fonction du temps
 (Conditions des analyses RP-HPLC : 0-100% B en 30 min, RT, C18 Nucléosil, 215 nm)

Nous pouvons constater que l'hydrolyse du peptide 2 en peptide 9 est de l'ordre de 30% à l'issue de la réaction malgré toutes les optimisations effectuées. Ce pourcentage maximal est néanmoins comparable à celui observé pour la voie A et ne nous a pas empêchés d'isoler les azapeptides avec des rendements très satisfaisants.

Cette seconde méthode de ligation azaGly étant nouvelle, nous devons également confirmer sa chimiosélectivité, c'est-à-dire, s'assurer que la ligation s'opère bien au niveau des extrémités des peptides et non au niveau des amines ϵ des lysines. Pour ce faire, nous avons soumis, à nouveau, les azapeptides 34, 37 et 38 à une digestion par la trypsine. Les fragments peptidiques attendus à la suite de cette digestion enzymatique et dont la masse monoisotopique a été observée grâce à une analyse par MALDI-TOF sont présentés à la Figure 69. Le Tableau 2 regroupe les masses monoisotopiques calculées et observées des différents fragments peptidiques.

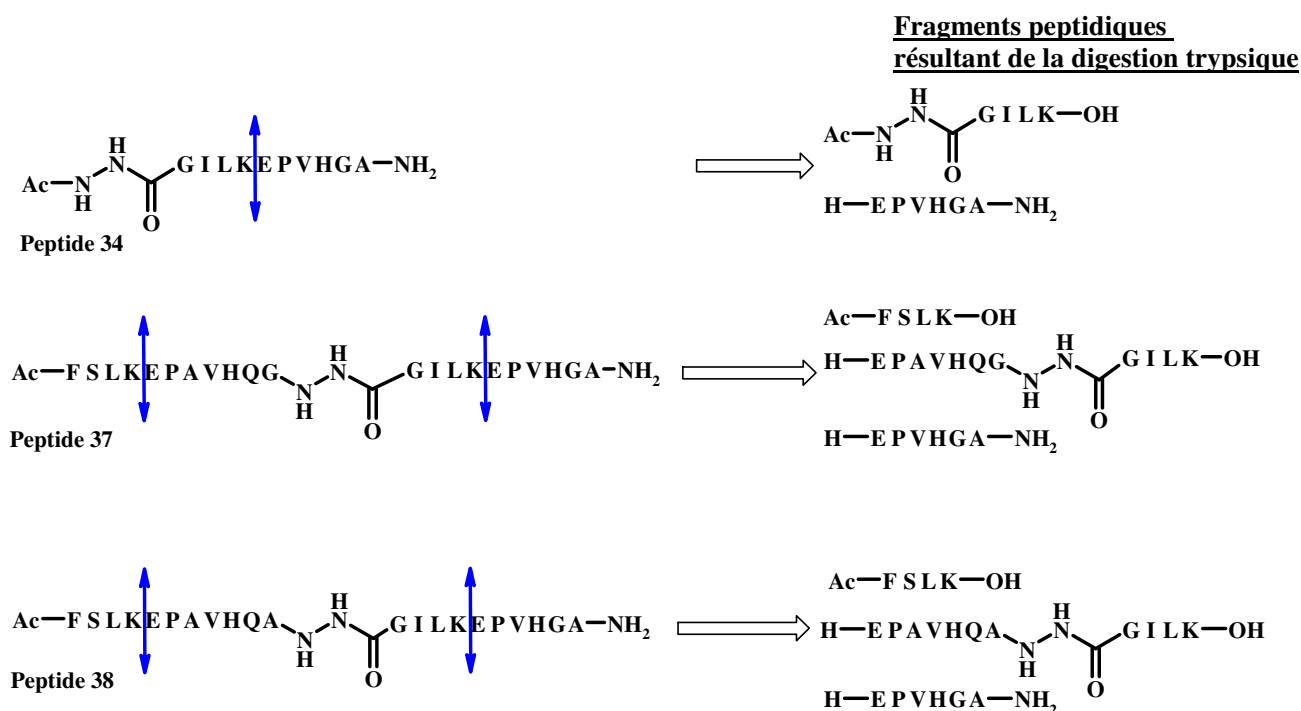


Figure 69 : Structures des fragments peptidiques attendus après digestion trypsique et identifiés par analyse MALDI-TOF du milieu réactionnel

Peptide 34	[M+H]⁺ calculée	[M+H]⁺ observée
Ac-NH-NH-CO-GILK-OH	530.33	530.34
H-EPVHGA-NH ₂	608.31	608.32
Peptide 37	[M+H]⁺ calculée	[M+H]⁺ observée
Ac-FSLK-OH	536.31	536.26
H-EPAVHQG-NH-NH-CO-GILK-OH	1206.66	1206.58
H-EPVHGA-NH ₂	608.31	608.32
Peptide 38	[M+H]⁺ calculée	[M+H]⁺ observée
Ac-FSLK-OH	536.31	536.31
H-EPAVHQA-NH-NH-CO-GILK-OH	1220.67	1220.63
H-EPVHGA-NH ₂	608.31	608.32

Tableau 2 : Masses monoisotopiques calculées et observées des fragments peptidiques (conditions d'analyse MALDI-TOF : α-CN mode réflectron positif)

Les structures des différents fragments témoignent que la ligation azaGly a bien eu lieu au niveau des extrémités des peptides, ce qui est comparable à ce que nous avons observé lors de la voie A. En l'absence d'autres fragments, qui pourraient suggérer des réactions secondaires impliquant l'amine ϵ des lysines, nous pouvons conclure que cette seconde voie de synthèse d'azaGlypeptide est chimiosélective.

La dernière étape importante a été de déterminer le taux de racémisation de l'alanine située au point de jonction entre les peptides. Contrairement à la première voie de synthèse des azapeptides, l'analyse GC-MS chirale des acides aminés des peptides **37** et **38** après hydrolyse acide par le DCI 6N dans le D₂O n'a pas montré de racémisation pour l'alanine présente à l'extrémité C-terminale du peptide hydrazide. Cette voie B de synthèse est donc appropriée pour préparer de manière efficace des azapeptides sans racémisation. Le peptide phénylthiocarbamate a été préparé de façon relativement aisée alors que la synthèse des peptides hydrazides nous a posé quelques problèmes, mais ces derniers ont été résolus par la suite en optimisant les conditions opératoires de l'étape limitante, à savoir l'hydrazinolyse de la peptidyl-résine. Dans les deux voies de synthèse, la ligation azaGly est chimiosélective mais seule la voie B permet d'éviter la racémisation.

Nous avons voulu, par la suite, tester l'efficacité de la voie B pour la préparation de bioconjugués et notamment de lipopeptides. Nous verrons dans le prochain paragraphe comment nous sommes parvenus à introduire des dérivés lipidiques, sous forme d'hydrazidolipides, à un peptide phénylthiocarbonyle pour former des azaGlylipopeptides.

4°) Application de la ligation azaGly à la préparation de lipopeptides

La ligation azaGly nous a paru être une solution suffisamment efficace pour lier des peptides à des dérivés lipidiques connus pour être instables dans les conditions opératoires de la SPPS. La conjugaison de lipides à des peptides permettrait d'augmenter leur temps de demi-vie dans les fluides biologiques¹²⁰. Pour citer un exemple concret de cette application, le

¹²⁰ Jorgensen L, Nielsen HM. Delivery technologies for biopharmaceuticals peptides, proteins, nucleic acids and vaccines. **2009**. *John Wiley & Sons*. 177-181

liraglutide est un lipopeptide analogue du GLP-1 (**G**lucagon-**L**ike **P**eptide-1) en phase III d'étude clinique dans le cadre du traitement du diabète de type 2¹²¹.

Pour préparer des azaGlylipopeptides, nous avons choisi d'utiliser à nouveau le peptide phénylthiocarbamate **2** dans la mesure où nous avons réussi à en obtenir des quantités importantes et qu'il s'est avéré très utile lors de la mise au point des ligations thiocarbamate et azaGly. Concernant la partie lipidique, nous avons opté pour trois types d'acides gras afin de démontrer l'intérêt de la méthode dans différents cas de figure :

- * le premier lipide choisi est un dérivé du cholestérol ;
- * le second est l'acide oléique possédant une chaîne carbonée à 18 carbones et une insaturation ;
- * le troisième est l'acide linoléique possédant également une chaîne C18 mais deux insaturations.

Les structures chimiques des acides gras choisis pour cette étude sont présentées à la Figure 70.

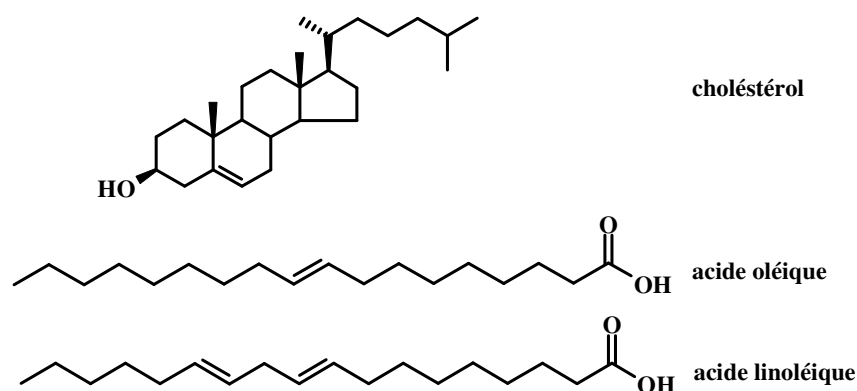


Figure 70 : Structures chimiques des acides gras sélectionnés pour la préparation de lipopeptides par ligation azaGly

Pour introduire une fonction hydrazide, nous avons employé deux stratégies de synthèse en fonction des matières premières qui se trouvaient à notre disposition. En effet, nous disposions du cholestéryl chloroformate et il suffisait de le faire réagir avec l'hydrate d'hydrazine dans un mélange THF/CH₂Cl₂ (1/1, v/v) afin d'obtenir l'hydrazidolipide **39** (Figure 71).

¹²¹ Russel-Jones. Molecular, pharmacological and clinical aspects of liraglutide, a once-daily human GLP-1 analogue. *Mol. Cell Endoc.* **2009**. 297, 137-140

Les rendements de synthèse se sont révélés très satisfaisants, car ils ont été supérieurs à 80% pour ces trois composés. Ces hydrazidolipides ont été caractérisés par MALDI-TOF et leur pureté par CCM a été jugée satisfaisante pour réaliser les ligations azaGly avec le peptide phénylthiocarbamate **2** sans purification supplémentaire.

Des essais préliminaires de ligation ont montré que les conditions opératoires de la ligation azaGly, à savoir un mélange *t*-butanol/AcOH (80/20, v/v) en présence de deux équivalents d'argent, n'étaient pas optimales pour mener à bien la réaction selon le schéma réactionnel de la Figure 73.

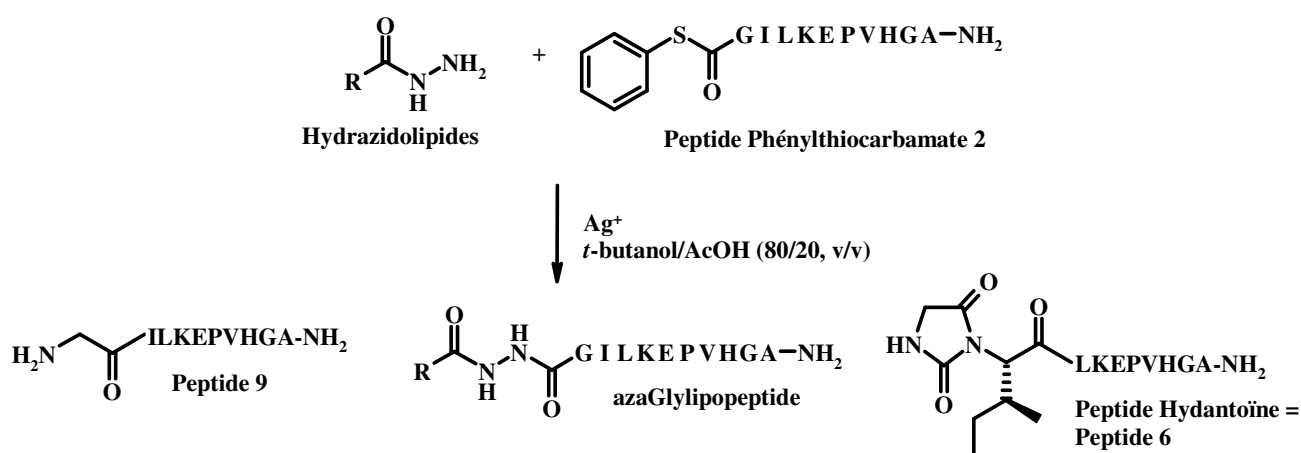


Figure 73 : Schéma général de la synthèse des azaGlylipopeptides et produits secondaires observés

Lors de la synthèse d'azaGlylipopeptides, nous avons observé que le peptide **2** se dégradait de façon plus importante que ce que nous avons constaté lors de la préparation des azapeptides (Figure 62, page 79). En effet, dans les voies A et B décrites précédemment, nous avons pu voir qu'environ 30% du peptide **2** était hydrolysé après 24 heures de réaction. Dans le cas de la synthèse d'azaGlylipopeptides, le suivi de la ligation par RP-HPLC conjointement à une analyse par MALDI-TOF nous ont permis de déterminer qu'il se formait 65% du peptide **9** et 8% du peptide **6**, contre seulement 27% de l'azaGlylipopeptide (chromatogrammes RP-HPLC non représentés).

Nous avons alors émis l'hypothèse que ces pourcentages élevés de produits secondaires provenaient peut-être d'un manque de solubilité des hydrazidolipides dans un tel tampon, ce qui les rendaient alors moins disponibles pour la ligation et favorisait la dégradation du peptide **2**. Nous avons déjà rencontré des problèmes de solubilité lors de la synthèse de MAPs par la ligation thiocarbamate et l'ajout d'un co-solvant organique, le *t*-

butanol, nous a permis de surmonter cette difficulté (page 65). Pour la ligation azaGly, nous avons néanmoins choisi d'ajouter un faible volume de CH₂Cl₂ (5%). De plus, nous avons déjà évoqué le fait (page 71) que l'ajout d'un solvant organique dans un tampon aqueux augmente son pH apparent, ce qui risquerait alors de déprotoner les amines ε des lysines et de diminuer la chimiosélectivité de la ligation. Cette modification minime des conditions de la ligation azaGly a permis de résoudre le défaut de solubilité des hydrazidolipides et nous n'avons observé que 30% d'hydrolyse du peptide 2 à l'issue de la ligation, c'est-à-dire une valeur proche de ce qui a été observé lors de la synthèse des azapeptides.

Le Tableau 3 regroupe les structures et les rendements des azaGlylipopeptides obtenus.

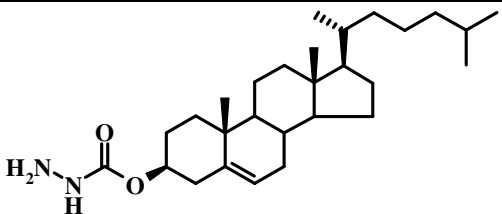
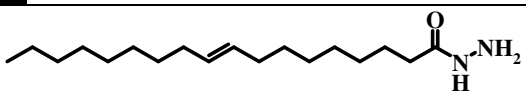
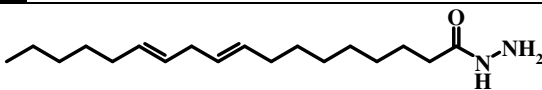
<u>Hydrazidolipides</u>	<u>Peptide</u> <u>phénylthiocarbonyle</u>	<u>azaGly-</u> <u>lipopeptide</u>	<u>Rdt</u>
 <p><u>39</u></p>	<u>2</u>	<u>42</u>	39%
 <p><u>40</u></p>		<u>43</u>	36%
 <p><u>41</u></p>		<u>44</u>	33%

Tableau 3 : Application de la ligation azaGly à la synthèse d'azaGlylipopeptides

Par rapport aux rendements de synthèse des azapeptides (40% en moyenne), nous avons constaté que ceux des azaGlylipopeptides étaient généralement plus faibles (36% en moyenne). Ceci peut s'expliquer par la faible solubilité des azaGlylipopeptides dans le mélange aqueux, constitué majoritairement d'eau, utilisé lors de la purification par RP-HPLC préparative. La difficulté de purifier les lipopeptides par RP-HPLC est bien connue.

Pour conclure sur cette partie, la ligation azaGly est une méthode efficace de préparation d'azapeptides mais également d'azaGlylipopeptides. Elle se déroule dans un

mélange aqueux à pH acide et en présence d'un sel d'argent comme catalyseur. Concernant la préparation des azapeptides, deux voies de synthèse ont été explorées. La première, entre des peptides thioester et hydrazinocarbonyle, a abouti à la formation des azapeptides avec des rendements satisfaisants mais nous avons observé un phénomène de racémisation. Par contre, l'utilisation de la seconde voie, entre des peptides hydrazide et phénylthiocarbonyle, a été tout aussi efficace et aucune racémisation n'a été relevée. Une optimisation de la synthèse des peptides hydrazides pourrait être envisagée et a d'ailleurs été initiée ultérieurement au laboratoire par le Docteur Reda Mhidia. Il a pu constater alors qu'en augmentant significativement la durée de l'hydrazinolyse, les rendements finaux étaient nettement améliorés. La ligation azaGly a été ensuite appliquée à la préparation de trois types de lipopeptides. Dans ce cadre, les conditions réactionnelles ont été modifiées (ajout d'un co-solvant organique), afin de favoriser la solubilisation des hydrazidolipides et nous avons pu isoler des quantités très satisfaisantes de ces molécules. Il serait envisageable d'améliorer les méthodes de synthèse, en travaillant à plus grande échelle ou en optimisant l'étape limitante de la purification par RP-HPLC.

D°) Partie expérimentale

Généralités

Méthodes d'analyses

La chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

Les analyses et les purifications ont été réalisées en phase inverse. Le gradient d'éluion est un mélange d'éluants A (H₂O/TFA 0,05%) et B (Acétonitrile 80%/H₂O 20%/TFA 0,05%). Pour la synthèse des peptides hydrazinocarbonyles **26** et **27**, l'éluant A est une solution à 10 mM en TEAA et le B est un mélange d'*i*-PrOH/H₂O (2/3 ; v/v) contenant 10 mM en TEAA.

Les analyses ont été effectuées sur un modèle CBM-10-A (Shimadzu) avec un débit de 1 mL/min, une colonne C18 Nucléosil (4,6 × 250 mm) à 30°C et à la longueur d'onde de détection de 215 nm. Seuls les peptides hydrazides **35** et **36** ont été analysés sur une colonne de type C3 Zorbax. 70µL d'une solution à 1 mg/mL de peptide ont été injectés.

La spectrométrie de masse

La matrice utilisée a été l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -CHCA) pour l'analyse des peptides. Pour l'analyse des molécules organiques de faible poids moléculaire, le DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) a été utilisé.

Les spectres des peptides ont été obtenus en mode réflectron positif avec une accélération de 20 kV. 1µL de l'échantillon a été mélangé avec 1µL de matrice sur une plaque MALDI-TOF. La cristallisation a été effectuée à température ambiante puis l'analyse a été réalisée sur un appareil PerSeptive Biosystems Voyager DETM-STR (Applied Biosystems, Palo Alto, CA). Les analyses ont été effectuées en mode réflectron positif pour les peptides chargés positivement. Par contre, les peptides chargés négativement de la Partie 2 ont été analysés en utilisant un mode linéaire négatif.

L'électrophorèse capillaire

Les analyses ont été effectuées sur un système 32 Karat™ Software Version 5.0 de chez Beckman Coulter à l'aide d'un capillaire en silice fondue (75 µm × 50 cm). Les éluants utilisés sont du citrate de sodium (pH = 3 ; 20 mM) et de l'acétate de sodium (pH = 4,5 ; 50 mM).

La résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker à 300 MHz pour le proton ¹H et 75,4 MHz pour le carbone ¹³C. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en parties par millions (ppm) par rapport à une référence interne, le tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz (Hz).

Provenance des produits

Les solvants les plus utilisés (Et₂O, DMF, CH₃CN, THF, CH₂Cl₂) proviennent de chez Acros. L'Et₂O (qualité >99,5%) utilisé pour la précipitation des peptides a été stabilisé avec du BHT (2,6-di-*t*-butyl-4-méthylphénol). L'HBTU, le TBTU proviennent de chez Iris Biotech GmbH. La DIEA, le TFA et la pipéridine sont de chez SigmaAldrich. L'anhydride acétique provient de chez Fluka. La résine NovaSyn TGR® provient de chez Novabiochem. Les acides aminés proviennent de chez Novabiochem, Senn Chemicals, ou Iris Biotech GmbH. Les colonnes Nucléosil C18 semi-préparative et analytique ont été fabriquées au laboratoire.

Synthèse Peptidique en Phase Solide (SPPS)

Les peptides ont été synthétisés à l'aide d'une résine NovaSyn TGR® dont la charge et l'échelle ont été précisées selon les cas. La stratégie de synthèse adoptée a été de type Fmoc/*t*-butyle. Les protections des chaînes latérales des acides aminés ont été les suivantes : Arg(Boc), Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(*Ot*-Bu), His(Trt), Ser(*t*-Bu), Thr(*t*-Bu), Trp(Boc), Tyr(*t*-Bu). Seule la lysine peut être protégée par différents groupements protecteurs qui ont été précisés selon les cas : Lys(Boc), Lys(Mtt), Lys(Fmoc).

Synthétiseur de peptides à micro-ondes Liberty (CEM μ WAVES, Saclay, France)

Le couplage d'un acide aminé a été effectué grâce au mélange de trois solutions :

- * l'acide aminé à 0,2 M dans le DMF ;
- * l'HBTU à 0,5 M dans le DMF ;
- * la DIEA à 2 M dans le NMP.

A la fin de chaque couplage, la peptidyl-résine a été déprotégée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc et l'amine a été acétylée à l'aide d'un mélange d'anhydride acétique (3%) et de DIEA (0,3%) dans le DMF. A la fin de la synthèse, la peptidyl-résine a été déprotégée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF, puis elle peut être acétylée avec un mélange d'anhydride acétique (3%) et de DIEA (0,3%) dans le DMF.

Synthétiseur de peptides MultiPep RS (Intavis, Bioanalytical Instruments AG)

Le couplage d'un acide aminé a été effectué grâce au mélange de trois solutions :

- * l'acide aminé à 0,68 M dans le DMF ;
- * l'HBTU à 0,6 M dans le DMF ;
- * la DIEA à 2 M dans le NMP.

A la fin de chaque couplage, la peptidyl-résine a été déprotégée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc et l'amine a été acétylée à l'aide d'un mélange d'anhydride acétique (3%) et de DIEA (0,3%) dans le DMF. A la fin de la synthèse, la peptidyl-résine a été déprotégée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF, puis elle est acétylée avec un mélange d'anhydride acétique (10%) et de DIEA (5%) dans le DMF.

Procédure générale pour la synthèse peptidique manuelle

L'acide aminé (4 éq) et le TBTU (4 éq) ont été dissous dans le minimum de DMF. Le TBTU a été ajouté sur l'acide aminé puis la DIEA (4 éq) a été ajoutée sur l'ensemble. Après 1 minute d'agitation, ce mélange a été additionné sur la peptidyl-résine placée dans un réacteur possédant un fritté. Après 1h d'agitation, la peptidyl-résine a été lavée avec le DMF et un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine.

Test TNBS¹²³

Solution 1 : DIEA à 10% dans le DMF ;

Solution 2 : acide 2,4,6-trinitrobenzensulfonique (TNBS).

Un aliquote de résine placé dans un tube à essais a été lavé à l'éthanol (2 fois). Deux gouttes de chaque solution ont été ajoutées sur les grains de résine. Le mélange a été laissé 1 min à température ambiante. La présence d'amines libres conduit à une coloration rouge-orangé des billes de résine alors que leur absence conduit à des billes incolores (Figure 74).

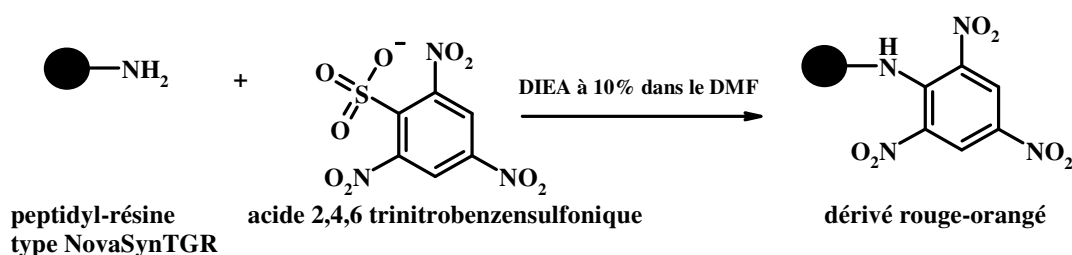


Figure 74 : Schéma de principe du test TNBS

Déprotection du groupement Fmoc

La peptidyl-résine a été déprotégée à l'aide d'une solution de pipéridine à 20% dans le DMF (1 × 5 min et 1 × 15 min) afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α entre chaque couplage et en fin de synthèse. La peptidyl-résine a ensuite été lavée avec le DMF (3 × 2 min).

Déprotection Mtt¹²⁴

La peptidyl-résine, placée dans un réacteur équipé d'un fritté, a été conditionnée dans le CH_2Cl_2 (3 × 2 min). La peptidyl-résine a été lavée avec une solution de TFA à 1% dans le CH_2Cl_2 (8 éq TFA/Mtt). 200 μL du filtrat de chaque lavage ont été évaporés à sec. Le résidu a été repris dans 1 mL d'une solution $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}/\text{THF}$ stabilisé par du BHT (10/5/5, v/v/v). 30 μL de cette solution ont été analysés par RP-HPLC (2 mL/min, colonne TSK gel, 215 nm, 0-100% de B en 10 min, 50°C). Quand le Mtt-OH a disparu du chromatogramme, la peptidyl-

¹²³ Hancock WS, Battersby JE. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzene-sulphonic acid. *Anal. Biochem.* **1976**. 71, 260-264

¹²⁴ Bourel L, Carion O, Gras-masse H, Melnyk O. The deprotection of Lys(Mtt) revisited. *J. Pept. Sci.* **2000**. 6. 264-270

résine a été lavée avec une solution de DIEA à 5% dans le CH₂Cl₂ (5 × 2 min), puis avec du CH₂Cl₂ (3 × 2 min). Un test TNBS a montré la présence d'amine primaire sur la résine.

Couplage du phénylthiochloroformiate (PhSCOCl)¹²⁵

La peptidyl-résine a été conditionnée dans le THF (8 × 2 min). Le THF (4 mL), l'Et₃N (4 éq) et le PhSCOCl (4 éq) ont été ajoutés dans cet ordre sur la peptidyl-résine. Après 1h d'agitation, la peptidyl-résine a été lavée avec le THF (3 × 2 min), puis le DMF (3 × 2 min). Un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine.

Déprotection des chaînes latérales et séparation du peptide de son support

La peptidyl-résine a été lavée avec le CH₂Cl₂ (3 × 2 min), avec l'Et₂O (2 × 2 min), et séchée sous vide. La déprotection des chaînes latérales et de coupure a été effectuée à l'aide d'une solution constituée majoritairement de TFA et de scavengers dont la nature chimique et les proportions ont été précisées au cas par cas. Cette solution a été ajoutée sur la peptidyl-résine placée dans un réacteur équipé d'un fritté. Après agitation, le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (1/1 ; v/v). Après centrifugation (3500 trs/min ; 10 min ; 4°C), le culot a été lavé deux fois avec cette solution et centrifugé. Le culot final a été repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé.

Purification des composés par RP-HPLC préparative

La purification a été effectuée à l'aide d'un système 600 Controller (Waters) sur une colonne C18 Nucléosil (120 mm, 5 µm, 300 Å), à la longueur d'onde de détection de 215 nm, avec un débit de 6 mL/min sauf cas contraires précisés. La purification a été effectuée à température ambiante, sauf pour les azaGlylipopeptides (**42**, **43**, **44**) pour lesquels la purification a été effectuée à 70°C.

La colonne C18 Nucléosil a été préalablement conditionnée à l'aide du tampon B puis avec le tampon A avec un débit de 6mL/min. Le peptide (30 mg maximum dans 3,5 mL maximum) a été injecté grâce à une boucle d'injection de 5 mL avec un débit d'élution de 6 mL/min. Le composé a été dissous dans un volume de tampon A inférieur à 4 mL. Il a été injecté sur une colonne C18 Nucléosil préparative. Pour chaque produit, le gradient utilisé a été précisé. Les fractions séparées grâce à un collecteur automatique ont été analysées par RP-

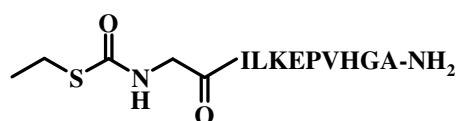
¹²⁵ Besret S, Ollivier N, Blanpain A, Melnyk O. Thiocarbamate-linked peptides by chemoselective peptide ligation. *J. Pept. Sci.* **2008**. 14, 1244-1250

HPLC analytique (1 mL/min, 215 nm, 0 à 100% de B en 30 min, 30°C). Les fractions les plus pures ont été regroupées, congelées et lyophilisées.

1°) Ligation thiocarbamate

1.1°) Synthèse des peptides

Peptide 1



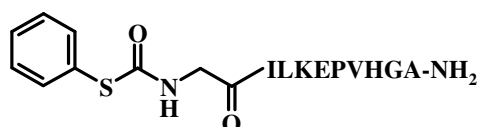
Le peptide H-GILK(Boc)E(*t*-Bu)PVH(Trt)GA a été préparé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,05 mmol, 0,23 mmol/g) à l'aide du synthétiseur automatique de peptides Pioneer[™]. La peptidyl-résine a été lavée au THF fraîchement distillé (8 × 2 min), puis mis en contact avec l'éthylthiochloroformate (4 éq, 21 µL) et l'Et₃N distillée (4 éq, 26 µL) dans le THF (2 mL) pendant 1h30. La peptidyl-résine a ensuite été lavée avec du THF (3 × 2 min), du CH₂Cl₂ (3 × 2 min), de l'Et₂O (2 × 2 min) et séchée sous vide. La déprotection finale et la séparation du peptide de son support ont été effectuées grâce à un mélange TFA/H₂O/thioanisole (5 mL, 96,5/2,5/1 ; v/v/v) pendant 1h. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (50 mL, 1/1 ; v/v) et centrifugé (10 min, 3500 trs/min, 4°C). Le solide blanc obtenu a été solubilisé dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Il a été purifié par RP-HPLC (0-33% de B en 33 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 30,1 mg du peptide 1 ont été obtenus (Rdt = 45%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 98%, acétate (10 min, 10 kV) : > 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₄₉H₈₂N₁₄O₁₃S [M+H]⁺ = 1107.6, observée 1107.3.

Peptide 2



Le peptide H-GILK(Boc)E(*t*-Bu)PVH(Trt)GA a été préparé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,3 mmol, 0,23 mmol/g) à l'aide du synthétiseur automatique de peptides Pioneer[™]. La peptidyl-résine a été lavée au THF fraîchement distillé (8 × 2 min), puis mise en réaction

avec le phénylthiochloroformate (4 éq, 173 μ L) et l'Et₃N (4 éq, 154 μ L) dans le THF (12 mL) pendant 1h30. La peptidyl-résine a ensuite été lavée avec le THF (3 \times 2 min), du CH₂Cl₂ (3 \times 2 min), de l'Et₂O (2 \times 2 min) et séchée sous vide. La déprotection finale et la séparation du peptide de son support ont été effectuées grâce à un mélange TFA/H₂O/thioanisole (30 mL, 96,5/2,5/1 ; v/v/v) pendant 1h. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (300 mL, 1/1 ; v/v) et centrifugé (10 min, 3500 trs/min, 4°C). Le solide blanc obtenu a été solubilisé dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Il a été purifié par RP-HPLC (0-20% de B en 10 min, 20-35% de B en 30 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 201 mg du peptide **2** ont été obtenus (Rdt = 55%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 98%, acétate (10 min, 10 kV) : > 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₅₃H₈₂N₁₄O₁₃S [M+H]⁺ = 1155.6, observée 1155.6.

Peptide 12

H-CYG-NH₂

Le peptide H-C(Trt)Y(O-*t*Bu)G a été préparé sur une résine Novasyn TGR[®] (0,25 mmol, 0,27 mmol/g) à l'aide du synthétiseur de peptides CEM. La résine a ensuite été lavée au CH₂Cl₂ (2 \times 2 min) puis à l'Et₂O (2 \times 2 min) et séchée sous vide. La déprotection des chaînes latérales et la séparation du peptide de son support ont été effectuées grâce à un mélange TFA/H₂O/EDT/TIS (8 mL, 94/2,5/2,5/1 ; v/v/v/v) pendant 1h. Le peptide a été précipité dans un mélange froid Et₂O/*n*-heptane (250 mL, 1/1, v/v) et centrifugé (10 min, 3500 trs/min, 4°C). Le solide blanc obtenu a été solubilisé dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. 84,3 mg du peptide **12** ont été obtenus (Rdt = 74%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 95%

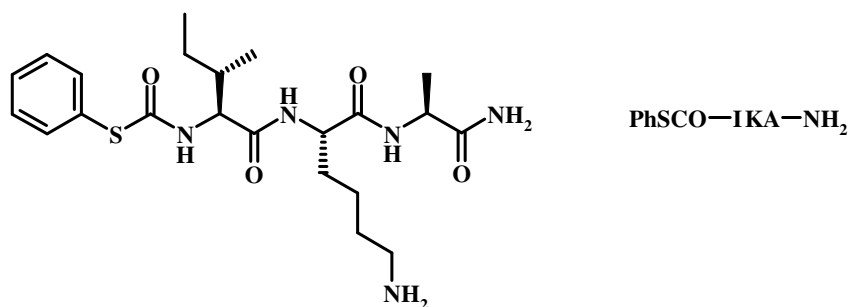
CZE citrate (15 min, 15 kV) : 97%, acétate (10 min, 10 kV) : 97%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₁₄H₂₀N₄O₄S [M+H]⁺ = 341.1, observée 341.2.

RMN ¹H (300 MHz, DMF-d₇) δ ppm : 2,94 (1H, m, H β Tyr), 3,15 (1H, m, H β' Tyr), 3,18-3,27 (2H, m, CH₂ Cys), 3,84 (2H, m, CH₂ Gly), 4,41 (1H, T, CH α Cys), 4,60 (1H, CH Tyr), 6,77 (2H, D, J=8,7Hz, H aro Tyr), 7,10 (2H, S, NH₂ Cys), 7,12 (2H, D, J=8,7Hz, H aro Tyr), 7,34 (2H, S, CONH₂), 8,44 (1H, T, NH Gly), 8,98 (1H, m, NH Tyr)

RMN ¹³C (75,4 MHz, DMF-d₇) δ ppm : 28,1, 28,3, 39,2, 39,4, 44,5, 58,8, 59,1, 118,3, 132,5

Peptide 13



Le peptide H-IK(Boc)A a été préparé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,25 mmol, 0,27 mmol/g) à l'aide du synthétiseur automatique de peptides CEM. La peptidyl-résine a été lavée avec du THF fraîchement distillé (8 × 2 min), puis mise en réaction avec le phénylthiochloroformate (1 éq, 36 µL) et la NMM (1 éq, 27 µL) dans le THF (3 mL) pendant 30 min. La peptidyl-résine a ensuite été lavée avec le THF (3 × 2 min), du CH₂Cl₂ (3 × 2 min), de l'Et₂O (2 × 2 min) et séchée sous vide. La déprotection finale et la séparation du peptide de son support ont été effectuées grâce à un mélange TFA/H₂O/thioanisole (8 mL, 96,5/2,5/1 ; v/v/v) pendant 1h. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (250 mL, 1/1 ; v/v) et centrifugé (10 min, 3500 trs/min, 4°C). Le solide blanc obtenu a été solubilisé dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. 111,8 mg du peptide **13** ont été obtenus (Rdt = 77%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 97%

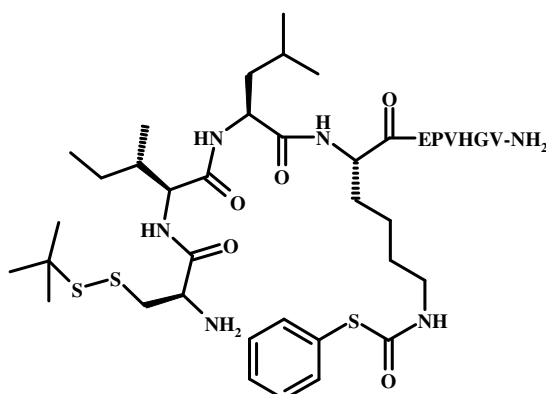
CZE citrate (15 min, 15 kV) : 96%, acétate (10 min, 10 kV) : 93%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₂₂H₃₅N₅O₄S [M+H]⁺ = 466.2, observée 466.1.

RMN ¹H (300 MHz, DMF-d₇) δ ppm : 0,88 (3H, t, CH₃ δIle), 0,95 (3H, d, CH₃ γIle), 1,32 (3H, d, CH₃ Ala), 1,34 (1H, m, 1,50 (3H, m, CH₂ εLys γ'Ile), 1,83 (5H, m, CH₂ δLys γLys βIle), 3,03 (2H, m, CH₂ βLys), 4,35 (3H, m, CH αLys, αIle, αAla), 7,09 (1H, s, CONH₂), 7,54 (6H, m, ArH, CONH₂), 7,97 (1H, d, NH Ala), 8,28 (1H, d, NH Lys), 8,41 (1H, d, NH Ile).

RMN ¹³C (75,4 MHz, DMF-d₇) δ ppm : 13,0; 13,2; 16,6; 17,6; 20,3; 20,4; 24,7; 26,8; 27,2; 29,1; 29,2; 33,5; 33,7; 39,1; 39,3; 41,7; 41,8; 51,0; 55,3; 59,7; 62,4; 72,7; 131,3; 131,4; 131,6; 137,5; 167,4; 170,6; 173,2; 173,4; 173,5; 177,0

Peptide 15



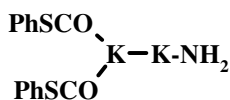
Le peptide H-C(S-*t*Bu)ILK(Mtt)E(*t*Bu)PVH(Trt)GV a été préparé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,19 mmol, 0,23 mmol/g) à l'aide du synthétiseur automatique de peptides Pioneer[™]. Le Boc₂O (415 mg, 10 éq) solubilisé dans le DMF a été mis en contact avec la peptidyl-résine pendant 1h. La résine a ensuite été lavée avec du DMF (4 × 2 min) et du CH₂Cl₂ (4 × 2 min). La déprotection sélective du groupement Mtt a été effectuée en lavant la résine avec une solution de TFA à 1% dans le CH₂Cl₂ (17 × 11,4 mL). La peptidyl-résine a ensuite été lavée avec une solution à 5% de DIEA dans le CH₂Cl₂ (5 × 2 min), puis avec le CH₂Cl₂ (6 × 2 min). La peptidyl-résine a été lavée avec du THF fraîchement distillé (8 × 2 min), puis mise en réaction avec le phénylthiochloroformate (4 éq, 110 μL) et l'Et₃N (4 éq, 107 μL) dans le THF (7,6 mL) pendant 2h. La peptidyl-résine a ensuite été lavée avec du THF (4 × 2 min), du CH₂Cl₂ (6 × 2 min), de l'Et₂O (2 × 2 min) et séchée sous vide. La déprotection finale et la séparation du peptide de son support ont été effectuées grâce à un mélange TFA/H₂O/thioanisole (10 mL ; 96,5/2,5/1 ; v/v/v) pendant 1h. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (200 mL, 1/1 ; v/v) et centrifugé (10 min, 3500 trs/min, 4°C). Le solide blanc obtenu a été solubilisé dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Il a été purifié par RP-HPLC (0-35% de B en 15 min, 35-50% de B en 50 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 33,9 mg du peptide **15** ont été obtenus (Rdt = 17,5%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 91%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 98%, acétate (10 min, 10 kV) : > 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₆₀H₉₆N₁₄O₁₃S₃ [M+H]⁺ = 1317,7, observée 1317,9.

Peptide 17



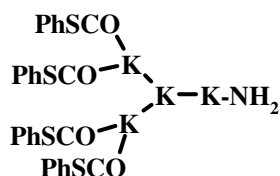
Le peptide Fmoc-K(Fmoc)K(Boc) a été préparé manuellement sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,025 mmol, 0,23 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été déprotégée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF (1 × 5 min, 1 × 15 min) afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α et ϵ . La peptidyl-résine a été lavée avec du THF fraîchement distillé (8 × 2 min), puis mise en réaction avec le phénylthiochloroformate (2 éq, 7,2 μ L) et l'Et₃N (2 éq, 5,6 μ L) dans le THF (500 μ L) pendant 30 min. La peptidyl-résine a ensuite été lavée avec le THF (3 × 2 min), du CH₂Cl₂ (3 × 2 min), de l'Et₂O (2 × 2 min) et séchée sous vide. La déprotection finale et la séparation du peptide de son support ont été effectuées grâce à un mélange TFA/H₂O/thioanisole (2,5 mL, 96,5/2,5/1 ; v/v/v) pendant 1h. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (50 mL, 1/1 ; v/v) et centrifugé (10 min, 3500 trs/min, 4°C). Le solide blanc obtenu a été solubilisé dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Il a été purifié par RP-HPLC (0-35% de B en 30 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 7 mg du peptide **17** ont été obtenus (Rdt = 42%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 91%, acétate (10 min, 10 kV) : 88%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₂₆H₃₅N₅O₄S₂ [M+H]⁺ = 546.2, observée 546.2.

Peptide 19



Le peptide **19** a été obtenu de la même façon que le peptide **17** sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,1 mmol, 0,23 mmol/g). 15,8 mg du peptide **19** ont été obtenus (Rdt = 13%).

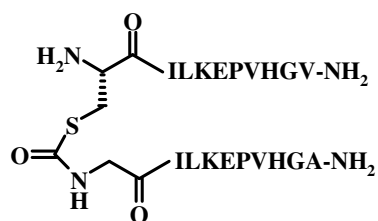
Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 93%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 93%, acétate (10 min, 10 kV) : 84%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₅₂H₆₇N₉O₈S₄ [M+H]⁺ = 1074.4, observée 1074.5.

1.2°) Ligations

Peptide 5



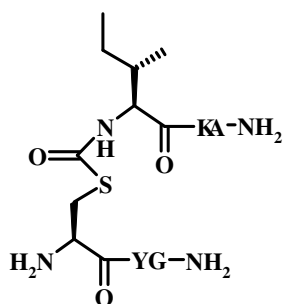
La ligation entre le peptide 2 (9,6 mg, 7,0 μ mol) et le peptide 3 (10,0 mg, 7,0 μ mol) a été réalisée dans un tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH = 7,48) contenant 4% en volume de thiophénol sous argon et à 20°C. La concentration finale en peptide était de 50 mM. Après 24h d'agitation, le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC (0-25% de B en 20 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 11,9 mg du peptide 5 ont été obtenus (Rdt = 66%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 94%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 98%, acétate (10 min, 10 kV) : 96%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{96}H_{160}N_{28}O_{25}S$ $[M+H]^+ = 2138.2$, observée 2138.1.

Peptide 14



La ligation entre le peptide 12 (29,9 mg, 66,0 μ mol) et le peptide 13 (38,1 mg, 66,0 μ mol) a été réalisée dans un tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH = 7,45) contenant 4% en volume de thiophénol sous argon et à 20°C. La concentration finale en peptide était de 50 mM. Après 24h d'agitation, le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC (0-20% de B en 66 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 37,9 mg du peptide 14 ont été obtenus (Rdt = 71%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 98%

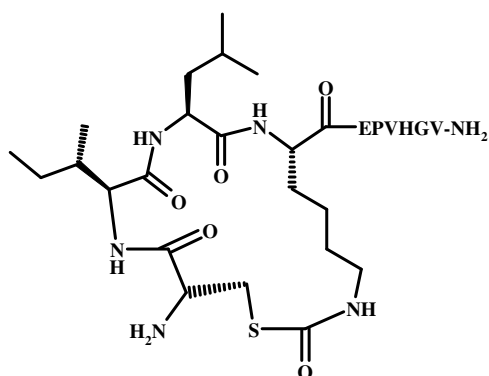
CZE citrate (15 min, 15 kV) : 98%, acétate (10 min, 10 kV) : 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{30}H_{49}N_9O_8S$ $[M+H]^+ = 696.3$, observée 696.2.

RMN ^1H (300 MHz, DMF-d7) δ ppm : 0,85 (3H, t, CH_3 δ Ile), 0,92 (3H, d, CH_3 γ Ile), 1,22 (1H, m, CH_2 γ Ile), 1,30 (3H, d, CH_3 β Ala), 1,53 (3H, m, CH_2 ϵ Lys γ' Ile), 1,80 (3,08 (4H, m, H $\beta\beta'$ Tyr, CH_2 β Lys), 3,47 (2H, m, CH_2 Cys), 3,85 (2H, t, CH_2 Gly), 4,25 (1H, t, CH α Ile), 4,32 (1H, T, CH α Cys), 4,37 (2H, m, CH α Ala, Lys), 4,64 (1H, dd, CH α Tyr), 6,73 (2H, d, J 8.5, $\text{H}_{3,5}$ Tyr), 7,10 (2H, d, J 8.4, $\text{H}_{2,6}$ Tyr), 7,14 (1H, s, CONH_2), 7,19 (1H, s, CONH_2), 7,45 (1H, s, CONH_2), 7,59 (1H, s, CONH_2), 8,07 (1H, d, NH Ala), 8,20 (1H, d, NH Lys), 8,33 (1H, t, NH Gly), 8,63 (1H, d, NH Ile), 8,92 (1H, d, NH Tyr).

RMN ^{13}C (75,4 MHz, DMF-d7) δ ppm : 13,2; 17,6; 20,5; 24,8; 27,3; 29,3; 39,2; 41,9; 44,7; 51,1; 55,2; 55,8; 58,0; 62,9; 117,5; 130,1; 132,8; 159,0; 168,3; 169,9; 173,3; 173,5; 173,7; 173,9; 177,2.

Peptide 16



Le peptide **15** (17,9 mg, 11,6 μmol) a été dissout dans 116 mL d'un tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH = 7,50) contenant 4,7 mL de thiophénol sous argon et à 20°C. Après 26h d'agitation, le thiophénol a été extrait par des lavages du milieu réactionnel au cyclohexane (6 \times 120 mL) et le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC (0-20% de B en 20 min, 20-50% de B en 100 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 9,5 mg du peptide **16** ont été obtenus (Rdt = 66%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 98%, acétate (10 min, 10 kV) : > 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $\text{C}_{50}\text{H}_{82}\text{N}_{14}\text{O}_{13}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1119.6$, observée 1119.8.

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 93%, acétate (10 min, 10 kV) : 95%

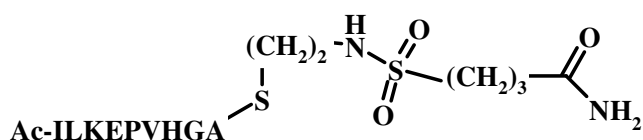
ESI (30V, T°C source : 80°C, T°C désolvation : 120°C) C₂₂₄H₃₇₉N₆₅O₅₆S₄ m/z calculé pour [M+4H]⁴⁺ = 1252.1, observée 1252.9 ; calculé pour [M+5H]⁵⁺ = 1001.9, observée 1001.5.

2°) Ligation azaGly

2.1°) Voie A

2.1.1°) Synthèse des peptides

Peptide 22



Réaction du brométhanol avec le thiolate potassique de triisopropylsilane

Le bromoéthanol (1,2 éq) a été additionné goutte à goutte sous argon, à 0°C, à une suspension de thiolate de triisopropylsilane (1 éq) dans du THF préalablement distillé. Après 15 min d'agitation, le bain de glace a été enlevé et le milieu réactionnel a été laissé pendant 4h30 sous agitation à température ambiante. Après filtration et lavage du précipité blanc obtenu avec du THF, les phases organiques ont été regroupées et évaporées à sec. Le résidu a ensuite été purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt/cyclohexane ; 1,5/8,5 ; v/v). 840 mg d'une huile incolore ont été obtenus (Rdt = 71%).

Analyse élémentaire : calculés 56,35 % C, 11,18% H, 13,68% S, 11,98% Si, observés 56,5% C, 10,9% H, 13,9% S.

HRMS (CI/CH₄) : masse calculée pour C₁₁H₂₆OSSi [M+H]⁺ = 235.15, observée 235.15.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ ppm : 1,12 (d, 18H, 6,7Hz, -CH(CH₃)₂), 1,27 (m, 3H, -CH(CH₃)₂), 2,21 (t large, 1H, HOCH₂-), 2,76 (t, 2H, 6,1Hz, -SCH₂-), 3,73 (m, 2H, -OCH₂-).

RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) δ ppm : 12,62 (-CH(CH₃)₂), 18,38 (-CH(CH₃)₂), 29,07 (-SCH₂-), 63,32 (-OCH₂-).

Elongation du peptide sulfonamide

La résine NovaSyn TGR[®] (0,50 mmol, 0,18 mmol/g) a été fonctionnalisée par le linker 3-carboxypropane sulfonamide. L'élargissement du peptide Ac-ILK(Boc)E(O-*t*Bu)PVH(Trt)GA a été effectué selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle à l'aide du synthétiseur automatique de peptides Pioneer[™].

Alkylation du peptide sulfonamide

Le bromoéthanol protégé par le thiolate de triisopropylsilane (7 équ) et le PPh₃ (7 équ) ont été dissous dans le THF fraîchement distillé et ajoutés sur la peptidyl-résine sous argon et à 0°C. La DEAD (9 équ) a été additionnée sur l'ensemble. Après 18h d'agitation à température ambiante, la peptidyl-résine a été lavée par du THF (6 × 2 min), du CH₂Cl₂ (4 × 2 min) et du THF (3 × 2 min).

Une solution de TBAF (1M dans le THF, 1 mL) a été mélangée à une solution d'acide acétique (0,2M dans le THF, 10 mL). Le mélange final a été ajouté sur la peptidyl résine. Après 30 min d'agitation, la résine a été lavée par du THF (4 × 2 min), du CH₂Cl₂ (4 × 2 min) et de l'Et₂O (2 × 2 min) et séchée sous vide.

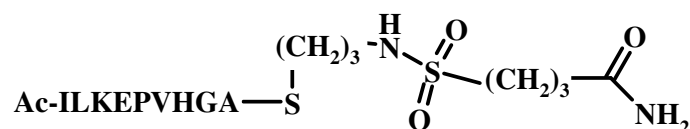
La déprotection finale et la séparation du peptide de son support ont été effectuées grâce à un mélange TFA/Me₂S/anisole/H₂O (5 mL, 80/10/5/5 ; v/v/v/v) pendant 1h30. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (50 mL, 1/1 ; v/v) et centrifugé (10 min, 3500 trs/min, 4°C). Le solide blanc obtenu a été solubilisé dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Il a été purifié par RP-HPLC (0-20% de B en 20 min, 20-100% de B en 270 min, C18 Nucléosil, 230 nm, 3 mL/min). 14,3 mg du peptide **22** ont été obtenus (Rdt = 22%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : >99%, acétate (10 min, 10 kV) : >99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₅₂H₈₈N₁₄O₁₅S₂ [M+H]⁺ = 1213.6, observée 1213.7.

Peptide 23



Le peptide **23** a été préparé selon le même mode opératoire que le peptide **22** en utilisant le bromopropanol comme réactif de départ. 44 mg du peptide **23** ont été obtenus (Rdt = 23%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : >99%, acétate (10 min, 10 kV) : >99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₅₃H₉₀N₁₄O₁₅S₂ [M+H]⁺ = 1227.6, observée 1227.2.

Peptide 26



L'élargissement du peptide H-GILK(Boc)E(*t*-Bu)PVH(Trt)GA a été réalisée sur une résine NovaSynTGR[®] (0,095 mmol, 0,25 mmol/g) à l'aide du synthétiseur automatique de peptides Pioneer (Applied Biosystems). La déprotection de l'amine α du peptide a été effectuée grâce à une solution de pipéridine à 20% dans le DMF.

Le *t*-butylcarbazate (125 mg, 10 éq) et le CDI (154 mg, 10 éq) ont été dissous dans le DMF fraîchement (4,7 mL) sous argon. Au bout d'1h, ce milieu réactionnel a été ajouté sur la peptidyl-résine et l'ensemble a été agité 1h30. La résine a été lavée au DMF (3 × 2 min), au CH₂Cl₂ (5 × 2 min), à l'Et₂O (2 × 2 min) et séchée sous vide.

La déprotection finale et la séparation du peptide de son support ont été effectuées grâce à un mélange TFA/H₂O/thioanisole (9,5 mL, 96,5/2,5/1 ; v/v/v) pendant 1h. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (95 mL, 1/1 ; v/v) et centrifugé (10 min, 3500 trs/min, 4°C). Le solide blanc obtenu a été solubilisé dans un tampon acétate de triéthylammonium (TEAA) (200 mM, pH = 6,5, 4 mL), congelé et lyophilisé. Il a été purifié par RP-HPLC (0-15% de B en 15 min, puis de 15 à 100% de B en 283 min, C18 hyperprep, 230 nm, 3 ml/min, tampon A (10 mM en TEAA) et B (*i*-PrOH/H₂O ; 2/3 en volume contenant 10 mM en TEAA)). 63,3 mg du peptide 26 ont été obtenus (Rdt = 54%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 90%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 89%, acétate (10 min, 10 kV) : 95%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₄₇H₈₀N₁₆O₁₃ [M+H]⁺ = 1077.6, observée 1077.1.

Peptide 27



Le peptide **27** a été obtenu de façon similaire au peptide **26**. 69,7 mg du peptide **27** ont été obtenus (Rdt = 66%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 89%, acétate (10 min, 10 kV) : > 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₄₅H₇₇N₁₅O₁₂ [M+H]⁺ = 1020.6, observée 1020.3.

2.1.2°) Ligations

Peptide 25



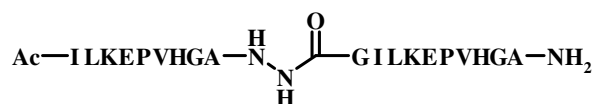
Le semicarbazide **24** (4,4 mg) a été dissous dans le mélange *t*-butanol/tampon acétate de sodium à 100 mM, pH = 3,9, (774 µL, 4/1 ; v/v) et a été ajouté au peptide thioester **22** (22,0 mg). AgNO₃ (5,3 mg) a été dissous dans le même mélange (400 µL) et a été ajouté au précédent mélange. Après 26h d'agitation, le milieu réactionnel a été dilué avec de l'eau (7 mL) et le peptide a été isolé par RP-HPLC (0-20% de B en 20 min, puis de 20 à 70% de B en 151 min, C18 Nucléosil, 230 nm, 3 mL/min). 9 mg du peptide **25** ont été obtenus (Rdt = 46%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 93%, acétate (10 min, 10 kV) : > 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₄₇H₇₉N₁₅O₁₃ [M+H]⁺ = 1062.6, observée 1062.7.

Peptide 28



L'acide camphorsulfonique (1,24 mg) a été dissous dans le mélange *t*-butanol/eau (4/1 ; v/v) contenant 40 mM en acide acétique (52 µL). Ce mélange a été ajouté au peptide **26** (6,7 mg). L'ensemble a été lui-même ajouté sur le peptide **23** (5,2 mg) solubilisé dans le même mélange (52 µL). Une solution d'AgNO₃ (4,8 mg/mL, 253 µL) a été ajoutée au précédent. Après 25h d'agitation à 18°C, NaCl (10 mM, 714 µL) a été ajouté pour piéger les ions argent. Cette solution a été filtrée et le peptide a été isolé par RP-HPLC (0-15% de B en

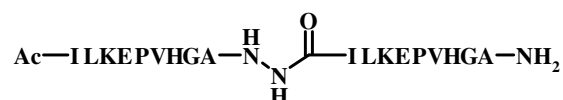
15 min, puis de 15 à 100% de B en 283 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 3 mL/min). 2,5 mg du peptide **28** ont été obtenus (Rdt = 28%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 98%, acétate (10 min, 10 kV) : > 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{93}H_{154}N_{28}O_{25}$ $[M+H]^+ = 2064.2$, observée 2063.9.

Peptide 29



Le peptide **29** a été obtenu de façon similaire au peptide **28**. 2,7 mg du peptide **29** ont été obtenus (Rdt = 34%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 57%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 86%, acétate (10 min, 10 kV) : 83%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{91}H_{151}N_{27}O_{24}$ $[M+H]^+ = 2007.1$, observée 2006.9.

2.2°) Voie B

2.2.1°) Synthèse des peptides

Peptide 35



La Fmoc-Gly-OH (10 éq, 594,6 mg) a été solubilisée dans un mélange CH_2Cl_2 /DMF (7 mL/700 μ L) sous argon. Le DIC (5 éq, 156,6 μ L) a été ajouté sur l'ensemble. Le milieu réactionnel a été placé dans un bain de glace et sous argon puis agité pendant 20 minutes. Le solvant a été évaporé à sec et le résidu a été repris dans le DMF (3 mL). Il a ensuite été ajouté sur la résine NovaSyn TG HMBA (0,2 mmol, 0,23 mmol/g) conditionnée au préalable dans le DMF. La DMAP (0,1 éq, 2,44 mg), solubilisée dans le DMF (500 μ L), a été ajoutée à son tour sur la peptidyl-résine. Après 1h d'agitation, la résine a été lavée par du DMF (4 \times 2 min), et du CH_2Cl_2 (4 \times 2 min).

L'élongation du peptide a été ensuite effectuée à l'aide du synthétiseur de peptides Pioneer (Applied Biosystems). Après déprotection de l'amine α , la peptidyl-résine a été

acétylée. La peptidyl-résine a été lavée avec le CH₂Cl₂ (3 × 2 min), l'Et₂O (3 × 2 min), et séchée sous vide.

La peptidyl-résine a été reprise dans une solution de TFA/H₂O/EDT (20 mL/g de résine, 95/2,5/2,5 ; v/v/v) sous agitation pendant 1h. Cette solution a été éliminée par filtration, la résine a été lavée par du TFA, du CH₂Cl₂ (5 × 2 min), de la DIEA à 10% dans le CH₂Cl₂ (5 × 2 min), et le DMF (5 × 2 min).

Une solution d'hydrate d'hydrazine à 5% dans le DMF (20 mL) a été ajoutée sur la résine et mise sous agitation pendant 1h. Après filtration et lavages de la résine par du DMF (2 × 2 min), les filtrats ont été réunis et le solvant a été évaporé à sec. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (1/1 ; v/v). Il a été purifié par RP-HPLC (isocratique à 0% de B, C3 Zorbax, 230 nm, 6 mL/min). 94 mg du peptide **35** ont été obtenus (Rdt = 31%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C3 Zorbax) : > 99%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 98%, acétate (10 min, 10 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₅₇H₈₉N₁₇O₁₆ [M+H]⁺ = 1268.7, observée 1268.5.

Peptide 36



Le peptide **36** a été obtenu de manière similaire au peptide **35**. 8,5 mg du peptide **36** ont été obtenus (Rdt = 6%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C3 Zorbax) : > 99%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 99%, acétate (10 min, 10 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₅₈H₉₁N₁₇O₁₆ [M+H]⁺ = 1282.7, observée 1283.1.

2.2.2°) Ligations

Peptide 34



L'acétylhydrazine **33** (3,25 mg) a été dissout dans le mélange *t*-butanol/AcOH (4/1 ; v/v) contenant 40 mM en acide acétique (200 µL) et a été ajouté sur le peptide **2** (23,3 mg).

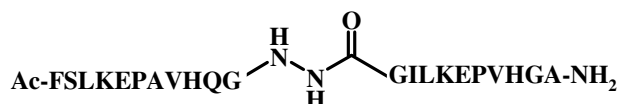
AgNO₃ (5,74 mg) dissous dans la même solution (200 µL) a été ajouté. Après 23h d'agitation à 18°C, une solution de NaCl (10 mM, 3,4 mL) a été ajoutée pour piéger les ions argent. Cette solution a été filtrée et le peptide a été isolé par RP-HPLC (0-10% de B en 10 min, puis de 10 à 30% de B en 30 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 9,7 mg du peptide **34** ont été obtenus (Rdt = 43%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 98%, acétate (10 min, 10 kV) : > 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₄₉H₈₂N₁₆O₁₄ [M+H]⁺ = 1119.6, observée 1119.3.

Peptide 37



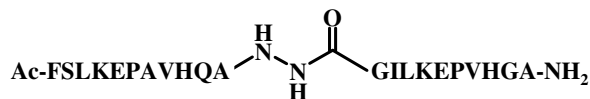
Les peptides **2** (10,2 mg) et **37** (22,0 mg) ont été dissous dans 200 µL chacun du mélange *t*-butanol/AcOH (4/1 ; v/v) contenant 40 mM en acide acétique. AgNO₃ (2,5 mg) dissous dans la même solution (323 µL) a été ajouté sur les peptides. Après 27h d'agitation à 18°C, NaCl (10 mM, 1,45 mL) a été ajouté pour piéger les ions argent. Cette solution a été filtrée et le peptide a été isolé par RP-HPLC (0-15% de B en 15 min, puis de 15 à 35% de B en 100 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 9,6 mg du peptide **37** ont été obtenus (Rdt = 48%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 91%, acétate (10 min, 10 kV) : 89%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₁₀₄H₁₆₅N₃₁O₂₉ [M+H]⁺ = 2313.2, observée 2313.1.

Peptide 38



Le peptide **38** a été obtenu de façon similaire au peptide **37**. 3 mg du peptide **38** ont été obtenus (Rdt = 41%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 88%

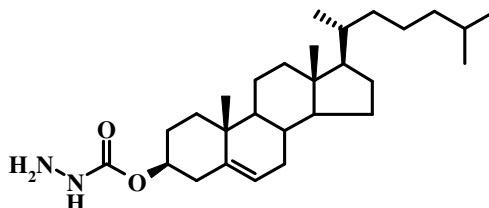
CZE citrate (15 min, 15 kV) : 91%, acétate (10 min, 10 kV) : 92%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{105}H_{167}N_{31}O_{29}$ $[M+H]^+ = 2327.3$, observée 2327.3.

2.3°) Préparation d'azaGlylipopeptides

2.3.1°) Synthèse des hydrazinolipides

Composé 39



Le cholestéryl chloroformate (1 éq, 15 mM) a été dissous dans un mélange THF/ CH_2Cl_2 (1/1, v/v). Cette solution a été additionnée goutte à goutte sur une solution d'hydrate d'hydrazine (50 éq, 24-26% dans l'eau). Après 30 min d'agitation, le milieu réactionnel a été lavé par du CH_2Cl_2 (1 fois) et par de l'eau désionisée (3 fois). La phase organique a été séchée sur $MgSO_4$ et évaporée à sec. 99 mg du composé **39** ont été obtenus (Rdt = 84%).

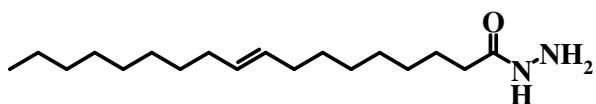
MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{28}H_{48}N_2O_2$ $[M+H]^+ = 444.4$, observée 444.3.

Rf ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9/1, v/v) = 0,7

Protocole général de synthèse des hydrazinolipides aliphatiques

Le lipide (1 éq, 0,1 M dans un mélange CH_2Cl_2/THF , 1/1 ; v/v) a été placé à 0°C et sous argon. Le NHS (1 éq, 0,99 M dans le THF), puis le DIC (0,77 éq, 0,9 M dans le CH_2Cl_2) ont été additionnés sur cette solution. Le milieu réactionnel a été mis sous agitation à 4°C pendant 16h, puis le solvant a été évaporé à sec. Le résidu a été repris dans un mélange THF/ CH_2Cl_2 (1/1 ; v/v). Cette solution a été additionnée goutte à goutte sur une solution d'hydrate d'hydrazine (50 éq, 24-26% dans l'eau). Après 30 min d'agitation, le milieu réactionnel a été lavé par du CH_2Cl_2 (1 fois) et par de l'eau désionisée (3 fois). La phase organique a été séchée par $MgSO_4$ et évaporée à sec.

Composé 40

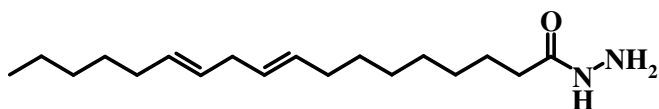


14,4 mg d'un solide blanc **40** ont été obtenus (Rdt = 93%)

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{18}H_{36}N_2O_1$ $[M+H]^+ = 297.3$, observée 297.3.

Rf (Cyclohexane/AcOEt, 8/2, v/v) = 0,4.

Composé 41



50 mg d'un solide blanc **41** ont été obtenus (Rdt = 91%)

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{18}H_{34}N_2O_1$ $[M+H]^+ = 295.3$, observée 295.3.

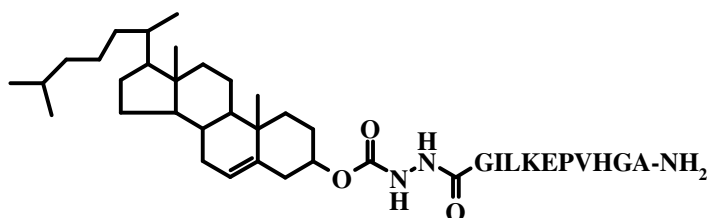
Rf (Cyclohexane/AcOEt, 8/2, v/v) = 0,3.

2.3.2°) Ligations

Protocole général de synthèse des azaGlylipopeptides

L'hydrazidolipide (4 éq) a été dissous dans le mélange *t*-butanol/H₂O/CH₂Cl₂ (80/15/5 ; v/v/v) contenant 40 mM en acide acétique. Il a été ajouté au peptide **2** (10 mM, 1 éq). AgNO₃ (2 éq) dissous dans la même solution a été ajouté sur les peptides. Après 24h d'agitation à 18°C, le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC (0-30% de B en 10 min, puis de 30 à 70% de B en 30 min, C3 Zorbax, 70°C, 215 nm, 6 mL/min).

Peptide 42



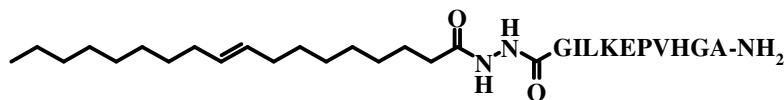
Quantités : 13,6 mg (dans 718 μ L du mélange réactionnel) de l'hydrazide du cholestérol **39**, 10,6 mg du peptide **2**, 2,61 mg (dans 50 μ L du mélange réactionnel) d'AgNO₃. 5,1 mg du peptide **42** ont été obtenus (Rdt = 39%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{75}H_{124}N_{16}O_{15}$ $[M+H]^+ = 1489.9$, observée 1490.0.

Peptide 43



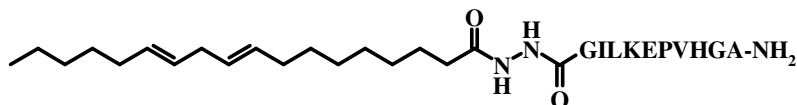
Quantités : 9,1 mg (dans 600 μ L du mélange réactionnel) de l'hydrazide de l'acide oléique 40, 10,2 mg du peptide 2, 2,54 mg (dans 150 μ L du mélange réactionnel) d'AgNO₃, 4,1 mg du peptide 43 ont été obtenus (Rdt = 36%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{65}H_{112}N_{16}O_{14}$ $[M+H]^+ = 1341.9$, observée 1341.9.

Peptide 44



Quantités : 9,2 mg (dans 600 μ L du mélange réactionnel) de l'hydrazide de l'acide linoléique 41, 10,8 mg du peptide 2, 2,65 mg (dans 180 μ L du mélange réactionnel) d'AgNO₃, 4,0 mg du peptide 44 ont été obtenus (Rdt = 33%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 98%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{65}H_{110}N_{16}O_{14}$ $[M+H]^+ = 1339.8$, observée 1340.0.

PARTIE 2
INHIBITION EXTRACELLULAIRE DE
LA SIGNALISATION HGF/SF-MET

A°) Le cancer et les traitements existants.....	121
1°) Les traitements locaux.....	122
1.1°) La chirurgie	123
1.2°) La radiothérapie et la curiethérapie	123
2°) Les traitements généraux	124
2.1°) L'hormonothérapie	124
2.2°) L'immunothérapie	124
2.3°) La chimiothérapie.....	125
2.3.1°) Les anti-métabolites	125
2.3.2°) Les agents altérant l'ADN.....	126
2.3.3°) Les poisons du fuseau	128
2.3.4°) Nouvelles cibles thérapeutiques	129
B°) Le facteur de croissance HGF/SF et le RTK MET	135
1°) Présentation	135
1.1°) Découverte, Caractéristiques biochimiques	135
1.1.1°) L'HGF/SF.....	135
1.1.2°) MET.....	136
1.2°) Mode de liaison HGF/SF-MET	138
1.3°) Implications de l'héparine et des HS dans l'action de l'HGF/SF et de MET	140
1.3.1°) Présentation de l'héparine et des HS	141
1.3.2°) Implications biologiques de la liaison entre l'héparine/HS et les protéines.....	142
2°) Rôles d'HGF/SF et de MET dans le développement normal et tumoral	146
2.1°) Effets cellulaires de la signalisation HGF/SF-MET	146
2.2°) Développement embryonnaire	147
2.3°) Régénération et maintien de l'intégrité tissulaire à l'âge adulte	148
2.4°) Implications dans le cancer	149
3°) Stratégies d'inhibition de la signalisation HGF/SF-MET	151
3.1°) Anticorps	151
3.2°) Leurres.....	152
3.3°) Inhibiteurs de la kinase de MET.....	153
3.4°) Nouvelles stratégies d'inhibition de la signalisation HGF/SF-MET.....	155
3.4.1°) Mimes d'héparine et des HS	155
3.4.2°) Peptides liant l'HGF/SF	156
3.4.3°) Peptides mimant des régions intracellulaires de MET	157
C°) Résultats préliminaires	159
1°) Criblage des polysaccharides grâce à la technologie biopuces	160
1.1°) Les biopuces : définitions et conception	160
1.2°) Les biopuces comme outil de sélection de polysaccharides.....	161
2°) Evaluation de l'activité biologique des polysaccharides sélectionnés.....	163
D°) Synthèse d'inhibiteurs extracellulaires de la signalisation HGF/SF-MET.....	167
1°) Synthèse de la première série de conjugués par ligation thiocarbamate	168
1.1°) Synthèse des cystéinyl-peptides	168
1.2°) Synthèse des peptides sulfonatés.....	170
1.2.1°) Stratégie générale de synthèse.....	171

1.2.2°) Fonctionnalisation des amines α et ϵ de K1	171
1.2.3°) Fonctionnalisation de l'amine ϵ de K2	173
1.3°) Synthèse de la première série de conjugués sulfonates thiocarbamate	174
1.3.1°) Validation de la méthode de ligation thiocarbamate	175
1.3.2°) Synthèse des conjugués sulfonates par ligation thiocarbamate.....	178
1.4°) Evaluation biochimique et de cytotoxicité des composés de la première série.....	179
1.4.1°) Test d'interaction pour la protéine chimérique MET-Fc au format biopuces....	179
1.4.2°) Evaluation de la cytotoxicité : test MTT	184
1.5°) Etude du conjugué sulfonate 57	186
1.5.1°) Comparaison entre l'HGF/SF et le cystéinyl-peptide 46	186
1.5.2°) Comparaison entre le conjugué sulfonate 57 et l'HGF/SF.....	187
1.5.3°) Hypothèses sur la liaison du conjugué sulfonate 57 avec MET.....	189
2°) Synthèse de la seconde série de conjugués par ligation thiocarbamate.....	190
2.1°) Modifications du cystéinyl-peptide 46	191
2.1.1°) Synthèse des cystéinyl-peptides	191
2.1.2°) Synthèse des conjugués sulfonates.....	193
2.2°) Modifications du peptide sulfonate 55	194
2.2.1°) Présence des groupements sulfonates.....	194
2.2.2°) Nombre et disposition spatiale des groupements sulfonates.....	196
2.2.3°) Substitution de la tyrosine du peptide sulfonate 55.....	209
2.3°) Evaluation de l'interaction avec la protéine chimérique MET-Fc par biopuces.....	212
2.3.1°) Modifications du cystéinyl-peptide 46	213
2.3.2°) Substitution de la tyrosine et des sulfonates.....	215
2.3.3°) Valence et disposition spatiale des sulfonates.....	217
2.3.4°) Evaluation de l'interaction avec d'autres RTKs.....	218
3°) Synthèse de la troisième série de conjugués par ligation thiocarbamate.....	220
3.1°) Conception et synthèse des cystéinyl-peptides	221
3.2°) Synthèse des conjugués de la troisième série par ligation thiocarbamate.....	222
3.3°) Interaction de la troisième série de peptides avec la protéine chimérique MET-Fc par biopuces.....	226
3.3.1°) Evaluation de l'adsorption des peptides sur le support biopuces.....	226
3.3.2°) Evaluation de l'interaction des peptides avec la protéine chimérique MET-Fc.....	227
3.3.3°) Normalisation de l'interaction par rapport à l'adsorption	229
3.5°) Etude de la stabilité du lien thiocarbamate.....	231
4°) Synthèse de la quatrième série de conjugués par ligation thioéther.....	237
4.1°) Choix des cystéinyl-peptides.....	238
4.2°) Stratégies de synthèse des peptides sulfonates.....	238
4.2.1°) Fonctionnalisation de l'amine ϵ de K2 sur support solide	240
4.2.2°) Fonctionnalisation de l'amine ϵ de K2 en solution	242
4.3°) Synthèse des conjugués sulfonates de la quatrième série.....	243
4.4°) Stabilité des conjugués thioéther	246
4.5°) Tests d'activité kinase	246
4.5.1°) Comparaison thiocarbamate/thioéther.....	246
4.5.2°) Mise au point du test ELISA	248
4.5.3°) Tests d'activité kinase optimisé	249
5°) Synthèse de la cinquième série de composés.....	253
5.1°) Synthèse des peptides	254
5.1.1°) Synthèse des disulfures	254

5.1.2°) Synthèse des séryl-peptides.....	255
5.2°) Evaluations biologiques: tests d'activité kinase.....	256
E°) Partie expérimentale.....	260
1°) Synthèse de la première série de conjugués par ligation thiocarbamate.....	260
1.1°) Synthèse des cystéinyl-peptides 45 à 50.....	260
1.2°) Synthèse des peptides sulfonates.....	261
1.3°) Synthèse des conjugués de la première série.....	263
2°) Synthèse de la seconde série de conjugués par ligation thiocarbamate.....	266
2.1°) Synthèse des cystéinyl-peptides 62 à 64.....	266
2.2°) Synthèse des peptides sulfonates.....	267
2.3°) Synthèse des conjugués.....	277
3°) Synthèse de la troisième série de conjugués par ligation thiocarbamate.....	280
3.1°) Synthèse des cystéinyl-peptides 83 à 85.....	280
3.2°) Synthèse des conjugués de la troisième série.....	282
3.2.1°) Ligations avec le peptide 55.....	283
3.2.2°) Ligations avec le peptide 78.....	285
4°) Synthèse de la quatrième série de conjugués par ligation thioéther.....	287
4.1°) Synthèse des peptides sulfonates.....	287
4.2°) Synthèse des conjugués de la quatrième série.....	291
5°) Synthèse de la cinquième série de composés.....	293
5.1°) Synthèse des disulfures 112 à 117.....	293
5.2°) Synthèse des séryl-peptides.....	295

A°) Le cancer et les traitements existants

Le cancer se caractérise par une prolifération anarchique de cellules due à des mutations génétiques ou à une prédisposition héréditaire à développer certains types de tumeurs.

A l'échelle mondiale, on estime que 25 millions de personnes sont aujourd'hui atteintes d'un cancer. Selon le dernier rapport du CIRC (**C**entre **I**nternational de **R**cherche sur le **C**ancer), le nombre de malades a doublé entre 1970 et 2000. En 2008, 12 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués, 7 millions de personnes sont décédées des suites d'un cancer et 25 millions de personnes vivaient avec cette maladie.

D'ici à 2030, on estime qu'il y aura plus de 26 millions de nouveaux cas de cancer chaque année. Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués dans le monde sont ceux du poumon (1,61 millions de cas, soit 12,7% du total), du sein (1,38 millions de cas, soit 10,9% du total) et colorectal (1,23 millions de cas, soit 9,7% du total). Les cancers causant le plus de décès sont le cancer du poumon (1,38 millions de décès, soit 18,2% du total), de l'estomac (0,74 millions de décès, soit 9,7% du total) et du foie (0,69 millions de décès, soit 9,2% du total)¹²⁶.

En France, on a estimé à 320000 le nombre de nouveaux cas de cancer en 2005, 183000 chez l'homme et 137000 chez la femme. En 25 ans, ce chiffre a quasiment doublé : + 93% chez l'homme et + 84% chez la femme¹²⁷. Malgré la diminution de la mortalité pour la plupart des tumeurs, l'incidence des cancers a augmenté de 60% en 30 ans, ce qui en fait une cause nationale. Depuis le début des années 2000, la France s'est engagée dans une politique de lutte contre le cancer. Elle se traduit notamment par des plans nationaux dotés de financements publics et ciblés sur un certain nombre d'objectifs.

Le 2 novembre 2009, le nouveau Plan Cancer 2009-2013 a été annoncé à Marseille. Six mesures « phare » ont été décidées et ont pour but principalement :

* de renforcer les moyens alloués à la recherche afin de mettre au point de nouveaux médicaments anticancéreux ;

¹²⁶ <http://globocan.iarc.fr/>

¹²⁷ Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinié F, Danzon A, Bara S, Bouvier AM, Trétarre B, Binder-Foucard F, Colonna M, Daubisse L, Hédelin G, Launoy G, Le Stang N, Maynadié M, MonnerEAU A, Troussard X, Faivre J, Collignon A, Janoray I, Arveux P, Buemi A, Raverdy N, Schvartz C, Bovet M, Chérié-Challine L, Estève J, Remontet L, Velten M Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev. Epid. Santé Publique*. **2008**. 56, 159-75

- * d'élaborer une « carte de France » des cancers ;
- * d'améliorer la prévention, le dépistage et les soins tout en réduisant les inégalités existantes dans ces différents domaines ;
- * d'augmenter la prise en charge et l'accompagnement des patients.

Dans ce contexte, de nombreux travaux de recherche visent à réduire à la fois l'incidence et la mortalité des cancers. Les traitements anticancéreux ont pour but de guérir le patient tout en diminuant le risque de récurrence, d'améliorer sa durée et sa qualité de vie. Actuellement, il existe une grande diversité de traitements qui peuvent être utilisés seuls ou le plus souvent en association et qui sont décidés en fonction du type de cancer. En effet, on peut distinguer quatre grandes familles de cancers¹²⁸ :

- * les carcinomes (ou épithélioma) se développent à partir de cellules épithéliales aux dépens des muqueuses ou de glandes. C'est le cas notamment des cancers du poumon, du sein, de la peau...entre autres ;

- * les sarcomes se développent aux dépens des tissus conjonctifs ou des tissus qui en dérivent (les os, les muscles) ;

- * les lymphomes sont des tumeurs du système lymphatique, le plus souvent dans les ganglions lymphatiques (comme la maladie de Hodgkin) ;

- * les leucémies sont des cancers des cellules de la moelle osseuse à l'origine des cellules sanguines.

Les traitements actuels peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur site d'action. En effet, il est possible d'agir au niveau local, grâce à la chirurgie et à la radiothérapie, mais également d'un point de vue général notamment par la chimiothérapie.

1°) Les traitements locaux

Leur action porte directement sur les cellules cancéreuses de l'organe atteint ou dans les ganglions. C'est le cas de la chirurgie et de la radiothérapie.

¹²⁸ <http://www.arc-cancer.net/Les-types-de-cancer/article/Les-types-de-cancer.html>

1.1°) La chirurgie

La chirurgie reste le traitement adopté en première intention dans la plupart des cancers (80% des cas) lorsqu'ils sont diagnostiqués à un stade précoce¹²⁹. Elle vise à extraire la tumeur de l'organisme et à limiter la propagation des cellules malignes. Dans certains cas, la chirurgie s'accompagne de la radiothérapie et/ou de la chimiothérapie destinées à enrayer l'évolution de la tumeur en détruisant les cellules cancéreuses résiduelles locales ou déjà disséminées. La chirurgie anticancéreuse bénéficie aujourd'hui des progrès des techniques d'intervention et d'imagerie médicale, qui permettent d'opérer de façon moins invasive, diminuant les risques de séquelles pour le patient. Cette méthode est très efficace pour les foyers tumoraux sans métastase mais peut s'avérer très mutilante notamment dans le cas du cancer du sein.

1.2°) La radiothérapie et la curiethérapie

La radiothérapie consiste à exposer les cellules cancéreuses à une source de radiations ionisantes qui ont pour effet d'altérer l'ADN, rendant ces cellules incapables de se diviser. Cette irradiation est souvent utilisée en association à la chirurgie et/ou à la chimiothérapie, selon le type de tumeur et son stade d'évolution. Les cellules cancéreuses sont particulièrement sensibles à ces rayonnements. Les progrès en imagerie médicale, en informatique et l'évolution des équipements ont permis d'affiner le volume d'irradiation afin de mieux préserver les tissus sains avoisinants. Néanmoins, pour atteindre leur cible, les rayons doivent traverser les tissus sains et peuvent les léser.

La curiethérapie est une technique d'irradiation consistant à introduire des sources radioactives au contact ou à l'intérieur même de la tumeur. Ce traitement cible directement la zone concernée par le cancer. Il s'agit en général de billes, de microsphères ou de fils composés d'iridium ou de césium radioactif. Ils sont implantés au contact de la tumeur, dans des cavités naturelles comme l'utérus ou l'œsophage, ou directement dans la tumeur comme c'est le cas dans certains cancers de la prostate ou du sein.

En association avec ces traitements locaux, sont appliqués des protocoles de soins dits généraux. Ce sont ceux qui, au contraire des premiers, agissent de façon plus globale sur

¹²⁹ <http://www.arc-cancer.net/La-chirurgie/article/La-chirurgie.html>

l'organisme. Dans cette catégorie, on retrouve l'hormonothérapie, l'immunothérapie et la chimiothérapie.

2°) Les traitements généraux

2.1°) L'hormonothérapie

L'hormonothérapie est utilisée pour lutter contre les cancers hormono-dépendants, c'est-à-dire ceux qui nécessitent un environnement hormonal favorable pour se développer, comme c'est le cas de certains cancers du sein et de la prostate. Avant le début du traitement, une analyse des cellules tumorales permet de vérifier la présence de récepteurs aux hormones. Cette technique ne détruit pas les cellules cancéreuses mais elle permet de stopper leur prolifération en agissant sur l'environnement hormonal dans lequel la tumeur évolue. Cette classe d'anticancéreux regroupe aussi bien des inhibiteurs enzymatiques (anti-aromatases) que des antagonistes des récepteurs hormonaux (antioestrogènes, antiandrogènes).

2.2°) L'immunothérapie

L'immunothérapie stimule les propres défenses de l'organisme pour combattre la tumeur et la détruire. L'ASCI (Antigen-Specific Cancer Immunotherapeutics ou immunothérapie spécifique d'un antigène) est l'un de ces types d'immunothérapie du cancer, développé par GlaxoSmithKline (GSK) en tant que nouveau traitement potentiel contre certains types de cancers. Le premier antigène étudié par GSK s'appelle MAGE-A3 qui est spécifiquement retrouvé sur des cellules de cancer du poumon, de mélanome mais pas sur les cellules normales^{130, 131}. C'est la raison pour laquelle, le traitement serait plus ciblé et n'aurait pas d'impact sur les cellules saines. L'ASCI pourrait également permettre de traiter divers autres cancers dans le futur et serait également susceptible de traiter plusieurs stades cancéreux. Cependant, toutes ces possibilités doivent être testées dans le cadre d'essais cliniques afin de déterminer leur efficacité.

¹³⁰ Brichard VG, Lejeune D. New data on MAGE-A3 cancer immunotherapy may signal new options for patients with melanoma and non-small cell lung cancer. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*. 2010. 2, 282-285

¹³¹ http://www.gsk-asci.com/Public/ASCI/cancer_targets.aspx

2.3°) La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à administrer au patient des composés naturels ou synthétiques enrayant la prolifération cellulaire (agents cytostatiques) ou tuant les cellules en prolifération (agents cytotoxiques). Il peut s'agir d'anti-métabolites, d'agents qui altèrent l'ADN et de poisons du fuseau. Récemment, de nouveaux traitements ont été développés afin de viser de nouvelles cibles thérapeutiques.

2.3.1°) Les anti-métabolites

Les anti-métabolites se substituent aux bases puriques ou pyrimidiques de l'ADN ou inhibent les enzymes impliquées dans leur synthèse. Dans cette classe, on retrouve :

* les antipyrimidines comme le 5-fluorouracile, analogue structural de l'uracile, commercialisé par Merck sous le nom de 5-FU^{®132} (Figure 75).

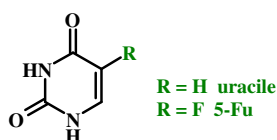


Figure 75 : Structures chimiques de l'uracile et du 5-FU[®]

L'uracile intervient dans la biosynthèse des acides nucléiques à deux niveaux : il est incorporé dans l'ARN sous forme d'UTP (uridine triphosphate) et il constitue la source principale de dTTP (désoxythymidine triphosphate) qui sera ensuite incorporé dans l'ADN.

Le 5-FU[®] doit être métabolisé dans la cellule pour être actif en subissant les mêmes réactions enzymatiques que les nucléotides normaux. Il agit principalement sur la synthèse d'ADN sous forme de 5-FdUMP (5-fluorodésoxy-uracile monophosphate) en bloquant l'activité de la thymidylate synthétase, enzyme qui permet la synthèse de l'uracile. De plus, un autre de ses métabolites (le 5-FUTP) peut être incorporé dans les divers types d'ARN. La transcription se fera alors de manière erronée.

* les antipurines parmi lesquels on peut citer la fludarabine (Figure 76). Il est utilisé sous le nom de Fludara[®] (Genzyme europe BV) pour traiter la leucémie myéloïde chronique¹³³.

¹³² Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitory compounds. *Nature*. **1957**. 179, 663-666

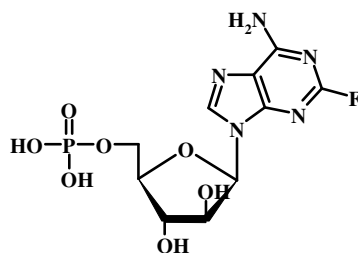


Figure 76 : Structure chimique de la fludarabine

* les antifolates inhibent la dihydrofolate réductase intervenant lors de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques¹³⁴. Dans cette classe, on retrouve le méthotrexate (Ledertrexate[®], Biodim), analogue de l'acide folique, substrat de l'enzyme (Figure 77).

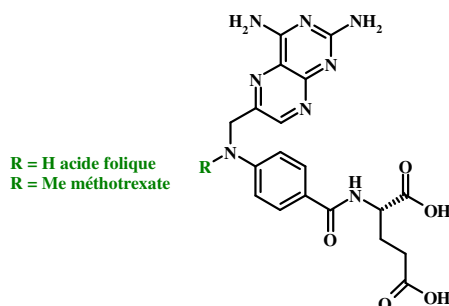


Figure 77 : Structures chimiques de l'acide folique et du méthotrexate (Ledertrexate[®])

2.3.2°) Les agents altérant l'ADN

Ils peuvent être classés en trois groupes : les agents alkylants de l'ADN, les inhibiteurs de topoisomérase et les intercalants de l'ADN.

* les agents alkylants de l'ADN : ils forment des liaisons covalentes avec l'ADN par le biais de réactions chimiques. Ces agents possèdent différents modes d'action :

* ils alkylent les hétéroatomes des bases de l'ADN. Cette modification provoque la perte des liaisons hydrogènes et de l'appariement de la double hélice.

* ils empêchent le déroulement de la double hélice d'ADN et donc la réplication en réalisant des pontages entre les bases puriques. En se fixant sélectivement sur

¹³³ Rai KR, Petterson BI, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Sheperd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, Schiffer CA. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2000**. 343, 1750-1757

¹³⁴ Bertino JR. Cancer research: from folate antagonism to molecular targets. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2009**. 22, 577-582

celles-ci, ils induisent une variation de la conformation locale du double brin d'ADN. Cette déformation inhibe la réplication et la transcription de l'ADN en ARN, ce qui abouti à la mort cellulaire. Dans cette classe de molécules, on retrouve des complexes organométalliques à base de platine dont le plus connu est le Cisplatine[®] (Merck) ou cis-diaminedichloroplatine(II) (CDDP), dont la structure chimique est retrouvée à la Figure 78¹³⁵.

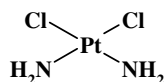


Figure 78 : Structure chimique du Cisplatine

Le Cisplatine[®] forme par réaction avec l'ADN des ponts entre les résidus guanine adjacents. Il est utilisé dans le traitement de différents cancers tels les sarcomes, les carcinomes (cancer du poumon à petites cellules, de l'ovaire...), ou encore les lymphomes.

* les inhibiteurs de topoisomérase : ce sont des enzymes impliquées dans la régulation du degré de super-enroulement de la double hélice d'ADN, essentiel lors de la transcription et réplication de l'ADN. L'inhibition de ces enzymes par l'irinotécan (Camptosar[®], Pfizer) provoque des lésions de l'ADN (Figure 79).

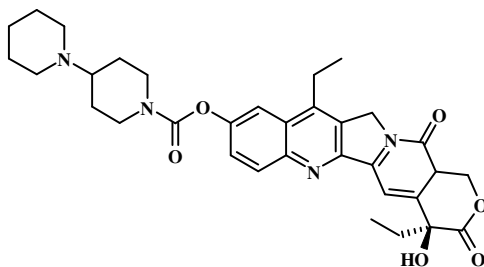


Figure 79 : Structure chimique de l'irinotécan (Camptosar[®])

Ce dérivé d'une substance naturelle, la camptothécine, est fréquemment associé au 5-FU pour traiter le cancer colorectal¹³⁶.

¹³⁵ Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur. J. Cancer.* **1998.** 34, 1522-1534

¹³⁶ O'Dwyer PJ, Catalano RB. Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 and irinotecan: practical pharmacogenomics arrives in cancer therapy. *J. Clin. Onc.* **2008.** 24, 4534-4538

* les intercalants de l'ADN : ils agissent par interactions directes avec la double hélice d'ADN. En s'intercalant entre les deux brins d'ADN, ils provoquent sa distorsion et une modification de la topologie des bases nucléiques. Les anthracyclines, notamment la doxorubicine (Adriblastine[®], Pfizer), appartiennent à cette famille (Figure 80).

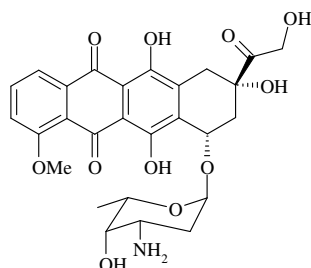


Figure 80 : Structure chimique de la doxorubicine (Adriblastine[®])

2.3.3°) Les poisons du fuseau¹³⁷

La Vincristine[®] (Pierre Fabre Médicament) est un alcaloïde extrait de la Pervenue de Madagascar. Ce poison du fuseau mitotique inhibe l'assemblage de la tubuline en microtubules et agit donc quand les chromosomes dédoublés doivent migrer le long des tubules du fuseau vers l'un des deux pôles avant la séparation des cellules.

Les taxanes, tels que le docétaxel (Taxotère[®], Aventis Pharma), empêchent la destruction des microtubules et bloquent la mitose (Figure 81).

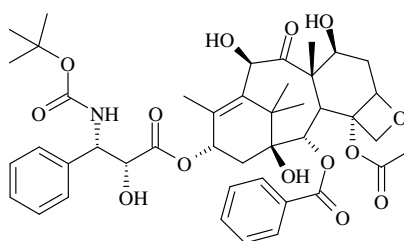


Figure 81 : Structure chimique du docétaxel (Taxotère[®])

Les cellules cancéreuses se divisent très activement et sont donc les plus touchées par ces différentes molécules, mais la chimiothérapie atteint également les tissus sains, ce qui

¹³⁷ McGrogan BT, Gilmartin B, Carney DN, McCann A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biophys. Biochim. Acta.* **2008.** 1785, 96-132

entraîne de nombreux effets secondaires comme une baisse du taux de globules blancs, une alopecie, ainsi qu'un risque de toxicité cardiaque et néphrologique.

Afin de parvenir à une action plus spécifique, des stratégies alternatives visant de nouvelles cibles sont en cours de développement.

2.3.4°) Nouvelles cibles thérapeutiques

* agents anti-angiogéniques : Les agents anti-angiogéniques bloquent la formation de vaisseaux sanguins induits par la tumeur afin de s'alimenter. Dans une première approche, ils permettent de limiter la croissance tumorale¹³⁸. Dans cette catégorie, on trouve :

* des anticorps monoclonaux administrés par voie intraveineuse comme le bévacizumab (Avastin[®], Genentech/Roche), dirigé contre un membre de la famille des récepteurs au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)¹³⁹, administré le plus souvent en association dans le traitement du cancer colorectal.

* des inhibiteurs du domaine kinase du VEGFR comme le sunitinib (Sutent[®], Pfizer Ltd) utilisé pour traiter certains carcinomes rénaux et des tumeurs gastro-intestinales résistantes au mésylate d'imatinib (Glivec[®], Novartis Europharm Ltd)¹⁴⁰.

* inhibiteurs de CDKs (Cyclin-Dependent Kinase) : Les CDKs sont des sérine/thréonine kinases impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, ainsi que dans le processus de transcription des ARNm. Leurs activités sont fréquemment dérégulées dans les cellules tumorales et ce sont donc des cibles potentielles pour des molécules anticancéreuses. En interférant sélectivement avec un ou plusieurs stades du cycle cellulaire des cellules cancéreuses, il serait possible d'inhiber leur prolifération ou d'induire leur mort. A titre d'exemple, le seliciclib ou R-roscovitine, développé par Cyclacel, est un inhibiteur de multiples CDKs. Dans le traitement de certains types de cancers du poumon, les résultats de la phase 2 d'étude clinique sont attendus d'ici la fin de l'année¹⁴¹.

¹³⁸ Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. **2005**. 438, 932-936

¹³⁹ Los, M, Roodhart JML, Voest EE. Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. *The Oncologist*. **2007**. 12, 443-450

¹⁴⁰ Rock EP, Goodman V, Jiang JX, Mahjoob K, Verbois SL, Morse D, Dagher R, Justice R, Pazdur R. Food and drug administration drug approval summary : sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma. *The Oncologist*. **2007**. 12, 107-113

¹⁴¹ <http://www.cyclacel.com/cyc/rd/programs/oncology/seliciclib/>

* inhibiteurs d'enzymes

* les inhibiteurs d'histones déacétylase (HDACs) : les histones sont des protéines basiques autour desquelles est enroulé l'ADN. L'équilibre acétylation/déacétylation des histones intervient dans le degré de compaction des histones autour de la double hélice et donc dans la régulation de l'expression des gènes. Les HDACs sont des enzymes qui participent, avec les HAT (**H**istones **A**cétyl **T**ransférase), au degré d'acétylation des histones et à la régulation de l'expression génique. Les HDACs ont un rôle dans le développement de cancers¹⁴². Des inhibiteurs d'HDACs sont donc utilisés en thérapeutique : c'est le cas du vorinostat (Zolinza[®], Merck & Co) dont la structure chimique est présentée à la Figure 82¹⁴³.

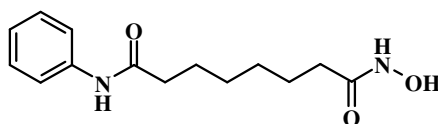


Figure 82 : Structure chimique du vorinostat (Zolinza[®])

* les inhibiteurs de télomérase : à chaque cycle de la réplication cellulaire, on assiste à un raccourcissement des télomères, qui sont des régions répétées protectrices de l'extrémité des chromosomes. S'ils deviennent trop courts, la cellule entre en apoptose. Lors du processus de cancérisation, la cellule se divise plus rapidement et les télomères raccourcissent plus vite. La surexpression de la télomérase par les cellules cancéreuses leur permet de renouveler les télomères et d'échapper à l'apoptose. Il serait donc possible de cibler les cellules cancéreuses par des inhibiteurs de télomérases¹⁴⁴. Dans ce contexte, Geron Corp développe actuellement un composé de type oligonucléotide, le GRN163L ou imetelstat, et projette d'effectuer prochainement une étude clinique de phase II afin de viser différents cancers.

* les inhibiteurs de phosphatases : les phosphatases constituent une famille d'enzymes capables d'éliminer par hydrolyse un groupement phosphate d'un substrat. Leur action est donc opposée à celle des kinases comme les protéines à activité tyrosine kinase que

¹⁴² Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol. Onc.* **2007**. 1, 19-25

¹⁴³ Batty N, Malouf GG, Issa JPJ. Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents. *Cancer Lett.* **2009**. 280, 192-200

¹⁴⁴ Shay JW, Wright WE. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2006**. 5, 577-584

nous détaillerons plus largement dans le prochain paragraphe. Parmi ces enzymes, les tyrosines phosphatases régulent des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la prolifération, de la migration et de l'adhésion cellulaires¹⁴⁵. Dans ce contexte, les différentes perturbations de leur activité suite à des mutations ou à leur surexpression peuvent favoriser le processus de cancérisation. Il est maintenant établi que les inhibiteurs de phosphatases sont des molécules anticancéreuses prometteuses.

* les inhibiteurs des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (RTKs) :

Dans la mesure où le travail présenté dans cette partie du manuscrit porte sur cette famille de protéines, nous détaillerons dans un premier temps leurs structures ainsi que celle de leurs ligands avant d'évoquer les médicaments ciblant cette classe de récepteurs.

Les RTKs sont des glycoprotéines membranaires qui, grâce à leur domaine intracellulaire, catalysent spécifiquement le transfert du groupement phosphate γ de l'ATP vers le groupement hydroxyle d'un résidu tyrosine d'une protéine. Les RTKs permettent la transduction d'un signal extracellulaire vers le cytoplasme à la suite de leur interaction avec leur ligand. L'interaction ligand-récepteur induit l'autophosphorylation du domaine intracellulaire, puis une cascade de phosphorylation de protéines cytoplasmiques qui va finalement se traduire par la modification de l'expression de gènes cible. Au niveau cellulaire, ils interviennent entre autre dans la prolifération, la différenciation, la migration, la survie et la mort cellulaire. Plus globalement, les RTKs sont impliqués dans l'embryogenèse, l'angiogenèse et la régénération tissulaire. On comprend alors aisément que leur dérégulation par surexpression ou par mutation participe au développement des tumeurs et des métastases : ce sont donc des cibles thérapeutiques anticancéreuses majeures¹⁴⁶.

La famille des RTKs comprend entre autres le récepteur à l'insuline, au VEGF, au FGF (**F**ibroblast **G**rowth **F**actor), à l'EGF ou encore à l'HGF/SF¹⁴⁷.

Les RTKs sont composés de trois domaines majeurs (Figure 83) :

- un domaine N-terminal extracellulaire glycosylé fixant le ligand et dont la composition en résidus varie selon le récepteur (présence de séquences riches en cystéines, domaine immunoglobuline...);

¹⁴⁵ Östman A, Hellberg C, Böhmer FD. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **2006.** 6, 307-320

¹⁴⁶ Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases : targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **2004.** 4, 361-370

¹⁴⁷ Hubbard SR, Till JH. Protein Tyrosine kinase Structure and Function. *Annu. Rev. Biochem.* **2000.** 69, 373-398

- une hélice transmembranaire permettant l'ancrage du récepteur à la membrane cellulaire et composée d'acides aminés majoritairement hydrophobes ;
- un domaine cytoplasmique lui-même divisé en trois domaines : juxtamembranaire (JM), tyrosine kinase (TK), et C-terminal (CT).

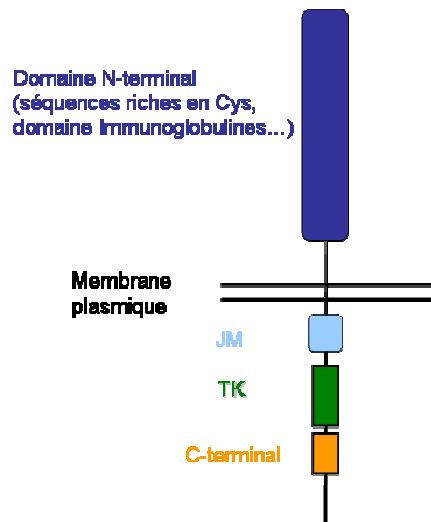


Figure 83 : Représentation schématique d'un RTK

Les RTKs sont présents en général sous la forme d'une chaîne polypeptidique monomérique en absence du ligand, comme les membres de la famille du récepteur à l'EGF. Concernant le récepteur à l'insuline (InsR) et les membres de sa famille (IRR, IGF1R), ils sont constitués de deux chaînes α extracellulaires reliées par ponts disulfures entre elles et à deux chaînes β transmembranaires. Pour le récepteur MET et les membres de sa famille (Ron et Sea), une chaîne α extracellulaire est reliée par un pont disulfure à une chaîne β transmembranaire.

Chaque RTK possède son propre ligand. Il s'agit de polypeptides dont le poids moléculaire varie de 6 kDa pour l'insuline à 90 kDa pour l'HGF/SF. La plupart de ces facteurs est produit par des cellules situées à proximité des cellules cibles possédant le récepteur. Par exemple, le RTK MET est exprimé surtout par les cellules épithéliales et endothéliales, alors que l'HGF/SF est exprimé par les cellules mésenchymateuses sous-jacentes.

Les inhibiteurs des RTKs peuvent exercer leur action au niveau du domaine intracellulaire, soit en ciblant le domaine kinase avec des petites molécules synthétiques, soit sur les protéines impliquées dans la transduction du signal intracellulaire comme les protéines de la famille Ras. On distingue :

* les petites molécules synthétiques inhibitrices du domaine tyrosine kinase. A titre d'exemple, le Glivec® (Novartis Europharm Ltd) ou mésylate d'imatinib est un inhibiteur de kinase du récepteur au PDGF et de la protéine Bcr-Abl, résultat d'une translocation chromosomique et fréquemment retrouvée chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique¹⁴⁸.

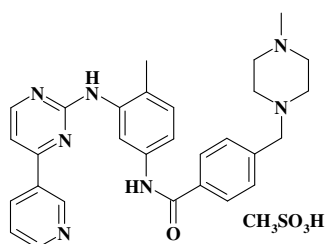


Figure 84 : Structure chimique du mésylate d'imatinib (Glivec®)

Le Sunitinib ou Sutent® (Pfizer Ltd) est un autre exemple d'inhibiteur de kinase. Il est utilisé dans le traitement de carcinome rénal et des tumeurs gastro-intestinales résistantes au Glivec®. Ses cibles sont principalement les kinases des VEGFR, des PDGFR, de KIT, de RET¹⁴⁹ ;

* les inhibiteurs de la Ras farnésyltransférase. Les protéines de la famille de Ras sont liées à la membrane plasmique et jouent un rôle dans la transduction du signal mitotique : leur dérégulation est observée dans divers types de cancers (pancréas, mélanome, poumon...) ¹⁵⁰. L'attachement de ces protéines à la membrane plasmique, essentiel pour leur activité, nécessite leur farnésylation, liaison covalente d'un groupement farnésyle par une farnésyltransférase sur la cystéine d'une séquence consensus CAAX au niveau de l'extrémité C-terminale (où A = résidu aliphatique, X = résidu variable). Les Ras farnésyltransférase sont donc des cibles d'anticancéreux et l'une des stratégies en cours de développement est de préparer des peptidomimétiques analogues de la séquence consensus CAAX, leurres de la farnésyltransférase¹⁵¹.

¹⁴⁸ Deininger MWN, Druker BJ. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharm. Rev.* **2003**. 55, 401-423

¹⁴⁹ Rock EP, Goodman V, Jiang JX, Mahjoob K, Verbois SL, Morse D, Dagher R, Justice R, Pazdur R. Food and drug administration drug approval summary : sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma. *The Oncologist.* **2007**. 12, 107-113

¹⁵⁰ Downward J. Targeting ras signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **2003**. 3, 11-22

¹⁵¹ Leonard DM. Ras farnesyltransferase : a new therapeutic target. *J. Med. Chem.* **1997**. 40, 2971-2990

Il est important de noter que le domaine kinase et les protéines intervenant dans la signalisation intracellulaire peuvent être communes à différents RTKs, et il peut alors se poser un problème de spécificité à l'origine d'effets secondaires.

Pour parvenir à des molécules plus spécifiques, il est également possible de cibler les RTKs au niveau de leur domaine extracellulaire et c'est cette stratégie que nous avons choisi d'adopter dans le cadre de ce travail. Dans cette catégorie de molécules, on retrouve essentiellement des anticorps monoclonaux, qui peuvent reconnaître le récepteur ou son ligand. On peut citer le trastuzumab (Herceptin[®], Roche Registration Ltd), anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur HER2/neu (**H**uman **E**pidermal **R**eceptor-2) encore appelé l'EGFR-2 (**E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor-2)¹⁵². Ce récepteur est surexprimé dans 20 à 25% des cancers du sein métastatiques¹⁵³.

Des travaux ont été également entrepris afin de viser les RTKs au niveau de leur domaine extracellulaire par le biais de molécules synthétiques telles que les peptides, les polysaccharides entre autres.

Dans le cadre de ce travail de recherche, nous nous sommes attachés à développer une nouvelle stratégie d'inhibition des RTKs agissant au niveau extracellulaire, partie plus spécifique à chacun de ces récepteurs. Notre intérêt s'est porté sur le RTK MET dans la mesure où la dérégulation de la signalisation HGF/SF-MET conduit à la progression tumorale (carcinomes, sarcomes,...), notamment en favorisant l'invasion et la métastase. Nous verrons également que des travaux antérieurs menés au laboratoire ont apporté la preuve que ce projet était réalisable.

Afin de mieux comprendre le fonctionnement du RTK MET et de son ligand, l'HGF/SF, nous exposerons les différentes caractéristiques structurales de ces protéines. Nous verrons ensuite dans quelle mesure ils peuvent être impliqués dans le cancer et quelles sont les stratégies d'inhibition développées à ce jour.

¹⁵² Hudis CA. Trastuzumab-Mechanism of action and use in clinical practice. *N. Eng. J. Med.* **2007**. 357, 39-51

¹⁵³ Nahta R, Esteva FJ. Herceptin : mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett.* **2006**. 232, 123-138

B°) Le facteur de croissance HGF/SF et le RTK

MET

1°) Présentation

1.1°) Découverte, Caractéristiques biochimiques

1.1.1°) L'HGF/SF

Sa double dénomination est due aux circonstances de sa découverte. En effet, un facteur de croissance des hépatocytes, nommé « Hepatocyte Growth Factor », a été partiellement purifié du sérum de rats partiellement hépatectomisés¹⁵⁴. Peu de temps après, à partir de milieux conditionnés de fibroblastes, une protéine capable de disperser des cellules épithéliales, nommée « Scatter Factor » a été identifiée¹⁵⁵. Au début des années 90, il a été démontré que ces deux protéines étaient identiques aussi bien d'un point de vue structural que fonctionnel¹⁵⁶. Naldini et coll ont ensuite prouvé que l'HGF/SF est le ligand du récepteur MET¹⁵⁷.

Cette glycoprotéine de 90 kDa est produite sous la forme d'un précurseur inactif (pro-HGF/SF). L'activation du pro-HGF/SF est le résultat d'une coupure protéolytique de la liaison Arg⁴⁹⁴-Val⁴⁹⁵ par des protéases à sérine^{158,159}. La forme mature de l'HGF/SF est donc un hétérodimère α - β relié par un pont disulfure (Figure 85).

¹⁵⁴ Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1984**. 122, 1450-1459

¹⁵⁵ Stoker M, Perryman M. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J. Cell. Sci.* **1985**. 77, 209-223

¹⁵⁶ Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingat S, Rieder H, Fonatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y, Birchmeier W. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**. 88, 7001-7005

¹⁵⁷ Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto A, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Birchmeier W, Comoglio PM. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *The EMBO J.* **1991**. 10, 2867-2878

¹⁵⁸ Hartmann G, Naldini L, Weidner KM, Sachs M, Vigna E, Comoglio PM, Birchmeier W. A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation but not mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**. 89, 11574-11578

¹⁵⁹ Naka D, Ishii T, Yoshiyama Y, Miyazawa K, Hara H, Hishida T, Kitamura N. Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J. Biol. Chem.* **1992**. 267, 20114-20119

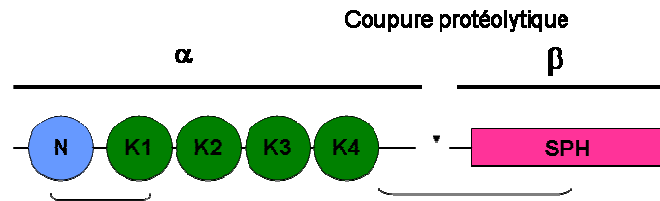


Figure 85 : Représentation schématique de l'HGF/SF

La chaîne α est formée :

* d'un domaine N-terminal (N) en épingle à cheveux stabilisé par des ponts disulfures.

La structure comporte cinq feuilletts β antiparallèles ainsi que deux hélices α .

* de quatre domaines kringles (K1-K4) comportant chacun environ 80 acides aminés dont six cystéines formant trois ponts disulfures. Les domaines kringles sont fréquemment impliqués dans des interactions protéine-protéine¹⁶⁰.

La chaîne β ou SPH (Serine Protease Homology) est un homologue structural du domaine catalytique des protéases à sérine mais dépourvu d'activité enzymatique¹⁶¹.

1.1.2°) MET

Dans les années 80, le récepteur MET a été découvert grâce à un oncogène (gène favorisant la cancérisation) appelé TPR-MET. Ce dernier a été isolé des cellules dérivées d'un ostéosarcome humain traitées par la *N*-Méthyl-*N*'-Nitro-*N*-NitrosoGuanidine (MNNG), qui appartient à la classe des agents alkylants de l'ADN¹⁶². TPR-MET résulte d'un réarrangement entre un fragment du chromosome 1 portant une partie du gène tpr (translocated promoter region) et un fragment du chromosome 7 portant une partie du gène c-met¹⁶³. La partie du gène tpr code une protéine possédant un motif de dimérisation de type « fermeture à leucine »¹⁶⁴ et la partie du gène c-met code les domaines kinase et C-terminal de MET. L'oncoprotéine cytoplasmique TPR-MET est donc un dimère activé constitutivement en

¹⁶⁰ Patthy L, Trexler M, Váli Z, Bányai L, Váradi A. Kringles: modules specialized for protein binding. *FEBS*. **1984**. 171, 131-136

¹⁶¹ Donate LE, Gherardi E, Srinivasan N, Sowdhamini R, Aparic S, Blundel TL. Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Prot Sci*. **1994**. 3, 2378-2394

¹⁶² Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, Vande Woude GF. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*. **1984**. 311. 29-34

¹⁶³ Park M, Dean M, Cooper CS, Schmidt M, O'Brien SJ, Blair DG, Vande Woude GF. Mechanism of met Oncogene Activation. *Cell*. **1986**. 45, 895-904

¹⁶⁴ Rodrigues GA, Park M. Dimerization mediated through a leucine zipper activates the oncogenic potential of the met receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol*. **1993**. 13, 6711-6722

absence de ligand. Cette découverte a entraîné ensuite l'identification de la protéine à activité tyrosine kinase MET¹⁶⁵.

Le récepteur MET est produit sous la forme d'un précurseur de 170 kDa inactif dans le réticulum endoplasmique, il est ensuite pris en charge dans l'appareil de Golgi où il est glycosylé puis clivé entre l'Arg³⁰⁷ et la Ser³⁰⁸ par la furine pour finalement former un hétérodimère de 190 kDa présent à la membrane plasmique¹⁶⁶. Le RTK MET est constitué de deux chaînes α et β reliées par un pont disulfure (Figure 86).

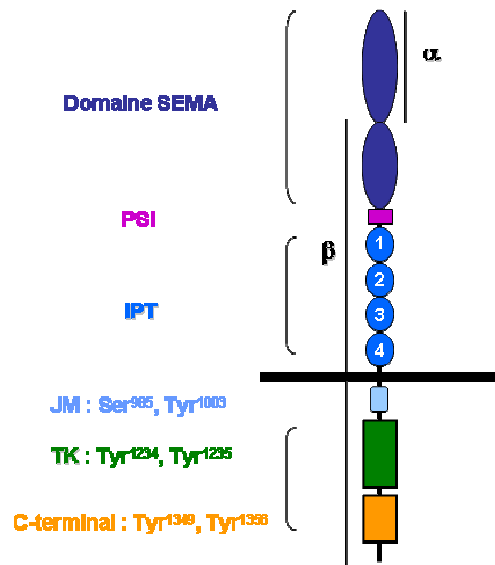


Figure 86 : Représentation schématique du RTK MET

La chaîne α (45 kDa) extracellulaire comprend une partie du domaine SEMA ($S\alpha$) homologue à certains domaines retrouvés dans le récepteur aux sémaphorines.

La chaîne β (145 kDa) est formée :

* d'une partie extracellulaire dans laquelle on distingue :

- un domaine SEMA ($S\beta$), prolongement de $S\alpha$, comportant un motif riche en cystéines appelé MRS (MET-Related Sequence) ;

- un domaine de 50 acides aminés dont quatre ponts disulfures conservés nommé PSI car ce domaine est retrouvé dans les Plexines, les Sémaphorines et les Intégrines¹⁶⁷ ;

¹⁶⁵ Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G. Sequence of MET protooncogen cDNA has feature characteristic of the tyrosine kinase family of growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**. 84, 6379-6383

¹⁶⁶ Komada M, Hatsuzawa K, Shibamoto S, Ito F, Nakayama K, Kitamura N. Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett.* **1993**. 328, 25-29

¹⁶⁷ Bork P, Doerks T, Springer TA, Snel B. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci.* **1999**. 24, 261-263

- quatre domaines de 90 acides aminés disposés en feuillets β appelés IPT car ils sont de type « Immunoglobulin like » retrouvées dans les Plexines et les facteurs de Transcription ;

* d'une partie transmembranaire comportant des résidus hydrophobes pour permettre l'ancrage du récepteur à la membrane ;

* d'une partie intracellulaire divisée en trois parties :

- une région juxtamembranaire (JM) comportant deux résidus impliqués dans la régulation négative du récepteur. Quand la Ser⁹⁸⁵ est phosphorylée, elle inhibe *in vivo* l'autophosphorylation de MET¹⁶⁸. La phosphorylation de la Tyr¹⁰⁰³ favorise l'ubiquitination, l'endocytose et la dégradation du récepteur¹⁶⁹.

- un domaine à activité tyrosine kinase (TK) incluant la Tyr¹²³⁴ et la Tyr¹²³⁵ transphosphorylées lors de l'activation du récepteur¹⁷⁰. Son architecture suit celle des autres RTKs, à savoir une structure bilobée renfermant le site de liaison de l'ATP ;

- une région C-terminale comportant la Tyr¹³⁴⁹ et la Tyr¹³⁵⁶ nécessaires au recrutement de plusieurs protéines cellulaires essentielles à la transduction du signal¹⁷¹.

Après avoir détaillé les caractéristiques structurales du facteur de croissance HGF/SF et du RTK MET, nous allons nous intéresser à la façon dont l'HGF/SF lie le récepteur MET.

1.2°) Mode de liaison HGF/SF-MET

Dans un premier temps, nous verrons comment les formes tronquées de l'HGF/SF constituées du domaine N-terminal et d'un à quatre domaines kringles ont permis d'étudier la liaison entre l'HGF/SF et MET. Il s'agit des variants (naturels ou non) NK1, NK2, NK3, NK4. Ce sont des formes tronquées de l'HGF/SF comportant le domaine N-terminal et d'un à quatre domaines kringles (Figure 87).

¹⁶⁸ Gandino L, Longati P, Medico E, Prat M, Comoglio PM. Phosphorylation of serine⁹⁸⁵ negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase. *J. Biol. Chem.* **1994.** 269, 1815-1820

¹⁶⁹ Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY, Park M. Mutation of the c-CBL TKB domain binding site on the met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol. Cell.* **2001.** 8, 995-1004

¹⁷⁰ Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM. Tyrosine¹²³⁴⁻¹²³⁵ are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the Met proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene.* **1994.** 9, 49-57

¹⁷¹ Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM. A multifunctional docking site mediates signalling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell.* **1994.** 77, 261-271

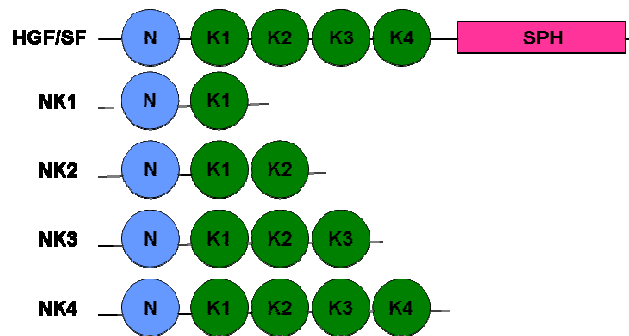


Figure 87 : Représentation schématique de l'HGF/SF et de ses variants

La liaison du variant naturel NK1 à MET est spécifiquement déplacée par l'ajout d'HGF/SF. NK1 induit la phosphorylation de MET, possède une activité mitogène moins puissante que l'HGF/SF et il favorise la dispersion cellulaire¹⁷². NK1 présente une activité agoniste partielle *in vitro*¹⁷³ et *in vivo*¹⁷⁴ et ceci, uniquement en présence d'héparine.

NK2, un autre transcrite alternatif de l'HGF/SF, est un inhibiteur de l'activité mitogène induite par l'HGF/SF¹⁷⁵. La liaison de NK2 à MET déplace l'HGF/SF et entraîne la phosphorylation du RTK. Néanmoins, son rôle dans la mobilité des cellules épithéliales est moindre par rapport à celle induite par l'HGF/SF¹⁷⁶.

NK3 favorise la mobilité des cellules endothéliales¹⁷⁷.

NK4 lie MET avec une affinité plus faible que l'HGF/SF mais inhibe l'ensemble de ses activités biologiques et est donc considéré comme un antagoniste compétitif¹⁷⁸.

Il est maintenant intéressant d'exposer la façon dont la forme complète de l'HGF/SF peut lier les différents domaines de MET. Les domaines NK1 de la chaîne α de l'HGF/SF

¹⁷² Cioce V, Csaky KG, Chan AM-L, Bottaro DP, Taylor WG, Jensen R, Aaronson SA, Rubin JS. Hepatocyte growth factor (HGF)/NK1 is a naturally occurring HGF/scatter factor variant with partial agonist/antagonist activity. *J. Biol. Chem.* **1996**. 271. 13110-13115

¹⁷³ Holmes O, Pillozzi S, Deakin JA, Carafoli F, Kemp L, Butler PJG, Lyon M, Gherardi E. Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains. *J. Mol. Biol.* **2007**. 367, 395-408

¹⁷⁴ Jakubczak JL, LaRoche WJ, Merlino G. NK1, a natural splice variant of hepatocyte growth factor/scatter factor, is a partial agonist *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **1998**. 18, 1275-1283

¹⁷⁵ Chan A M-L, Rubin JS, Bottaro DP, Hirschfield DW, Chedid M, Aaronson SA. Identification of a competitive HGF antagonist encoded by an alternative transcript. *Science*. **1991**. 254, 1382-1385

¹⁷⁶ Hartmann G, Naldini L, Weidner KM, Sachs M, Vigna E, Comoglio PM, Birchmeier W. A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation but not mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**. 89, 11574-11578

¹⁷⁷ Silvagno F, Follenzi A, Arese M, Prat M, Giraudo E, Gaudino G, Camussi G, Comoglio PM, Bussolino F. *In Vivo* Activation of met tyrosine kinase by heterodimeric hepatocyte growth factor molecule promotes angiogenesis. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **1995**. 15, 1857-1865

¹⁷⁸ Matsumoto K, Nakamura T. Mechanisms and significance of bifunctional NK4 in cancer treatment. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **2005**. 333, 316-327

lient les domaines IPT 3 et 4 de MET avec une haute affinité ($K_d = 1 \text{ nM}$)¹⁷⁹. Le domaine N-terminal est important pour la liaison au récepteur ainsi que dans l'activité mitogène et de dispersion des hépatocytes. La délétion des domaines K1 ou K2 abolit totalement l'activité biologique de l'HGF/SF. Par contre, celle des domaines K3 et K4 inhibe partiellement les activités biologiques de l'HGF/SF¹⁸⁰.

La chaîne β exprimée seule lie MET mais n'a pas d'activité biologique¹⁸¹. Stamos et coll ont déterminé la structure cristallographique de la chaîne β complexée aux domaines Sema et PSI de MET et ont pu déterminer que l'affinité de liaison est de l'ordre de 90 nM ¹⁸². La forme complète de l'HGF/SF est donc nécessaire et essentielle pour activer le récepteur et les cascades de signalisations intracellulaires¹⁸³. Il existe donc une coopération entre les deux chaînes protéiques formant l'HGF/SF. La chaîne α est le site de haute affinité pour MET alors que la chaîne β , zone de basse affinité, joue un rôle dans l'activation optimale du récepteur¹⁸⁴.

L'HGF/SF et MET sont également capables d'interagir avec des biomolécules de la matrice extracellulaire, l'héparine et les héparanes sulfates (HS).

1.3°) Implications de l'héparine et des HS dans l'action de l'HGF/SF et de MET

L'héparine et les HS sont des glycosaminoglycanes (GAGs), qui sont conjugués à des protéines pour former les protéoglycanes, composants essentiels de la matrice extracellulaire. Les GAGs sont des polysaccharides linéaires constitués de la répétition d'unités disaccharidiques : un hexose ou un acide hexuronique lié à une hexosamine. Les membres de cette famille de biomolécules varient en fonction du type d'ose et de lien glycosidique.

¹⁷⁹ Basilico C, Arnesano A, Galluzzo M, Comoglio PM, Michieli P. A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in three Immunoglobulin-like region of Met. *J. Biol. Chem.* **2008**. 283, 21267-21277

¹⁸⁰ Matsumoto K, Takehara T, Inoue H, Hagiya M, Shimizu S, Nakamura T. Deletion of krigle domains or the N-terminal hairpin structure in hepatocyte growth factor results in marked decreases in related biological activities. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1991**. 181, 691-699

¹⁸¹ Hartmann G, Naldini L, Weidner KM, Sachs M, Vigna E, Comoglio PM, Birchmeier W. A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation but not mitogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**. 89, 11574-11578

¹⁸² Stamos J, Lazarus RA, Yao X, Kirchhofer D, Wiesmann C. crystal structure of the HGF β -chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *The EMBO J.* **2004**. 23, 2325-2335

¹⁸³ Holmes O, Pillozzi S, Deakin JA, Carafoli F, Kemp L, Butler PJG, Lyon M, Gherardi E. Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains. *J. Mol. Biol.* **2007**. 367, 395-408

¹⁸⁴ Matsumoto K, Kataoka H, Date K, Nakamura T. Cooperative interaction between α - and β -chains of hepatocyte growth factor on c-met receptor confers ligand-induced receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses. *J. Biol. Chem.* **1998**. 273, 22913-22920

1.3.1°) Présentation de l'héparine et des HS

L'héparine est composée majoritairement d'un acide 2-O-sulfo-L-iduronique et d'une 6-O-sulfo-2-N-sulfo-glucosamine reliés en α 1-4 (Figure 88).

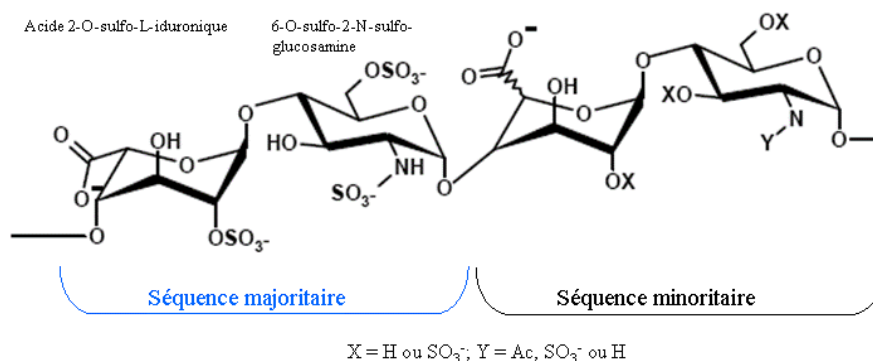


Figure 88 : Schématisation des unités disaccharidiques répétées de l'héparine

L'héparine possède la densité de charges négatives la plus élevée parmi les biomolécules connues (2,7 sulfates/disaccharide)¹⁸⁵. Son poids moléculaire varie de 5 à 40 kDa avec une masse moléculaire moyenne de 15 kDa. Dans l'organisme, l'héparine est stockée dans les granules sécrétoires des mastocytes dans des organes tels que le foie, les intestins et les poumons. Principalement utilisée en thérapeutique dans le traitement et la prévention des maladies thromboemboliques, elle est administrée en injection sous cutanée sous forme d'héparine de bas poids moléculaire. Elle s'associe à l'antithrombine III et potentialise son effet inhibiteur de la coagulation. Les interactions observées sont électrostatiques et par liaisons hydrogène entre les sulfates et/ou les carboxylates de l'héparine et des résidus basiques tels que les lysines et les arginines de la protéine¹⁸⁶.

Les HS sont composés majoritairement d'un acide 2-O-sulfo-D-glucuronique et d'une 2-N-acétylglucosamine reliés en α 1-4 (Figure 89).

¹⁸⁵ Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**. 41, 390-412

¹⁸⁶ Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike RN, Carrell RW. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**. 94, 14683-14688

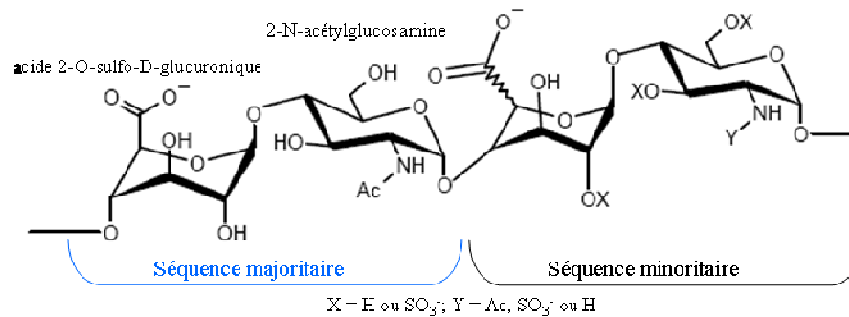


Figure 89 : Schématisation des unités disaccharidiques répétées des HS

Les HS sont des molécules moins sulfatées que l'héparine (1 sulfate/disaccharide). Son poids moléculaire varie de 5 à 70 kDa avec une masse moléculaire moyenne de 30 kDa. Sous leur forme d'HSPG (**H**éparanes **S**ulfates **P**rotéo**G**lycanes), ils sont retrouvés à la surface de la plupart des cellules et dans la MEC (**m**atrice **e**xtra**c**ellulaire) des tissus et des organes de tous les mammifères. En interagissant avec diverses protéines de la MEC, ils interviennent dans sa structure, dans le contrôle de la migration, l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaires. Leur rôle est majeur pendant l'embryogenèse et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Les interactions HS-protéines sont impliquées dans divers processus physiopathologiques tels que l'inflammation, l'angiogenèse et les dépôts amyloïdes observés dans la maladie d'Alzheimer. Ceci suggère que des mimes d'oligosaccharides pourraient devenir des candidats médicaments dans des pathologies telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer¹⁸⁷.

1.3.2°) Implications biologiques de la liaison entre l'héparine/HS et les protéines

L'héparine et les HS interagissent avec diverses familles de protéines (enzymes, facteurs de croissance...) et peuvent favoriser l'augmentation de la concentration locale en protéine mais également modifier son activité biologique. En étudiant la distribution des résidus basiques (B) de protéines liant l'héparine, des séquences consensus de reconnaissance des GAGs ont été identifiées. Elles sont de type [XBBXBX] et [XBBBXXBX], dites de « Cardin et Weintraub », où B est un résidu basique et X, un résidu neutre et hydrophobe. Ces liaisons se font par des interactions électrostatiques entre B et les carboxylates et/ou les

¹⁸⁷ Lindhal U. Heparan sulphate–protein interactions–A concept for drug design? *Thromb Haemost.* **2007.** 98, 109-115

sulfates de l'héparine¹⁸⁸. Néanmoins, parmi les résidus basiques, Fromm et coll ont montré que l'affinité d'une arginine avec l'héparine est plus importante que celle d'une lysine¹⁸⁹. Ils démontrent ensuite l'importance du regroupement des arginines en « clusters » de 1, 2, ou 3 ainsi que le rôle de leur espacement respectif dans des sites connus de liaison à l'héparine. Ils établissent ainsi des séquences consensus optimales dans l'interaction avec l'héparine et les HS¹⁹⁰.

Un nombre important de protéines peuvent interagir avec les HS et nous nous intéresserons à deux exemples. Le premier est celui de l'interféron γ qui est une cytokine intervenant dans la défense immunitaire. L'interaction avec les HSPG lui permet de se positionner dans une conformation plus favorable pour interagir avec son récepteur, d'être protégé et de favoriser son accumulation aux abords des tissus cibles¹⁹¹. D'autres protéines interagissent avec les HS comme, par exemple, les membres de la famille du FGF. Cette famille de facteurs de croissance est impliquée dans l'angiogenèse, le développement embryonnaire et la régénération tissulaire. Il est maintenant établi que l'héparine et les héparanes sulfates interagissent à la fois avec le FGF et son récepteur, ce qui est nécessaire pour la dimérisation et l'activation de la signalisation intracellulaire¹⁹².

Il existe également des preuves de l'interaction entre l'héparine et l'HGF/SF. En effet, la purification de l'HGF/SF a été possible grâce à son affinité pour l'héparine de l'ordre du nanomolaire¹⁹³. L'interaction se fait principalement au niveau du domaine N-terminal¹⁹⁴ riche en clusters d'acides aminés basiques¹⁹⁵. Le second site d'interaction se situe sur K2 qui possède également des clusters de résidus basiques¹⁹⁶. Une étude cristallographique du

¹⁸⁸ Cardin AD, Weintraub HJR. Molecular modelling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arter.* **1989.** 9, 21-32

¹⁸⁹ Fromm JR, Hileman RE, Caldwell EEO, Weiler JM, Linhardt RJ. Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995.** 323. 279-287

¹⁹⁰ Fromm JR, Hileman RE, Caldwell EEO, Weiler JM, Linhardt RJ. Pattern and spacing of basic amino acids in heparin binding sites. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997.** 343. 92-100

¹⁹¹ Lortat-Jacob H. Interferon and heparan sulphate. *Biochem. Soc. Trans.* **2006.** 34, 461-464

¹⁹² Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahim OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cyt. Growth Fact. Rev.* **2005.** 16, 107-137

¹⁹³ Zhou H, Casas-Finet JR, Coats RH, Kaufman JD, Stahl SJ, Wingfield PT, Rubin JS, Bottaro DP, Byrd RA. Identification and dynamics of heparin-binding site in hepatocyte growth factor. *Biochem.* **1999.** 38, 14793-14802

¹⁹⁴ Sakata H, Stahl SJ, Taylor WG, Rosenberg JM, Sakaguchi K, Wingfield PT, Rubin JS. Heparin binding and oligomerisation of hepatocyte growth factor/scatter factor isoforms. *J. Biol. Chem.* **1997.** 272, 9457-9463

¹⁹⁵ Zhou H, Mazzulla MJ, Kaufman JD, Stahl SJ, Wingfield PT, Rubin JS, Bottaro DP, Byrd RA. The solution structure of the N-terminal domain of hepatocyte growth factor reveals a potential heparin-binding site. *Struct.* **1998.** 6, 109-116

¹⁹⁶ Mizuno K, Inoue H, Hagiya M, Shimizu S, Nose T, Shimohigashi Y, Nakamura T. Hairpin loop and second kringle domain are essential sites for heparin binding and biological activity of hepatocyte growth factor. *J. Biol. Chem.* **1994.** 269, 1131-1136

complexe NK1 et de l'héparine a été réalisée par Lietha et coll. Dans le domaine N, l'interaction se fait entre l'Arg⁷³ (rôle majeur), la Lys⁶⁰ et la Thr⁶¹ par des liaisons hydrogène avec l'héparine. Ces résidus sont nécessaires pour la dimérisation de NK1 en solution suggérant un rôle crucial *in vivo*¹⁹⁷.

D'autres études montrent que l'héparine module l'activité de deux antagonistes, NK1 et NK2, qui deviennent agonistes en sa présence et stimulent la prolifération de cellules exprimant MET. L'héparine agit en induisant la dimérisation de NK1¹⁹⁸. A l'heure actuelle, différents modèles ont été proposés et sont schématisés à la Figure 90.

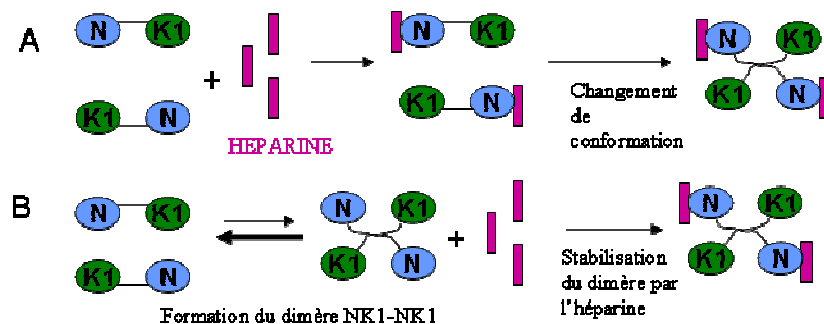


Figure 90 : Modèles proposés d'interaction NK1-Héparine par Kemp et coll

Le premier des modèles (A Figure 90) suggère que l'héparine induit un changement de conformation de NK1, ce qui favorise sa dimérisation. Le dimère ainsi formé lierait alors MET de façon plus stable¹⁹⁹. Le second modèle (B Figure 90) propose que l'héparine stabilise le dimère NK1-NK1 préalablement constitué et qui peut se former même en absence d'héparine. D'autres modèles intègrent des éléments des deux premiers modèles et sont toujours sujets à controverse²⁰⁰.

En plus du récepteur MET, son récepteur de « haute affinité », l'HGF/SF a un récepteur de « basse affinité » : les chaînes HS des HSPG de la MEC. L'interaction se fait entre la chaîne α du ligand et la partie HS des HSPG²⁰¹. Cette propriété est importante dans

¹⁹⁷ Lietha D, Chirgadze DY, Mulloy B, Blundell TL, Gherardi E. Crystal structures of NK1-heparin complexes reveal the basis for NK1 activity and enable engineering potent agonists of the MET. *The EMBO J.* **2001.** 20, 5543-5555

¹⁹⁸ Schwall RH, Chang LY, Godowski PJ, Kahn DW, Hillan KJ, Bauer KD, Zioncheck TF. Heparin induces dimerisation and confers proliferative activity onto the hepatocyte growth factor antagonists NK and NK2. *J. Cell. Biol.* **1996.** 133, 709-718

¹⁹⁹ Lyon M, Deakin JA, Gallagher JT. The mode of action of heparan and dermatan sulfates in the regulation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *J. Biol. Chem.* **2002.** 277, 1040-1046

²⁰⁰ Kemp LE, Mulloy B, Gherardi E. Signalling by HGF/SF and Met: the role of heparan sulphate co-receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **2006.** 34, 414-417

²⁰¹ Lyon M, Deakin JA, Mizuno K, Nakamura T, Gallagher JT. Interaction of hepatocyte growth factor with heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **1994.** 269, 11216-11223

l'activation de l'HGF/SF. En effet, lors de sa synthèse, son précurseur inactif est sécrété et stocké dans la MEC associé aux HSPG. Ceci crée un réservoir d'HGF/SF rapidement utilisable en cas de lésions au niveau du foie, du rein, de la rate.... Son activation se fait par l'HGFA (**H**epatocyte **G**rowth **F**actor **A**ctivator) dont la forme active est également affine pour les HSPG. Cette double interaction avec les HSPG « co-localise » le pro-HGF/SF et l'HGFA activé à proximité des organes à régénérer²⁰².

Des tests ELISA ont permis à Rubin et coll de mettre en évidence une liaison entre la partie extracellulaire de MET et les HS²⁰³. De plus, en s'intéressant aux acides aminés du domaine extracellulaire de MET, des séquences consensus de type Cardin-Weintraub (en gras et soulignées à la Figure 91) et des clusters de résidus basiques sont relevés. A l'instar de nombreuses protéines liant l'héparine et les HS, on peut supposer que ces résidus seraient impliqués dans une interaction avec l'héparine et les HS.

10	20	30	40	50	60	
MKAPAVLAPG	ILVLLFTLVQ	RSNGECKEAL	AKSEMNVNME	YQLPNFTAET	PIQNVILHEH	
70	80	90	100	110	120	
HIFLGATNYI	YVLNEEDLQK	VAEYKTGPVL	EHPDCFCQD	CSSKANLSSG	VWKDNINMAL	
130	140	150	160	170	180	
VVDTYDDQL	ISCGSVNRGT	QQRHVFPNH	TADIQSEVHC	IFSPQIEEPS	QCPDCVVSAL	
190	200	210	220	230	240	Domaine
GAKVLSSVKD	RFINFFVGMT	INSSYFPDHP	LHSISVRRLE	ETKDGFMFLT	DQSYIDVLPK	SEMA
250	260	270	280	290	300	
FRDSYPIKYV	HAFESMNFY	FLTVQRETLD	AQTFHTRIIR	FCSINSGLHS	YMEMPLECIL	
310	320	330	340	350	360	
TEKRRKRSTK	KEVFNILQAA	YVSKPGAQLA	RQIGASLNDD	ILFGVFAQSK	PDSAEPMDRS	
370	380	390	400	410	420	
AMCAFFIKYV	NDFFNKIVNK	MNVRCLQHFY	GPNHEHCFNR	TLLRNSGCE	ARRDEYRTEF	
430	440	450	460	470	480	
TTALQRVDLF	MGQFSEVLLT	SISTFIKBDL	TIANLGTSEG	RFMQVVVSRK	GPSTPHVNF	
490	500	510	520	530	540	
LDSHPVSEFV	IVEHTLNQMG	YTLVITGKKEI	TKIPLNGLGC	RHFQSCSOCL	SAPPFVOCGW	
550	560	570	580	590	600	
CHDKCVRSEE	CLSGTWTQOI	CLPAITKVFP	NSAPLEGGTR	LTICGWDFGF	RRNKKFDLEK	IPT1
610	620	630	640	650	660	
TRWLLGNESC	TLTLSESTWN	TLKCTVGPAM	NKHFNMSLII	SNGHGTTQYS	TFSYVDPVIT	
670	680	690	700	710	720	IPT2
SISPKYGPMA	GGTLLTLTGM	YLNCGNSRHI	SIGGKCTLEK	SVSNSILECY	TPAQTISTEF	
730	740	750	760	770	780	
AVKLIKIDIAN	RETSIFSYRE	DPIVYEINPT	KSFISGGSTI	TGVGKNLNSV	SVPRMVINVR	IPT3
790	800	810	820	830	840	
EAGRNFIVAC	QHRNSSEIIC	CTTPSLQQLN	LQLPLKTRAF	FELDGILSKY	FDLIYVHNPV	
850	860	870	880	890	900	
FKPFEKPVMI	SMGNEMVLEI	KGNDIDPEAV	KGEVLKVGNE	SCENIHLHSE	AVLCTVPNDL	IPT4
910	920	930	940	950	960	
LKLNSELNIE	WKOATSSTVL	GKVIIVQPDON	FTGLIAGVVS	ISTALLLLLG	FFLWLKRRKQ	

Figure 91 : Séquence en acides aminés de la partie extracellulaire de MET
(les séquences consensus de Cardin et Weintraub sont en gras et soulignées)

²⁰² Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura N. activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator. *J. Biol. Chem.* **1996**. 271, 3615-3618

²⁰³ Rubin JS, Day RM, Breckenridge D, Atabay N, Taylor WG, Stahl SJ, Wingfield PT, Kaufman JD, Schwall R, Bottaro DP. Dissociation of heparan sulphate and receptor binding domains of hepatocyte growth factor reveals that heparan sulphate-c-Met interaction facilitates signalling. *J. Biol. Chem.* **2001**. 276, 32977-32983

En conclusion, il existe des preuves de la liaison de l'HGF/SF avec l'héparine et les HS. Par contre, celles concernant le RTK MET et l'héparine et/ou les HS sont moins documentés. Comme c'est d'ailleurs le cas avec d'autres facteurs de croissance liant les HS, ces derniers concentreraient l'HGF/SF à la surface des cellules augmentant ainsi sa probabilité d'interaction avec MET²⁰⁴. Bien qu'ils ne semblent pas indispensables pour la liaison d'HGF/SF à MET *in vitro* et *in vivo*, l'héparine et les HS potentialisent l'effet mitogène de l'HGF/SF. En effet, ils favoriseraient son oligomérisation qui à son tour facilite la dimérisation et l'activation de MET. Pour NK1 et NK2, des variants naturels de l'HGF/SF, la situation est plus complexe. En effet, dans les cellules n'exprimant pas d'HS, ils ne lient pas MET et n'ont donc pas d'effets biologiques. C'est l'ajout d'héparine exogène qui permet de restaurer leur activité²⁰⁵.

Après cette étude détaillée des structures de l'HGF/SF et de MET, nous nous intéresserons aux effets cellulaires, dans le développement embryonnaire et tumoral.

2°) Rôles d'HGF/SF et de MET dans le développement normal et tumoral

2.1°) Effets cellulaires de la signalisation HGF/SF-MET

L'HGF/SF et MET participent à différents processus cellulaires tels que :

* la prolifération *in vitro* des mélanocytes, des hépatocytes, des cellules épithéliales et endothéliales²⁰⁶.

* la survie cellulaire: suite à une privation de sérum, l'apoptose des cellules épithéliales rénales ainsi que les changements morphologiques associés sont atténués par l'ajout d'HGF/SF. La production d'HGF/SF permettrait de maintenir la croissance des cellules épithéliales et endothéliales ayant ainsi un effet de survie²⁰⁷.

²⁰⁴ Schlessinger J, Lax I, Lemmon M. Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell*. **1995**. 83, 357-360

²⁰⁵ Zioncheck TF, Richardson L, Liu J, Chang L, King KL, Bennett GL, Fügedi P, Chamow SM, Schwall RH, Stack RJ. Sulfated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity. *J. Biol. Chem*. **1995**. 270, 16871-16878

²⁰⁶ Matsumoto K, Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J. Biochem*. **1996**. 119, 591-600

²⁰⁷ Yo Y, Morishita R, Nakamura S, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Potential role of hepatocyte growth factor in the maintenance of renal structure: anti-apoptotic action of HGF on epithelial cells. *Kidney. Int*. **1998**. 54, 1128-1138

* la dispersion et l'organisation spatiale de différents types cellulaires comme les cellules épithéliales rénales canines appelées MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) très utilisées lors d'études portant sur les effets d'HGF/SF-MET, car ces cellules expriment le récepteur MET et réagissent bien à l'effet de l'HGF/SF. Lors de leur culture sur boîtes de pétri, l'HGF/SF provoque leur dispersion, alors que lorsqu'elles sont cultivées dans un gel de collagène, il entraîne la formation d'un réseau de tubules (Figure 92)²⁰⁸.

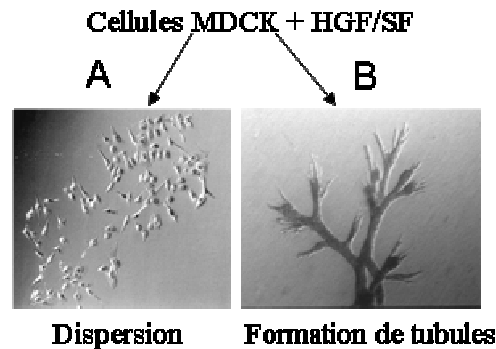


Figure 92 : Effets de l'HGF/SF sur les cellules MDCK cultivées :
A°) sur boîte de Pétri ; B°) dans un gel de collagène

A titre d'exemple, l'angiogenèse fait intervenir ces processus cellulaires, à savoir la prolifération, la survie, la migration et l'organisation des cellules endothéliales, et il a été démontré que l'HGF/SF est un inducteur d'angiogenèse²⁰⁹.

2.2°) Développement embryonnaire

Le récepteur membranaire MET et son ligand, l'HGF/SF, interviennent dans le développement embryonnaire et plus particulièrement lors de la formation du foie²¹⁰.

Chez la souris, l'inactivation du gène de l'HGF/SF entraîne la mort *in utero* des embryons, avec des défauts dans la structure et la taille du foie et du placenta^{211,212}. Par

²⁰⁸ Rosario M, Birchmeier W. How to make tubes°: signalling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends. Cell. Biol.* **2003**. 13, 328-335

²⁰⁹ Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffler A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J. Cell. Biol.* **1992**. 119, 629-641

²¹⁰ Birchmeier C, Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends. Cell. Biol.* **1998**. 8, 404-410

²¹¹ Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. **1995**. 373, 699-702

²¹² Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno, J, Noda T, Kitamura N. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*. **1995**. 373, 702-705

ailleurs, la formation des muscles, notamment lors du développement et de la migration des précurseurs des cellules musculaires, est altérée chez les souris homozygotes *c-met*^{-/-}²¹³. Lors du développement du système nerveux central, l'HGF/SF est, à la fois, un facteur de survie pour les motoneurons et un facteur chimioattractif pour leurs axones²¹⁴. MET et son ligand jouent également un rôle important dans le développement du rein²¹⁵, de la glande mammaire²¹⁶, des poumons²¹⁷.

2.3°) Régénération et maintien de l'intégrité tissulaire à l'âge adulte

Le facteur de croissance HGF/SF et le RTK MET jouent également un rôle dans la régénération tissulaire chez l'adulte et plus particulièrement dans celle du foie. En effet, chez la souris, il a été montré l'importance de MET pour sa régénération suite à une hépatectomie partielle mais également dans l'homéostasie de cet organe²¹⁸.

D'autres organes bénéficient également de l'effet régénérateur de la signalisation HGF/SF-MET. Chez la souris, lors de l'ablation partielle ou lors de lésions aiguës du rein, le taux d'HGF/SF circulant augmente alors que l'injection intraveineuse d'HGF/SF recombinant accélère la régénération rénale²¹⁹. L'expression autocrine de *c-met* et de son ligand est essentielle lors de la régénération de la peau. Alors que d'autres facteurs de croissance peuvent intervenir en cas de lésions, MET est à ce jour le seul récepteur essentiel à cette fonction²²⁰. En neutralisant l'HGF/SF endogène et en supplémentant en HGF/SF recombinant, Nakamura et coll ont mis en évidence, sur un modèle d'ischémie/reperfusion chez le rat, l'effet cardioprotecteur de l'HGF/SF endogène et l'effet d'atténuateur de l'HGF/SF exogène

²¹³ Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. essential role for the *c-met* receptor in the migration of myogenic precursors cells into the limb bud. *Nature*. **1995**. 376,768-771

²¹⁴ Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG, Bladt F, Birchmeier C, Barres BA, Tessier-Lavigne M. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron*. **1996**. 17, 1157-1172

²¹⁵ Santos OFP, Barros EJG, Yang X-M, Matsumoto K, Nakamura T, Park M, Nigam SK. Involvement of hepatocyte growth factor in kidney development. *Dev. Biol.* **1994**. 163, 525-529

²¹⁶ Niranjan B, Buluwela L, Yant J, Perusinghe N, Atherton A, Phippard D, Dale T, Gusterson B, Kamalati T. HGF/SF: a potent cytokine for mammary growth, morphogenesis and development. *Dev.* **1995**. 121, 2897-2908

²¹⁷ Ohmichi H, Koshimizu U, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) acts as a mesenchyme-derived morphogenic factor during foetal lung development. *Dev.* **1998**. 125, 1315-1324

²¹⁸ Borowiak M, Garratt AN, Wüstefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**. 101, 10608-10613

²¹⁹ Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**. 91, 4357-4361

²²⁰ Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, Stradal T, Munz B, Werner S, Wehland J, Birchmeier C, Birchmeier W. *c-MET* is essential for wound healing in the skin. *J. Cell. Biol.* **2007**. 177, 151-162

sur les lésions induites²²¹. Après des lésions pulmonaires, une augmentation de la synthèse d'HGF/SF au niveau du poumon entier, suivie de la prolifération des cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires ont été observées. Ware et coll ont ainsi prouvé le rôle de l'HGF/SF endogène dans la régénération de cet organe. De plus, l'HGF/SF exogène permet d'inverser les effets provoqués par les différents agents d'agression²²².

Le facteur de croissance HGF/SF et le RTK MET sont également impliqués de multiples façons dans le cancer, à savoir par leur surexpression, leur mutation ou encore l'activation autocrine de cette signalisation. C'est ce que nous allons développer dans le prochain paragraphe.

2.4°) Implications dans le cancer

La surexpression ou l'amplification de c-met est retrouvée dans des lignées cellulaires de cancers gastriques, pulmonaires, colorectaux, et osseux alors que des niveaux plasmatiques élevés d'HGF/SF sont retrouvés dans la plupart des cancers. Dans tous les cas, ces surexpressions sont associées à un mauvais pronostic²²³.

Des mutations de MET ont été retrouvées dans de nombreux cancers. Dans des formes héréditaires de cancers de la papille rénale, des mutations germinales et somatiques ont été identifiées dans le domaine kinase de MET. Cette découverte a mis en évidence pour la première fois un lien direct entre MET et le cancer²²⁴. Dans des cellules métastatiques de cancers de la tête et du cou, la Tyr¹²³⁵, essentielle à l'activité kinase du récepteur, est mutée en acide aspartique. Ce résidu chargé négativement mimerait la charge négative du phosphate. Cette mutation entraînerait l'activation constitutive de MET et favoriserait la prolifération et la dispersion métastatique des cellules portant cette mutation dans leur génome²²⁵. Pour déterminer le pouvoir tumorigène de ces mutations, des souris nude ont reçu par injection des

²²¹ Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Yoshiki S, Matsuda H, Nakamura T. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J. Clin. Invest.* **2000**. 106, 1511-1519

²²² Ware LB, Matthay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation and repair. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **2002**. 282, L924-L940

²²³ Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-MET, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cyt. Growth Factor Rev.* **2002**. 13, 41-59

²²⁴ Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, Kinjerski T, Weirich G, Miller M, Lubensky I, Neumann HPH, Brauch H, Decker J, Vocke C, Brown JA, Jenkins R, Richard S, Bergerheim U, Gerrard B, Dean M, Marston Linehan WM, Zbar B. Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene.* **1999**. 18, 2343-2350

²²⁵ Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, De Stefani A, Valente G, Giordano S, Cortesina G, Comoglio PM. Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene.* **2000**. 19, 1547-1555

cellules NIH3T3 porteuses de ces mutations. Les souris ont alors développé des cancers²²⁶. Les cellules porteuses de certaines de ces mutations seraient sélectionnées durant le processus métastatique, montrant le rôle de MET dans la formation des métastases²²⁷. Des mutations du domaine tyrosine kinase de MET pourraient favoriser les cancers hépatiques chez l'enfant²²⁸. Des mutations ont été mises en évidence au niveau des domaines Sema²²⁹ et juxtamembranaire²³⁰ de MET dans des lignées cellulaires de cancers pulmonaires.

Enfin, dans certains types de cellules cancéreuses, il peut se mettre en place une boucle d'activation autocrine, à savoir qu'un même type cellulaire exprime à la fois le ligand et le récepteur. Dans un contexte cellulaire sain, MET est exprimé par les cellules épithéliales alors que son ligand est surtout exprimé par les fibroblastes. Dans les cellules cancéreuses, les deux protéines peuvent être produites par une seule et même cellule et une boucle d'activation autocrine se met en place. Ceci a été observé dans des sarcomes osseux, des gliomes, des carcinomes thyroïdiens, pulmonaires, du sein²³¹. De plus, l'expression du gène de c-met dans des fibroblastes confère un caractère invasif et métastatique chez la souris²³². A l'inverse, la transfection du gène de l'HGF/SF dans des cellules épithéliales induit une transformation tumorigène et confère à ces cellules un comportement invasif et métastatique²³³.

Ces dérégulations font de la signalisation HGF/SF-MET une cible majeure lors du développement d'une thérapie anticancéreuse. L'invasion tumorale et les métastases, dans lesquelles MET est impliqué, sont des causes majeures de décès chez les patients atteints de

²²⁶ Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T, Zbar B, Vande Woude GF. Activating mutations for the MET tyrosine kinase receptor in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**. 94, 11445-11450

²²⁷ Lorenzato A, Olivero M, Patanè S, Rosso E, Oliaro A, Comoglio PM, Di Renzo MF. Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion. *Cancer Res.* **2002**. 62, 70225-7030

²²⁸ Park WS, Dong SM, Kim SY, Na EY, Shin MS, Pi JH, Kim BJ, Bae JH, Hong YK, Lee KS, Lee SH, Yoo NJ, Jang JJ, Pack S, Zhuang Z, Schmidt L, Zbar B, Lee JY. Somatic mutations in the kinase domain of the Met/Hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* **1999**. 59, 307-310

²²⁹ Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, Hansen M, Schaefer E, Naoki K, Lader A, Richards W, Sugarbaker D, Husain AN, Christensen JG, Salgia R. Functional expression and mutations of c-met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **2005**. 65, 1479-1488

²³⁰ Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, Johnson BE, Salgia R. c-met mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res.* **2003**. 63, 6272-6281

²³¹ Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2003**. 4, 915-925

²³² Rong S, Segal S, Anver M, Resau JH, Vande Woude GF. Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**. 91, 4731-4735

²³³ Johnson M, Koukoulis G, Kochhar K, Kubo C, Nakamura T, Iyer A. selective tumorigenesis in non-parenchymal liver epithelial cell lines by hepatocyte growth factor transfection. *Cancer Lett.* **1995**. 96, 37-48

cancer. De nombreuses équipes tentent de développer des inhibiteurs du ligand et/ou du récepteur.

3°) Stratégies d'inhibition de la signalisation HGF/SF-MET

Dans le but d'interférer avec l'HGF/SF et/ou MET, il existe plusieurs approches telles que :

- * des anticorps dirigés contre l'HGF/SF ou contre MET ;
- * des inhibiteurs du domaine tyrosine kinase de MET ;
- * des leurres de l'HGF/SF et de MET.

Nous évoquerons également les nouvelles stratégies développées ces dernières années dans la mesure où c'est dans cette direction que nous avons choisi d'orienter notre travail de recherche.

3.1°) Anticorps

Les anticorps L2G7²³⁴ et AMG102²³⁵ sont dirigés contre l'HGF/SF. L'AMG102 (Amgen) est le plus avancé du point de vue du développement clinique. En effet, l'étude de phase II en association avec d'autres molécules anti-tumorales est en cours dans le traitement des cancers pulmonaires, gastriques ou encore colorectaux.

L'anticorps monoclonal DN30 lie la chaîne β de MET sur un épitope distinct du ligand. Il inhibe l'ensemble des activités biologiques hormis la mobilité cellulaire²³⁶. Il provoque la coupure protéolytique du récepteur, entraînant d'une part le relargage du domaine extracellulaire, qui piège le ligand, et d'autre part, la dégradation de la partie intracellulaire par le protéasome²³⁷. Ce mode d'action original en fait un anticorps prometteur dont l'étude de phase I débutera prochainement.

²³⁴ Jin Kim K, Wang L, Su YC, Gillespie GY, Salhotra A, Lal B, Lattera J. Systemic anti-hepatocyte growth factor monoclonal antibody induces the regression of intracranial glioma xenografts. *Clin. Cancer Res.* **2006**. 12, 1292-1298

²³⁵ Jun HT, Sun J, Rex K, Radinsky R, Kendall R, Coxon A, Burgess TL. AMG 102, a fully human anti-hepatocyte growth factor/scatter factor neutralizing antibody, enhances the efficacy of temozolomide or docetaxel in U-87 MG cells and xenografts. *Clin. Cancer Res.* **2007**. 13, 6735-6743

²³⁶ Prat M, Crepaldi T, Pennachietti S, Bussolino F, Comoglio PM. Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *J. Cell. Sci.* **1998**. 111, 237-247

²³⁷ Petrelli A, Circosta P, Granziero L, Mazzone M, Pisacane A, Fenoglio S, Comoglio PM, Giordano S. Ab-induced ectodomain shedding mediates hepatocyte growth factor receptor down-regulation and hampers biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**. 103, 5090-5095

3.2°) Leurres

Les leurres sont des protéines recombinantes qui sont capables :

* de mimer une zone de l'HGF/SF comme c'est le cas pour NK4 ;

* de résister à l'activation protéolytique en élaborant une protéine dérivée du pro-HGF/SF.

NK4 est un variant de l'HGF/SF considéré comme un antagoniste compétitif de l'HGF/SF. La protéine recombinante NK4 lie le récepteur MET avec une affinité plus faible que l'HGF/SF et elle inhibe l'ensemble des activités biologiques du RTK²³⁸ (Figure 93).



Figure 93 : Représentation schématique de NK4

C'est à la fois un antagoniste de l'HGF/SF et un inhibiteur d'angiogenèse, processus se mettant en place lors d'un cancer et qui favorise la survie des cellules cancéreuses²³⁹. Un essai de thérapie génique chez la souris met en évidence sa capacité à inhiber la croissance tumorale et les métastases hépatiques du cancer du côlon²⁴⁰

Parmi les leurres existants, on trouve également une protéine dérivée du pro-HGF/SF, qui ne peut pas subir les étapes de maturation nécessaires à l'obtention de la forme active de l'HGF/SF. Nous avons vu que cette forme active de l'HGF/SF est obtenue par coupure protéolytique de la liaison Arg⁴⁹⁴-Val⁴⁹⁵. La protéine leurre dérivée du pro-HGF/SF ne peut pas être maturée car l'arginine a été remplacée par une glutamine. Elle entre en compétition avec la forme mature de l'HGF/SF dans la liaison à MET et inhibe l'ensemble des réponses cellulaires. Une étude a permis de montrer qu'elle possède une activité antitumorale et anti-métastatique²⁴¹.

²³⁸ Date K, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS Lett.* **1997.** 420, 1-6

²³⁹ Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. HGF/NK4, a four-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res.* **2000.** 60, 6737-6743

²⁴⁰ Wen J, Matsumoto K, Taniura N, Tomioka D, Nakamura T. Inhibition of colon cancer growth and metastasis by NK4 gene delivery in mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2007.** 358, 117-123

²⁴¹ Mazzone M, Basilico C, Cavassa S, Pennachietti S, Risio M, Naldini L, Comoglio PM, Michieli P. An uncleavable form of pro-scatter factor suppresses tumor growth and dissemination in mice. *J. Clin. Invest.* **2004.** 114, 1418-1432

Des stratégies analogues ont été développées pour mimer certains domaines extracellulaires de MET (appelés « decoy », Sema). La protéine recombinante decoy MET, composée des domaines N-terminal à IPT4, lie l'HGF/SF et MET avec une affinité de l'ordre du nanomolaire. Elle inhibe à la fois l'ensemble des activités de MET sur cellules tumorales dépendantes ou non du ligand. *In vivo*, un effet inhibiteur sur la croissance tumorale, la dissémination métastatique, l'angiogenèse tumorale a été observé²⁴². Il a été mis en évidence l'importance du domaine Sema dans la dimérisation et l'activation du RTK en délétant successivement chaque domaine de la partie extracellulaire de MET. La protéine recombinante, constituée uniquement de ce domaine Sema, inhibe *in vitro* la signalisation HGF/SF-MET²⁴³.

3.3°) Inhibiteurs de la kinase de MET

Ce sont des molécules naturelles ou synthétiques, généralement de faible poids moléculaire. Leur action est d'inhiber la kinase de MET soit par compétition avec l'ATP au niveau de la poche catalytique de l'enzyme, soit par une action allostérique. Dans les deux cas, elles abolissent l'autophosphorylation de MET et donc sa signalisation. Elles peuvent être spécifiques ou non de la kinase de MET²⁴⁴. Une sélection de quelques unes de ces molécules, de leur statut en recherche clinique et des cancers ciblés est présentée dans le Tableau 4.

²⁴² Michieli P, Mazzone M, Basilico C, Cavassa S, Sottile A, Naldini L, Comoglio PM. Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell*. **2004**. 6, 61-72

²⁴³ Kong-Beltran M, Stamos J, Wickramasinghe D. The sema domain of met is necessary for receptor dimerisation and activation. *Cancer Cell*. **2004**. 6, 75-84

²⁴⁴ Liu X, Newton RC, Scherle PA. Developing c-MET pathway inhibitors for cancer therapy : progress and challenges. *Trends Mol. Med*. **2009**. 16, 37-45

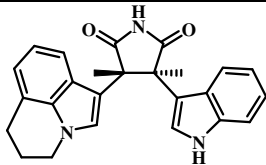
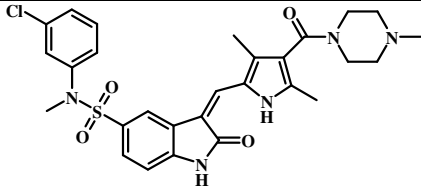
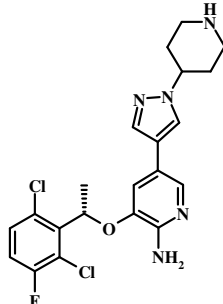
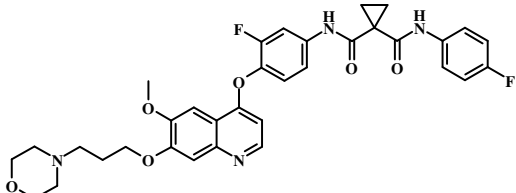
<u>Molécules</u>	<u>Structure</u>	<u>Statut</u>	<u>Cancers ciblés</u>	<u>Réf</u>
<u>Spécifiques de MET</u>				
ARQ197 (ArQule)		II	cancer du poumon non à petites cellules cancer hépatocellulaire	245
SU11274 (Pfizer)		Pré-clinique	mélanome	246, 247
<u>Non spécifiques de MET</u>				
PF-2341066 (Pfizer)		III	cancer du poumon non à petites cellules	248, 249
XL880 (Exelixis)		II	cancers gastriques, de la papille rénale et tête et cou	250

Tableau 4 : Sélection de molécules inhibitrices de la kinase de MET

²⁴⁵ Borbath I, Santoro A, Van Laethem J, Daniele B, Cicalese L, Zeuzem S, Buggish P, Bolondi L, Strosberg J, Abbadessa G, Schwartz B. ARQ 197-215: a randomized, placebo-controlled Phase 2 clinical trial evaluating the c-MET inhibitor, ARQ 197, in patients with hepatocellular carcinoma. ASCO Annual Meeting 2010. Abstract TPS215

²⁴⁶ Sattler M, Pride YB, Ma P, Gramlich JL, Chu SC, Quinnan LA, Shirazian S, Linag C, Podar K, Christensen JG, Salgia R. A novel small molecule MET inhibitor induces apoptosis in cells transformed by the oncogenic TPR-MET tyrosine kinase. *Cancer Res.* **2003.** 63, 5462-5469

²⁴⁷ Kenessey I, Keszthelyi M, Kramer Z, Berta J, Adam A, Dobos J, Mildner M, Flachner B, Cseh S, Barna G, Szokol B, Orfi L, Keri G, Dome B, Klepetko W, Timar J, Tovari J. Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma. *Curr. Cancer Drug Targets.* **2010.** 10, 332-342

²⁴⁸ Zillhardt M, Christensen JG, Lengyel E. An orally available small-molecule inhibitor of c-MET, PF-2341066, reduces tumor burden and metastasis in a preclinical model of ovarian cancer metastasis. *Neoplasia.* **2010.** 12, 1-10

²⁴⁹ Zou HY, Li Q, Lee JH, Arango ME, McDonnell SR, Yamazaki S, Koudriakova TB, Alton G, Cui JJ, Kung PP, Nambu MD, Los G, Bender SL, Mroczkowski B, Christensen JG. An orally available small-molecule inhibitor of c-met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res.* **2007.** 67, 4408-4417

²⁵⁰ Srinivasan R, Linehan U, Vaishampayan T, Shankar SM, Sherman LJ, Liu Y, Choueri TK. A phase II study of two dosing regimens of GSK 1363089 (GSK089), a dual MET/VEGFR2 inhibitor, in patient with papillary renal carcinoma (PRC). *J. Clin. Oncol.* **2009.** 27, 5103

L'inconvénient d'inhiber l'activité kinase de MET réside dans le manque de spécificité dans la mesure où tous les RTK membranaires ont en commun le domaine à activité tyrosine kinase. Ces dernières années, des stratégies innovantes et parfois plus spécifiques ont été développées. Nous nous y intéresserons plus particulièrement dans la mesure où c'est dans cette direction que nous avons choisi d'orienter le travail présenté dans ce manuscrit.

3.4°) Nouvelles stratégies d'inhibition de la signalisation HGF/SF-MET

De nouvelles stratégies d'inhibition de la signalisation HGF/SF-MET sont en cours de développement. Elles font intervenir des molécules qui agissent soit au niveau extracellulaire en piégeant l'HGF/SF soit au niveau intracellulaire grâce à des peptides mimes du domaine kinase ou C-terminal de MET.

3.4.1°) Mimes d'héparine et des HS

Nous avons détaillé précédemment (page 143) les interactions entre l'héparine et/ou les HS et l'HGF/SF et/ou MET. Basées sur cette propriété, de nouvelles stratégies d'inhibition de la signalisation HGF/SF-MET ont été développées. En effet, Raiber et coll ont conçu et synthétisé des mimes non osidiques de l'héparine potentiellement inhibiteurs de la signalisation HGF/SF-MET²⁵¹. Ces mimes sont constitués d'un cycle aromatique fonctionnalisé par une fonction acide carboxylique mimant le résidu carbohydate central. Ce cycle porte, de façon diamétralement opposée, deux chaînes aliphatiques substituées par des groupements sulfates (N- et O-sulfates) de manière à reproduire l'orientation spatiale des sulfates présents sur le trisaccharide de départ (Figure 94).

²⁵¹ Raiber EA, Wilkinson JA, Manetti F, Botta M, Deakin J, Gallagher J, Lyon M, Ducki SW. Novel heparin/heparan sulphate mimics as inhibitors of HGF/SF-induced Met activation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007.** 17, 6321-6325

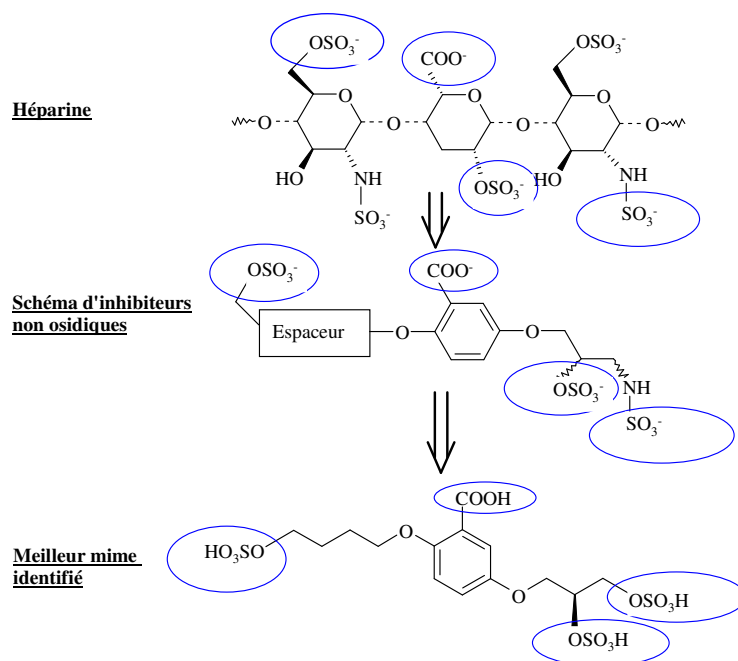


Figure 94 : De l'héparine (en haut), à son mime non osidique (au centre), au meilleur mime (en bas)

Le meilleur mime identifié lors de cette étude semble inhiber la phosphorylation des protéines participant à la signalisation HGF/SF-MET et la dispersion des cellules épithéliales MDCK en présence d'HGF/SF. Les auteurs de ce travail ont alors proposé que l'interaction entre l'HGF/SF et le meilleur mime identifié se ferait par des liaisons ioniques et hydrogènes au niveau de résidus connus pour leur importance dans l'interaction héparine-HGF/SF, comme la lysine ou encore l'arginine.

3.4.2°) Peptides liant l'HGF/SF

Des études de la littérature ont permis de montrer qu'il est possible d'inhiber la signalisation HGF/SF-MET par des peptides affins pour l'HGF/SF. Ces derniers peuvent être sélectionnés grâce au phage display, méthode choisie par Tam et coll pour identifier 10 cyclopeptides liant l'HGF/SF. Ils ont été nommés « HBX » pour « **H**GF/SF **B**inding » où X varie de 1 à 10²⁵². Le peptide possédant la meilleure affinité pour l'HGF/SF, HB10, est composé de 15 acides aminés. Sa structure est stabilisée par un pont disulfure intramoléculaire entre les cystéines et des interactions hydrophobes dues aux tryptophanes (Figure 95).

²⁵² Tam EM, Runyon ST, Santell L, Quan C, Yao X, Kirchofer D, Skelton NJ, Lazarus RA. Noncompetitive inhibition of hepatocyte growth factor-dependent Met signalling by a phage-derived peptide. *J. Mol. Biol.* **2009**. 385, 79-90

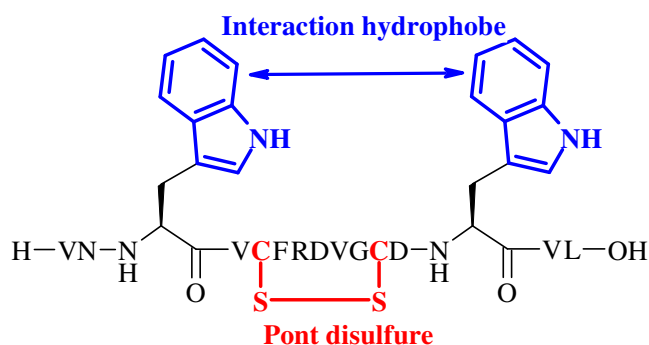


Figure 95 : Structure de HB10

Ce peptide HB10 lie la chaîne β de l'HGF/SF et diminue ainsi l'activation de MET par son ligand (IC_{50} de 0,45 μ M).

3.4.3°) Peptides mimant des régions intracellulaires de MET

Afin d'inhiber MET, Bardelli et coll ont élaboré des peptides dont les séquences miment deux régions intracellulaires de MET et incluent les tyrosines des domaines kinase (Y^{1234} et Y^{1235}) et de la région C-terminale (Y^{1349} et Y^{1356})²⁵³. La séquence notée X ajoutée à ces peptides correspond au domaine Tat permettant l'internalisation des peptides avec un minimum de toxicité pour les cellules²⁵⁴ (Figure 96).

²⁵³ Bardelli A, Longati P, Williams TA, Benvenuti S, Comoglio PM. A peptide representing the carboxyl-terminal tail of the met receptor inhibits kinase activity and invasive growth. *J. Biol. Chem.* **1999**. 274. 29274-29281

²⁵⁴ Derossi D, Chassaing G, Prochiantz A. trojan peptides : the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* **1998**. 8, 84-87

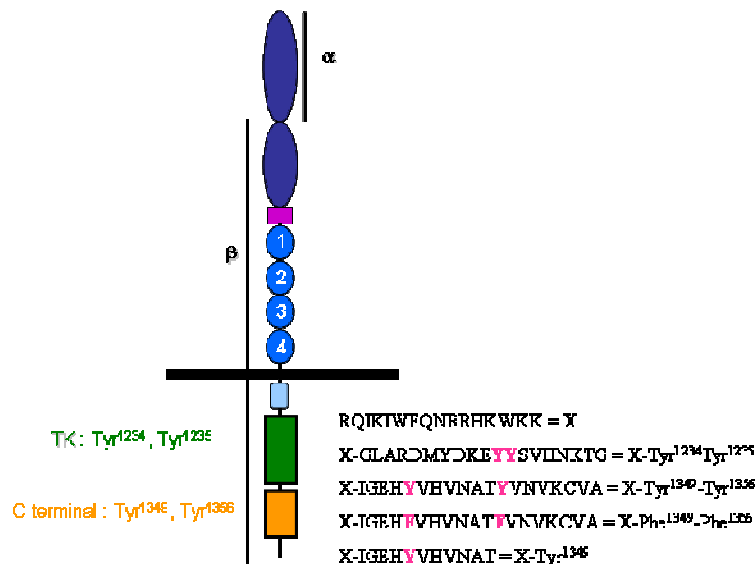


Figure 96 : Représentation schématique de MET (à gauche) et séquences des peptides correspondant aux sites d'autophosphorylation de MET (à droite)

D'après leurs résultats, seuls les peptides analogues du domaine C-terminal (X-Y₁₃₄₉₋₁₃₅₆ et X-F₁₃₄₉₋₁₃₅₆) semblent capables de lier MET, d'inhiber l'activité kinase de ses formes natives et mutantes, ainsi que les effets biologiques induits par l'HGF/SF. Ils pourraient agir soit en empêchant l'accès du substrat au site actif de l'enzyme ou en interagissant ailleurs dans le site catalytique.

Nous avons pu le voir, il existe actuellement différentes façons d'interférer avec la signalisation d'HGF/SF-MET, en agissant au niveau :

- * du ligand HGF/SF (anticorps, forme non processée) ;
- * du domaine kinase de MET (mimes d'ATP) ;
- * ou de domaines de MET impliqués dans son activation, que ce soit en extracellulaire (anticorps, récepteur leurre) ou en intracellulaire (peptides).

Dans le cadre de ce travail, nous avons voulu développer une stratégie d'inhibition originale et suffisamment spécifique de la signalisation d'HGF/SF-MET et nous avons donc ciblé le RTK au niveau extracellulaire. Dans la MEC, se trouvent des biomolécules connues pour leurs interactions avec MET et l'HGF/SF : l'héparine et les HS. Nous avons donc envisagé de préparer des composés mimes de ces polysaccharides capables d'inhiber la signalisation HGF/SF-MET.

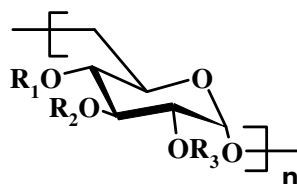
Le but du travail présenté dans cette partie du manuscrit a été de concevoir et de synthétiser des inhibiteurs agissant au niveau du domaine extracellulaire du récepteur MET. Ses implications dans le cancer en font une cible de choix dans le développement d'anticancéreux. Ce projet est basé sur la capacité de l'héparine et des HS à former un complexe ternaire avec le récepteur et son ligand. L'objectif était alors de préparer des mimes de l'héparine et des HS pouvant interagir avec MET et inhibant sa signalisation.

Dans ce contexte, des travaux ont été entrepris au laboratoire lors d'une collaboration entre les équipes de chimistes, dirigés par le Docteur Oleg Melnyk, et de biologistes, dirigés par le Docteur Véronique Fafeur, de l'Institut de Biologie de Lille. Ces deux équipes ont réuni leurs compétences afin de sélectionner des molécules liant l'HGF/SF et/ou la partie extracellulaire de MET et conduisant à l'inhibition de la signalisation HGF/SF-MET. Afin de mimer au mieux l'héparine et les HS, leur choix s'est alors arrêté sur une chimiothèque de polysaccharides sulfatés mise à disposition par la société Biodex.

Nous présenterons tout d'abord les résultats de ces travaux préliminaires qui ont été à la base du travail de thèse présenté dans ce manuscrit. Par la suite, nous détaillerons la conception et la synthèse de macromolécules potentiellement anticancéreuses.

C°) Résultats préliminaires

Les résultats préliminaires présentés ci-après ont été obtenus grâce à une collaboration avec la société Biodex qui avait mis à la disposition du laboratoire une chimiothèque d'environ 130 polysaccharides, appelés DMCBSu (Dextran MéthylCarboxylate Benzylamide Sulfate). Il s'agit de dérivés d'un dextran linéaire de 40 kDa substitués par des groupements CarboxyMéthyl (CM), Sulfates (S) et CarboxyMéthylBenzylamide (CMB) (Figure 97).



R1, R2, R3=H,
 CH₂COONa (CM);
 SO₃Na (S);
 CH₂CO-NH-CH₂-C₆H₅ (CMB)

Figure 97 : Structure schématique des DMCBSu

La synthèse de ces polysaccharides a été effectuée par la société Biodex en trois étapes :

* la carboxyméthylation des groupements hydroxyyles par l'acide chloroacétique en milieu basique dans un mélange eau/isopropanol²⁵⁵ ;

* une benzylamidification des groupements méthylcarboxylates par la benzylamine en présence d'un carbodiimide ;

* une sulfatation des groupements hydroxyyles restants par le complexe SO₃-pyridine dans le DMF.

Ces polysaccharides modifiés possèdent des propriétés biologiques assez proches de celles de l'héparine, le polysaccharide naturel le plus sulfaté. En particulier, c'est la dernière étape de sulfatation qui leur confère leurs propriétés anticoagulantes²⁵⁶.

Dans une première approche, la collaboration a porté sur l'identification de DMCBSu capables d'interagir avec le facteur de croissance PDGF-BB (l'isoforme BB du PDGF). Un criblage à l'aide d'une nouvelle génération de biopuces à polysaccharides a permis la sélection de DMCBSu capables de lier le PDGF-BB et de potentialiser son action biologique dans des tests cellulaires de prolifération²⁵⁷.

Grâce à ce premier résultat encourageant, le laboratoire s'est intéressé à l'identification de DMCBSu capables de lier, cette fois, le domaine extracellulaire de MET, en utilisant à nouveau la technologie biopuces à polysaccharides. Les biologistes ont montré que, parmi les polysaccharides sélectionnés, certains étaient capables d'inhiber la dispersion de cellules épithéliales et la phosphorylation de MET induite par l'HGF/SF.

1°) Criblage des polysaccharides grâce à la technologie biopuces

1.1°) Les biopuces : définitions et conception

Les biopuces sont des surfaces sur lesquelles des molécules « sonde » (peptide ou protéine, oligonucléotide, polysaccharide par exemple) sont immobilisées sous la forme de microspots dont la dimension est de l'ordre de 200 µm. Ces dispositifs permettent d'étudier

²⁵⁵ Huynh R, Chaubet F, Jozefonvicz J. Carboxymethylation of dextran in aqueous alcohol as the first step of the preparation of derivatized dextrans. *Angew. Makromol. Chem.* **1998**, 254, 61-65

²⁵⁶ Huynh R, Chaubet F, Jozefonvicz J. Anticoagulant properties of dextranmethylcarboxylate benzylamide sulfate (DMCBSu); a new generation of bioactive functionalized dextran. *Carbohydr. Res.* **2001**, 332, 75-83

²⁵⁷ Carion O, Lefebvre J, Dubreucq G, Dahri-Correia L, Correia J, Melnyl O. Polysaccharide microarrays for polysaccharide-platelet-derived growth-factor interaction studies. *ChemBioChem.* **2006**, 7, 817-826

les interactions de ces molécules « sondes » avec des molécules « cibles » solubles (facteurs de croissance, récepteurs membranaires...), à condition de pouvoir détecter la formation des complexes à l'interface solide-liquide. La miniaturisation du système permet d'augmenter le débit d'analyse et de n'utiliser que de très faibles quantités de molécules cibles et sondes. Cet outil, largement utilisé au laboratoire, a permis entre autres d'étudier les interactions entre peptides et protéines et en particulier la sérodétection d'anticorps dirigés contre un peptide ou une protéine virale²⁵⁸.

1.2°) Les biopuces comme outil de sélection de polysaccharides

Les interactions entre les DMCBSu de la chimiothèque et le domaine extracellulaire de MET ont été évaluées grâce à une biopuce à polysaccharides. Le support biopuce est une lame de verre, fonctionnalisée par une fonction semicarbazide, selon un protocole développé au laboratoire²⁵⁹ (Figure 98).

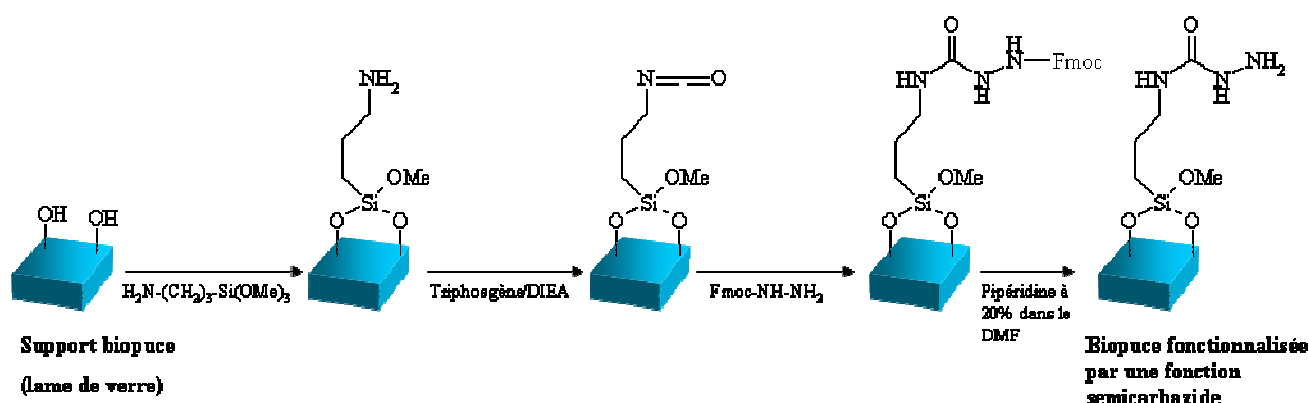


Figure 98 : Préparation d'une lame de verre fonctionnalisée semicarbazide

Les lames ont d'abord été fonctionnalisées par le 3-aminopropyltriméthoxysilane dans un mélange eau/méthanol. Suite à l'action d'un mélange de triphosgène et de DIEA, la fonction isocyanate a été introduite et a pu réagir à son tour avec la Fmoc-hydrazine pour former le semicarbazide protégé par le groupement Fmoc. Sa déprotection a été ensuite effectuée à l'aide d'une solution de pipéridine et de DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-

²⁵⁸ Duburcq X, Olivier C, Malingue F, Desmet R, Bouzidi A, Zhou F, Auriault C, Gras-Masse H, Melnyk O. Peptide-Protein microarrays for the simultaneous detection of pathogen infections. *Bioconj. Chem.* **2004**. 15, 307-316

²⁵⁹ Olivier C, Hot D, Huot L, Ollivier N, El-Mahdi O, Gouyette C, Huynh-Dinh T, Gras-Masse H, Lemoine Y, Melnyk O. α -oxox semicarbazone peptide or oligodeoxynucleotide microarrays. *Bioconj. Chem.* **2003**. 14, 430-439

ène) dans le DMF, ce qui a permis d'obtenir la lame de verre fonctionnalisée par une fonction semicarbazide.

Après l'adsorption des polysaccharides (molécule « sonde ») sur la lame de verre fonctionnalisée, ont été incubés successivement la protéine chimérique correspondant au domaine extracellulaire de MET (dans le cas présent, la molécule « cible ») fusionnée à un fragment cristallisable (Fc) d'anticorps humain, puis l'anticorps anti-anticorps humain marqué à la tétraméthylrhodamine. L'intensité de la fluorescence émise par les microspots de polysaccharide permet d'identifier les molécules les plus affines pour le domaine extracellulaire de MET (Figure 99).

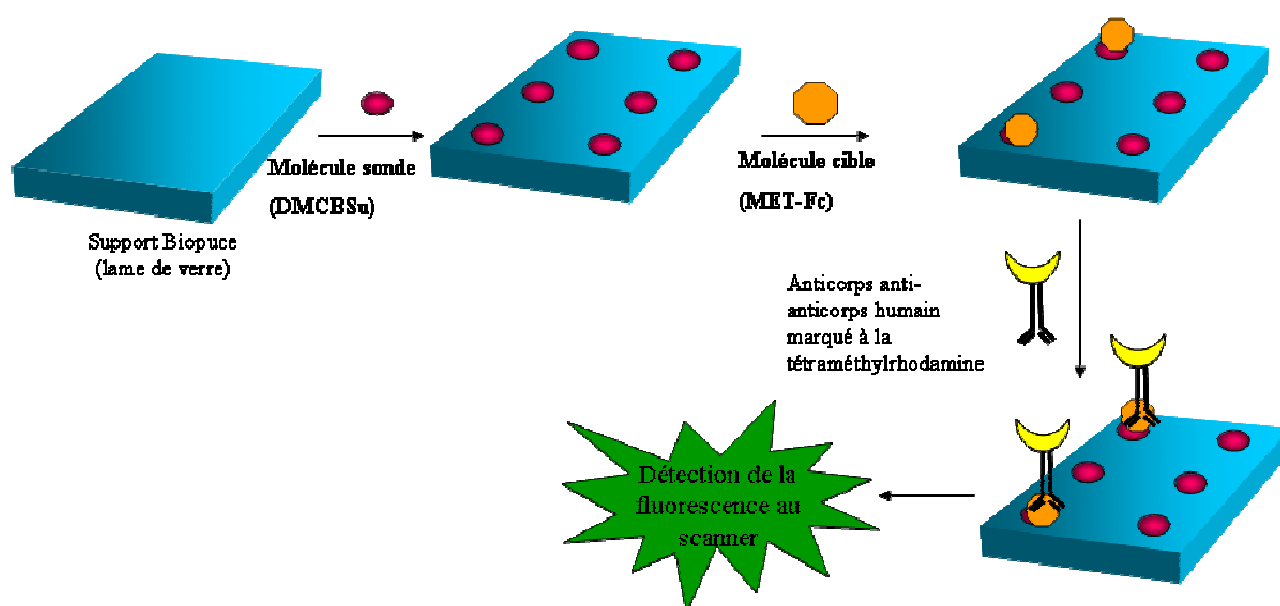


Figure 99 : Principe de la détection de l'interaction entre la molécule sonde (les DMCBSu) et la molécule cible (MET) au format biopuce

Pour illustrer ces propos, la Figure 100 montre l'image obtenue suite à la lecture au scanner confocal à fluorescence à 532 nm de deux biopuces à polysaccharides incubées (A) ou (B) non avec la protéine correspondant au domaine extracellulaire de MET.

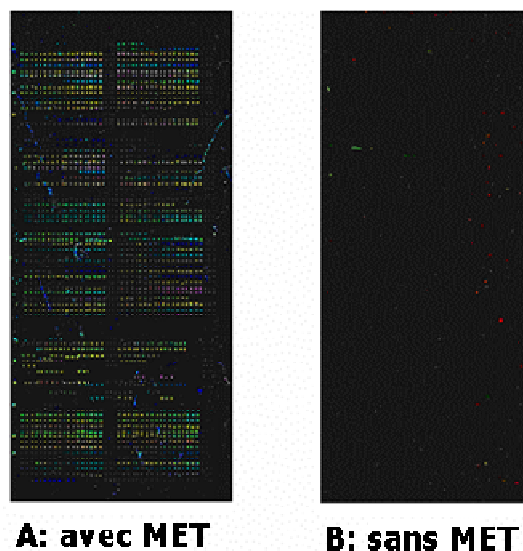


Figure 100 : Biopuces à polysaccharides incubées avec MET (A) et sans MET (B)

Grâce à ces expériences de criblage, le laboratoire a pu sélectionner des polysaccharides interagissant avec le domaine extracellulaire de MET. Leur capacité à inhiber la signalisation HGF/SF-MET a ensuite été évaluée. En particulier, l'équipe s'est intéressée à l'effet des composés sur la dispersion des cellules épithéliales MDCK et sur la phosphorylation du récepteur MET en présence de l'HGF/SF.

2°) Evaluation de l'activité biologique des polysaccharides sélectionnés

Nous avons pu voir page 147 que les cellules épithéliales MDCK expriment le récepteur MET et sont capables de se disperser en présence d'HGF/SF²⁶⁰. L'activité biologique des polysaccharides sélectionnés a tout d'abord été évaluée grâce à un test de dispersion des cellules MDCK.

Cette capacité de dispersion de l'HGF/SF sur ce type cellulaire a été vérifiée lors des expériences contrôles de la Figure 101. Les cellules ont été incubées avec et sans l'HGF/SF (à 10 ng/mL). Les cellules ont été ensuite mises en présence des polysaccharides (appelés S) à 0,1 et 1 µg/mL et de l'HGF/SF à 10 ng/mL.

²⁶⁰ Stoker M, Perryman M. An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J. Cell. Sci.* **1985**, 77, 209-223

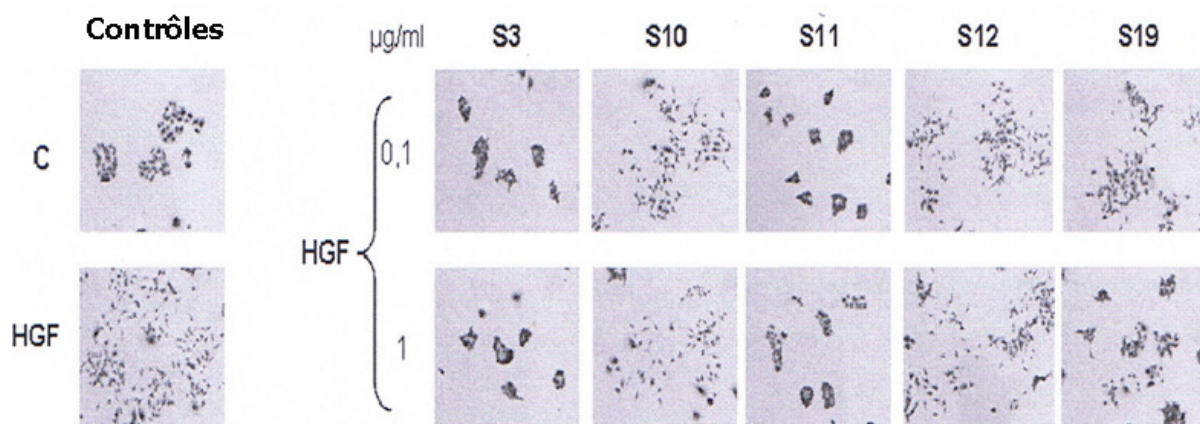


Figure 101 : Dispersion des cellules MDCK en présence d'HGF/SF (à 10 ng/mL) et des polysaccharides (à 0,1 et 1 µg/mL)

La Figure 101 montre que certains polysaccharides, notamment S3 et S11, inhibent de façon importante la dispersion des cellules MDCK induite par l'HGF/SF. L'effet inhibiteur est moindre pour S19 et est négligeable pour S10 et S12.

Un second test biologique a été ensuite réalisé afin de déterminer si l'inhibition observée lors du test de dispersion (du polysaccharide S3 notamment) était due à une inhibition de l'activation du récepteur MET. Ce test est basé sur la capacité de l'HGF/SF à induire l'autophosphorylation des tyrosines du récepteur MET. Cette autophosphorylation est détectée lors des expériences contrôles de la Figure 102 (SDS-PAGE d'un lysat de cellules MDCK) grâce à l'utilisation d'anticorps anti-phosphoMET. Les cellules MDCK ont ensuite été incubées avec les polysaccharides (1 et 10 µg/mL) et l'HGF/SF (10 ng/mL), afin de caractériser leur capacité d'inhibition.

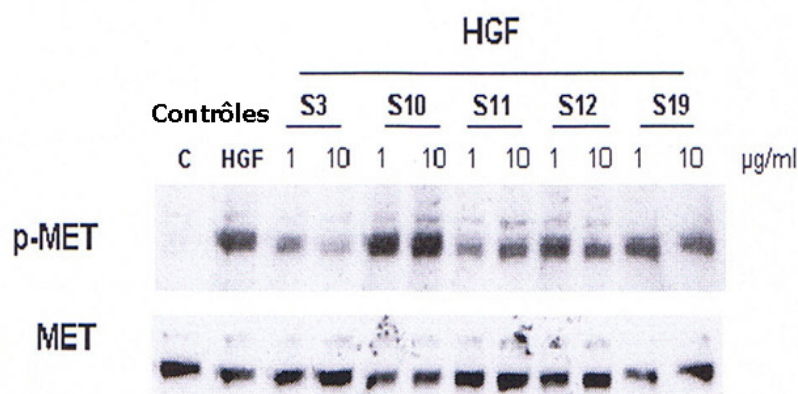


Figure 102 : Phosphorylation du RTK MET des cellules MDCK induite par l'HGF/SF (10 ng/mL) en présence des polysaccharides (1 et 10 µg/mL)

La Figure 102 montre que l'autophosphorylation de MET induite par l'HGF/SF est inhibée par le polysaccharide S3, partiellement inhibée par le S19 et peu inhibée par le polysaccharide S10. Il semble y avoir une corrélation entre les résultats obtenus lors des tests de dispersion des cellules MDCK et ceux du test de phosphorylation de MET. En effet, de manière dose dépendante, il semble que le polysaccharide S3 soit le meilleur inhibiteur de la dispersion des cellules MDCK et que cette capacité passe bien par l'inhibition de l'autophosphorylation de MET.

Ces résultats prometteurs ont apporté la preuve que des polysaccharides, sélectionnés à l'aide de la technologie biopuce pour leur affinité pour le domaine extracellulaire de MET, sont capables d'inhiber la signalisation HGF/SF-MET. Cependant, la diversité fonctionnelle des polysaccharides de la chimiothèque mise à disposition par la société Biodex s'est avérée assez limitée. Ainsi, la seconde partie de mon travail de thèse a consisté à concevoir et synthétiser de nouveaux mimes de l'héparine et des HS capables d'inhiber la signalisation HGF/SF-MET. Pour augmenter la spécificité et l'affinité des molécules pour MET, nous nous sommes intéressés plus précisément à la synthèse de conjugués entre des peptides affins pour MET et des glycomimétiques. Compte tenu de l'efficacité des ligations mises au point dans la première partie de ce manuscrit, nous avons choisi de nous orienter vers la préparation d'une chimiothèque de peptides obtenus par ligation, et en particulier d'exploiter la ligation thiocarbamate²⁶¹ dont le principe est rappelé dans la Figure 103.

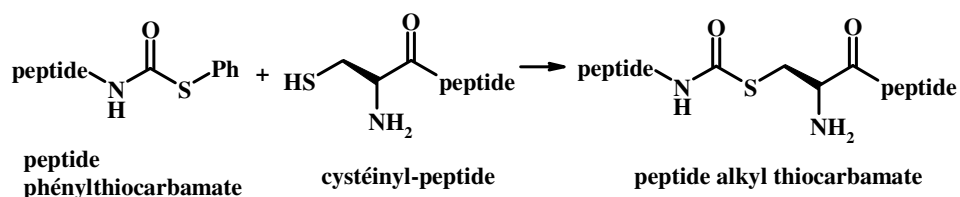


Figure 103 : Principe de la ligation thiocarbamate

En effet, d'après nos observations, la ligation thiocarbamate est une méthode de ligation chimique efficace et facile à mettre en œuvre :

²⁶¹ Besret S, Ollivier N, Blanpain A, Melnyk O. Thiocarbamate-linked peptides by chemoselective peptide ligation. *J. Pept. Sci.* **2008**. 14, 1244-1250

* la fonction phénylthiocarbonyle peut être facilement introduite sur la peptidyl-résine grâce à un réactif commercial, le phénylthiochloroformate ;

* les rendements en produits isolés sont élevés, à savoir supérieurs à 60% notamment pour les peptides linéaires ;

* les peptides phénylthiocarbamates et les produits de ligation de structure alkylthiocarbamate se sont avérés très stables lors de leur stockage à -20°C.

Ces arguments ont donc été en faveur de l'application de cette ligation pour préparer la chimiothèque d'inhibiteurs potentiels de la signalisation HGF/SF-MET. Le principe même de la ligation nous a permis d'amener facilement une diversité structurale à notre librairie de composés, car nous avons ainsi la possibilité de faire varier chaque fragment peptidique indépendamment l'un de l'autre. Connaissant l'instabilité des peptides natifs en milieu biologique, nous avons choisi d'utiliser une ligation aboutissant à la formation de conjugués assemblés par des liens non peptidiques et à structure ramifiée. En effet, Bracci et coll ont montré que les formes dendrimériques de peptides bioactifs seraient plus résistantes aux peptidases et aux protéases, et que leur temps de demi-vie pourrait être augmenté²⁶². Cette propriété pourrait être à l'origine de l'utilisation plus aisée des MAPs en thérapeutique²⁶³.

²⁶² Bracci L, Falciani C, Lelli B, Lozzi L, Runci Y, Pini A, De Montis MG, Tagliamonte A, Neri P. Synthetic peptides in the form of dendrimers become resistant to protease activity. *J. Biol. Chem.* **2003**. 278, 46590-46595

²⁶³ Pini A, Falciani C, Bracci L. Branched peptides as therapeutics. *Curr. Protein. Pept. Sci.* **2008**. 9, 468-477

D°) Synthèse d'inhibiteurs extracellulaires de la signalisation HGF/SF-MET

Le but de ce projet était de synthétiser des inhibiteurs extracellulaires de la signalisation HGF/SF-MET, mimes des HS. Nous avons opté pour une stratégie associant d'une part des peptides affins pour le domaine extracellulaire de MET et d'autre part des peptides sulfonates, dendrimères de lysines mimes des chaînes hautement sulfatées des HS. Chaque élément a été lié de façon covalente par ligature thiocarbamate, ce qui a abouti à la formation d'un grand nombre de conjugués sulfonates selon la stratégie schématisée à la Figure 104.

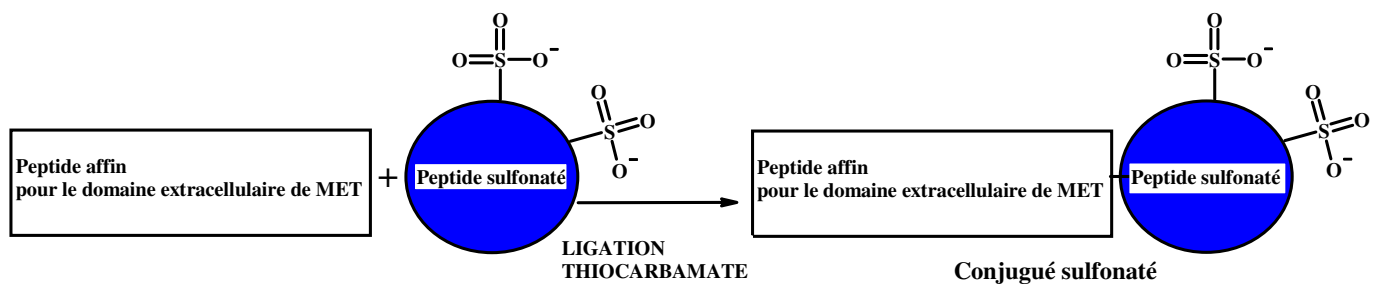


Figure 104 : Stratégie de synthèse par ligature thiocarbamate des conjugués sulfonates

Nous décrivons la conception et la synthèse des peptides affins pour le domaine extracellulaire de MET, celle des peptides sulfonates puis comment grâce à la ligature thiocarbamate, nous sommes parvenus à la préparation d'une première chimiothèque de conjugués sulfonates. Cette première série a ensuite été évaluée pour son affinité pour le domaine extracellulaire de MET grâce à des tests biopuces. Ces résultats ont permis d'établir les premières relations structure/activité et d'envisager, par la suite, diverses modifications.

1°) Synthèse de la première série de conjugués par ligation thiocarbamate

1.1°) Synthèse des cystéinyl-peptides

Afin d'obtenir des conjugués affins pour le domaine extracellulaire de MET, nous avons choisi, dans la littérature, des peptides ayant une affinité établie pour le récepteur²⁶⁴. Ces peptides sont issus de clones sélectionnés par phage display, dont le principe a été détaillé page 5. Un test ELISA compétitif a ensuite permis aux auteurs de les classer en fonction de leur capacité à entrer en compétition avec l'HGF/SF dans la liaison à MET. Dans leurs travaux, le récepteur chimère MET, c'est-à-dire une protéine composée du domaine extracellulaire de MET et d'un Fc d'anticorps humain, a été fixé sur une plaque ELISA. L'HGF/SF (25 µg/mL) a été incubé en présence ou non des phages ou des peptides synthétiques (10, 100, 500 µmol/mL) issus de la sélection par phage display. L'incubation d'un anticorps de lapin anti-HGF/SF puis d'un anticorps dirigé contre ce dernier a permis, grâce à un système de révélation colorimétrique, de déterminer un pourcentage de compétition des peptides avec l'HGF/SF pour la liaison à MET. Trois peptides, dont le pourcentage de compétition est le plus élevé, ont été retenus pour ce projet (Tableau 5).

<u>Séquence</u>	<u>% de compétition avec l'HGF/SF</u>
QHKTSITGHHLEP	28,6%
TLPSPLALLTVH	39,1%
YLFSVHWPPPLKA	59,3%

Tableau 5 : Séquences peptidiques affines pour MET identifiées par Zhao et coll et leur pourcentage de compétition avec l'HGF/SF

Comme nous avons déjà pu le voir à plusieurs reprises, la ligation thiocarbamate fait intervenir la fonction thiol d'un cystéinyl-peptide et le carbonyle d'un groupement phénylthiocarbamate d'un second peptide. Nous avons donc été contraints d'ajouter une

²⁶⁴ Zhao P, Grabinski T, Gao C, Skinner RS, Giambenardi T, Su Y, Hudson E, Resau J, Gross M, Vande Woude GF, Hay R, Cao B. Identification of a met-binding peptide from a phage display library. *Clin. Cancer Res.* **2007**. 13. 6049-6055

cystéine à ces différentes séquences qui en étaient dépourvues. Afin d'espacer le peptide affiné pour MET du glycomimétique, un espaceur constitué de deux glycines a été inséré entre la cystéine et la séquence peptidique. De plus, nous ne pouvions prévoir l'impact de l'ajout de cet espaceur « GGC » sur les propriétés biologiques du peptide et/ou du conjugué sulfonaté et nous avons donc décidé de le positionner aux deux extrémités de chaque séquence identifiée par Zhao et coll. Six cystéinyl-peptides ont été préparés par SPPS automatisée selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle sur une résine NovaSyn TGR[®]. Leurs structures chimiques sont présentées à la Figure 105.

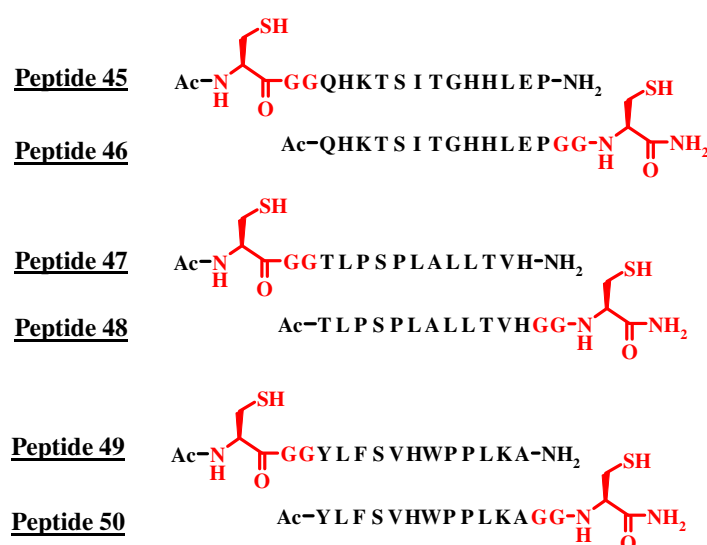


Figure 105 : Séquences de la première série de cystéinyl-peptides synthétisés (les résidus en rouge ont été ajoutés aux séquences déterminées par Zhao et coll)

Les rendements après purification par RP-HPLC préparative de ces peptides sont présentés dans le Tableau 6.

Peptide	45	46	47	48	49	50
Rdt	43%	88%	45%	27%	74%	71%

Tableau 6 : Rendements des synthèses des peptides 45 à 50

La pureté de ces peptides a été contrôlée par RP-HPLC et par électrophorèse capillaire et elle s'est avérée être supérieure à 90% dans tous les cas de figure.

Ces synthèses nous ont permis d'obtenir le premier élément nécessaire à la préparation des conjugués sulfonatés. Nous avons ensuite mis au point la synthèse des peptides

sulfonaté, le second élément de la ligation, ce que nous allons détailler dans le prochain paragraphe.

1.2°) Synthèse des peptides sulfonaté

Pour obtenir rapidement des peptides sulfonaté de pureté satisfaisante, nous avons opté pour la synthèse peptidique en phase solide selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle grâce à une résine NovaSyn TGR[®]. Pour diverses raisons qui seront expliquées ensuite, nous avons choisi un térapeptide de type dendrimère de lysines comme structure de base des peptides sulfonaté (Figure 106).

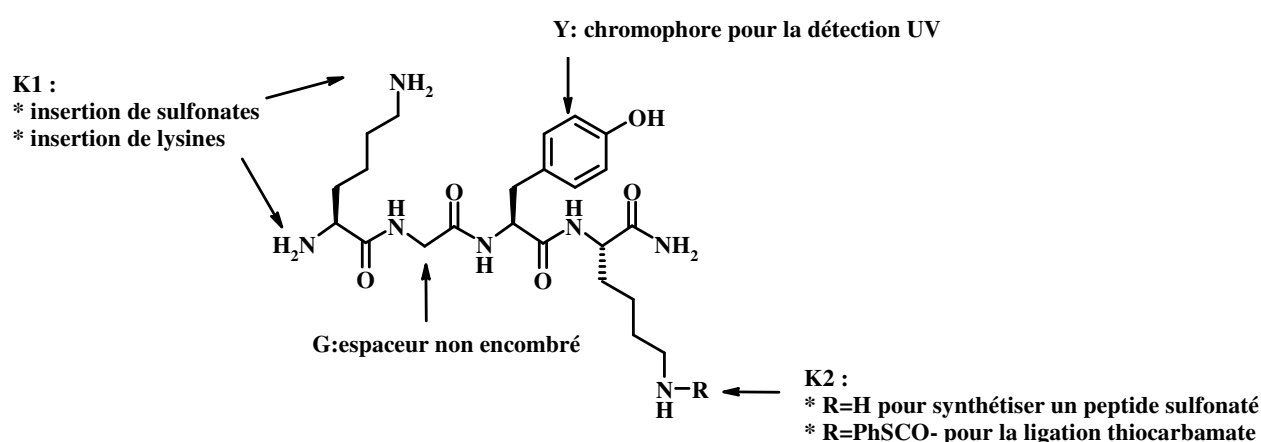


Figure 106 : Structure générale du dendrimère de lysines

Ce térapeptide se décompose de la manière suivante :

- une lysine (notée K1), dont les amines α et ϵ serviront de support aux groupements sulfonaté. Des lysines supplémentaires pourront être couplées sur ces amines α et ϵ , ce qui permettra d'augmenter la valence en groupements sulfonaté ;

- une glycine (G), l'acide aminé le moins encombré, pour son rôle d'espaceur ;

- une tyrosine (Y) chromophore utile pour la détection en UV lors de l'analyse et de la purification par RP-HPLC des peptides ;

- une lysine (K2) dont l'amine ϵ peut porter une fonction chimique, en l'occurrence un groupement phénylthiocarbonyle, intervenant dans la ligation thiocarbamate. Il a été également envisagé de préparer un peptide sulfonaté non fonctionnalisé (R = H à la Figure 106), dont l'affinité pour le domaine extracellulaire de MET pourra être comparée à celle du cystéinyl-peptide et à celle du conjugué sulfonaté.

1.2.1°) Stratégie générale de synthèse

Après la synthèse du dendrimère de lysines, il a fallu déterminer l'ordre le plus judicieux pour l'introduction des groupements phénylthiocarbonyle et sulfonates. En effet, lors de la mise au point de la ligation thiocarbamate, nous avons pu constater que le groupement phénylthiocarbonyle peut s'avérer instable dans certaines conditions et particulièrement en milieu basique. Or, le mode opératoire permettant de greffer les sulfonates sur les amines α et ϵ de K1, que nous avons développé à l'occasion de ce travail, nécessite la présence d'une base. Nous avons alors décidé de fonctionnaliser K1 avant K2 et donc d'introduire les groupements sulfonates avant le phénylthiocarbonyle.

1.2.2°) Fonctionnalisation des amines α et ϵ de K1

* Choix de la première molécule sulfonagée : la taurine

Nous avons choisi, dans un premier temps, d'introduire un groupement monosulfonaté sur chaque amine de K1, ce qui nous permettait d'accéder à un peptide disulfonaté. Parmi les molécules commerciales sulfonagées peu onéreuses, notre choix s'est arrêté sur la taurine ou l'acide 2-aminoéthane sulfonique, dont la structure chimique présentée à la Figure 107 est relativement simple.

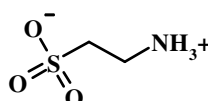


Figure 107 : Structure chimique de la taurine

La taurine est dérivé du métabolisme de la cystéine et de la méthionine²⁶⁵. Initialement isolée à partir de la bile de taureau, elle entre dans la composition des acides biliaires, comme l'acide taurocholique, participant à la digestion. Un de ses analogues, l'acamprosate (Aotal[®], Merck Santé), est utilisé en thérapeutique afin de maintenir l'état d'abstinence chez des patients alcoolodépendants. D'autres dérivés de la taurine, comme le taltrimide, ou encore la tauromustine, présenteraient une utilité dans le traitement de l'épilepsie ou encore du cancer²⁶⁶.

²⁶⁵ Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*. **2009**. 37, 1-17

²⁶⁶ Gupta R, Win T, Bittner S. Taurine analogues; a new class of therapeutics: retrospect and prospects. *Curr. Med. Chem.* **2005**. 12, 2021-2039

* Introduction de la taurine

Une fois la molécule sulfonée choisie, il nous fallait définir un moyen simple et rapide pour l'introduire sur les amines de la lysine. Nous avons opté pour la formation d'un lien urée entre les amines de K1 et celle de la taurine. Divers agents dérivés du phosgène sont disponibles commercialement pour former un lien urée²⁶⁷. Nous avons utilisé le CDI qui est couramment utilisé en synthèse organique et qui s'est révélé efficace pour la synthèse de dipeptides possédant une liaison urée²⁶⁸.

Nous avons mis au point les conditions de réaction entre la taurine et le CDI, aboutissant à l'intermédiaire **51**, puis son introduction, sans purification intermédiaire, sur les amines α et ϵ de K1 de la peptidyl-résine **52**. Nous avons ainsi obtenu la peptidyl-résine **53**, selon le schéma réactionnel présenté à la Figure 108.

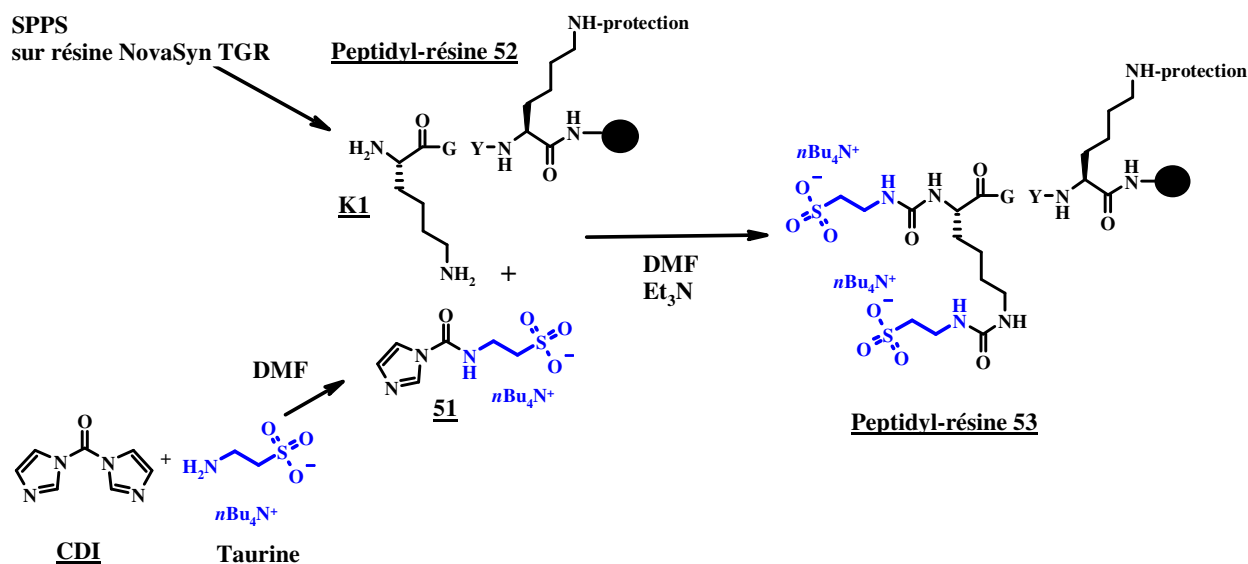


Figure 108 : Synthèse de l'intermédiaire 51 et son couplage sur la peptidyl-résine 52

D'un point de vue expérimental, la taurine est une molécule zwitterionique soluble en milieu aqueux et, dans ces conditions, le CDI est insoluble et s'hydrolyse. De plus, la taurine sous sa forme zwitterion s'est avérée être insoluble dans le DMF à l'inverse du CDI. De ce fait, la taurine a d'abord été solubilisée dans une solution d'hydroxyde de

²⁶⁷ Bigi F, Maggi R, Sartori G. Selected syntheses of ureas through phosgene substitutes. *Green Chem.* **2000.** 2, 140-148

²⁶⁸ Zhang X, Rodrigues J, Evans L, Hinkle B, Ballantyne L, Peña M. Formation of urea dipeptides from carbonyldiimidazole : application toward the protease inhibitors GE 20372 and MAPI. *J. Org. Chem.* **1997.** 62, 6420-6423

tétrabutylammonium à 1M dans l'eau ($n\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{OH}^-$). Le sel obtenu a été ensuite solubilisé dans le DMF. L'ensemble a été additionné sur le CDI et l'évolution du milieu réactionnel a été suivie par CCM. Pour pouvoir évaluer le taux de conversion de taurine en intermédiaire **51**, nous avons réalisé un suivi de l'évolution du milieu réactionnel par RMN ^1H . Cette analyse nous a permis de déterminer un taux de conversion de 70% en intermédiaire **51**. Malgré la formation incomplète de l'intermédiaire **51**, la taurine a été aisément introduite sur la peptidyl-résine **52**, grâce à l'utilisation d'un excès de réactif (10 équivalents par amine de la lysine) en présence de triéthylamine (10 équivalents par amine de la lysine). La formation du lien urée a été suivie grâce au test TNBS, qui permet de révéler la présence d'amines libres sur la résine. Au besoin, un double couplage a été réalisé pour forcer la formation du lien urée et obtenir la peptidyl-résine **53**.

1.2.3°) Fonctionnalisation de l'amine ϵ de K2

Lors de la SPPS du dendrimère de lysines, le choix du groupement protecteur de l'amine ϵ de K2 dépend du produit final souhaité. En effet, notre objectif était de préparer un peptide sulfonaté possédant un groupement phénylthiocarbonyle (peptide **55**) ainsi qu'un peptide sulfonaté non fonctionnalisé (peptide **54**) (Figure 109).

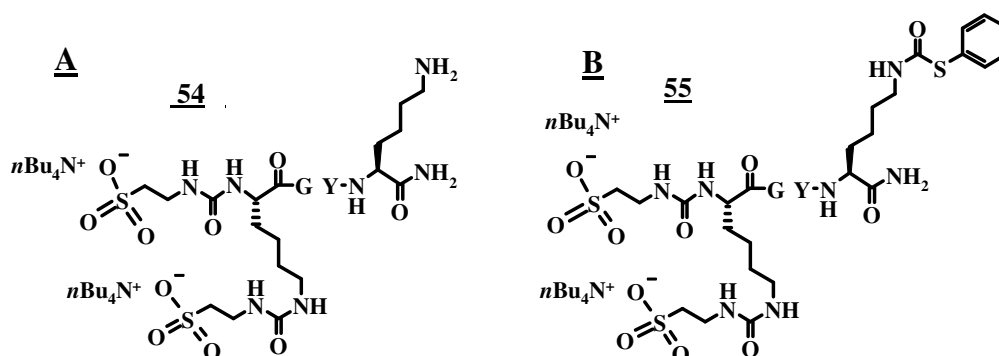


Figure 109 : Structure des peptides disulfonatés :

A°) non fonctionnalisé (peptide 54)

B°) fonctionnalisé par un groupement phénylthiocarbonyle (peptide 55)

Pour obtenir le peptide **54**, l'amine ϵ de K2 de la peptidyl-résine **53** a été protégée, lors de la synthèse, par un groupement Boc. Ce dernier a été éliminé lors du traitement final de la peptidyl-résine par une solution concentrée de TFA. Le peptide **54** a été préparé avec un

rendement de 69%. Son interaction avec le domaine extracellulaire de MET a été comparée à celle des cystéinyl-peptides et à celle des conjugués sulfonates.

Afin de pouvoir fonctionnaliser le peptide **54** et ainsi obtenir le peptide **55**, l'amine ε de K2 de la peptidyl-résine **53** a été protégée, lors de la SPPS, par le groupement acido-labile, Mtt, puis elle a été fonctionnalisée par le groupement phénylthiocarbonyle sur le support solide. Le protocole d'élimination sélective du Mtt a été mis en place au laboratoire et a déjà été détaillé dans la première partie de ce manuscrit²⁶⁹. La fonction phénylthiocarbonyle nécessaire à la ligation thiocarbamate a été introduite sur le support solide selon le protocole que nous avons mis au point, à savoir grâce au phénylthiochloroformate (4 équivalents) et à la triéthylamine (4 équivalents) dans le THF²⁷⁰. Après traitement de la peptidyl-résine par une solution concentrée de TFA, nous avons alors obtenu le peptide **55** avec un rendement de 25% et une pureté satisfaisante.

Ce peptide a ensuite été ligué aux cystéinyl-peptides **45** à **50** dont les structures ont été présentées à la Figure 105.

1.3°) Synthèse de la première série de conjugués sulfonates thiocarbamate

Dans la partie 1 de ce manuscrit portant sur les ligations chimiques, nous avons largement évoqué la mise au point de la ligation thiocarbamate que nous avons eu ici l'opportunité d'appliquer à la préparation de conjugués sulfonates. Pour rappel, elle se déroule :

- * en faisant réagir des quantités équimolaires de peptides ;
- * à température ambiante ;
- * dans un tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH 7,5) ;
- * sous atmosphère inerte (sous argon) pour limiter l'oxydation du cystéinyl-peptide ;
- * en présence d'un excès de thiophénol (4% en volume). Ce réactif permet de rester en milieu réducteur ce qui limite l'oxydation des cystéinyl-peptides.

Notre objectif étant de produire un nombre important de conjugués sulfonates dans les conditions opératoires les plus simples, nous avons étudié l'impact de différents paramètres de la ligation thiocarbamate. Dans un premier temps, nous avons validé cette méthode de ligation pour la synthèse de quelques conjugués sulfonates, lors desquelles nous avons étudié

²⁶⁹ Bourel L, Carion O, Gras-masse H, Melnyk O. The deprotection of Lys(Mtt) revisited. *J. Pept. Sci.* **2000**. 6. 264-270

²⁷⁰ Besret S, Ollivier N, Blanpain A, Melnyk O. Thiocarbamate-linked peptides by chemoselective peptide ligation. *J. Pept. Sci.* **2008**. 14, 1244-1250

différents paramètres tels que l'importance du thiophénol, la cinétique et confirmé la stoechiométrie de la réaction.

1.3.1°) Validation de la méthode de ligation thiocarbamate

* Etude de l'importance du thiophénol dans la ligation thiocarbamate

Afin de vérifier si la ligation thiocarbamate était applicable à la préparation de conjugués sulfonates, la réaction entre les peptides **50** et **55** a été menée tout d'abord dans les conditions précitées et a permis d'obtenir le conjugué **56**. Le schéma réactionnel correspondant est présenté à la Figure 110.

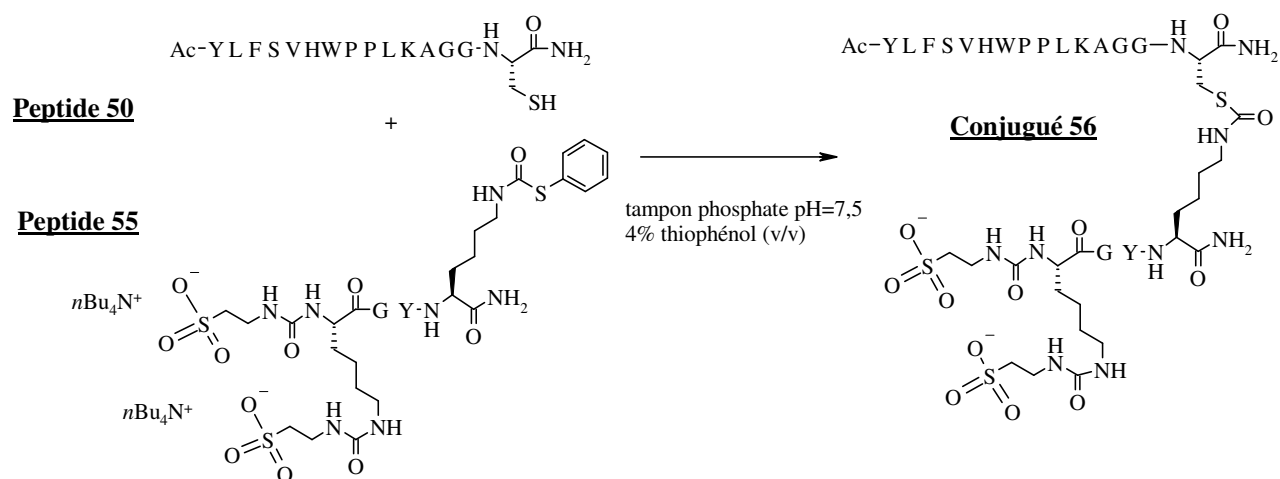


Figure 110 : Ligation thiocarbamate entre les peptides 50 et 55 : synthèse du conjugué 56

Pour évaluer l'importance du thiophénol dans la ligation, celle-ci a ensuite été effectuée en absence de ce réactif : un chromatogramme RP-HPLC assez similaire a été obtenu au terme de la réaction (Figure 111 Chromatogramme B).

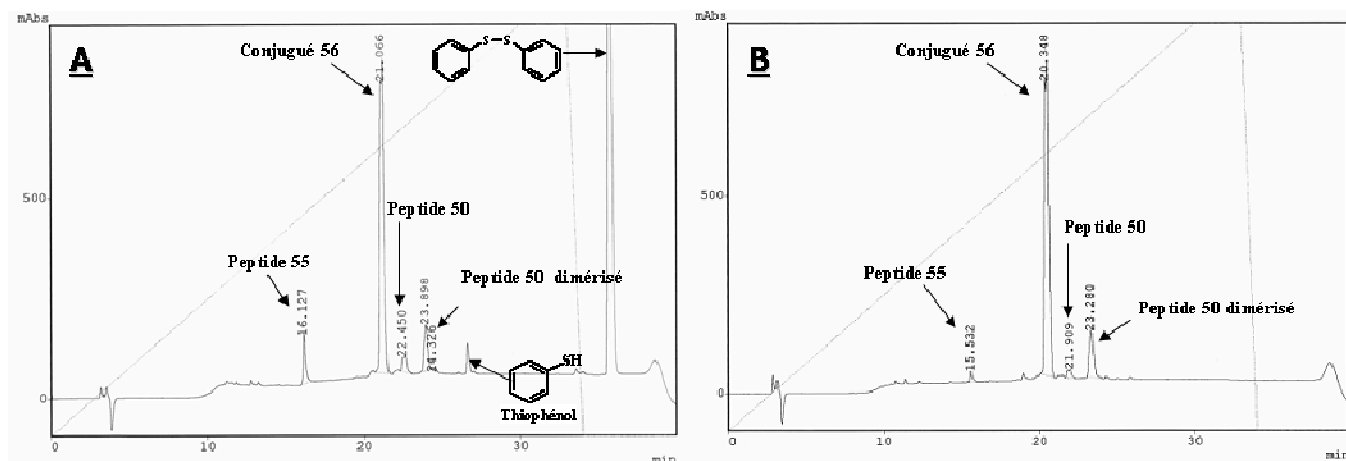


Figure 111 : Chromatogrammes RP-HPLC $t = 48h$ de la ligation entre les peptides 50 et 55 :

A°) en présence de thiophénol

B°) en absence de thiophénol

(0-100% B en 30 min, 50°C, C18 Nucléosil, 215 nm)

Les profils RP-HPLC étant proches et le thiophénol étant fortement toxique et particulièrement odorant, nous avons décidé de ne plus l'utiliser dans la suite de ce travail.

* Etude de la cinétique de la réaction

Nous nous sommes ensuite intéressés à la cinétique de la ligation. En effet, nous voulions savoir si la méthode était suffisamment efficace pour préparer rapidement un grand nombre de conjugués sulfonatés. Grâce au suivi de l'évolution du milieu réactionnel par des analyses RP-HPLC, nous avons constaté que la durée de la réaction dépendait fortement de la solubilité des peptides de départ dans le tampon phosphate de sodium. Néanmoins, aucune réaction n'a duré plus de 48 heures malgré parfois des difficultés à solubiliser certains cystéinyl-peptides. Grâce à cette ligation, nous avons pu accéder rapidement à un grand nombre de composés.

* Stœchiométrie de la réaction

Afin de limiter les quantités de matières mises en jeu lors de la ligation, nous nous sommes intéressés à la stœchiométrie de la réaction. Par exemple, la ligation entre les

Nous avons donc constaté que la ligation thiocarbamate était totale dans ces conditions expérimentales et qu'elle semblait efficace pour préparer les conjugués sulfonates.

1.3.2°) Synthèse des conjugués sulfonates par ligation thiocarbamate

Suite à ces expériences préliminaires, la ligation thiocarbamate a été réalisée en utilisant des quantités équimolaires de chacun des peptides, à température ambiante, sous atmosphère inerte dans un tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH 7,5). Au terme de la réaction, le conjugué sulfonate a été directement isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC préparative. Ces ligations ont abouti à la synthèse de la première série de conjugués sulfonates entre les six cystéinyl-peptides 45 à 50 et le peptide sulfonate 55. Les structures chimiques de cette première série de conjugués sulfonates sont présentées à la Figure 114.

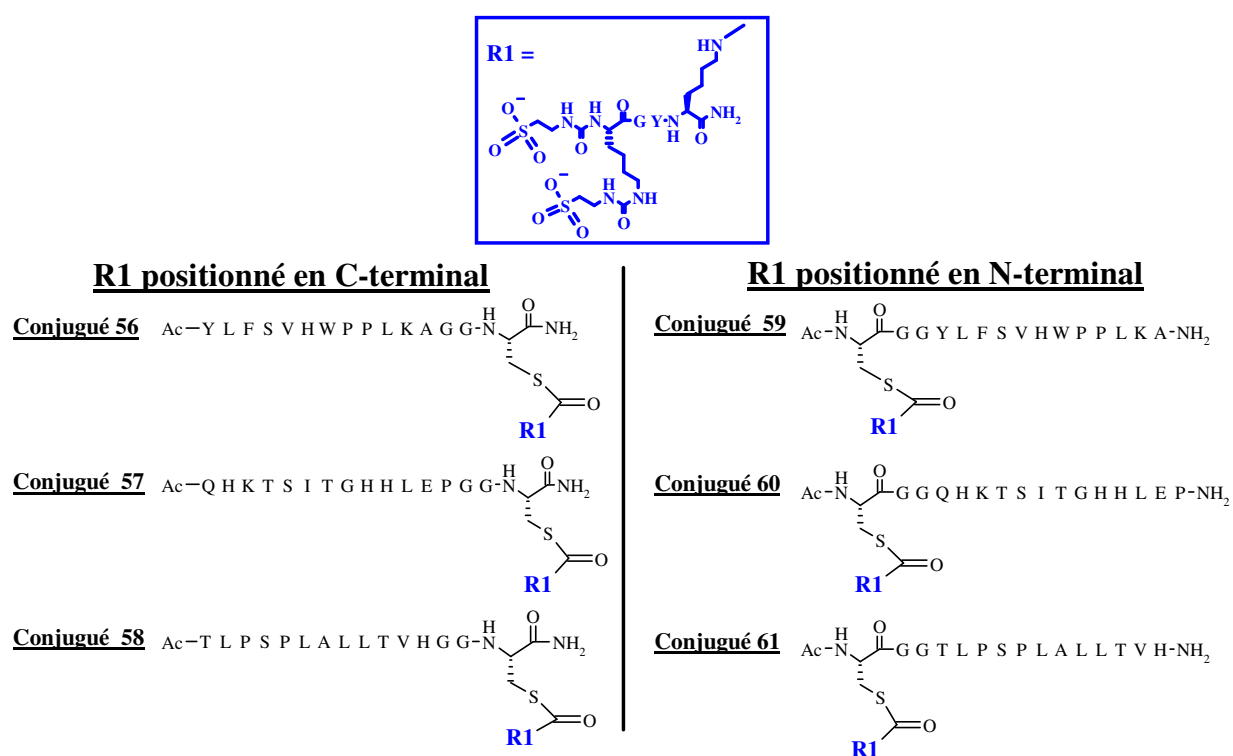


Figure 114 : Structures chimiques de la première série de conjugués sulfonates

Les rendements des conjugués 56 à 61 après purification du milieu réactionnel correspondant par RP-HPLC préparative sont récapitulés dans le Tableau 7.

Conjugué	56	57	58	59	60	61
Rdt	44%	61%	59%	47%	76%	44%

Tableau 7 : Rendements des conjugués 56 à 61

Grâce aux contrôles par RP-HPLC et par électrophorèse capillaire, nous avons pu vérifier que les conjugués sulfonates étaient de très bonne qualité (pureté supérieure à 95%). Les analyses par MALDI-TOF ont ensuite confirmé l'identité de chacun des conjugués.

Une première série de 13 peptides sulfonates ou non se trouvait alors à notre disposition. L'objectif de ce travail a été ensuite de déterminer si certains d'entre eux étaient capables d'interagir avec le domaine extracellulaire de MET et si l'ajout du peptide sulfonate au cystéinyl-peptide permettait d'obtenir un conjugué sulfonate possédant une meilleure affinité. Pour ce faire, nous avons utilisé la technologie biopuces dont le principe a été détaillé page 160. Comme nous avons pu le voir, c'est un bon outil pour le criblage d'une librairie de composés vis-à-vis d'une biomolécule (protéine, polysaccharide...). Cette technique a donc été appliquée afin d'étudier les interactions entre les peptides de notre chimiothèque et la protéine chimérique MET-Fc composée du domaine extracellulaire du récepteur MET et d'un Fc humain.

1.4°) Evaluation biochimique et de cytotoxicité des composés de la première série

1.4.1°) Test d'interaction pour la protéine chimérique MET-Fc au format biopuces

Cette expérience devait nous permettre de vérifier si la synthèse de conjugués sulfonates (56 à 61) par la ligation thiocarbamate entre les cystéinyl-peptides (45 à 50) et le peptide 55 pouvait éventuellement conduire à des composés plus affins pour MET. Pour ce faire, les peptides (10^{-4} M dans le PBS) ont été adsorbés sur des lames de verre fonctionnalisées par une fonction semicarbazide. La protéine chimère MET-Fc a été incubée à différentes concentrations. Un anticorps anti-anticorps humain marqué à la tétraméthylrhodamine a été incubé. Les résultats ont été révélés grâce à une lecture au scanner confocal à fluorescence à 532 nm. Pour chaque concentration en protéine chimérique MET-Fc, les expériences ont été réalisées en triplicats générant trois valeurs de fluorescence pour chaque condition. Ces valeurs nous ont permis de calculer la médiane ainsi que l'intervalle interquartile de la fluorescence observée pour chaque composé. Les résultats de l'interaction

entre certains des composés et des concentrations croissantes en protéine chimérique MET-Fc sont représentés à la Figure 115.

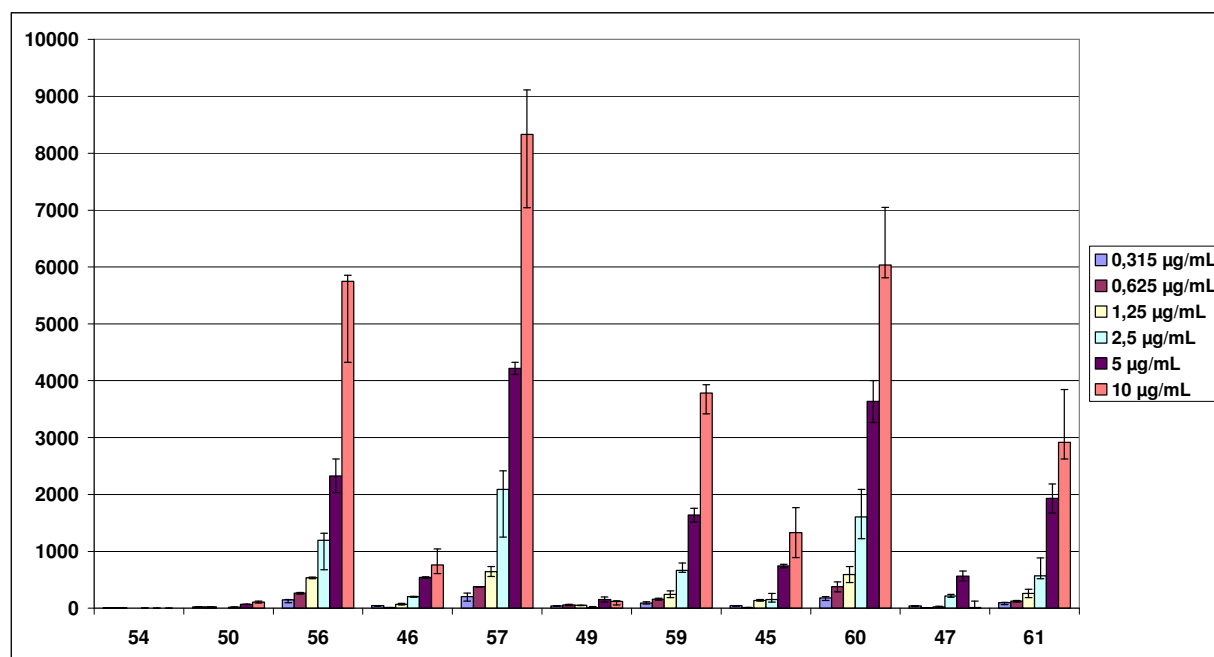


Figure 115 : Quantification par fluorescence des interactions entre les peptides de la première série et la protéine chimérique MET-Fc

Dans ce graphe, le peptide sulfonaté 54 a été placé en première position et les cystéinyl-peptides (50, 46, 49, 45, 47) ont été placés à côté de leurs conjugués sulfonés respectifs (56, 57, 59, 60, 61). Les résultats concernant le cystéinyl-peptide 48 et le conjugué sulfonaté 58, qui n'avait pu alors être synthétisé, sont présentés page 213. Les structures chimiques des cystéinyl-peptides et des conjugués sulfonés correspondants sont rappelées à la Figure 116.

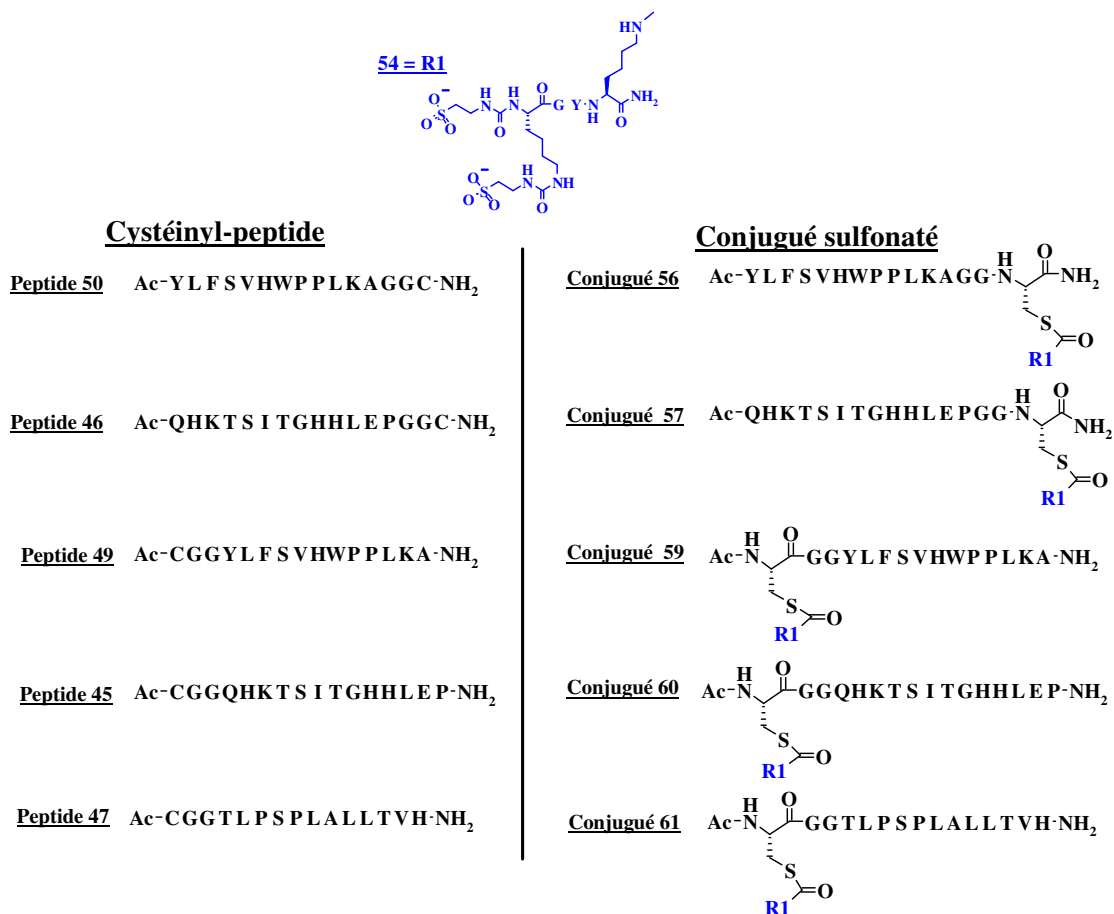


Figure 116 : Rappel des structures des peptides de la première série

Nous avons constaté que le peptide **54** ainsi que certains cystéinyl-peptides (**47**, **49**, **50**) présentaient une interaction très minime, voire quasi-inexistante avec la protéine chimérique incubée à différentes concentrations. Par contre, les cystéinyl-peptides **45** et **46**, possédant la même séquence de base (QHKT SITGHHLEP) avec l'extension « GGC » positionnée soit en C- soit en N-terminal, présentaient une affinité, néanmoins assez faible, pour MET-Fc. Cette observation nous a semblé assez surprenante dans la mesure où ces séquences peptidiques se sont révélées les moins affines pour le domaine extracellulaire de MET lors des tests ELISA effectués par Zhao et coll. Ceci pourrait s'expliquer en partie par le fait que la méthodologie est très différente entre les tests biopuces et ELISA. En effet, lors de l'ELISA, la protéine MET-Fc a été immobilisée sur la plaque ELISA et le peptide a été mis en compétition avec l'HGF/SF pour la liaison. Par contre, lors des tests biopuces, ce sont les composés qui ont été adsorbés alors que le récepteur est venu interagir avec eux. Le fait d'immobiliser les produits, et non le récepteur, pourrait donc être à l'origine d'une

conformation différente des composés lors de l'interaction et ainsi expliquer la différence de résultat observé.

Un classement en fonction de l'affinité des conjugués pour le domaine extracellulaire de MET a été possible. Le conjugué 57, obtenu par ligation entre 46 et 54, semble interagir le plus avec MET. Nous avons également constaté que l'affinité du conjugué 60 ne nous a pas paru significativement différente de celle du conjugué 57. Par contre, les conjugués 56, 59 et 61 ont montré une affinité pour le domaine extracellulaire de MET, légèrement plus faible. De manière générale, chacune de ces interactions entre les peptides et le récepteur paraît se faire de façon dose dépendante.

D'après ces résultats, les conjugués issus de la séquence QHKTSITGHHLEP semblent être les plus affins que ceux ayant la séquence YLFSVHWPLKA, eux-mêmes plus affins que celui issu de la séquence TLPSPALLTVH. L'ordre d'interaction des conjugués avec le domaine extracellulaire de MET est inversé par rapport aux résultats du test ELISA compétitif de Zhao et coll. En effet, d'après leurs travaux (Tableau 5), nous attendions les meilleurs résultats avec les conjugués 56 ou 59, comportant la séquence la plus affine pour MET, d'après les travaux de Zhao et coll.

Dans tous les cas, le peptide sulfonaté 54 et les cystéinyl-peptides (47, 49, 50) ne semblent pas lier MET-Fc alors que les conjugués correspondants (56, 59, 61) semblent systématiquement plus affins. Seuls deux cystéinyl-peptides (46 et 45) paraissent faiblement affins alors que les conjugués (57 et 60) qui en dérivent le sont plus. L'introduction des sulfonates sur ces peptides semble augmenter leur capacité d'interaction, ce qui va dans le sens des hypothèses que nous avons émises au démarrage du projet.

En comparant les conjugués en fonction de la position de l'espaceur « GGC », nous avons constaté que le conjugué 57 interagit plus que le 60 et que le 56 est plus affin pour MET-Fc que le 59. L'ajout de cette extension semblerait donc favorable en position C-terminale du peptide : la situation de l'espaceur permettrait de présenter plus ou moins favorablement le conjugué au récepteur. Cette observation demande à être vérifiée ultérieurement avec un plus grand nombre de peptides.

La même expérience a ensuite été menée pour savoir si les composés interagissaient spécifiquement avec le récepteur MET. Nous avons donc évalué l'interaction des composés avec le domaine extracellulaire de l'EGFR encore appelé HER1 (**H**uman **E**pidermal **R**eceptor 1). Nous avons choisi ce RTK pour effectuer cette expérience car il est également impliqué

dans le développement de cancers et une cible d'anticancéreux²⁷¹. La protéine incubée lors de ces tests est également une protéine chimérique, constituée du domaine extracellulaire de l'EGFR fusionnée à un Fc humain (Figure 117).

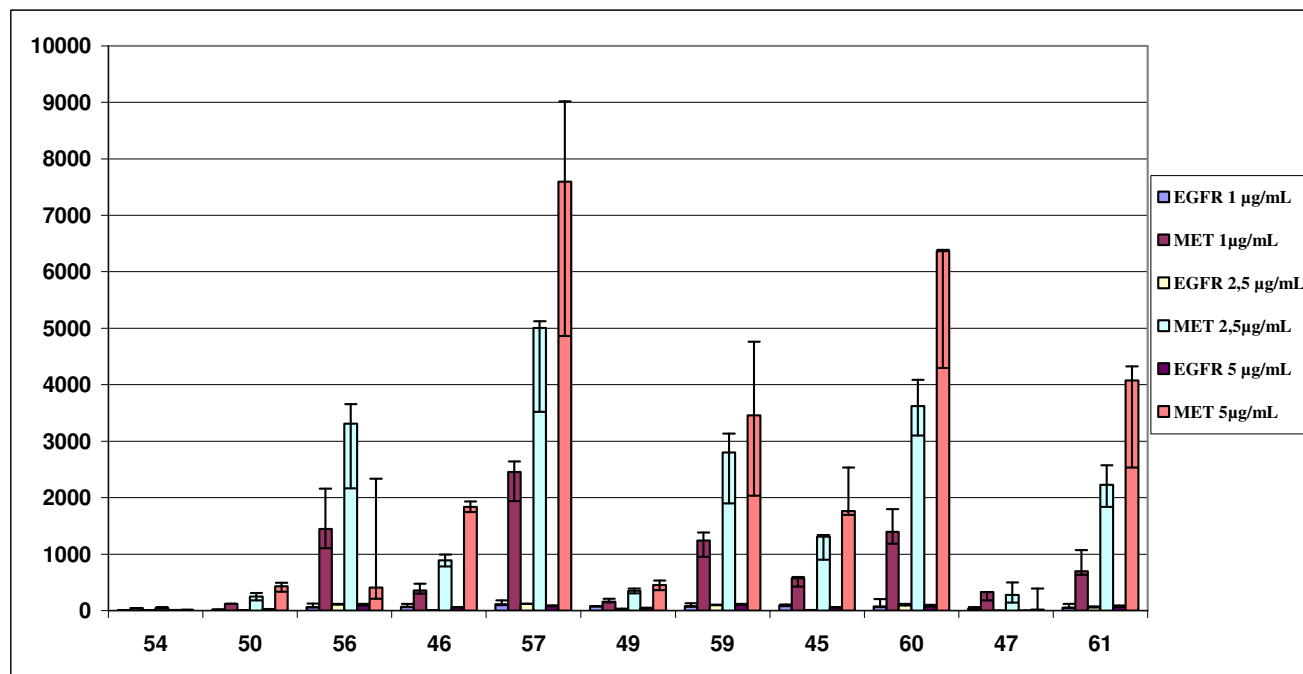


Figure 117 : Quantification par fluorescence des interactions entre :
- les peptides et MET-Fc (1, 2,5, 5 µg/mL)
- les peptides et l'EGFR-Fc (1, 2,5, 5 µg/mL)

D'après ces résultats, aucun composé de la première série n'interagissait de manière significative avec le domaine extracellulaire du récepteur à l'EGF et ceci était valable même à une forte concentration en récepteur (5 µg/mL). Ces résultats montraient que les conjugués semblaient spécifiquement interagir avec le domaine extracellulaire du récepteur MET.

L'interaction spécifique de certains conjugués (notamment 57 et 60) pour le domaine extracellulaire de MET a été établie grâce à ces tests biopuces. Nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à ces conjugués mais également aux peptides ayant permis leur préparation (45, 46, et 54).

L'une des étapes majeures dans le développement d'une molécule à visée thérapeutique est l'évaluation de sa cytotoxicité qui peut, si elle s'avère trop importante, constituer un obstacle à la poursuite des recherches. Un test de cytotoxicité de certains des

²⁷¹ Arteaga C. Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. *Semin. Oncol.* **2003.** 30, 3-14

composés a donc été effectué par le docteur Gauthier Goormachtigh, avec qui nous avons collaboré dans le cadre de ce projet.

1.4.2°) Evaluation de la cytotoxicité : test MTT

La cytotoxicité de certains des composés a été évaluée par le biais d'un test MTT. Le MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) est une molécule de couleur jaune qui possède une structure de type tétrazole. En biologie, il est couramment utilisé afin d'évaluer la cytotoxicité des produits actifs pharmacologiquement. Lorsque les cellules sont viables, les réductases mitochondriales le réduisent en cristaux violets de formazan (Figure 118).

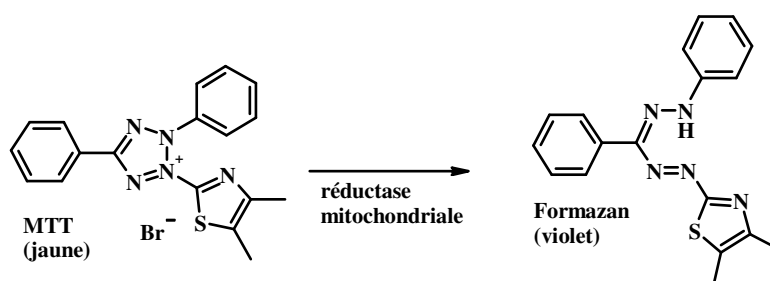


Figure 118 : Réduction du MTT en formazan

Après la dissolution des cristaux de formazan dans le DMSO, la concentration en formazan est mesurée par spectrophotométrie : la densité optique mesurée est le reflet de l'activité mitochondriale et de la survie des cellules en présence des composés²⁷². Nous avons utilisé la lignée cellulaire de type HeLa, provenant à l'origine d'un prélèvement de métastases effectué sur une patiente, appelée Henrietta Lacks, atteinte d'un cancer du col de l'utérus²⁷³.

D'après les résultats biopuces, il nous a paru judicieux d'effectuer en priorité ce test avec les peptides ayant présenté la meilleure interaction, c'est-à-dire **54**, **46**, **57**, **45** et **60**. Le test a été réalisé à trois concentrations en peptides, à savoir 0,1, 1, 10 et 100 μ M. Le pourcentage de survie en fonction de la concentration en peptides est présenté à la Figure 119.

²⁷² Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**. 65, 55-63

²⁷³ O'Brien SJ. Cell culture forensics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**. 98, 7656-7658

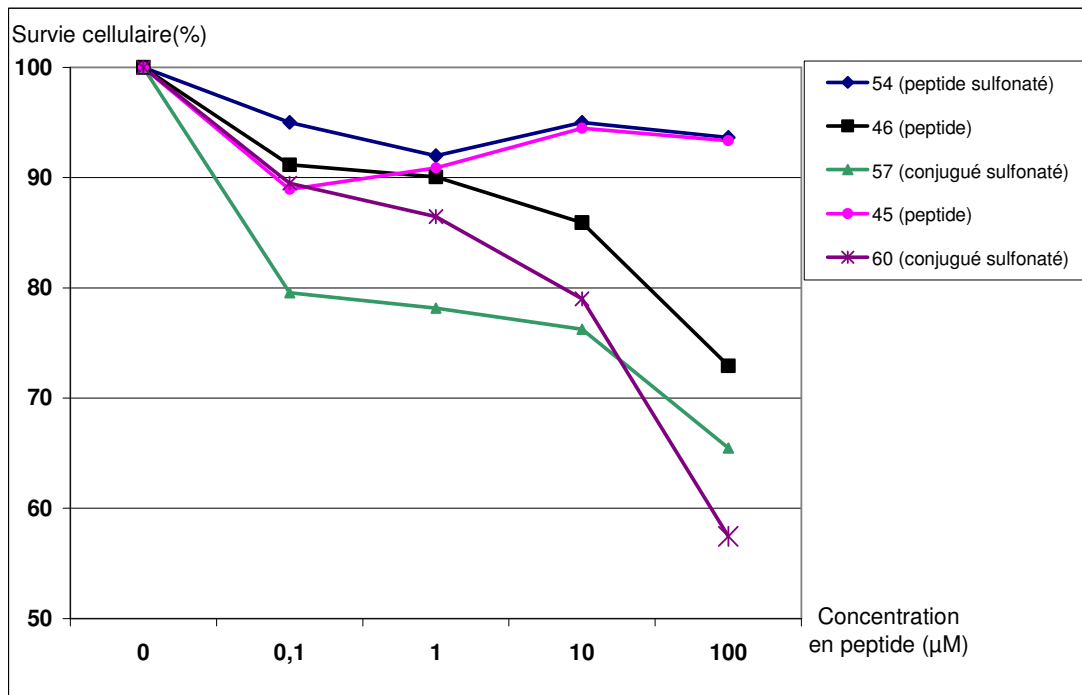


Figure 119 : Effet des peptides sur la survie des cellules HeLa après 24h : % de survie cellulaire en fonction de la concentration en peptide

Ces résultats nous ont permis de constater que :

* les peptides 54 et 45 semblaient relativement peu toxiques car plus de 90% des cellules ont survécu alors qu'elles ont été mises en contact avec ces produits pendant 24 heures et ceci même à la plus forte concentration (100 μM) ;

* les autres peptides (46, 57, 60) présentaient une cytotoxicité plus élevée que les deux premiers peptides. Ce phénomène semblait plus marqué pour le conjugué 60. Néanmoins, pour observer une mortalité importante mais qui restait malgré tout inférieure à 50%, il fallait se placer à une concentration relativement élevée soit 100 μM en peptide.

Ces observations nous ont paru encourageantes pour la suite du projet. En effet, le meilleur composé identifié par biopuces, le 57, semblerait être le plus cytotoxique jusque 10 μM. Ce constat n'est pas négatif en soi dans la mesure où cette propriété a été observée sur des cellules cancéreuses.

Nous avons ensuite tenté d'expliquer en partie ces résultats grâce à une étude détaillée du conjugué 57.

1.5°) Etude du conjugué sulfonaté 57

D'après les résultats des tests biopuces, le conjugué **57**, produit de la ligation entre les peptides **54** et **46**, présentait la meilleure interaction avec le domaine extracellulaire de MET. De plus, d'après le test MTT, il s'avère relativement peu cytotoxique (moins de 40% de mort cellulaire quand il a été mis en contact avec les cellules HeLa à 100 μ M).

Nous avons alors cherché à comprendre comment il pouvait interagir avec MET en étudiant les similitudes structurales qu'il présentait avec le ligand, l'HGF/SF. Pour ce faire, nous avons d'abord étudié les homologues structurales entre le cystéinyl-peptide **46** et l'HGF/SF, puis nous nous sommes intéressés au conjugué **57**.

1.5.1°) Comparaison entre l'HGF/SF et le cystéinyl-peptide 46

Comme nous l'avons vu page 135, l'HGF/SF est une protéine hétérodimérique constituée par deux chaînes α et β reliées par un pont disulfure. Le cystéinyl-peptide **46** (QHKTSITGHHLEPGGC) a été comparé avec différentes zones de l'HGF/SF grâce à la base de données UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/P14210>). Nous avons pu noter un alignement partiel entre la séquence de **46** et une zone de la chaîne β , qui est une interface de liaison à MET (Figure 120).

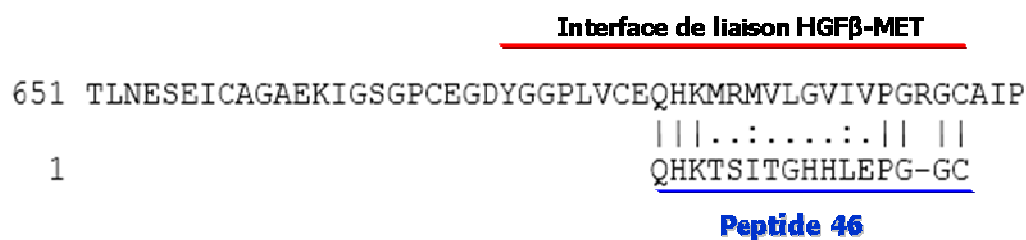


Figure 120 : Comparaison entre l'interface de liaison HGF β -MET et le peptide 46

Les deux extrémités du peptide **46** semblaient s'aligner partiellement avec la chaîne β de l'HGF/SF. En effet, par rapport à la chaîne β de l'HGF/SF, sont retrouvées dans la séquence du peptide **46** :

- * la proline ;
- * les deux glycines ayant un rôle d'espaceur ;
- * la cystéine, ajoutée pour la ligation ;

Par contre, il faut noter qu'une arginine, qui permettrait d'obtenir un alignement parfait avec l'HGF/SF, est absente du peptide 46.

Par ailleurs, des homologues concernant la nature des acides aminés ont été relevés : des résidus hydrophobes, comme la méthionine et l'isoleucine de l'interface HGF β -MET, sont positionnées respectivement face à une isoleucine et une leucine sur le peptide 46.

D'après ces observations, nous avons supposé que le peptide 46 pourrait être un mime de cette zone de l'HGF/SF. Néanmoins, la chaîne β de l'HGF/SF possède la plus faible affinité pour le récepteur MET (Kd = 90 nM) mais cette zone demeure essentielle à l'activation de MET par l'HGF/SF (page 138). Toujours d'après les résultats biopuces, l'interaction du conjugué 57 avec le domaine extracellulaire de MET semblerait être plus importante que le cystéinyl-peptide 46. Nous avons émis alors l'hypothèse que 57 présenterait une interaction avec MET plus importante que 46 grâce à l'ajout du peptide sulfonaté.

Ces constats sont à prendre avec une extrême prudence dans la mesure où ils ne proviennent que de comparaisons entre des compositions en acides aminés. Or, l'HGF/SF est une protéine dont la structure tertiaire expose certains résidus et en enfouit d'autres. Afin de vérifier si ces homologues de séquences peuvent présenter un intérêt dans la liaison à MET, nous nous sommes intéressés aux études cristallographiques récemment publiées. La structure cristallographique de l'interface de liaison entre la chaîne β de l'HGF/SF et le récepteur MET a été récemment publiée par Stamos et coll²⁷⁴ et, grâce à cet article, nous avons essayé de comprendre comment le conjugué 57 pouvait interagir avec l'HGF/SF mais également avec le récepteur.

1.5.2°) Comparaison entre le conjugué sulfonaté 57 et l'HGF/SF

Nous avons recherché les analogies entre le conjugué 57 et la chaîne β de l'HGF/SF grâce à l'étude cristallographique de Stamos et coll (Figure 121).

²⁷⁴ Stamos J, Lazarus RA, Yao X, Kirchofer D, Wiesmann C. Crystal structure of the HGF β -chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *The EMBO J.* **2004.** 23, 2325-2335

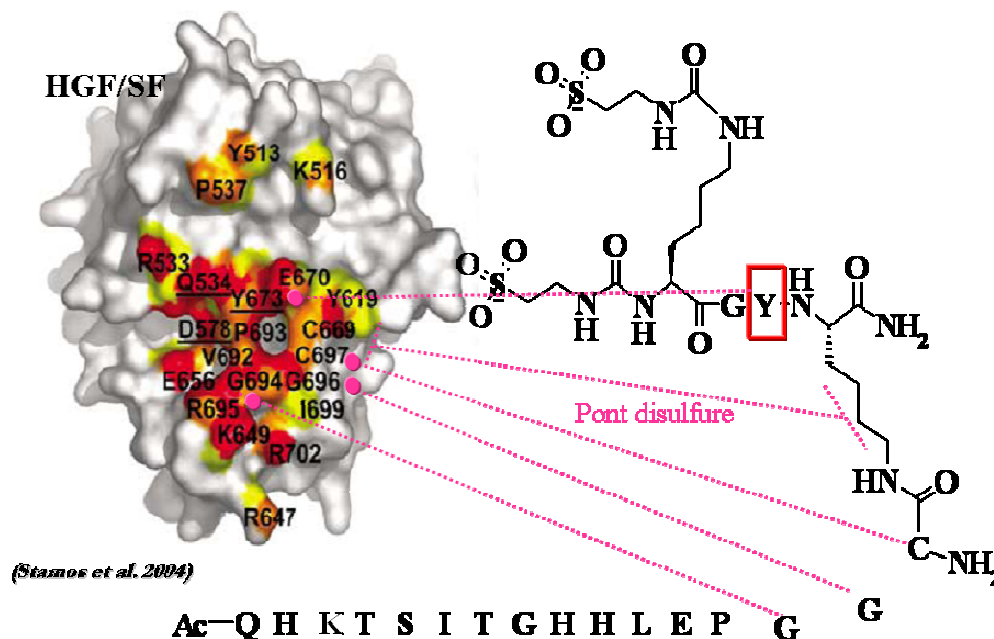


Figure 121 : Comparaison entre la structure cristallographique de la chaîne β de l'HGF/SF et le conjugué 57
(Figure tirée de l'article de Stamos 2004)

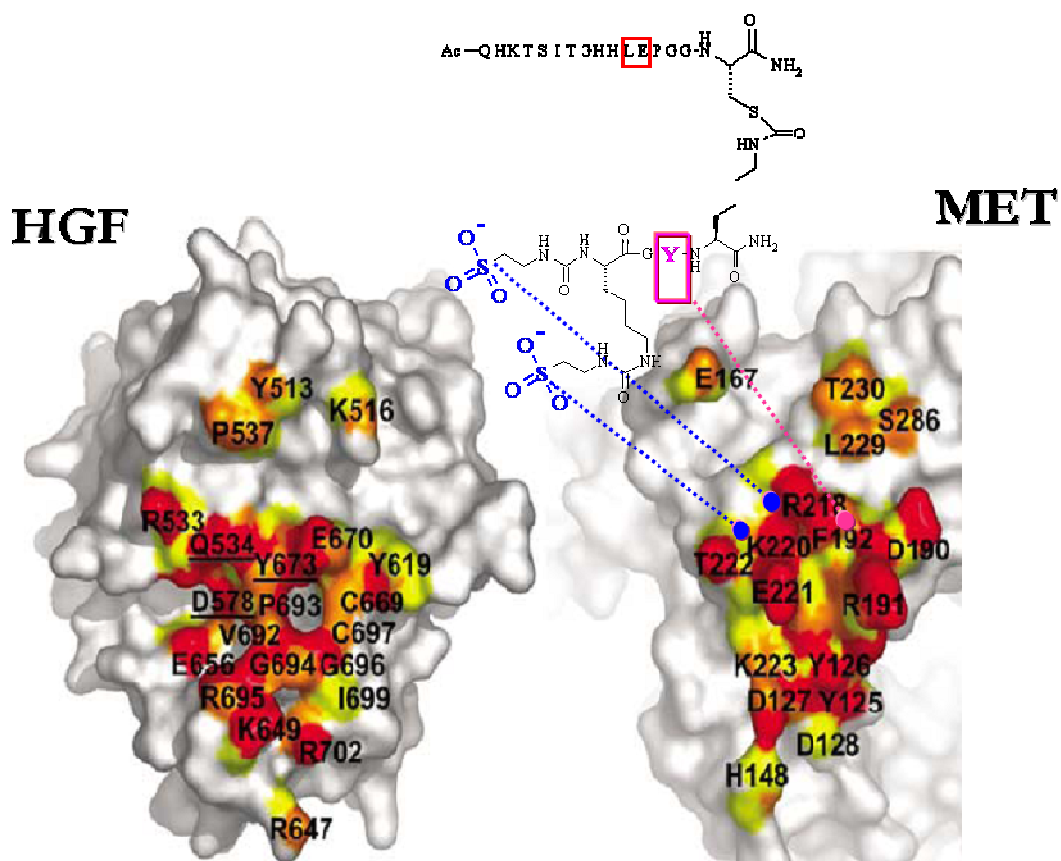
Leurs travaux démontrent l'importance de la Tyr⁶⁷³ du ligand dans la liaison à MET. En effet, ils ont préparé une protéine correspondant à la chaîne β de l'HGF/SF dans laquelle la Tyr⁶⁷³ a été substituée par une alanine. Des tests ELISA compétitifs ont été effectués entre cette protéine mutée et la protéine chimère MET-Fc. Ces expériences ont montré que la mutation de la tyrosine provoquait une perte significative de la capacité de liaison au récepteur. Ce résidu est également présent dans le conjugué 57 au niveau du peptide sulfonaté, contrairement au cystéinyl-peptide 46. Afin de vérifier si cette tyrosine a une importance dans la liaison de 57 à MET-Fc, il faudrait synthétiser un conjugué 57 en substituant la tyrosine par une alanine, comme l'ont effectué Stamos et coll.

A proximité de cette tyrosine, deux glycines, Gly⁶⁹⁴ et Gly⁶⁹⁶, sont présentes dans l'HGF/SF et sont retrouvées dans l'extension « GGC » du conjugué 57. De plus, la cystéine terminale de cette extension mimerait la Cys⁶⁹⁷ qui forme, dans la structure cristallographique de l'HGF/SF, un pont disulfure avec la Cys⁶⁶⁹. En considérant le nombre d'atomes, ce pont serait mimé dans le conjugué 57 par la chaîne latérale de la lysine K2. Enfin, la Pro⁶⁹³ voisine de l'extension « GGC » est également retrouvée dans l'HGF/SF. Grâce à l'ensemble de ces observations, nous avons pu établir des homologies structurales entre le conjugué 57 et l'HGF/SF, qui pourraient constituer une ébauche d'explication des résultats obtenus à l'issue

des tests biopuces. Ensuite, nous nous sommes intéressé à la façon dont le conjugué 57 pourrait venir interagir avec le récepteur MET.

1.5.3°) Hypothèses sur la liaison du conjugué sulfonaté 57 avec MET

Pour comprendre comment 57 pouvait interagir avec MET, nous nous sommes servis de la Figure 122, issue de l'article de Stamos et sur laquelle nous y avons inséré 57.



*Figure 122 : Interface de liaison HGFβ-MET et comparaison avec le conjugué 57
(Figure tirée de l'article de Stamos 2004)*

D'après l'étude de Stamos et coll, le noyau aromatique de la Tyr⁶⁷³ de la chaîne β de l'HGF/SF pourrait interagir, de manière hydrophobe, avec celui de la Phe¹⁹² de MET. À proximité de la Phe¹⁹², se trouvent une Arg²¹⁸ et une Lys²²⁰. En supposant que la tyrosine de 57 mime la Tyr⁶⁷³ de l'HGF/SF, on peut supposer que ces résidus basiques seraient des candidats potentiels pour une interaction avec les groupements sulfonates du conjugué 57.

De plus, l'Arg¹⁹¹ de MET interagirait via sa chaîne hydrophobe avec la Val⁶⁹² et la Pro⁶⁹³ de l'HGF/SF. La leucine (L) de 57 pourrait interagir de façon hydrophobe avec la chaîne aliphatique de l'Arg¹⁹¹ alors que l'acide glutamique (E) voisin pourrait se lier électrostatiquement avec la charge positive de cette arginine. Cet enchaînement « LE » est également retrouvé dans la séquence du peptide 46, qui ne semble pas lier MET. Cet élément n'est donc pas suffisant en soi pour la liaison à MET. En effet, l'Arg¹⁹¹ de l'HGF/SF se trouve à proximité de la Phe¹⁹² qui interagirait avec la tyrosine du peptide sulfonaté. L'enchaînement « LE » n'aurait donc de l'importance dans l'interaction avec MET que si elle est située à proximité d'un acide aminé hydrophobe.

Pour résumer, nous avons émis différentes hypothèses :

- * les résidus « GGC » pourraient avoir une importance dans l'interaction du conjugué 57 avec MET. Leur ajout sur le peptide sélectionné par Zhao et coll pourrait être l'une des raisons de la liaison avec le récepteur MET et expliquer partiellement les différences entre nos résultats et ceux qu'ils ont obtenus ;

- * l'importance de l'enchaînement « LE » situé à proximité de la tyrosine du peptide sulfonaté ;

Nous avons été également amenés à nous poser différentes questions :

- * la tyrosine du peptide sulfonaté participerait-elle à l'interaction du conjugué 57 avec le récepteur MET, de façon analogue à ce qui a été observé avec la Tyr⁶⁷³ de l'HGF/SF ? ;

- * les groupements sulfonates augmenteraient-ils l'affinité en raison d'interactions électrostatiques avec les résidus basiques présents à la surface de MET ?

En répondant à ces deux questions, nous pourrions apporter une explication sur la différence de liaison pour MET entre les peptides 46 et 57. Pour ce faire, nous avons choisi de préparer de nouveaux peptides présentant les modifications appropriées par rapport au conjugué 57.

2°) Synthèse de la seconde série de conjugués par ligation thiocarbamate

Pour déterminer l'importance de chaque élément, nous avons ensuite décidé de préparer une seconde série de peptides dont les structures chimiques découlent du conjugué 57. Pour rappel, ce dernier a été préparé par ligation thiocarbamate entre le cystéinyl-peptide 46 et le peptide sulfonaté 55. Nous avons modifié, d'une part, la séquence du cystéinyl-

peptide **46** et, d'autre part, celle du peptide sulfonaté **55**, ce qui nous a permis d'accéder, après ligation thiocarbamate des éléments modifiés, à diverses modifications du conjugué **57**. L'intérêt d'avoir opté, dès le départ, pour une méthode de ligation chimique a pris alors tout son sens dans la mesure où il a été possible de faire varier indépendamment chaque élément du conjugué très rapidement. La structure du conjugué **57** est rappelée à la Figure 123.

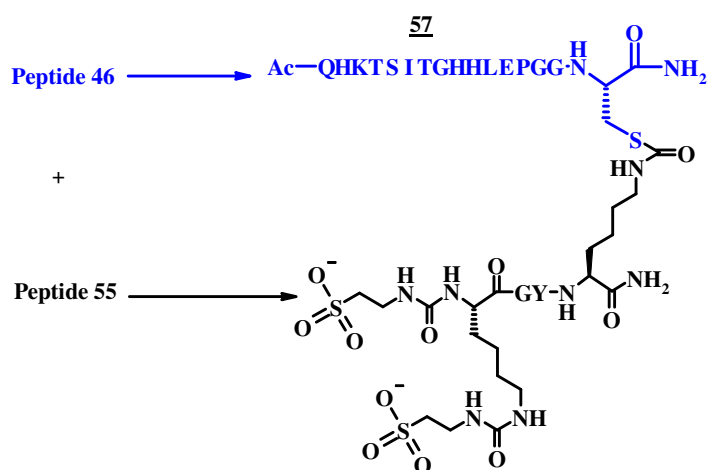


Figure 123 : Rappel de la structure du conjugué 57

2.1°) Modifications du cystéinyl-peptide 46

2.1.1°) Synthèse des cystéinyl-peptides

Nous avons décidé, afin de déterminer leur implication potentielle dans la liaison avec MET, de faire varier certains résidus du peptide **46**. Compte tenu des homologues relevés entre la chaîne β de l'HGF/SF et la séquence du peptide **46**, nous avons choisi d'apporter différentes modifications à la séquence du peptide **46** afin de mimer au mieux la zone d'interaction HGF β -MET (Figure 124).

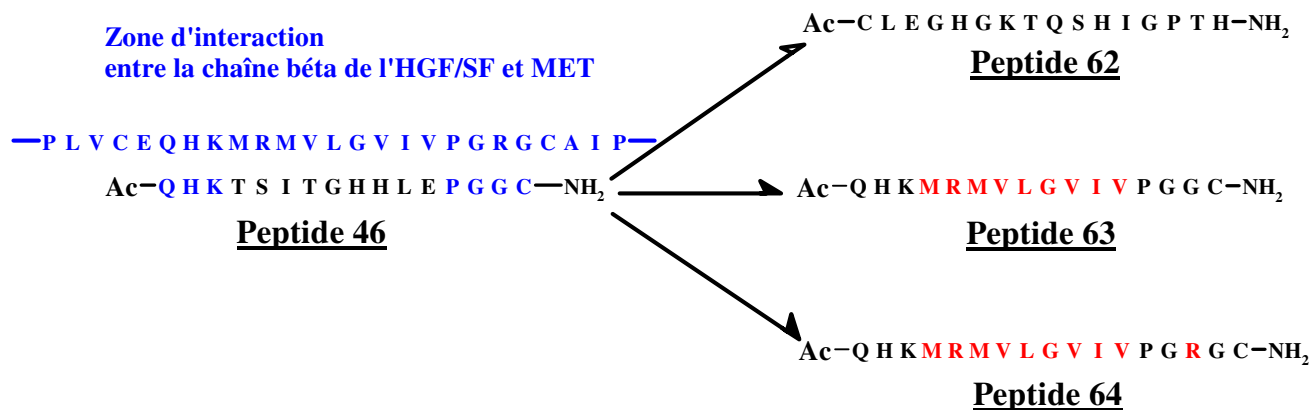


Figure 124 : Modifications de la séquence du peptide 46 : structures des peptides 62, 63, 64

De nouveaux peptides ont été préparés :

- un peptide « scramble » du peptide **46** afin d'évaluer l'importance de l'enchaînement des résidus dans l'interaction avec MET, nous avons obtenu le peptide **62** ;
- le peptide **63**, dont la séquence s'aligne avec la zone d'interaction HGFβ-MET tout en conservant l'extension « GGC » comme dans le peptide **46** ;
- le peptide **64**, dont la séquence s'aligne parfaitement avec la zone d'interaction HGFβ-MET.

Cette nouvelle série de peptides a été préparée par la SPPS automatisée selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle sur une résine NovaSyn TGR[®]. Les rendements après purification des peptides **62**, **63**, et **64** sont présentés dans le Tableau 8.

Peptide	62	63	64
Rdt	8%	34%	40%

Tableau 8 : Rendements des synthèses des peptides 62, 63, 64

Leur identité a été contrôlée par analyses MALDI-TOF. De plus, leur pureté a été vérifiée (supérieure à 98%) par des analyses par RP-HPLC et par électrophorèse capillaire.

Ces cystéinyl-peptides ont été liés au peptide sulfonaté **55** par ligation thiocarbamate pour ne faire varier qu'un paramètre à la fois.

2.1.2°) Synthèse des conjugués sulfonates

La ligation des peptides **62**, **63**, **64** avec le peptide **55** a abouti à la synthèse des conjugués sulfonates **65**, **66**, et **67** (Figure 125).

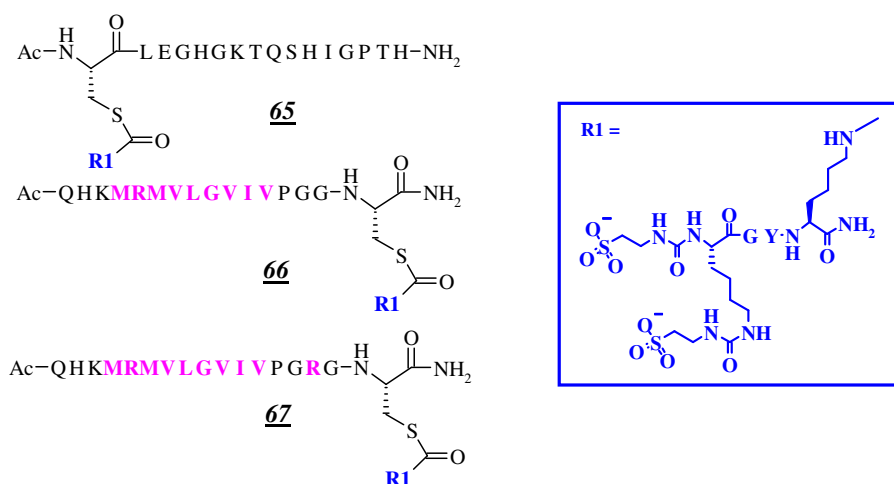


Figure 125 : Structure des conjugués sulfonates 65, 66, 67

La ligation a été effectuée dans les conditions réactionnelles optimisées, à savoir dans un tampon phosphate de sodium (200 mM, pH 7,5) sous atmosphère inerte. Les peptides ont été isolés avec succès de leur milieu réactionnel par RP-HPLC préparative. Les rendements en produits isolés sont regroupés dans le Tableau 9.

Peptide	65	66	67
Rdt	70%	40%	25%

Tableau 9 : Rendements de synthèse des peptides sulfonates 65, 66, 67

Leur identité a été confirmée grâce à des analyses par MALDI-TOF et leur pureté (supérieure à 90%) a été contrôlée par RP-HPLC et de l'électrophorèse capillaire.

A ce stade, nous avons préparé six nouveaux produits (peptides et conjugués sulfonates) différant du conjugué **57** au niveau de la séquence du cystéinyl-peptide.

Afin de ne modifier que la partie sulfonate de ce conjugué, nous avons décidé ensuite de synthétiser de nouveaux peptides sulfonates, dont la structure chimique dérive du peptide **55**, qui ont été liés ensuite au cystéinyl-peptide **46**.

2.2°) Modifications du peptide sulfonaté 55

D'après nos hypothèses découlant des tests biopuces et de l'étude du conjugué 57, il semblerait que deux éléments majeurs de la structure du peptide sulfonaté aient une importance dans la liaison à MET : la présence des sulfonates et de la tyrosine. Il nous a paru alors essentiel de vérifier cette hypothèse en modifiant ces deux paramètres en modifiant :

- * la disposition spatiale, la valence et la présence des groupements sulfonates ;
- * la tyrosine en la substituant par un autre résidu, telle qu'une alanine.

La structure du peptide 55 ainsi que les éléments qui ont été modifiés sont présentés à la Figure 126.

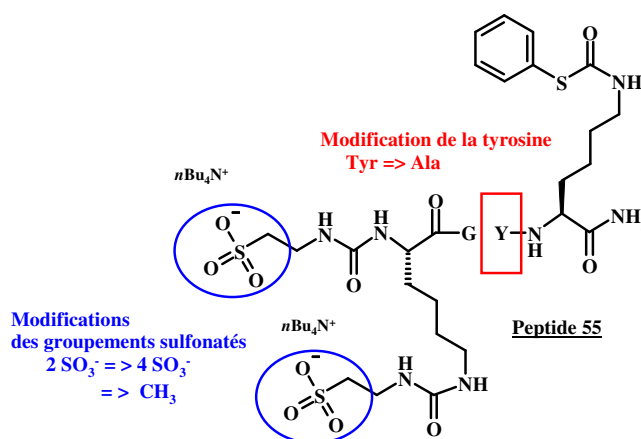


Figure 126 : Rappel de la structure du peptide sulfonaté 55 et modifications envisagées

Les groupements sulfonates du conjugué 57 pourraient avoir un rôle dans son interaction avec les résidus basiques (Arg²¹⁸, Lys²²⁰) présents dans la séquence du RTK MET. Pour tester cette hypothèse, nous avons envisagé trois modifications des groupements sulfonates du peptide 55. Nous avons alors testé si leur présence, leur valence et leur disposition spatiale pouvaient avoir un rôle dans l'interaction par biopuces. Après ligation avec le cystéinyl-peptide 46, nous avons obtenu trois conjugués sulfonates dérivés du conjugué 57.

2.2.1°) Présence des groupements sulfonates

Grâce aux travaux de Stamos et coll, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les groupements sulfonates pourraient interagir de façon électrostatique avec les résidus basiques

de MET (Arg²¹⁸ et Lys²²⁰). Pour la vérifier, nous les avons substitués par un groupement non chargé comme un groupement acétyle : nous avons alors obtenu le peptide **68** (Figure 127).

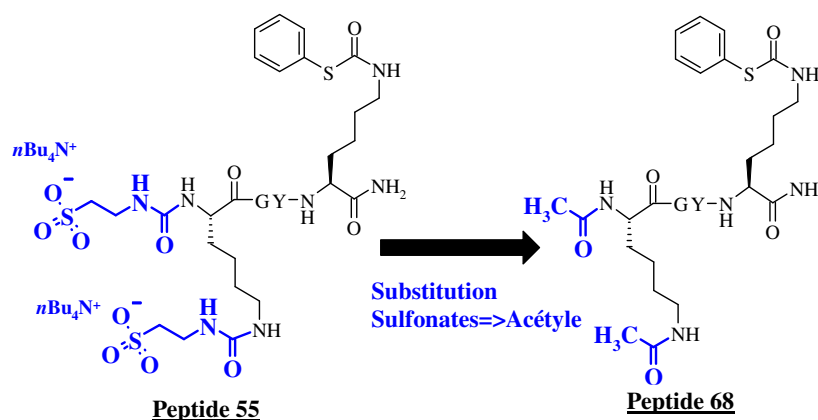


Figure 127 : Modification du peptide 55 : Substitution des groupements sulfonates par des groupements acétyle

La synthèse de la peptidyl-résine (Fmoc-K(Fmoc)GY(O-*t*Bu)K(Mtt)) a été effectuée par SPPS selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle sur une résine NovaSyn TGR[®]. Les groupements Fmoc ont été éliminés par un traitement avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF. L'acétylation des amines α et ϵ de la lysine a été réalisée à l'aide un mélange d'anhydride acétique (3%) et de DIEA (0,3%) dans le DMF. Le groupement phénylthiocarbonyle a été introduit sur le support solide selon le protocole que nous avons mis au point, à savoir grâce au PhSCOCI (4 équivalents) et à la triéthylamine (4 équivalents) dans le THF. Après la déprotection des chaînes latérales et séparation du peptide de la résine, le peptide **68** a été isolé avec un rendement de 53% et une pureté par RP-HPLC de 97%.

Afin de ne modifier qu'un seul paramètre par rapport au conjugué sulfonaté **57**, le peptide **68** a ensuite été lié au cystéinyl-peptide **46** par la ligation thiocarbamate. Nous avons ainsi obtenu le conjugué **69** (Figure 128).

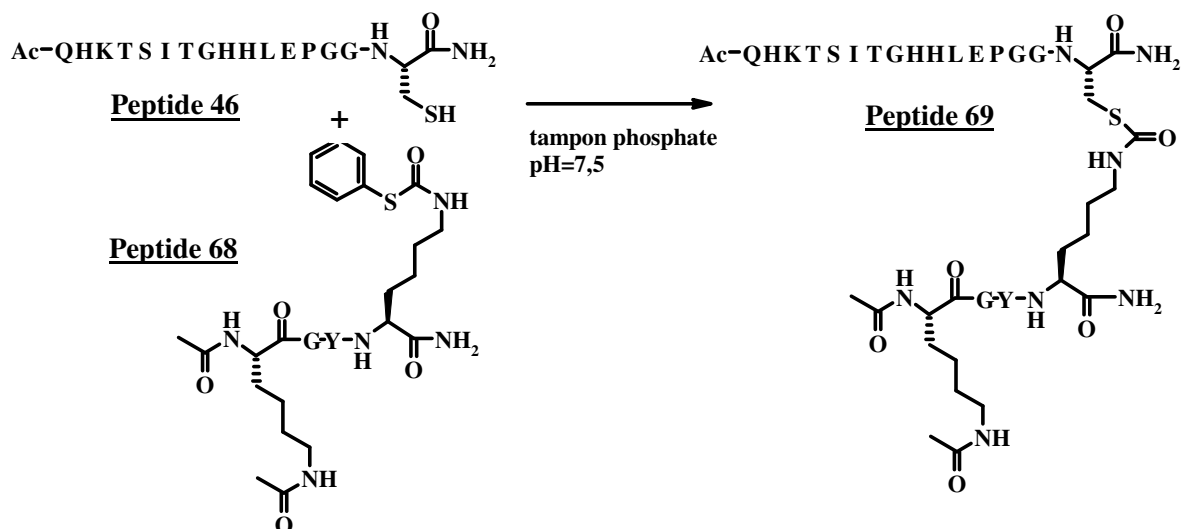


Figure 128 : Ligation thiocarbamate entre les peptides 46 et 68 : synthèse du conjugué 69

Le peptide **69** a été obtenu avec un rendement de 25% et une pureté supérieure à 99% quel que soit le moyen d'analyse (RP-HPLC et électrophorèse capillaire).

2.2.2°) Nombre et disposition spatiale des groupements sulfonates

Dans le but de moduler potentiellement l'interaction supposée entre les groupements sulfonates de **57** et les résidus basiques de MET (Arg²¹⁸ et la Lys²²⁰), nous avons également envisagé d'augmenter le nombre de groupements sulfonates présents dans la structure du peptide **55** et de parvenir à un peptide présentant quatre groupements sulfonates. Deux dispositions spatiales des groupements sulfonates nous ont semblées possibles et sont schématisées à la Figure 129.

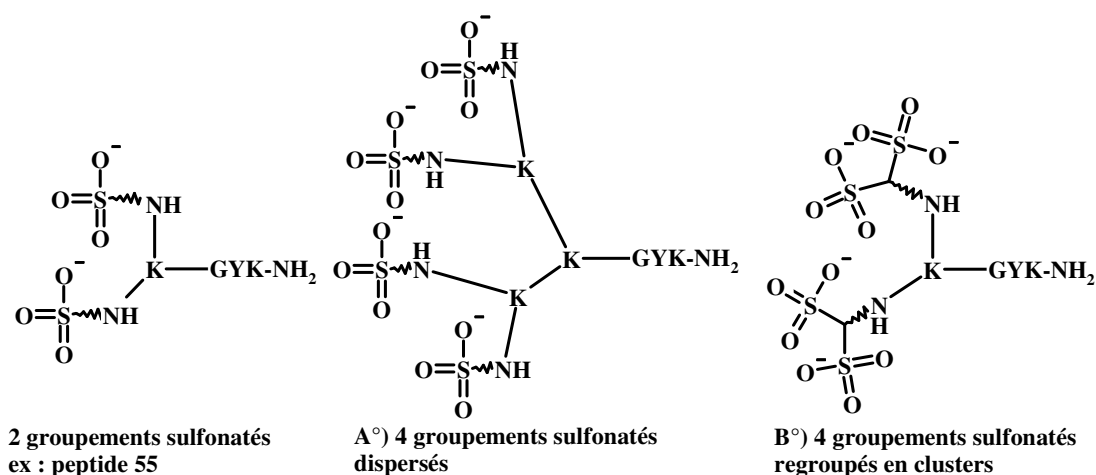


Figure 129 : Modifications du squelette du peptide sulfonaté

Dans la structure A (Figure 129), les groupements sulfonaté sont disposés de façon espacée afin de ne modifier qu'un seul paramètre par rapport au peptide 55, à savoir le nombre de charges négatives sur la structure finale. Lors de la description de la structure de base du peptide sulfonaté (cf page 170), nous avons évoqué le fait qu'il était judicieux de choisir une structure basée sur un dendrimère de lysines pour pouvoir ensuite y greffer des lysines supplémentaires sur lesquelles d'autres groupements sulfonaté pourraient être ajoutés. A ce stade de notre travail, cette précaution a pris tout son sens.

A l'inverse, dans la structure B (Figure 129), les groupements sulfonaté sont regroupés en « clusters » sous la forme de groupements gem-disulfonaté afin d'augmenter le nombre et la densité en charges négatives et favoriser potentiellement l'interaction électrostatique avec les résidus basiques de MET. La préparation de la structure peptidique B a été possible grâce à un analogue disulfonaté de la taurine, l'acide 2-amino-éthane-1,1-disulfonique (AAEDS), mis à notre disposition dans le cadre d'une collaboration avec le Docteur Anthony Romieu (Institut de Recherche en Chimie Organique Fine de Rouen) (Figure 130).

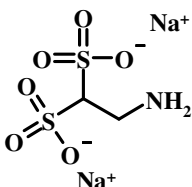


Figure 130 : Structure chimique de l'acide 2-amino-éthane-1,1-disulfonique (AAEDS)

Pour obtenir les structures A et B, nous avons préparé de nouveaux peptides sulfonates selon le protocole qui sera largement détaillé dans le prochain paragraphe. Tout d'abord, les groupements sulfonates ont été apportés sur les amines α et ϵ des lysines du dendrimère en utilisant le CDI comme agent de couplage. Néanmoins, nous verrons que suite à des difficultés de synthèse, nous avons été contraints d'abandonner le CDI.

* Synthèse des peptides sulfonates

Nous décrivons tout d'abord la synthèse de la structure A de la Figure 129. La peptidyl-résine **70** a été tout d'abord préparée par SPPS selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle sur une résine NovaSyn TGR[®]. En parallèle, le CDI a permis la synthèse de l'intermédiaire **51** selon un protocole déjà décrit, intermédiaire qui a été greffé sur la peptidyl-résine **70** pour former la peptidyl-résine **71**. Il nous a fallu effectuer cinq couplages successifs de l'intermédiaire **51** afin d'obtenir de manière satisfaisante la peptidyl-résine **71**, le moyen le plus simple de l'évaluer étant de réaliser un test TNBS entre chaque couplage. Les étapes de cette synthèse sont présentées à la Figure 131.

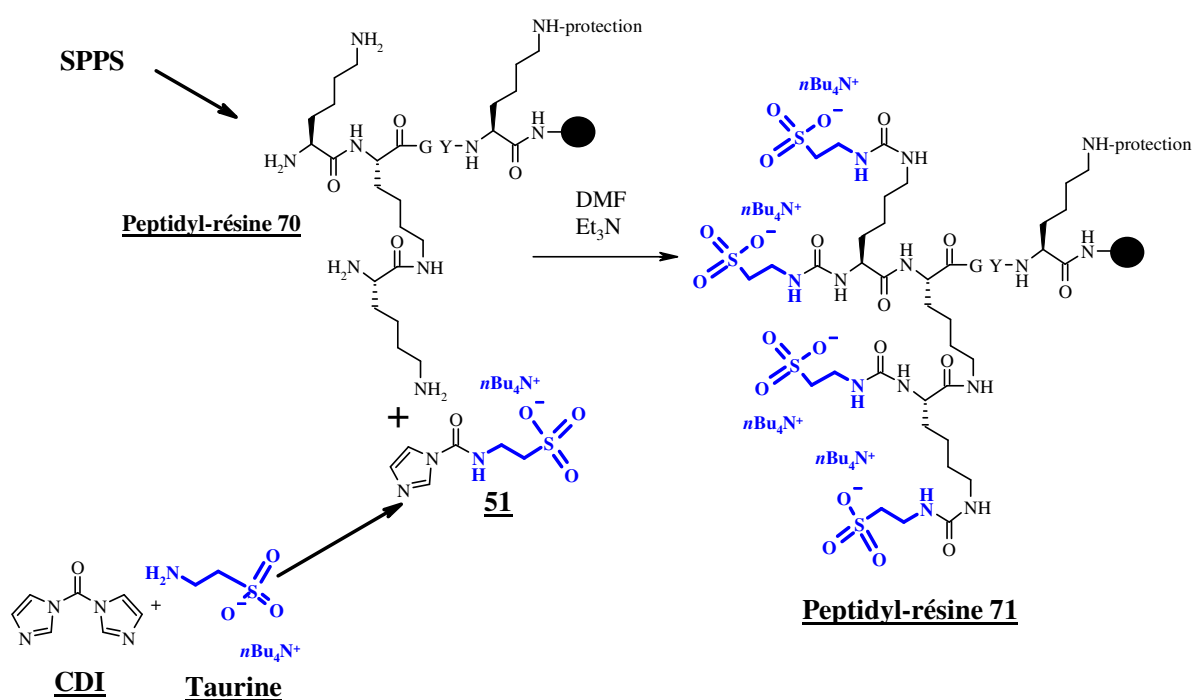


Figure 131 : Synthèse des peptidyl-résines 70 et 71

A ce stade, deux peptides sulfonatés ont été obtenus :

* la peptidyl-résine **71a**, protégée au niveau de l'amine ϵ de K2 par un groupement Boc, a été mise en contact avec une solution concentrée de TFA libérant le peptide **72**. Son interaction avec la protéine chimérique Met-Fc sera comparée avec celle du peptide sulfonaté **54** (Figure 132).

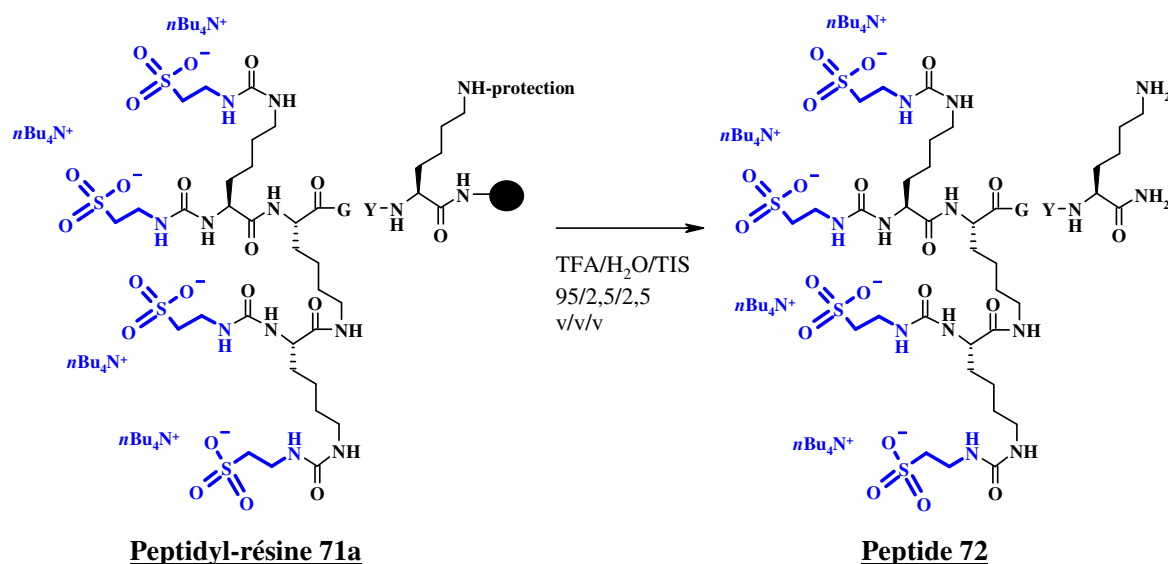


Figure 132 : Synthèse du peptide sulfonaté 72

* la peptidyl-résine **71b**, protégée au niveau de l'amine ϵ de K2 par un groupement Mtt, a été fonctionnalisée sur le support solide par le phénylthiochloroformate pour obtenir le peptide **73** (Figure 133). Par la suite, nous verrons que ce peptide tétrasulfonaté a été associé au cystéinyl-peptide **46** par ligation thiocarbamate.

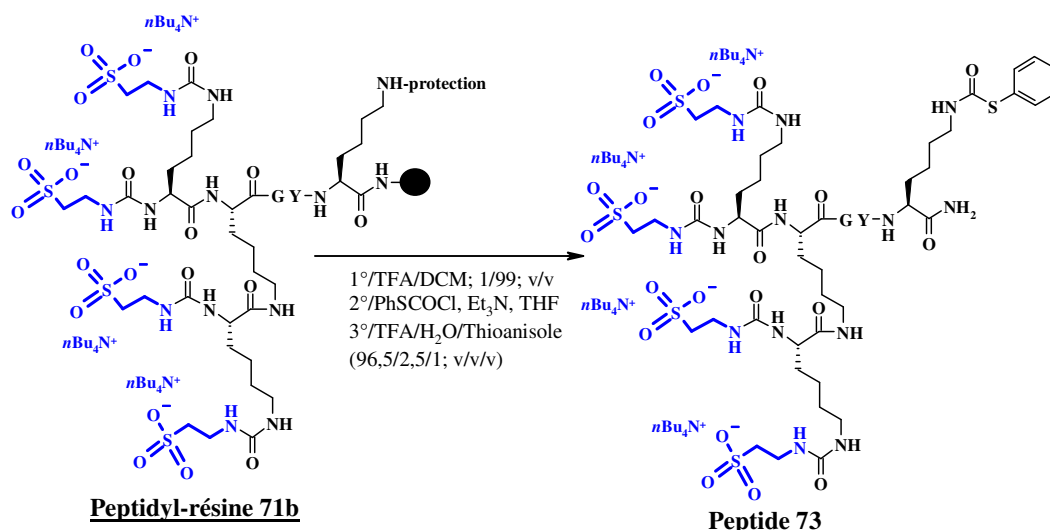


Figure 133 : Synthèse du peptide sulfonaté 73

Nous avons ensuite tenté d'appliquer cette stratégie pour préparer la structure B de la Figure 129. Nous voulions former l'intermédiaire gem disulfonaté issu de la réaction de l'AAEDS avec le CDI, le greffer sur la peptidyl-résine **52** et la fonctionnaliser directement en phase solide. Le schéma réactionnel envisagé est présenté à la Figure 134.

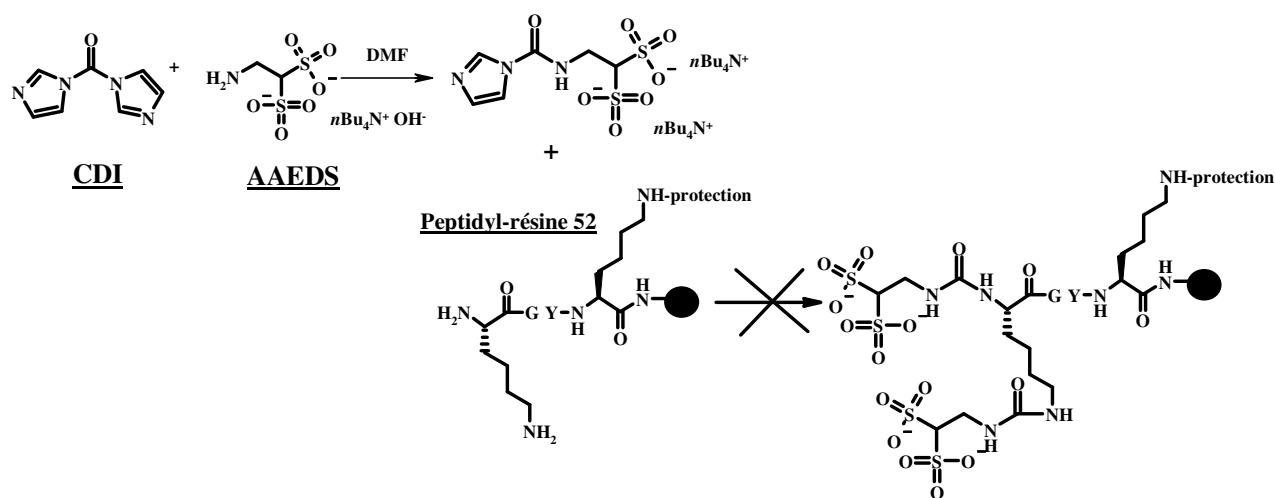


Figure 134 : Essai de synthèse de l'intermédiaire tétrasulfonaté et de couplage sur la peptidyl-résine 52

De façon analogue à la taurine, nous avons solubilisé l'AAEDS dans une solution aqueuse de $n\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{OH}^-$, repris l'ensemble dans le DMF que nous avons ensuite additionné sur le CDI. Malheureusement, l'analyse RMN de ce milieu réactionnel nous a permis de déterminer que seulement 15% de l'intermédiaire gem-disulfonaté se formait : il était donc

peu probable d'obtenir la structure B en utilisant cet agent de couplage. Nous avons alors décidé, pour remédier à ce problème, de changer d'agent de couplage et parmi ceux existant, des résultats probants ont été obtenus avec le **bis(para-nitrophényl)carbonate (BPNPC)**, dont la structure chimique est représentée à la Figure 135.

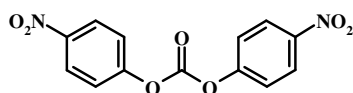


Figure 135 : Structure chimique du bis(para-nitrophényl)carbonate (BPNPC)

Dans les travaux de Tilley et coll, une molécule proche du BPNPC, le (para-nitrophényl)chloroformate, a été utilisée pour introduire efficacement la taurine, via un lien carbamate, sur des alcools aliphatiques²⁷⁵. La Figure 136 reprend schématiquement leurs synthèses.

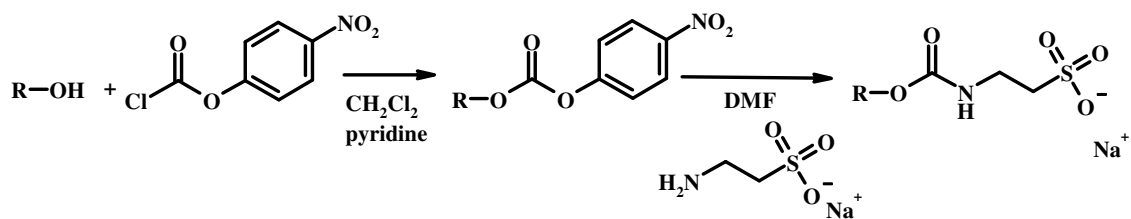


Figure 136 : Réaction entre un alcool aliphatique R-OH et le bis(para-nitrophényl)chloroformate suivie d'une réaction avec la taurine (Travaux de Tilley et coll)

Nous nous sommes basés sur leurs travaux pour préparer les intermédiaires sulfonates. Contrairement à Tilley et coll, nous avons d'abord introduit la taurine sur l'agent de couplage, puis nous avons fait réagir cet intermédiaire carbamate avec les amines de la lysine de la peptidyl-résine. Afin de mettre au point les conditions opératoires avec une molécule simple, nous avons tout d'abord mis au point la réaction entre le BPNPC et la taurine.

²⁷⁵ Tilley SD, Francis MB. Tyrosine-selective protein alkylation using π -allylpalladium complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**. 128. 1080-1081

* Couplage de la taurine au BPNPC : synthèse des peptides sulfonates 54 et 55

La taurine a été préalablement solubilisée dans une solution aqueuse de $n\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{OH}^-$ (1 M dans l'eau), puis du DMF a été ajouté sur l'ensemble : ce mélange a été ensuite additionné sur le BPNPC. L'intermédiaire carbamate, **74**, a été ainsi formé (Figure 137).

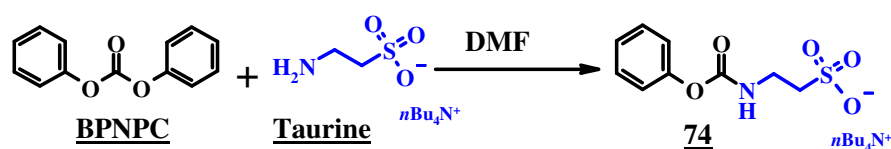
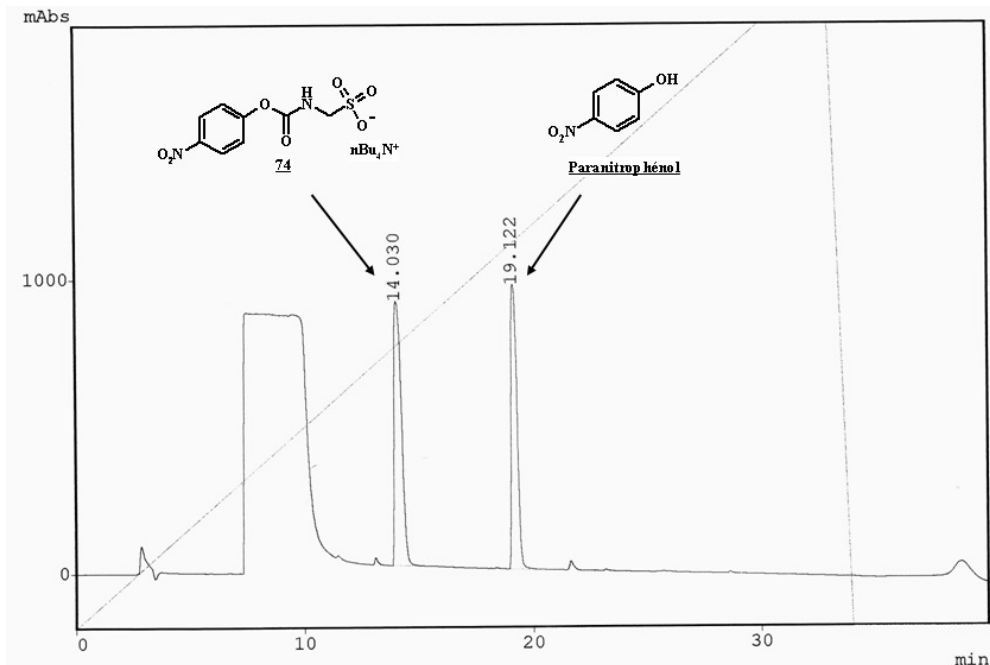


Figure 137 : Réaction entre le BPNPC et la taurine : formation de l'intermédiaire 74

La molécule **74**, s'est avérée stable dans les conditions acides employées lors des analyses RP-HPLC effectuées pour suivre l'évolution du milieu réactionnel en fonction du temps. Le chromatogramme RP-HPLC au bout de 30 minutes de réaction est présenté à la Figure 138.



**Figure 138 : Chromatogramme RP-HPLC du milieu réactionnel entre la taurine et le BPNPC à $t = 30$ minutes
(0-100% B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil, 215 nm)**

Après 30 minutes de réaction, l'analyse par RP-HPLC a permis de confirmer la formation de l'intermédiaire ainsi que la disparition totale du BPNPC. Le seul produit secondaire observé par RP-HPLC est le paranitrophénol qui colore en jaune le milieu réactionnel. Cette propriété colorimétrique le classe d'ailleurs dans la catégorie des indicateurs colorés et c'est la raison pour laquelle, il est fréquemment employé pour effectuer des dosages acido-basiques.

L'intermédiaire **74** étant préparé dans le DMF, compatible avec la SPPS, il a donc été ajouté sans purification intermédiaire sur la peptidyl-résine **52**, dont la synthèse a été décrite à la page 172, ce qui nous a permis d'obtenir la peptidyl-résine **53**. Cette fois-ci, contrairement à ce que nous avons mis au point avec le CDI, nous avons choisi de n'utiliser que deux équivalents de l'intermédiaire par amine libre, ce qui s'est avéré suffisant pour obtenir un bon taux de couplage sur les amines de la lysine (Figure 139).

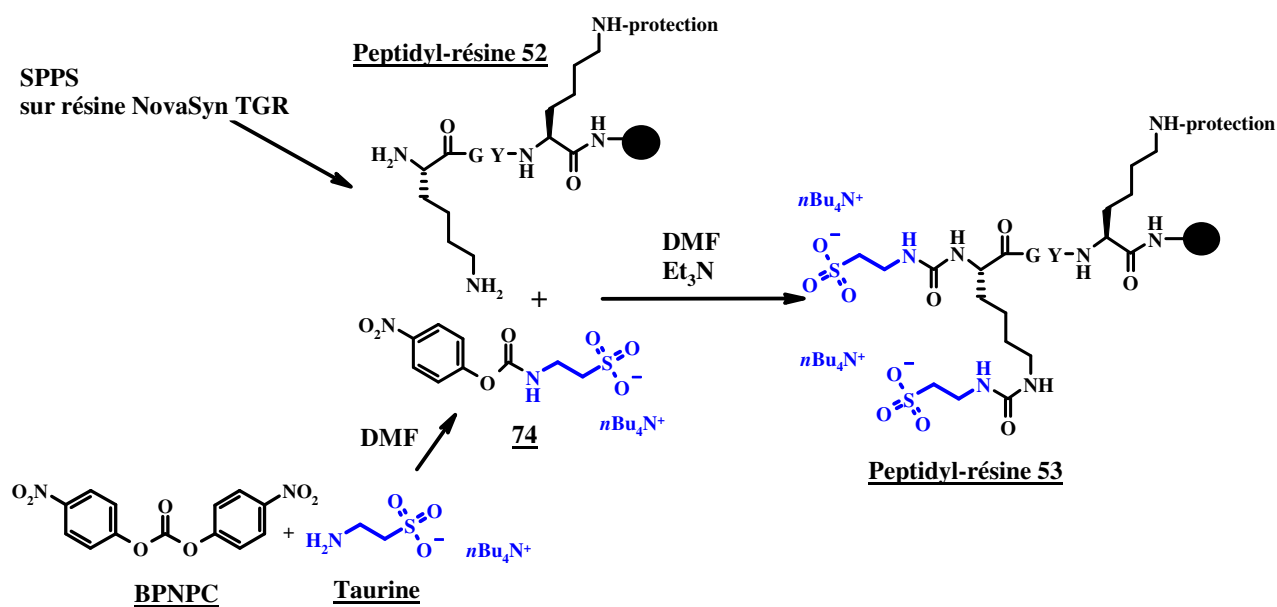


Figure 139 : Synthèse de l'intermédiaire 74 et couplage sur la peptidyl-résine 52

Deux cas de figure se sont à nouveau présentés (Figure 140) :

* le traitement de la peptidyl-résine **53** par une solution concentrée de TFA a permis d'obtenir le peptide **54** avec un rendement après purification de 44%, inférieur à celui obtenu avec le CDI (69%) mais dans ce dernier cas, le peptide n'avait pas été purifié.

* l'amine ε de la lysine a été fonctionnalisée directement en phase solide, nous permettant d'accéder au peptide **55** avec un rendement de 36% après purification avec une

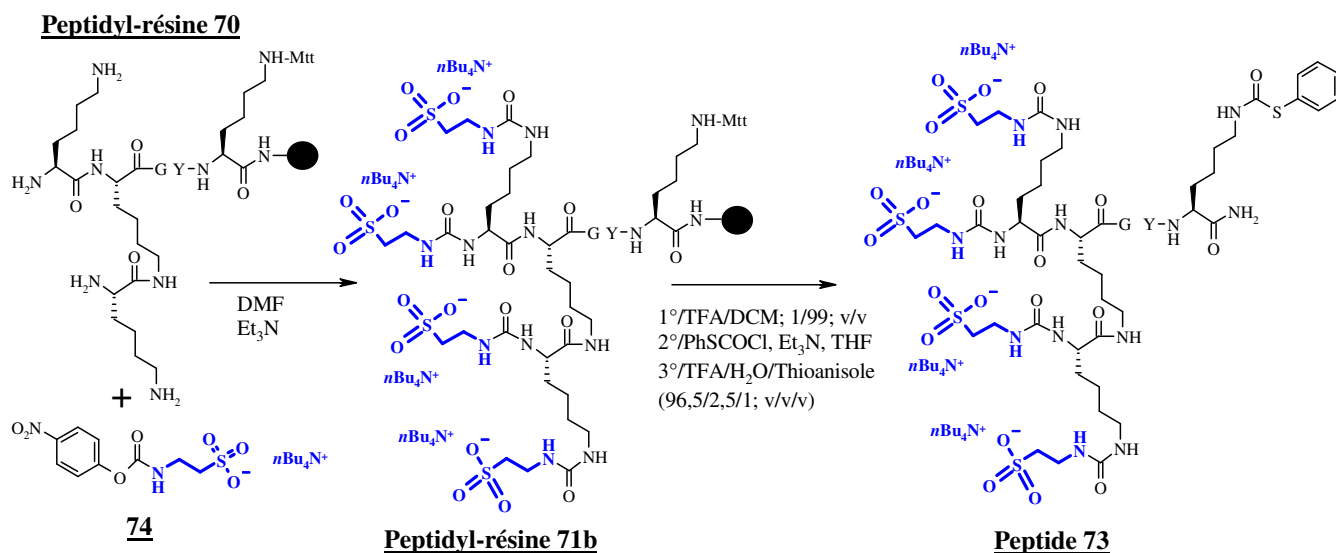


Figure 141 : Synthèse du peptide 73 par la stratégie BPNPC

Le rendement de synthèse s'est avéré être identique à celui obtenu lors de l'emploi du CDI. Néanmoins, la stratégie BPNPC étant très efficace, seuls deux couplages successifs de la molécule intermédiaire **74** ont été nécessaires pour parvenir à un tel résultat (contre cinq en utilisant la stratégie CDI).

Nous avons ensuite mis au point la réaction entre le BPNPC et l'AAEDS.

*** Couplage de l'AAEDS au BPNPC : synthèse des peptides sulfonates 77 et 78**

L'AAEDS a été solubilisé dans le $n\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{OH}^-$, du DMF a été ajouté et l'ensemble a été additionné sur le BPNPC. Nous avons obtenu la molécule intermédiaire **75** (Figure 142).

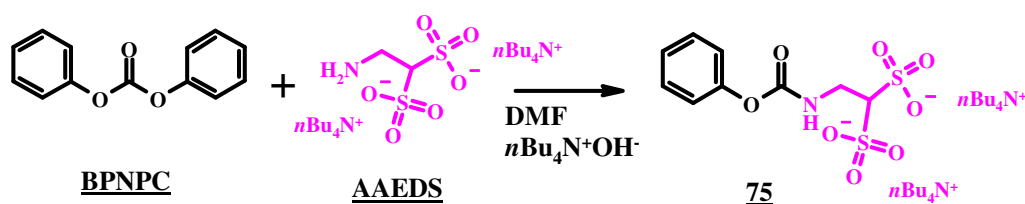
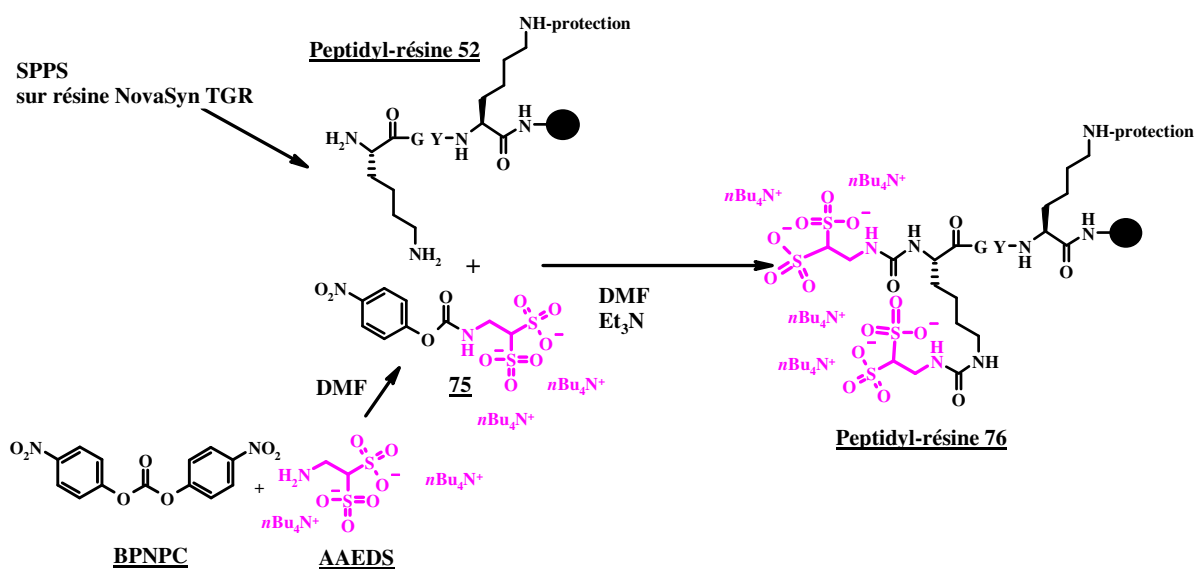


Figure 142 : Synthèse de l'intermédiaire 75

Le suivi de l'évolution du milieu réactionnel a été effectué au moyen de l'HPLC en phase inverse. Nous avons constaté que l'intermédiaire **75** se formait et ainsi que le paranitrophénol était le seul produit secondaire observé par RP-HPLC. Nous avons isolé **75**

par RP-HPLC préparative avec un rendement de 49%. Sa pureté et son identité ont été confirmées par des analyses LC-MS et RMN.

Il a été ajouté sans purification intermédiaire sur la peptidyl-résine **52**, dont la synthèse a déjà été décrite page 172, ce qui nous a permis d'obtenir la peptidyl-résine **76** (Figure 143).



**Figure 143 : Synthèse de la molécule intermédiaire 75
couplage sur la peptidyl-résine 52
Synthèse de la peptidyl-résine 76**

Deux cas de figure ont été de nouveau envisagés :

* la peptidyl-résine **76** a été mise en contact avec une solution concentrée de TFA pour déprotéger les chaînes latérales et libérer le peptide **77**. Ce dendrimère a été préparé pour comparer son affinité et/ou son activité avec le peptide sulfonaté **54** (Figure 144).

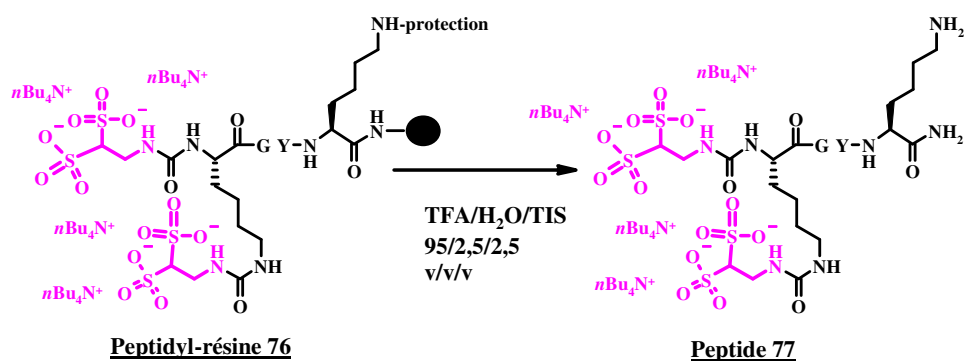


Figure 144 : Synthèse du peptide sulfonaté 77

* nous avons tenté de fonctionnaliser la peptidyl-résine **76** sur le support solide. Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à éliminer le groupement Mtt protecteur de la lysine K2. Nous avons choisi de fonctionnaliser le peptide **77** en solution en utilisant les mêmes conditions expérimentales qu'en phase solide, à savoir en présence de quatre équivalents de PhSCoCl et de triéthylamine. Les peptides étant généralement insolubles dans le THF, nous avons effectué la réaction dans le DMF. Le peptide **78** a été obtenu avec un rendement après purification de 43% (Figure 145).

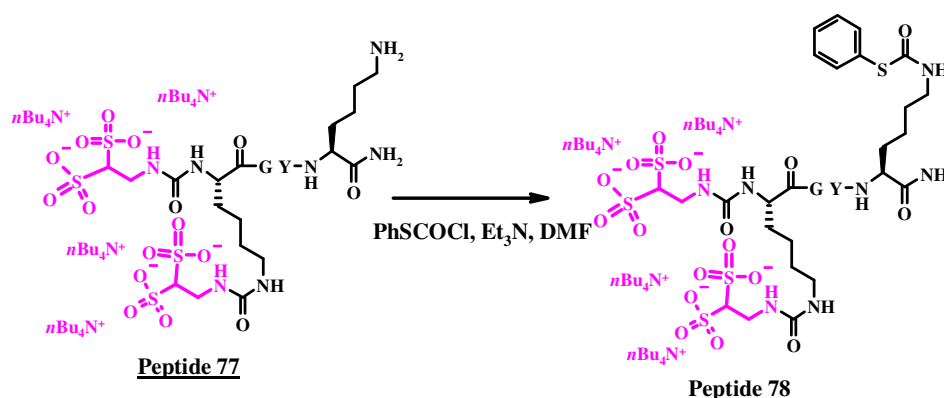


Figure 145 : Synthèse en solution du peptide sulfonaté 78

En conclusion, nous avons obtenu l'ensemble des peptides sulfonates souhaités avec des rendements généralement très satisfaisants. Ce sont des analogues du peptide **55** avec un nombre de groupements sulfonates plus important disposés en clusters ou espacés à la manière du peptide **55**. Grâce au BPNPC, nous sommes parvenus à améliorer les rendements de synthèse des peptides sulfonates, notamment le peptide **55**, mais également à simplifier le protocole de synthèse ainsi que son suivi. Les structures des peptides sulfonates à notre disposition sont rappelées à la Figure 146.

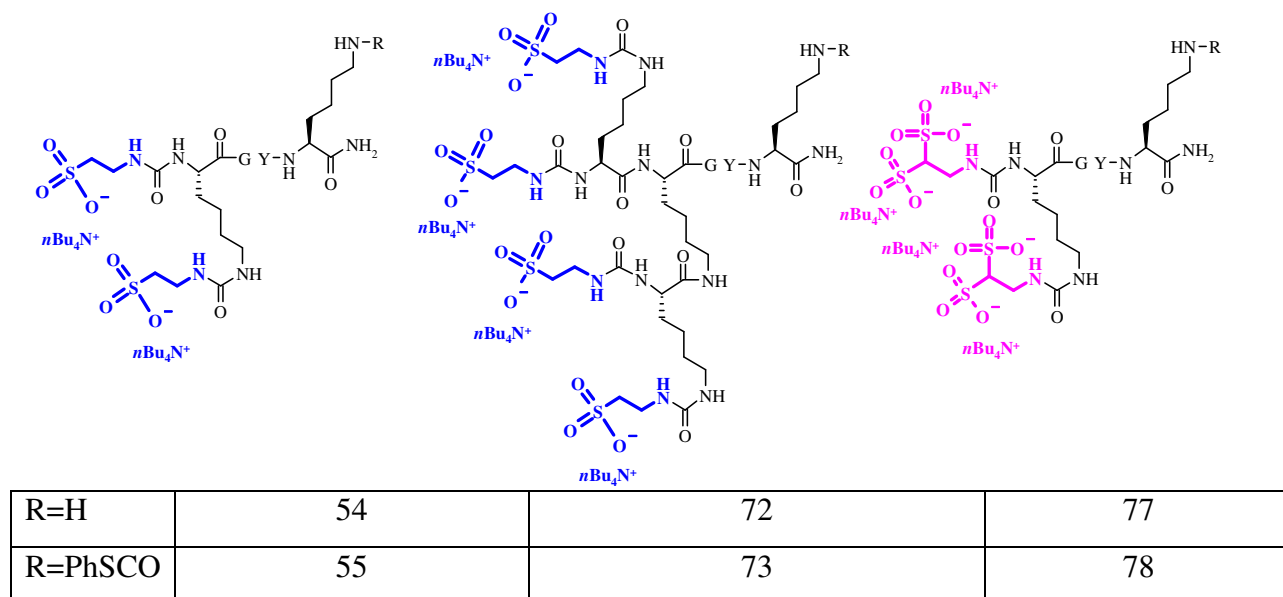


Figure 146 : Récapitulatif des structures et numéros des peptides sulfonates synthésés

Grâce à ces peptides sulfonates, nous avons pu faire varier un deuxième élément sur le conjugué 57, qui, pour rappel, résulte de la ligation thiocarbamate entre le peptide sulfonate 55 et le cystéinyl-peptide 46. Afin de vérifier l'influence des modifications apportées au niveau du peptide 55, nous avons donc effectué la synthèse des conjugués tétrasulfonates en liant les peptides sulfonates 73 et 78 avec le cystéinyl-peptide 46.

* Synthèse des conjugués sulfonates par ligation thiocarbamate

Les conjugués tétrasulfonates ont été obtenus par ligation thiocarbamate entre les peptides tétrasulfonates 73 et 78 et le cystéinyl-peptide 46. Elle s'est déroulée selon les conditions précédemment mises au point, à savoir dans un tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH 7,5) sous argon. Nous avons pu ainsi accéder aux conjugués tétrasulfonates 79 et 80 (Figure 147).

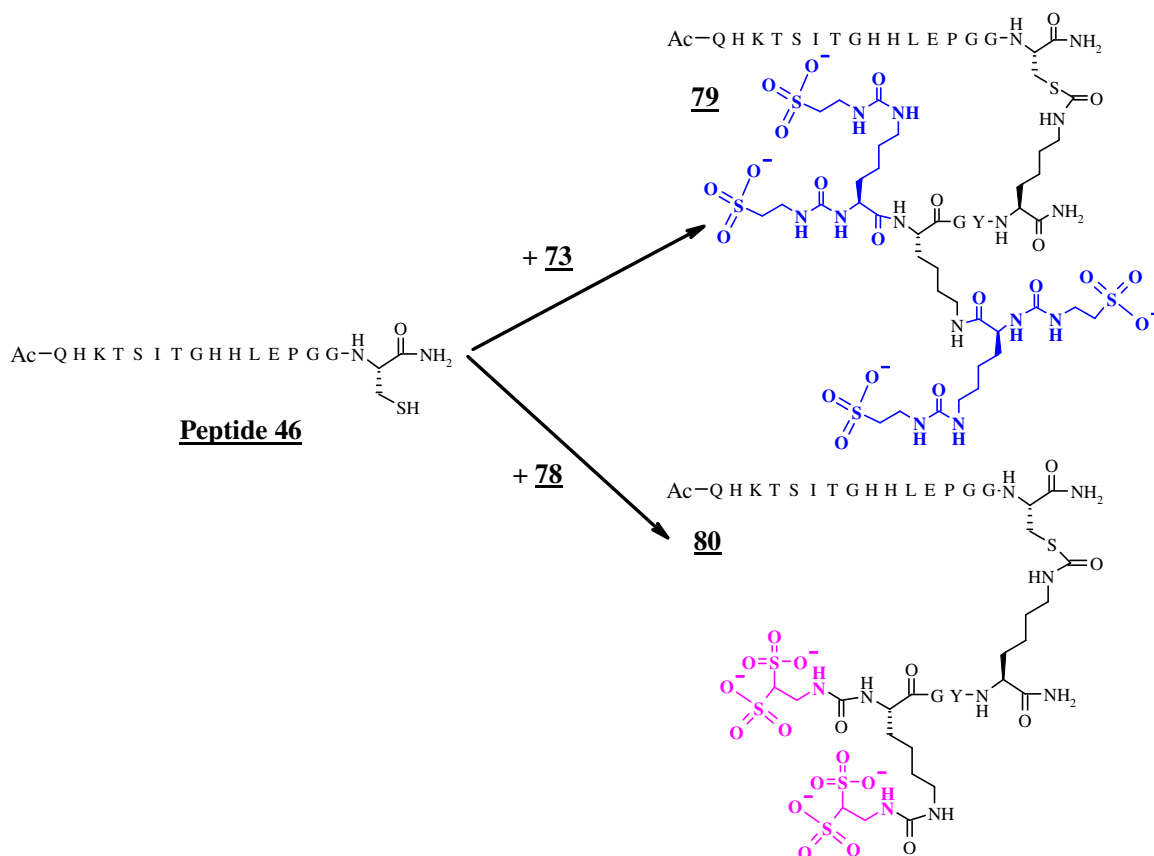


Figure 147 : Ligation thiocarbamate entre le cystéinyl-peptide 46 et les peptides tétrasulfonés 73 et 78

Les rendements de synthèse de ces peptides après purification par RP-HPLC préparative sont respectivement de 56% et de 64%.

2.2.3°) Substitution de la tyrosine du peptide sulfonaté 55

* Synthèse du peptide sulfonaté 81

L'étude de Stamos démontre l'importance de la Tyr⁶⁷³ de l'HGF/SF dans la liaison au récepteur²⁷⁶. En se basant sur leurs travaux et nos résultats expérimentaux, nous voulions déterminer l'importance dans la liaison à MET de cette tyrosine, retrouvée dans la séquence du peptide 55 et donc dans celle du conjugué 57. Nous avons donc substitué lors de la SPPS

²⁷⁶ Stamos J, Lazarus RA, Yao X, Kirchhofer D, Wiesmann C. Crystal structure of the HGF β -chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *The EMBO J.* **2004.** 23, 2325-2335

cette tyrosine par une alanine, ce qui a entraîné la formation du peptide **81** dont la structure est présentée à la Figure 148.

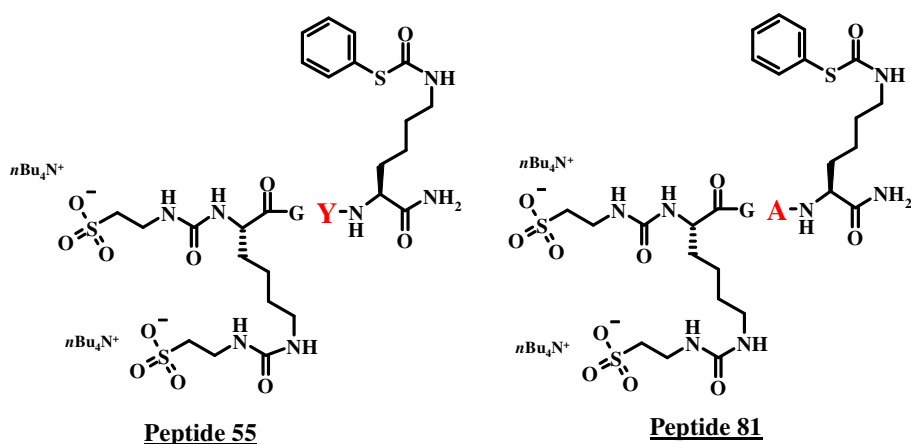


Figure 148 : Structure des peptides 55 et 81

Cette stratégie de substitution d'un résidu par une alanine est fréquemment appliquée pour évaluer son influence. En effet, cet aminoacide ne génère pas d'encombrement stérique, n'est ni chargé, ni réactif : cette mutation est donc tout à fait indiquée pour effectuer une modification minimale de la structure d'un peptide²⁷⁷.

La synthèse de la peptidyl-résine (Fmoc-K(Fmoc)GAK(Mtt)) a été effectuée selon la stratégie Fmoc/*t*-butyle sur une résine NovaSyn TGR[®] grâce à la SPPS automatisée. Les groupements Fmoc ont été éliminés grâce à un traitement avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF et la taurine a été introduite par le biais de la formation de l'intermédiaire **74**. Le rendement de synthèse après purification du peptide a été de 39% avec une pureté supérieure à 99% par RP-HPLC.

Dans le but de ne modifier qu'un paramètre par rapport au conjugué **57**, nous avons ensuite engagé le peptide **81** dans une réaction de ligation avec le peptide **46**.

* Synthèse du conjugué 82

La ligation thiocarbamate entre le cystéinyl-peptide **46** et le peptide sulfonaté **81** nous a permis d'obtenir le conjugué **82**, dont la structure est présentée à la Figure 149.

²⁷⁷ Cunningham BC, Wells JA. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*. **1989**. 244, 1081-1085

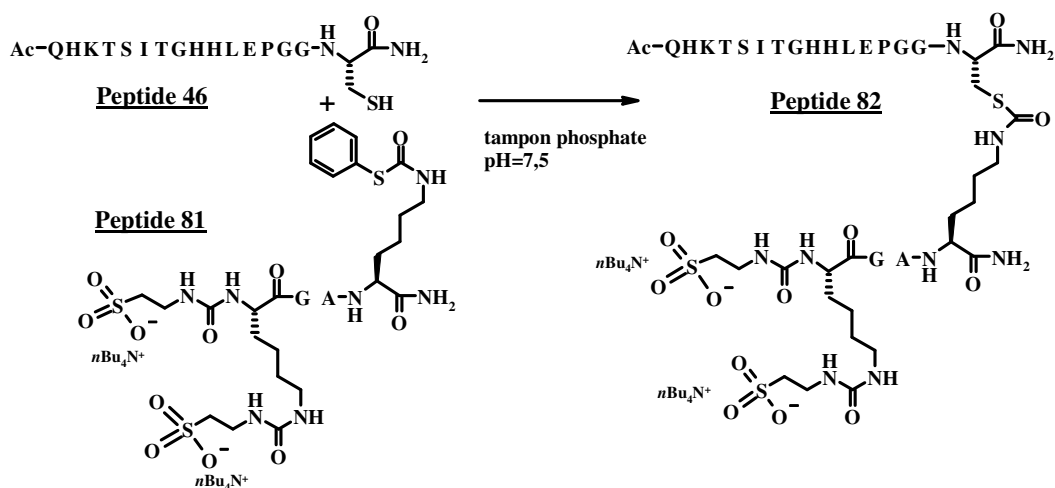


Figure 149 : Ligation thiocarbamate entre les peptides 46 et 68 : synthèse du peptide 82

La ligation a été effectuée dans les conditions opératoires habituelles, c'est-à-dire, dans un tampon phosphate de sodium (200 mM, pH de 7,5) sous atmosphère inerte et à température ambiante. Le peptide de ligation a été isolé avec succès par RP-HPLC préparative (Rdt = 60%) et une pureté supérieure à 99% aussi bien par RP-HPLC analytique que par électrophorèse capillaire.

En résumé, les peptides et conjugués sulfonatés de cette seconde série ont été conçus à partir du conjugué **57**, qui nous a semblé le plus prometteur, en faisant varier soit la structure du cystéinyl-peptide **46**, soit celle du peptide sulfonaté **55** (Figure 150).

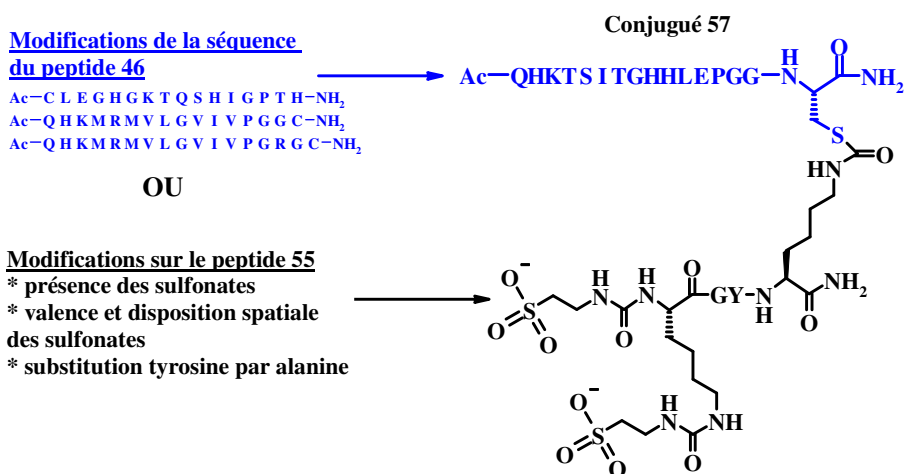


Figure 150 : Récapitulatif des modifications apportées au conjugué 57

Ils ont été synthétisés afin de répondre à trois questions découlant des tests biopuces :

* la séquence du peptide 46 est-elle primordiale dans l'interaction du conjugué 57 avec le domaine extracellulaire de MET ?

* quel est le rôle des groupements sulfonates dans l'interaction ? Est-il judicieux d'augmenter leur valence et quelle est alors la disposition privilégiée pour parvenir à une meilleure interaction ?

* la tyrosine du peptide 55 participe-t-elle à cette interaction en jouant le rôle de la Tyr⁶⁷³ de l'HGF/SF ?

A ce stade de notre travail, nous avons conçu et synthétisé une chimiothèque de 26 composés (peptides sulfonates, cystéinyl-peptides et conjugués sulfonates thiocarbamate) dérivant du conjugué 57. Un criblage de l'ensemble de ces composés a ensuite été effectué par biopuces pour déterminer leur affinité éventuelle pour le domaine extracellulaire de MET et savoir si les modifications apportées sur le conjugué 57 ont permis de confirmer ou d'infirmer certaines des hypothèses émises.

2.3°) Evaluation de l'interaction avec la protéine chimérique MET-Fc par biopuces

La capacité d'interaction avec le domaine extracellulaire de MET de l'ensemble de nos composés a été caractérisée en appliquant le même protocole expérimental que lors des précédents tests, à savoir :

* les peptides (10^{-4} M dans le PBS) ont été adsorbés sur les lames de verre fonctionnalisées par un groupement semicarbazide ;

* la protéine chimérique MET-Fc a été incubée à différentes concentrations (0-10 µg/mL) ;

* un anticorps anti-anticorps humain marqué à la tétraméthylrhodamine ;

* les biopuces ont été ensuite révélées par une lecture au scanner confocal à fluorescence (532 nm), la médiane et les intervalles interquartiles des signaux de fluorescence ont été calculés.

Pour chaque produit, les résultats obtenus, en fonction de la concentration en protéine chimérique MET, sont présentés à la Figure 151.

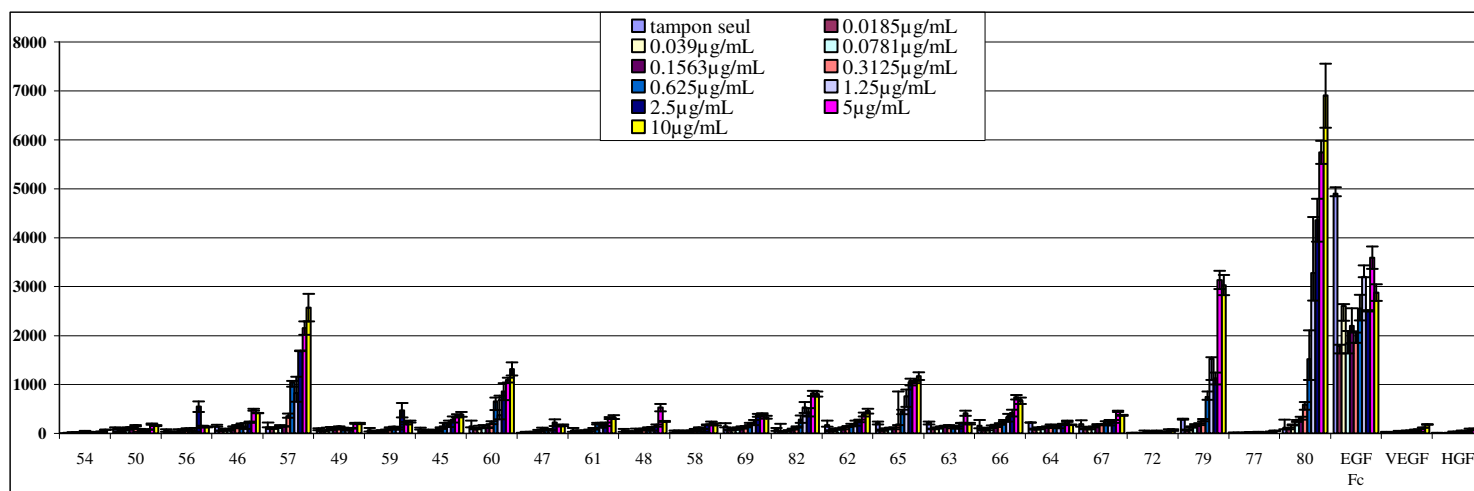


Figure 151 : Quantification par fluorescence de l'interaction MET-Fc et les composés

Un agrandissement correspondant à chaque type de modification est effectué afin d'améliorer la visibilité de ces résultats. Nous nous intéresserons successivement aux modifications apportées à la séquence du cystéinyl-peptide 46, puis à celui concernant le peptide sulfonaté 55.

2.3.1°) Modifications du cystéinyl-peptide 46

Nous avons d'abord modifié la séquence du peptide 46 et obtenu trois nouveaux cystéinyl-peptides (62, 63, 64). Après ligation thiocarbamate avec le peptide 55, nous avons obtenu trois conjugués sulfonates (65, 66, 67). Les structures de ces peptides sulfonates ainsi que celles des peptides 54, 46 et 57 sont rappelées à la Figure 152.

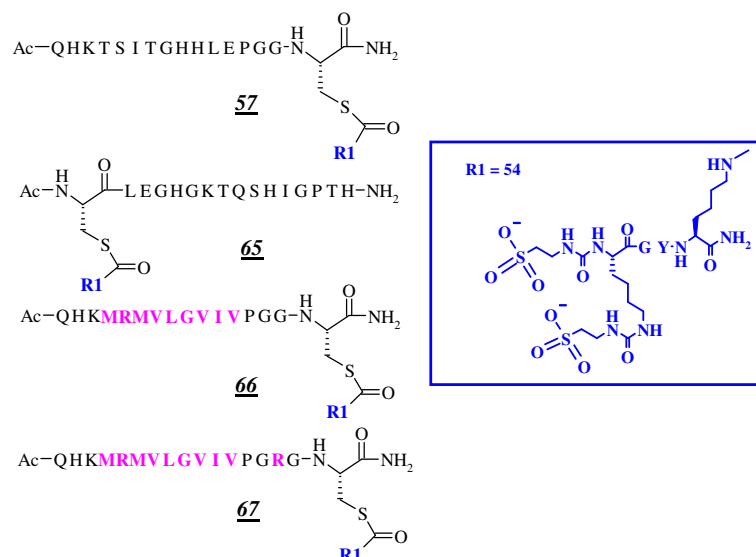


Figure 152 : Rappels des structures des peptides 57, 65, 66, 67

La sélection des résultats obtenus pour ces peptides est présentée à la Figure 153.

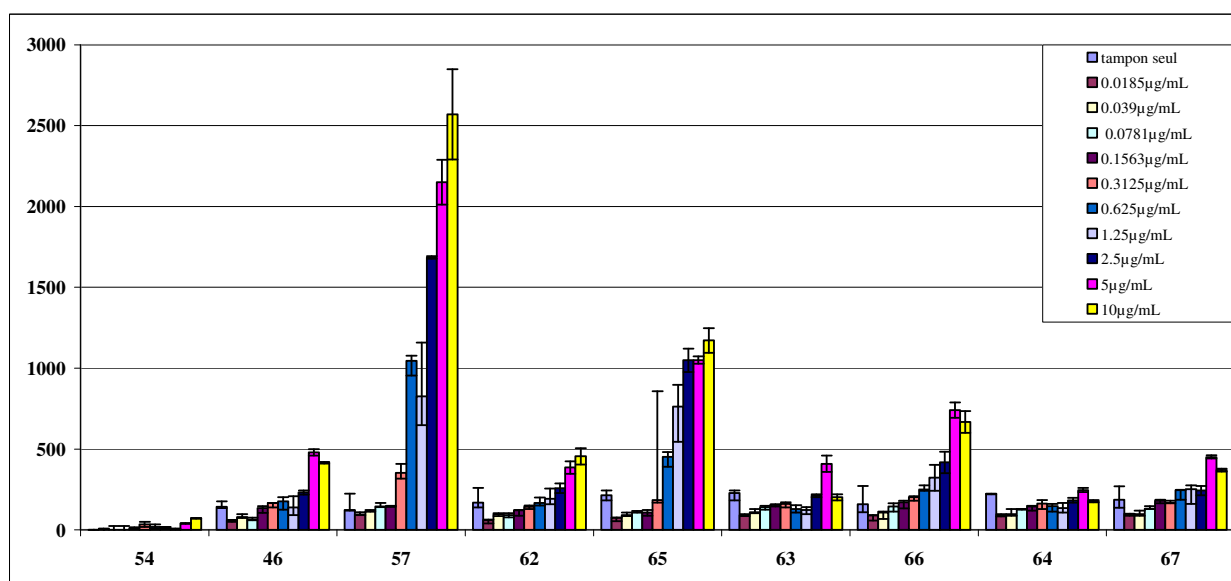


Figure 153 : Quantification par fluorescence de l'interaction entre la protéine chimérique MET-Fc et les composés

Différentes conclusions peuvent être tirées de cette expérience :

* le peptide sulfonaté **54** ne lie pas le domaine extracellulaire de MET, le cystéinyl-peptide **46** ne le lie pas de façon significative alors que le conjugué **57**, associant **46** et **54** dans la même structure, interagit de façon plus importante. Ces observations confirment ceux des précédents tests biopuces (cf page 180).

* le cystéinyl-peptide 62, scramble de 46, interagit faiblement avec la protéine chimérique MET-Fc, comparable à celle de 46 quelle que soit la concentration. Un cystéinyl-peptide ne semble donc pas suffisant pour lier de façon significative le domaine extracellulaire de la protéine. L'affinité de 65 augmente de façon significative par rapport à celle du cystéinyl-peptide 62, ce qui suggère que l'ajout de groupements sulfonates permettrait à elle seule d'augmenter l'affinité pour MET. Néanmoins en s'intéressant à la séquence peptidique de 65, nous avons observé que différents éléments de 57, que nous avons jugés importants sont retrouvés. En effet, grâce à nos observations et aux travaux de Stamos et coll, nous avons supposé que l'enchaînement « LE » pouvait être important car la leucine (L) pourrait interagir de façon hydrophobe avec la chaîne aliphatique de l'Arg¹⁹¹ alors que l'acide glutamique (E) pourrait se lier électrostatiquement avec la charge positive de cette arginine. De plus, comme dans 57, cet enchaînement se retrouve à proximité du peptide sulfonaté. Il semblerait que lors de la conception de 65, nous ayons fortuitement conservé l'agencement de structures qui semblent nécessaire pour interagir avec MET.

* Si les séquences de 63 et 64 s'alignent mieux avec celle de l'interface de liaison HGFβ-MET que le peptide 46, cette similitude ne semble pas suffisante pour interagir de façon importante avec le récepteur. L'interaction des conjugués 66 et 67 est beaucoup plus faible que celle du conjugué 57, ce qui nous a paru surprenant dans la mesure où en mimant la zone d'interaction HGFβ-MET et en y greffant des groupements sulfonates, nous nous attendions à de meilleurs résultats. Comme pour 63 et 64, le simple fait de mimer cette zone ne permet pas d'obtenir des résultats plus probants. Pour ces peptides, l'enchaînement « LE » n'est pas retrouvé, ce qui pourrait confirmer son importance. Le remplacement de E par une V semble donc défavorable à cause de la perte d'interaction électrostatique. Une autre hypothèse est que cette zone de la chaîne β de l'HGF/SF n'est peut être pas finalement celle que mime nos peptides, malgré les similitudes des séquences observées au démarrage de ce projet.

2.3.2°) Substitution de la tyrosine et des sulfonates

Suite aux résultats biopuces de la première série de peptides, nous nous sommes posés deux questions concernant la partie peptidique sulfonaté de 57 :

* la tyrosine des conjugués pourrait-elle avoir un rôle analogue à celui de la Tyr⁶⁷³ de l'HGF/SF qui interagit de façon hydrophobe avec la Phe¹⁹² de MET ? ;

* les sulfonates interagiraient-ils électrostatiquement avec l'Arg²¹⁸ et la Lys²²⁰, résidus basiques situés à proximité de la Tyr⁶⁷³ ?.

Deux conjugués **69** et **82**, dans lesquels ces éléments ont été modifiés, ont donc été préparés. Leurs structures sont rappelées à la Figure 154. Les résultats obtenus pour les peptides de référence **54**, **46**, **57** et les deux conjugués **69** et **82** sont agrandis à la Figure 155.

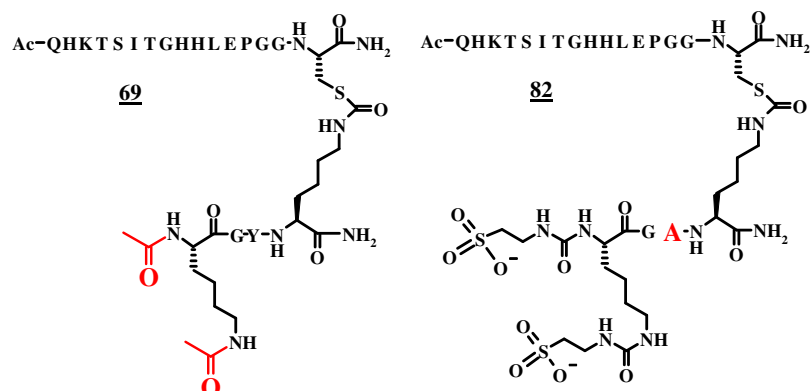


Figure 154 : Structures chimiques des peptides **69** et **82**

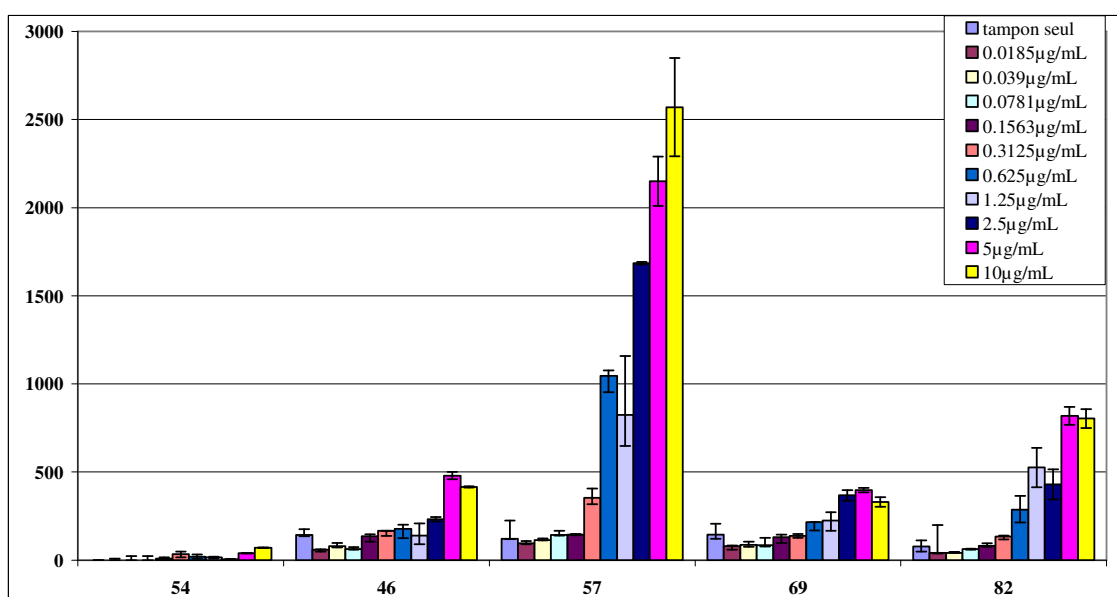


Figure 155 : Quantification par fluorescence de l'interaction entre la protéine chimérique MET-Fc et les composés

En substituant la tyrosine par une alanine (**82**), la liaison avec le domaine extracellulaire de MET semblerait diminuer significativement par rapport à **57**, et cette diminution est encore plus marquée lorsque les sulfonates ne sont plus présents (**69**). Ces résultats biopuces sembleraient montrer que ces deux éléments seraient importants dans la

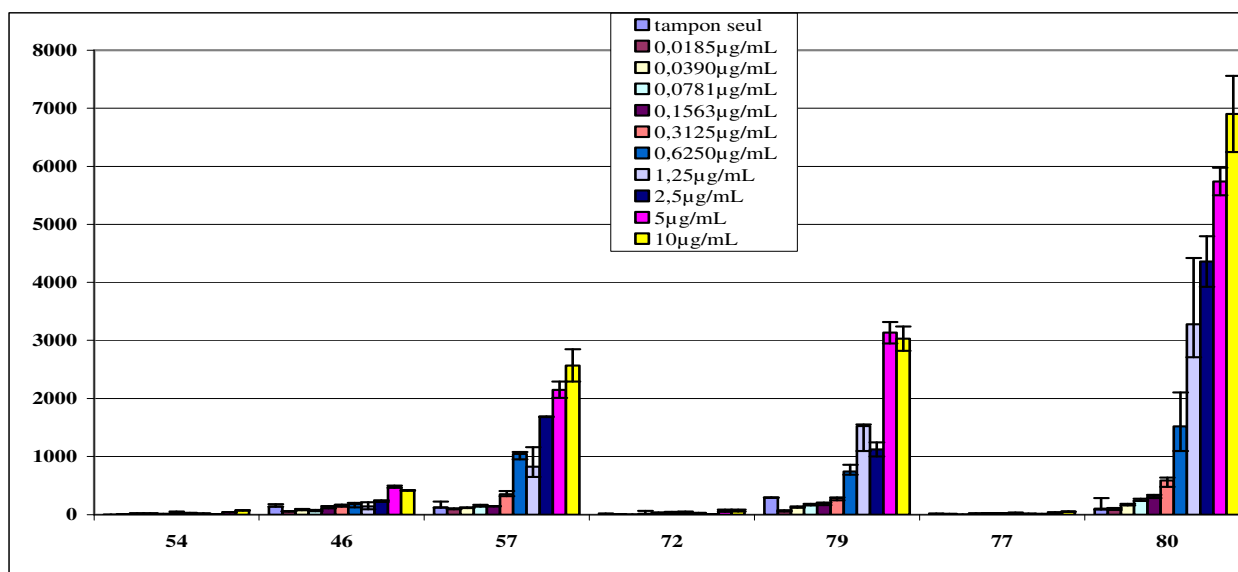


Figure 157 : Quantification par fluorescence de l'interaction entre la protéine chimérique MET-Fc et les composés

Les peptides sulfonates (54, 72, 77) n'interagissent pas avec la protéine chimérique MET-Fc sur biopuces. Par contre, après ligation avec le peptide 46, une augmentation du signal a été observée, laissant penser une fois de plus que le cystéinyl-peptide et le peptide sulfonate interviennent tous deux dans l'interaction avec MET. Les signaux obtenus pour le conjugué 79 sont légèrement supérieurs pour les fortes concentrations de MET-Fc (5 et 10 µg/mL) à ceux observés pour le conjugué 57 : la valence en sulfonates jouerait donc un rôle important dans l'interaction avec MET-Fc. De plus, au delà de 0,625 µg/mL en protéine chimérique MET-Fc, le signal était encore plus fort si le composé possède une plus forte densité de sulfonates et si ceux-ci sont regroupés en « clusters » (80).

L'augmentation de la densité des sulfonates semblerait corrélée avec l'augmentation de l'interaction du conjugué avec le domaine extracellulaire de MET. Ce gain d'affinité est encore plus important si les sulfonates sont regroupés en clusters.

2.3.4°) Evaluation de l'interaction avec d'autres RTKs

La spécificité d'interaction des composés de la chimiothèque pour MET a été également étudiée. Pour ce faire, les produits ont été incubés avec les protéines chimériques correspondant à un Fc et aux domaines extracellulaires des RTKs HER1 et KDR (Kinase insert Domain containing Receptor) encore appelé le VEGFR-2 et MET à une concentration

de 5 µg/mL (Figure 158). Comme MET et HER1, le VEGFR a été choisi car il fait partie de la famille des RTKs et est également impliqué dans le processus de cancérisation. En effet, le VEGF et son récepteur jouent un rôle primordial dans la formation des nouveaux vaisseaux pendant l'embryogenèse mais également lors de la croissance tumorale et la formation de métastases²⁷⁸.

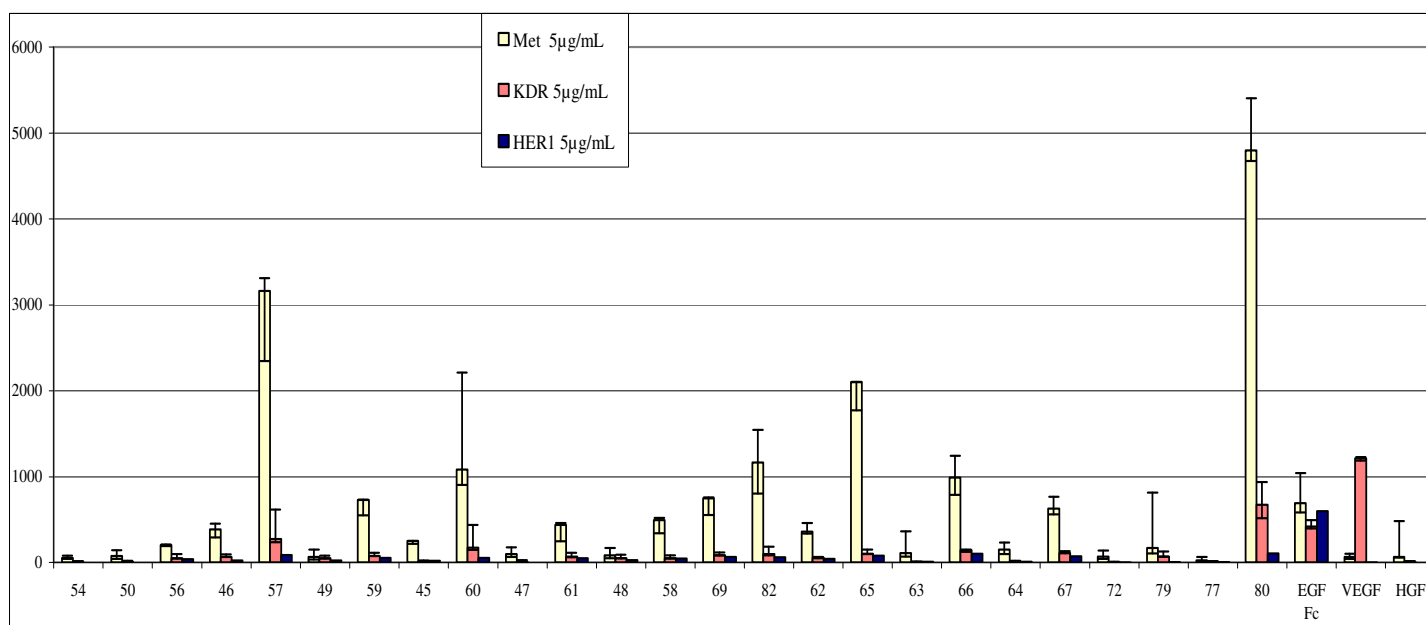


Figure 158 : Quantification par fluorescence de l'interaction des composés avec MET, KDR ou HER1

A 5µg/mL en protéine chimérique, les peptides ne paraissent pas lier les autres RTKs et interagiraient donc spécifiquement avec MET-fc. Une légère nuance est à apporter pour le conjugué 80 qui semble interagir assez faiblement avec KDR.

A l'issue de ces tests, deux conjugués semblent particulièrement intéressants : le 57 et le 80. Tous deux ont en commun la séquence du cystéinyl-peptide 46 mais ils diffèrent au niveau de la structure du peptide sulfonaté (Figure 159).

²⁷⁸ Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The Oncologist*. 2003. 9, 2-10

Séquence du cystéinyl-peptide 46

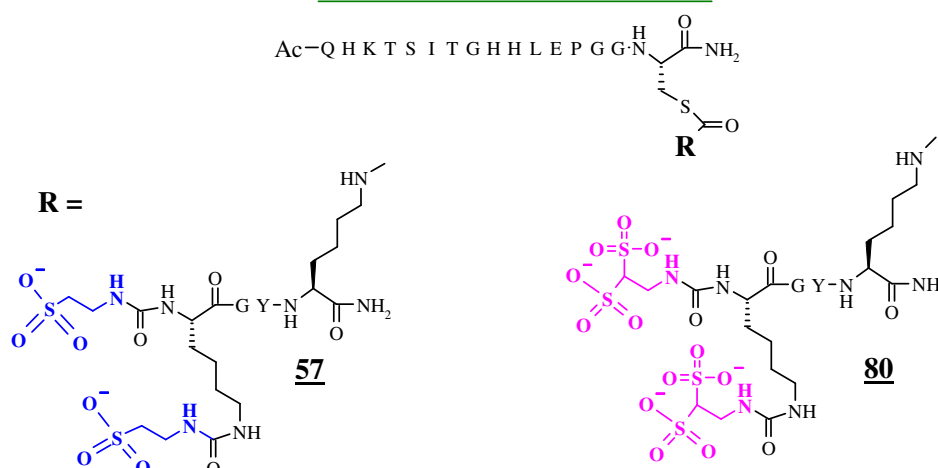


Figure 159 : Rappel des structures chimiques des peptides 57 et 80

Lors du développement d'une molécule à visée thérapeutique, il est important d'obtenir la structure minimale possédant l'activité biologique²⁷⁹. En effet, les interactions entre un composé et sa cible ne font généralement intervenir qu'une zone restreinte de ce composé alors que les autres éléments peuvent être à l'origine d'effets indésirables ou d'une diminution de l'activité. Une fois cette zone déterminée, les modifications les plus judicieuses peuvent être entreprises dans l'espoir d'augmenter l'activité de la molécule.

Dans le cadre de ce travail, nous avons envisagé de réduire la séquence de **46**, commune aux deux conjugués **57** et **80** ayant présenté les meilleurs résultats, afin de définir la séquence minimale interagissant avec le domaine extracellulaire de MET.

3°) Synthèse de la troisième série de conjugués par ligation thiocarbamate

Afin de déterminer la séquence minimale de **46** interagissant avec le domaine extracellulaire de MET, nous avons choisi d'éliminer successivement un résidu de la séquence peptidique **46** de l'extrémité N-terminale et jusqu'au tripeptide « GGC ». Nous verrons, dans un premier temps, la conception et la synthèse de cette nouvelle série de cystéinyl-peptides, puis, leur ligation aux peptides sulfonates **55** et **78**.

²⁷⁹ Hummel G, Reineke U, Reimer U. Translating peptides into small molecules. *Mol. Biosyst.* **2006.** 2, 499-508

3.1°) Conception et synthèse des cystéinyl-peptides

Les conjugués **57** et **80** possèdent en commun la séquence du cystéinyl-peptide **46**. Nous envisagions donc de procéder à la synthèse de 13 cystéinyl-peptides puis de les conjuguer aux peptides di- et tétrasulfonates **55** et **78**. Nous devions ainsi obtenir 39 produits (13 cystéinyl-peptides et 26 conjugués sulfonates) (Figure 160).

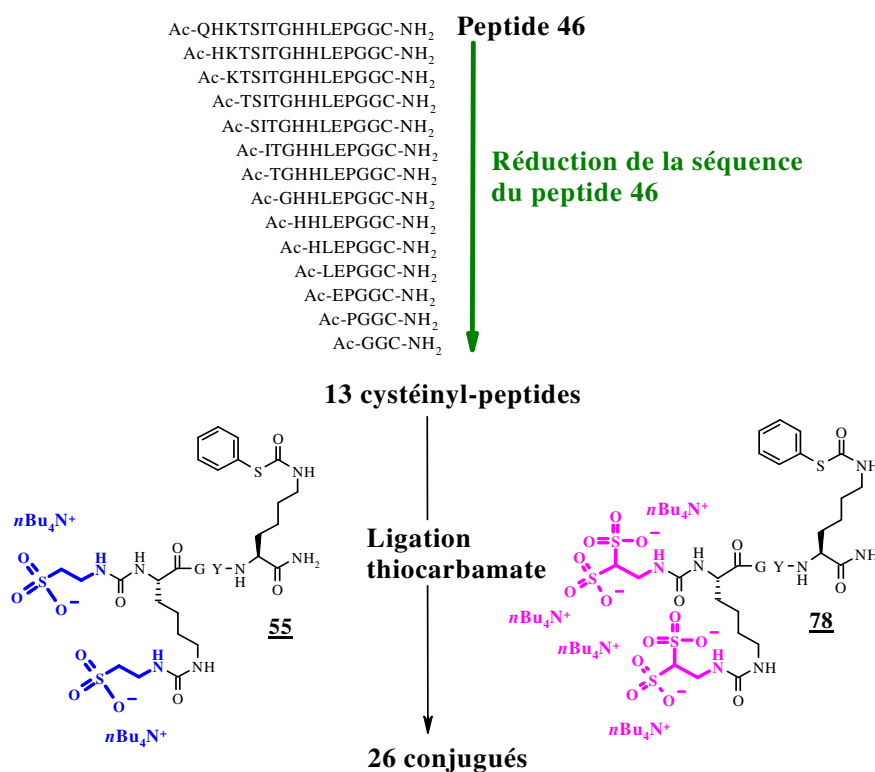


Figure 160 : Synthèses envisagées pour la troisième série de composés

Nous voulions évaluer rapidement leur capacité d'interaction avec la protéine chimérique MET-Fc et nous avons opté une fois de plus pour des tests au format biopuces. Nous avons ajouté aux cystéinyl-peptides une lysine biotinyllée dans la mesure où nous craignons que l'adsorption des peptides sur le support biopuce ne diminue avec leur taille et que ce résidu pourrait nous servir d'indicateur de la quantité de peptide adsorbée. Nous avons donc choisi d'introduire lors de la SPPS la Fmoc-K(Biot)-OH pour deux raisons :

- * il s'agit d'un réactif commercial simple à incorporer dans une séquence peptidique ;
- * nous allons être ainsi en mesure de déterminer la proportion relative de chaque peptide adsorbé sur le support biopuces grâce à l'interaction de la biotine avec la streptavidine

couplée à un fluorophore. En comparant les signaux de fluorescence ainsi obtenus avec ceux résultant de l'interaction des peptides avec la protéine chimérique MET-Fc, nous serons en mesure de « normaliser » les résultats.

Les cystéinyl-peptides ont été préparés sur une résine NovaSyn TGR[®] selon les protocoles standards de la SPPS. Après la synthèse automatisée, la Fmoc-K(Biotine)-OH (1,5 équivalents) a été introduite en activant la fonction acide carboxylique avec un mélange de TBTU (0,95 équivalents) et de DIEA (3 équivalents) dans le NMP. Suite à des difficultés de synthèse, nous n'avons obtenu que les six cystéinyl-peptides (**83** à **88**) dont les séquences sont présentées à la Figure 161.

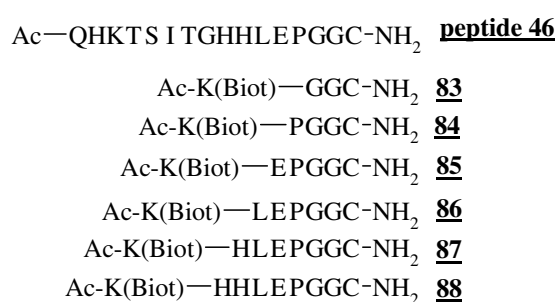


Figure 161 : Peptides dérivés de la séquence du peptide 46 et ajout de la Fmoc-K(Biotine)-OH

Leur identité a été confirmée par MALDI-TOF et leur pureté, déterminée par RP-HPLC s'est avérée supérieure à 80%. Ces peptides ont été préparés à des échelles trop faibles (5-20 μmol) pour pouvoir déterminer un rendement précis. Néanmoins, nous en avons obtenu des quantités suffisantes (quelques milligrammes de chaque peptide) pour effectuer les ligations thiocarbamate avec les peptides sulfonés **55** et **73**.

3.2°) Synthèse des conjugués de la troisième série par ligation thiocarbamate

Les expériences biopuces démontrent clairement que les conjugués **57** et **80** sembleraient être les conjugués les plus intéressants. Ils comportent tous deux le cystéinyl-peptide **46** et respectivement le peptide **54** (disulfonaté) et **78** (tétrasulfonaté). Lors de la synthèse de la troisième série de conjugués sulfonés, en plus de déterminer quel était le nombre de résidus indispensables du peptide **46**, nous voulions étudier quel était le nombre optimal de groupements sulfonés en préparant des conjugués di- et tétrasulfonés. Pour ce

faire, nous avons réalisé des ligations thiocarbamate entre chacun des cystéinyl-peptides **83** à **88** et les peptides sulfonates **55** et **78**. Ces expériences nous ont permis d'obtenir douze conjugués sulfonates.

Le nombre important de peptides à préparer en parallèle nous a incités à tenter de simplifier le mode opératoire de la ligation thiocarbamate. D'après nos précédentes observations, la ligation thiocarbamate est rapide et quasi-totale (cf page 176) lorsque les peptides ont été mis en réaction en quantités équimolaires dans un tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH 7,5) et sous argon. Afin de simplifier protocole, nous n'avons pas placé le milieu réactionnel sous argon, ce qui généralement génère des étapes de préparations assez fastidieuses. Pour rester malgré cela en milieu réducteur, nous avons ajouté de la TCEP-HCl (chlorhydrate de tris(2-carboxyéthyl)phosphine). Cette phosphine hydrosoluble peut être utilisée lors de la NCL pour conserver le thiol du cystéinyl-peptide sous forme réduite²⁸⁰. A titre d'exemple, la ligation entre les peptides **83** et **55** a été réalisée en se plaçant à une concentration de 10 mM en TCEP dans un tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH 7,5) (Figure 162).

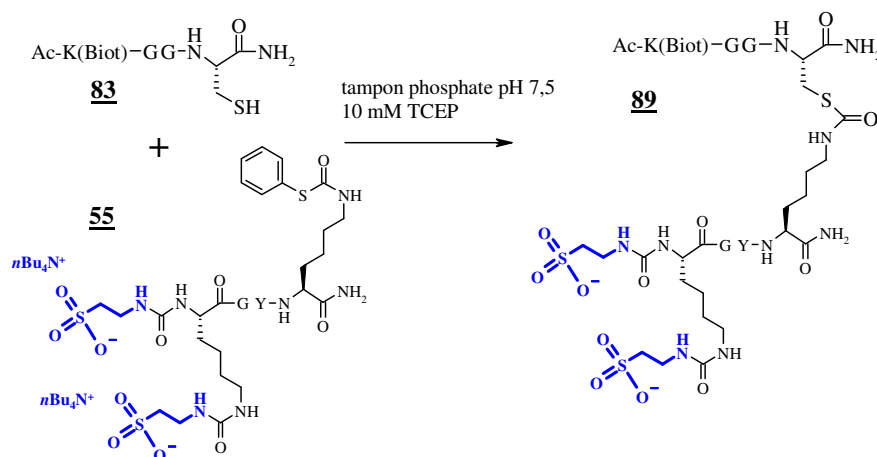


Figure 162 : Ligation thiocarbamate entre les peptides 83 et 55 : synthèse du peptide 89

L'analyse du milieu réactionnel 24 heures après le début de la réaction nous a permis d'obtenir le chromatogramme RP-HPLC présenté à la Figure 163.

²⁸⁰ Tam JP, Lu YA, Liu CF, Shao J. Peptide synthesis using unprotected peptides through orthogonal coupling methods. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**. 92, 12485-12489

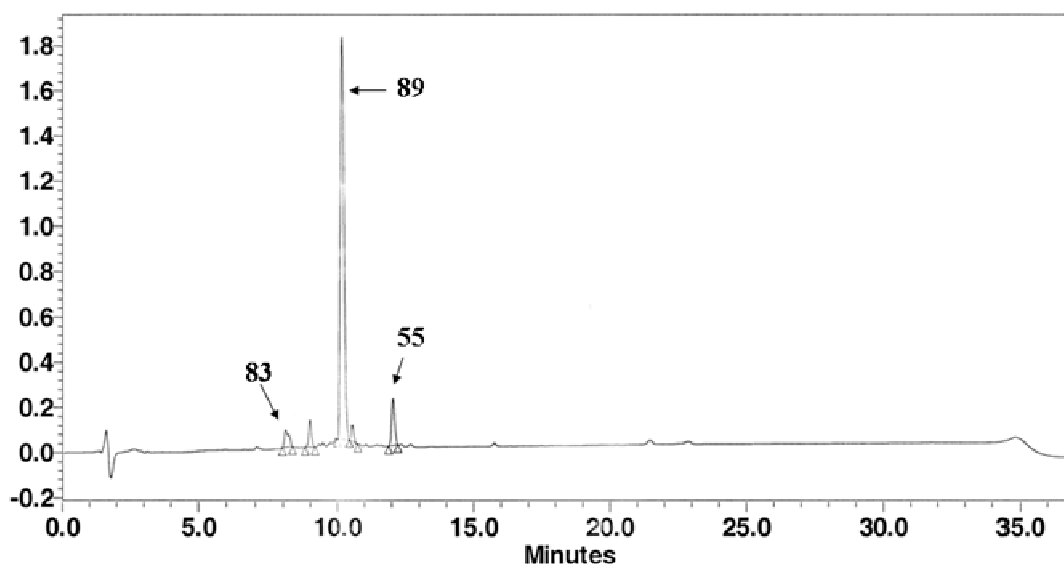


Figure 163 : Chromatogramme RP-HPLC de la ligation thiocarbamate entre les peptides 83 et 55 (t = 24 heures) (0-100% B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil, 215 nm)

Grâce à cette analyse, nous avons pu constater que le conjugué sulfonaté 89 se formait majoritairement (82%) et qu'il ne restait qu'un faible pourcentage de chaque peptide de départ. En effet, sur le chromatogramme RP-HPLC, nous n'observons que 5% de 83 et 8% de 55.

Les chromatogrammes RP-HPLC des milieux réactionnels des autres ligations nous ont permis de conclure que, dans ces conditions, nous formions très majoritairement le conjugué attendu. Face à un tel constat, il ne nous est pas paru absolument nécessaire d'isoler le conjugué par RP-HPLC préparative, ce qui constitue un moyen supplémentaire de simplifier le mode opératoire. Après contrôle final de chaque milieu réactionnel par RP-HPLC et par MALDI-TOF, le conjugué obtenu a donc été dessalé directement sur une colonne Sep-Pak[®] C18. Nous avons ainsi pu rapidement accéder aux produits présentés à la Figure 164.

3.3°) Interaction de la troisième série de peptides avec la protéine chimérique MET-Fc par biopuces

Cette troisième série de peptides devrait nous permettre de déterminer la séquence minimale de **46** interagissant avec le domaine extracellulaire de MET ainsi que le nombre optimal de sulfonates nécessaires pour cette interaction. Les peptides (10^{-4} M dans le PBS) ont été adsorbés sur des lames de verre fonctionnalisées par un groupement semicarbazide. Nous avons également inclus dans cette étude les peptides de référence (**54**, **46**, **77**) ainsi que les conjugués ayant montré une interaction notable avec MET-Fc (**57**, **57***, **80** et **80***). Nous avons ensuite effectué différentes expériences qui seront détaillées dans les prochains paragraphes.

3.3.1°) Evaluation de l'adsorption des peptides sur le support biopuces

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer l'influence de la longueur du peptide sur son adsorption sur les lames de microscope en verre. Pour cela, la streptavidine couplée à la Cyanine 3 a été incubée avec les biopuces. Après lecture au scanner confocal à fluorescence (532 nm), calculs des médianes et des intervalles interquartiles pour chaque composé, les résultats obtenus sont présentés à la Figure 165.

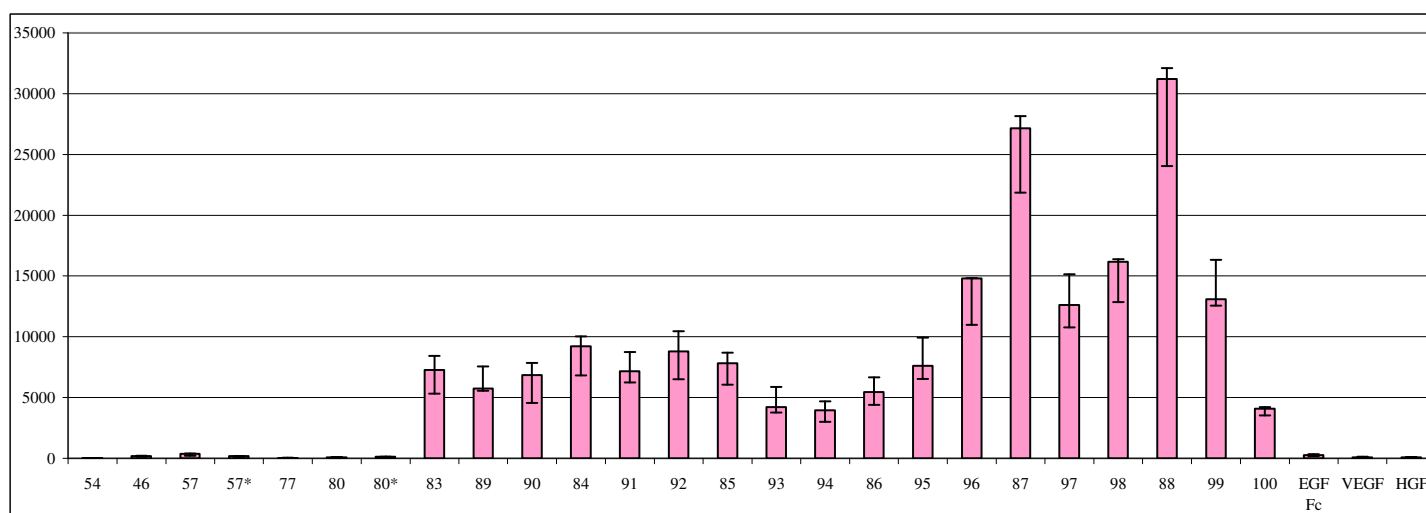


Figure 165 : Quantification par fluorescence de l'adsorption des peptides après incubation avec la Streptavidine-Cy3

Pour faciliter la lecture des résultats, le cystéinyl-peptide a été placé en premier (par exemple, le 83), puis le conjugué disulfonaté (par exemple, le 89) et enfin le tétrasulfonaté (par exemple, le 90).

Les cystéinyl-peptides, dont la séquence est inférieure ou égale à cinq acides aminés (83, 84), semblent s'adsorber de façon significativement peu différente des conjugués sulfonates correspondants (respectivement 89, 90 et 91, 92). Par contre, le cystéinyl-peptide 86 génère un signal plus faible que les conjugués sulfonates associés (95 et 96). Pour les peptides 85, 87 et 88, il semblerait que les signaux soient plus importants que ceux des conjugués sulfonates correspondants (soit 93, 94, 97, 98 et 99, 100, respectivement). Dans ce cas, cet effet pourrait être dû à la dimérisation partielle des cystéinyl-peptides par oxydation à l'air. Néanmoins, l'adsorption très faible du conjugué 100 nous a paru surprenante : il pourrait s'agir d'une erreur lors de la pesée du composé ou lors des dilutions, plutôt qu'un défaut d'adsorption du peptide.

D'une manière générale, il semblerait que plus le peptide comporte d'acides aminés, plus il s'adsorbe sur le support biopuces. Ces constatations nous permettent de justifier de l'ajout de la lysine biotinyllée pour effectuer une normalisation de l'interaction du peptide avec MET-Fc en fonction de sa capacité d'adsorption.

3.3.2°) Evaluation de l'interaction des peptides avec la protéine chimérique MET-Fc

La protéine chimérique MET-Fc a ensuite été incubée à une concentration de 5 µg/mL, puis un anticorps anti-anticorps humain marqué à la tétraméthylrhodamine. Après lecture au scanner confocal à fluorescence à 532 nm, calculs des médianes et des intervalles interquartiles pour chaque composé, les résultats obtenus sont présentés (Figure 166).

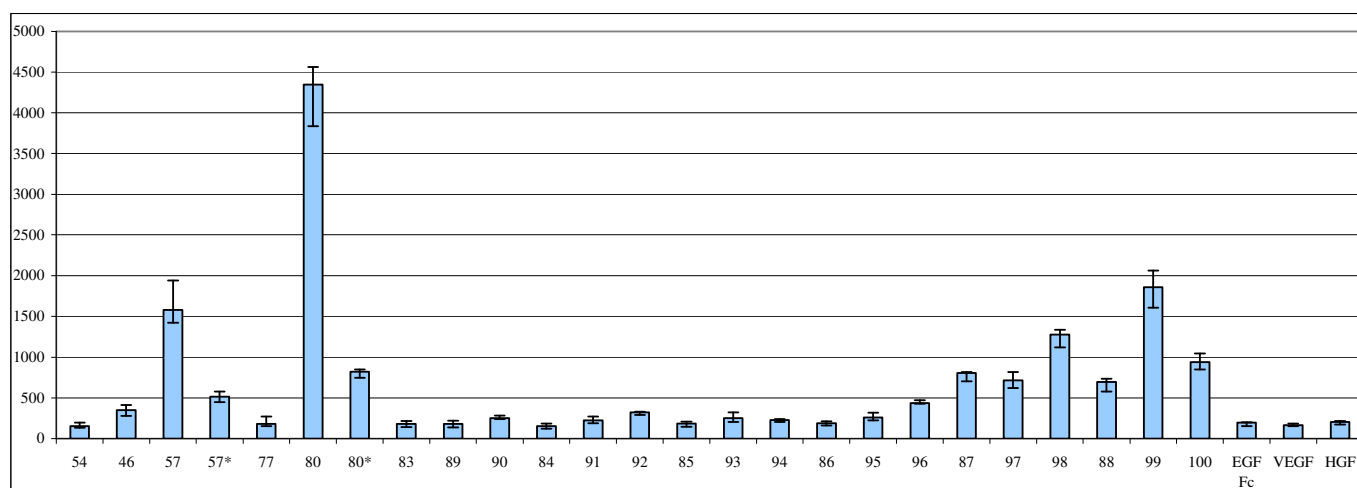


Figure 166 : Quantification par fluorescence de l'interaction entre les composés et la protéine chimérique MET-Fc (5 µg/mL)

Pour faciliter la lecture des résultats, le cystéinyl-peptide a été placé en premier (par exemple, le **83**), puis le conjugué disulfonaté (par exemple, le **89**) et enfin le tétrasulfonaté (par exemple, le **90**).

Les conjugués imprimés directement sur la puce sans purification préalable (**57*** et **80***) semblent présenter une interaction beaucoup plus faible que leurs analogues purifiés par RP-HPLC (**57** et **80**). La quantité résiduelle des peptides de départ a peut être un rôle dans cette différence.

Les cystéinyl-peptides **83** à **86** semblent présenter une interaction très minime avec la protéine chimérique. Néanmoins, à partir du peptide **87** (comportant huit résidus), l'interaction semble devenir significative. Concernant les conjugués, l'interaction reste faible tant que le nombre de résidus du cystéinyl-peptide le composant est inférieur à huit résidus (**89** à **96**). Au-delà de huit résidus, (**97** à **100**), le signal de fluorescence augmente. Ce constat est d'autant plus vrai pour le conjugué **99** (disulfonaté) pour lequel l'interaction avec MET-Fc devient significativement proche de celle observée pour le conjugué **57**. Le conjugué tétrasulfonaté **100** semble beaucoup moins affiné que le conjugué **99**, ce qui constitue un résultat contradictoire avec celui observé lors de la comparaison entre les conjugués **57** (disulfonaté) et **80** (tétrasulfonaté). Néanmoins, lors de l'incubation des biopuces avec la streptavidine, nous avons pu observer que le conjugué **100** (tétrasulfonaté) s'est moins adsorbé que le **99** (disulfonaté) sur le support biopuces. L'adsorption moindre du conjugué **100** dans cette expérience pourrait donc expliquer le signal faible obtenu pour ce conjugué en interaction avec la protéine chimérique MET-Fc.

D'après ces observations, le signal obtenu pour **99** (« HHLEPGGC ») étant assez peu différent de celui de **57** (« QHKTSITGHHLEPGGC »), il semblerait que nous puissions réduire de moitié la séquence du peptide **46** pour obtenir un conjugué de séquence réduite aussi intéressant que **57**. Cependant, en absence de normalisation, les résultats obtenus sont à prendre avec précaution.

3.3.3°) Normalisation de l'interaction par rapport à l'adsorption

Lors de la conception de cette troisième série de peptides, nous avons décidé d'inclure dans leur séquence une lysine biotinyllée qui permettait de comparer les signaux de fluorescence obtenus après incubation avec la streptavidine avec ceux obtenus après incubation avec MET-Fc. Le rapport entre le signal obtenu après incubation avec la streptavidine et avec MET-Fc a donc été effectué et les résultats sont présentés à la Figure 167.

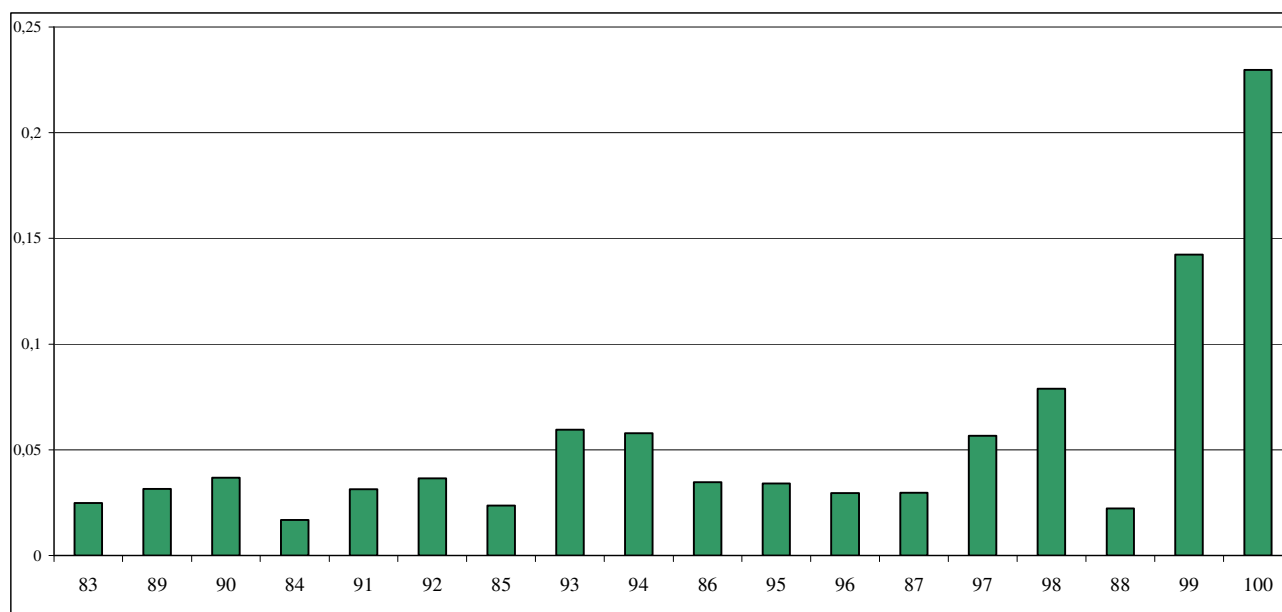


Figure 167 : Quantification de la fluorescence : normalisation des signaux de fluorescence

Pour faciliter la lecture des résultats, le cystéinyl-peptide a été placé en premier (par exemple, le **83**), puis le conjugué disulfonaté (par exemple, le **89**) et enfin le tétrasulfonaté (par exemple, le **90**).

De manière générale, quand le peptide sulfonaté a été lié au cystéinyl-peptide, le signal augmente de manière plus ou moins importante. Ce constat ne semble pas se vérifier

pour la série 86, 95, 96 (« LEPGGC ») pour laquelle la fluorescence restait sensiblement la même. Pour les conjugués 93 et 94 (« EPGGC ») ainsi que 95 et 96 (« LEPGGC »), la liaison à la protéine chimérique MET-Fc semblait être identique que le cystéinyl-peptide soit ligué au peptide di- ou tétrasulfonaté. Par contre, pour les peptides 87, 97, 98 et 88, 99, 100, l'ajout de sulfonates permet d'augmenter fortement le signal obtenu. L'augmentation du signal semble particulièrement marquée à la suite de la conjugaison avec le dendrimère tétrasulfonaté (98 > 97, et 100 > 99).

Ces tests au format biopuces nous ont apporté différentes informations :

- l'adsorption d'un peptide semblerait être dépendante du nombre de résidus ;
- en comparant les signaux obtenus entre 57 et 99, la séquence minimale affine pour la protéine chimérique MET-Fc serait « HHLEPGGC », ce qui permettrait de réduire la séquence du cystéinyl-peptide 46 de moitié ;
- la conjugaison avec les dendrimères sulfonates augmenterait la capacité d'interaction avec la protéine chimérique MET-Fc. Cet effet resterait dépendant du nombre et de la distribution des groupements sulfonates ;
- en comparant les résultats entre 57 et 57* et entre 80 et 80*, nous avons constaté une baisse d'interaction avec la protéine chimère MET-Fc lorsque la ligation est effectuée en présence de la TCEP. Il serait donc possible que la capacité de liaison de certains conjugués, notamment 99 et 100, ait été sous-estimée dans cette partie du travail. Cette hypothèse aurait pu être vérifiée en effectuant la synthèse des conjugués 99 et 100 selon le même protocole que 57 et 80, à savoir en réalisant la ligation sous argon et en purifiant les conjugués par RP-HPLC préparative. Après ces étapes, il aurait pu être envisagé de refaire les tests au format biopuces et ainsi de comparer l'interaction des conjugués avec la protéine chimérique MET-Fc en fonction du mode de synthèse des conjugués.

A ce stade du projet, nous avons conçu et synthétisé une chimiothèque constituée d'une cinquantaine de composés environ (cystéinyl-peptides, peptides sulfonates et conjugués sulfonates). La majeure partie a été étudiée pour son interaction avec le domaine extracellulaire de MET (par biopuces), alors que la cytotoxicité de seulement quelques composés a été évaluée (par un test MTT).

L'objectif majeur était ensuite d'évaluer leur activité biologique, notamment par des tests de phosphorylation de MET et de dispersion des cellules MDCK. Lors de ces tests, les composés doivent être mis en présence d'un tampon de culture cellulaire, le DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle Medium). Ce milieu adapté à un grand nombre de types cellulaires a été élaboré par Dulbecco et coll dans les années 60²⁸¹. Avant de mettre au point ces tests, nous avons voulu connaître le devenir des peptides et des conjugués thiocarbamate dans le DMEM. La ligation thiocarbamate étant développée depuis peu de temps, nous ne disposons que de quelques éléments concernant la stabilité du lien thiocarbamate et nous avons mené diverses expériences afin d'élargir nos connaissances.

3.5°) Etude de la stabilité du lien thiocarbamate

L'étude de la stabilité des conjugués thiocarbamate a été effectuée en les plaçant dans différentes conditions et en observant leur devenir grâce à un suivi de la composition du milieu par RP-HPLC associé à des analyses par MALDI-TOF.

Le lien thiocarbamate nous a semblé stable quand le conjugué thiocarbamate a été placé dans des tampons dont le pH est proche de la neutralité comme le phosphate de sodium (0,2 M, pH = 7,5) utilisé pour effectuer les ligations, et dans le PBS, utilisé pour diluer les peptides lors des tests biopuces. Il ne se dégrade pas quand il est mis en présence de tampons basiques aqueux de type acide borique (0,05 M, pH = 8,5), bicarbonate de sodium (0,1 M, pH = 8 et 0,2 M, pH = 8,5).

Nous avons réalisé le suivi du devenir des conjugués thiocarbamate lorsqu'ils sont placés dans le DMEM. Il s'agit d'un milieu de culture cellulaire contenant des éléments essentiels pour la survie et la prolifération des cellules. Il est composé : de sels inorganiques (NaHCO₃, NaCl, Fe(NO₃), KCl), d'acides aminés, de vitamines, d'autres composants tels que le rouge de phénol (indicateur de pH), le glucose, le pyruvate de sodium (apport d'énergie)...

Le chromatogramme RP-HPLC du DMEM est présenté à la Figure 168.

²⁸¹ Dulbecco R, Freeman G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology*. **1959**. 8:396-397

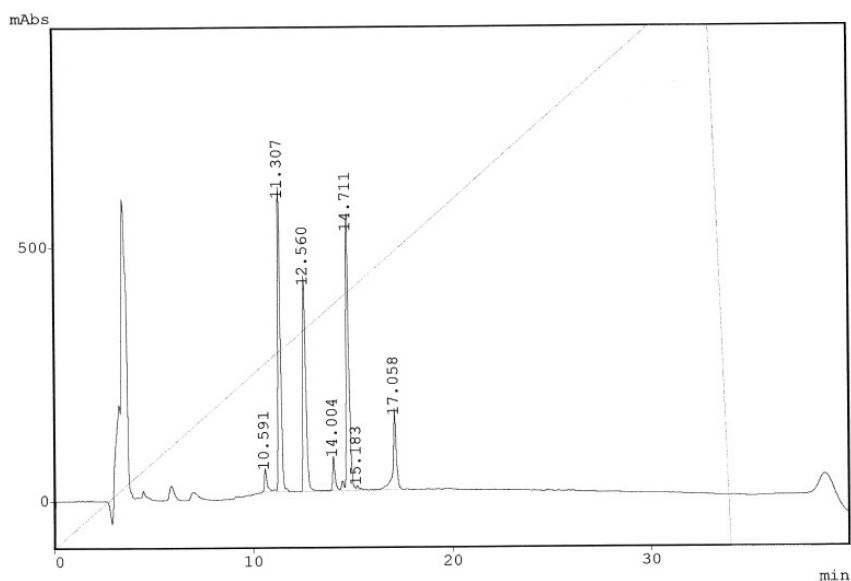


Figure 168 : Chromatogramme RP-HPLC du DMEM
(0-100% B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil, 215 nm)

Comme nous avons pu le constater, certains des composants (acides aminés, vitamines) absorbent en UV et apparaissent donc sur le chromatogramme RP-HPLC avec des temps de rétention (t_R) compris entre 10,591 et 17,058 minutes. Nous avons choisi de réaliser l'étude de stabilité grâce à des conjugués dont le t_R en RP-HPLC différait fortement des composants du DMEM, c'est-à-dire supérieur à 17 minutes. De plus, nous avons souhaité réaliser cette étude sur deux conjugués présentant le lien thiocarbamate en C- et en N-terminal. Les conjugués **61** et **58**, remplissant ces deux conditions, ont été choisis (Figure 169).

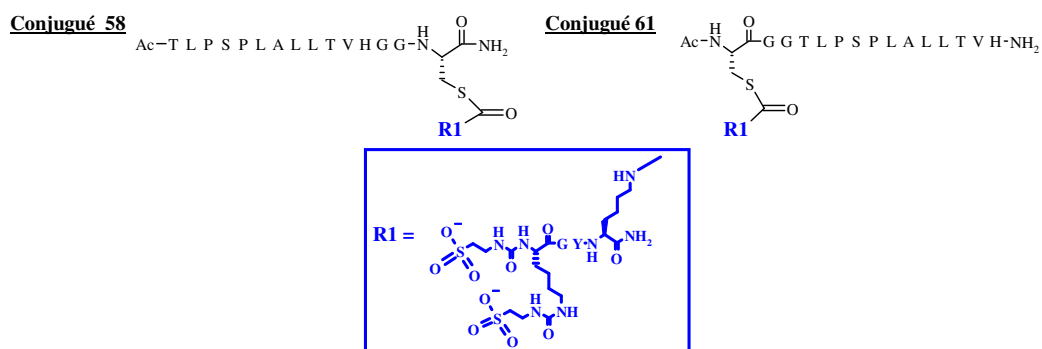
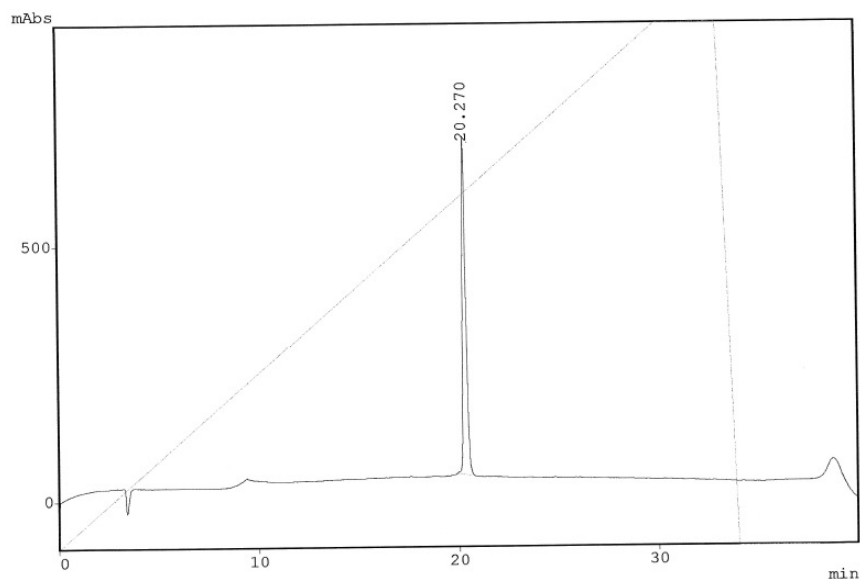


Figure 169 : Rappel des structures chimiques des conjugués thiocarbamate 58 et 61

Le conjugué thiocarbamate **61** (1 mg/mL dans l'eau) a été contrôlé par RP-HPLC (Figure 170), et le même contrôle a été effectué pour le conjugué **58** (chromatogramme RP-HPLC non représenté).



**Figure 170 : Chromatogramme RP-HPLC du conjugué thiocarbamate 61
(1 mg/mL dans H₂O)
(0-100% B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil, 215 nm)**

Le conjugué thiocarbamate **61** (100 µM) a ensuite été solubilisé dans le DMEM. Les chromatogrammes obtenus par RP-HPLC (t = 0 et 4 heures) sont présentés à la Figure 171.

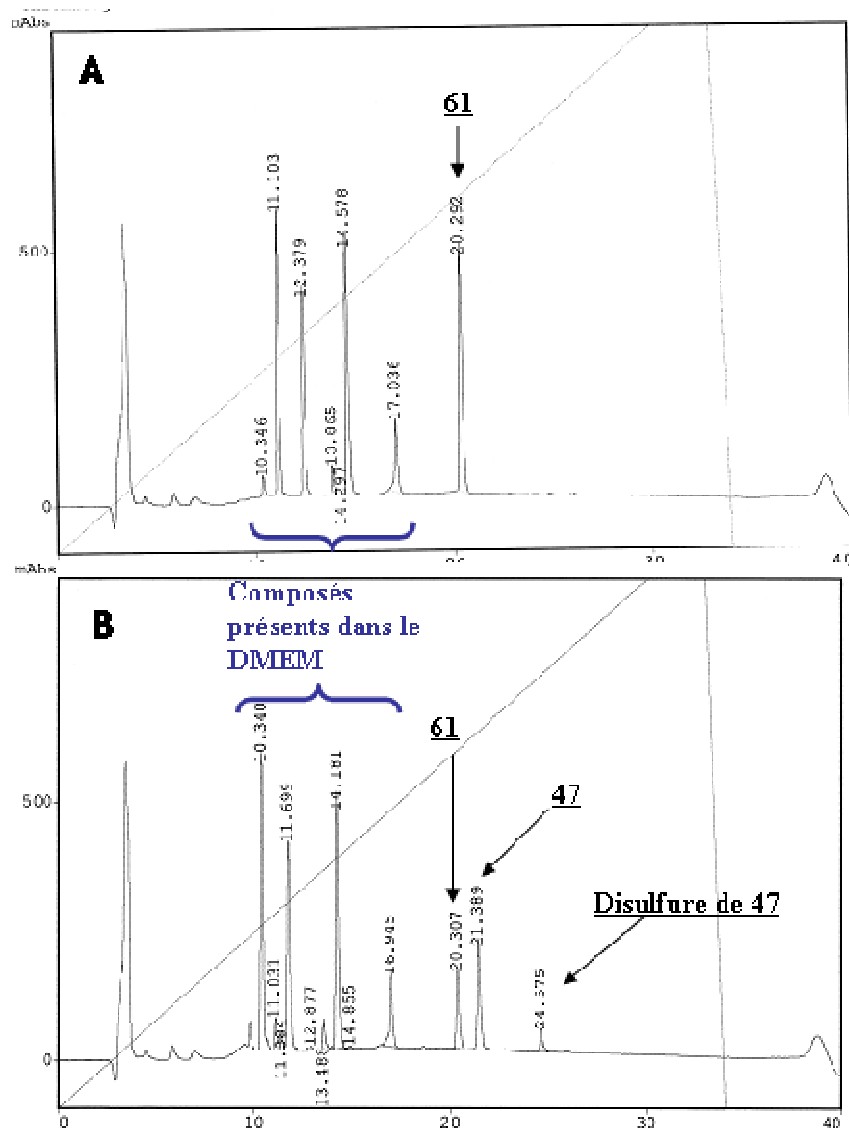


Figure 171 : Chromatogrammes RP-HPLC de 61
(100 μ M dans le DMEM)
A°) $t = 0$; B°) $t = 4h$
(0-100% B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil, 215 nm)

Ces chromatogrammes montrent la dégradation du conjugué 61 lorsqu'il est en contact avec le DMEM. Une RP-HPLC micro-préparative, suivie d'une analyse par MALDI-TOF, a été menée sur les deux composés qui se forment ($t_R = 21,389$ et $24,575$ minutes). Nous avons alors observé qu'il se libérait un produit dont la masse monoisotopique correspondait à celle du cystéinyl-peptide 47, qui au fil du temps se dimérise par formation d'un pont disulfure. La masse correspondant à 54 a été également détectée lors de l'analyse du milieu réactionnel par

MALDI-TOF, alors qu'il n'apparaît pas sur le chromatogramme RP-HPLC. Ce produit co-élue probablement avec l'un des composants du DMEM (Figure 172).

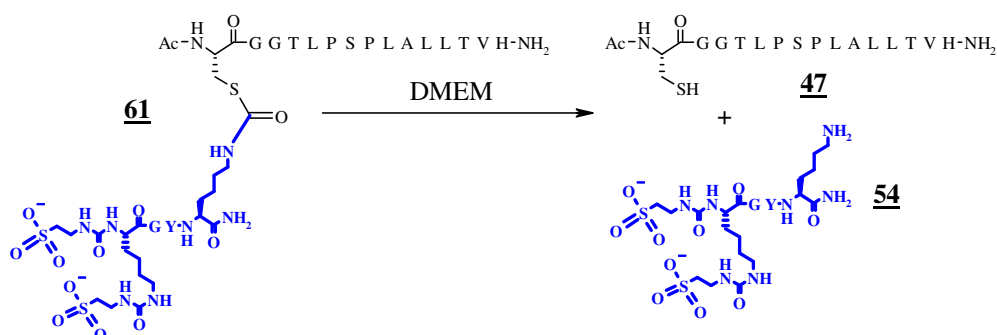


Figure 172 : Peptides obtenus lors de la solubilisation de 61 (100 μ M) dans le DMEM

Le profil RP-HPLC et les analyses MALDI-TOF de **58** placé dans le DMEM ont abouti aux mêmes observations. La Figure 173 montre le pourcentage de **61** ou de **58** restant dans le milieu au cours du temps, pour une durée maximale d'incubation de 24h.

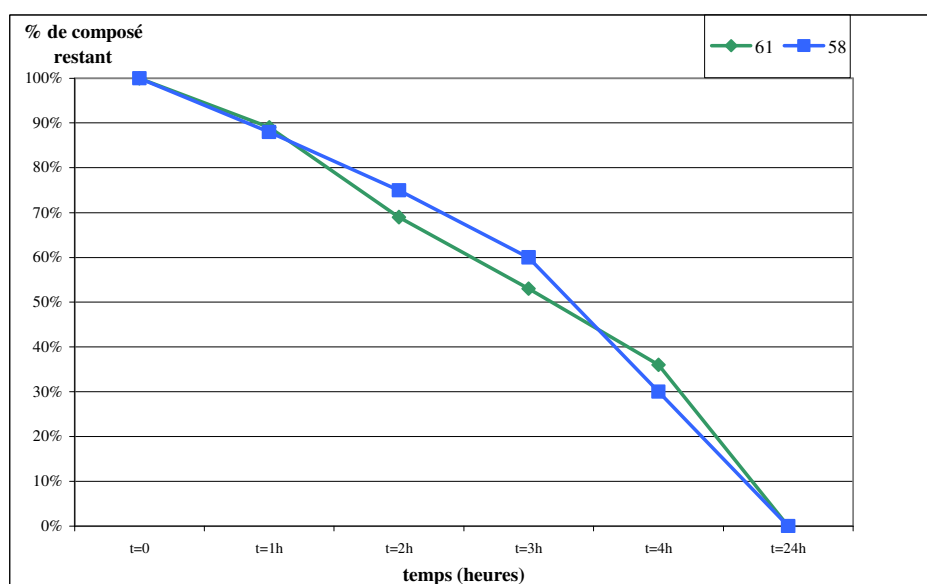


Figure 173 : Pourcentage de 61 et de 58 (100 μ M dans le DMEM) restant en fonction du temps

La dégradation est de l'ordre de 50% après trois heures de contact avec le DMEM. Ce temps correspond aux temps d'incubation des composés dans le DMEM lors des essais

biologiques. Il serait probable que l'instabilité partielle des conjugués thiocarbamate dans le DMEM fausse l'évaluation de leur activité biologique.

Nous avons cherché à expliquer ce phénomène. Une étude menée par Schuller et coll montre que les S-phénylthiocarbamates s'hydrolysent en solution aqueuse basique et que cette décomposition génère la formation d'un dérivé soufré, en l'occurrence, le thiophénol, et un dérivé isocyanate²⁸². Dans le cas des conjugués thiocarbamate, nous avons émis l'hypothèse que la dégradation pourrait être due en partie à la présence de fer dans le DMEM. Ce métal thiophile favoriserait l'activation du soufre et l'attaque nucléophile de l'eau sur le carbonyle du thiocarbamate. Cette hypothèse a été testée en plaçant le conjugué **61** (100 μ M) dans un tampon bicarbonate de sodium (0,1 M, pH 8,5) contenant du sulfate de Fer (II) (0,1 mg/L). L'évolution de la composition du milieu a été suivie par RP-HPLC (Figure 174).

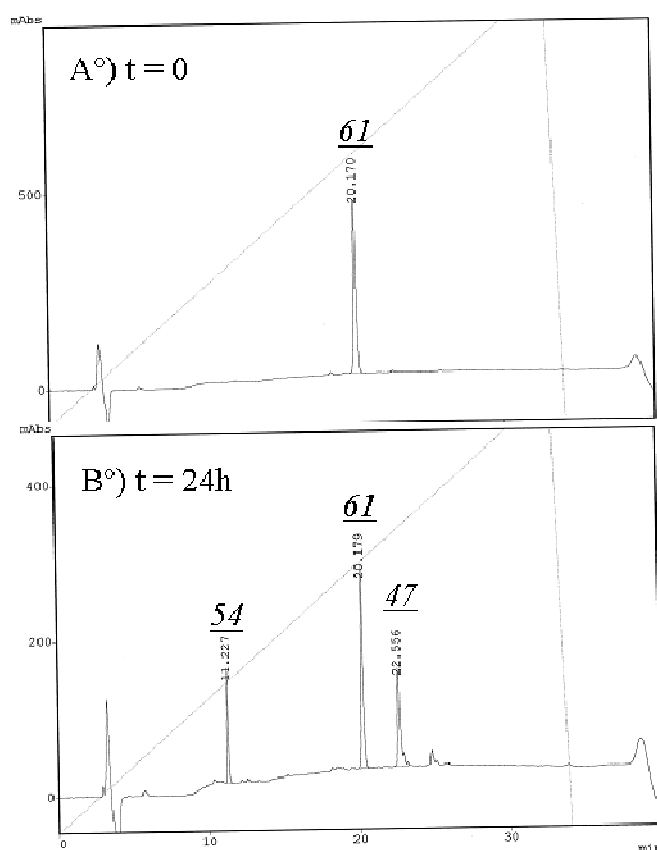


Figure 174 : Chromatogrammes RP-HPLC de 61 (100 μ M) dans un tampon bicarbonate de sodium (0,1 M, pH 8,5) contenant du sulfate de Fer (II) (0,1 mg/L) : t = 0 (A), t = 24h (B) (0-100% B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil, 215 nm)

²⁸² Schuller WH, Niemann C. The synthesis of substituted ureas. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**. 75, 3425-3428

Après 24 heures, nous avons constaté, suite à l'analyse par RP-HPLC et MALDI-TOF, que **61** s'hydrolysait et libérait le peptide sulfonaté **54** (19%) et le cystéinyl-peptide **47** (28%). La dégradation a semblé moins rapide que celle observée dans le DMEM car il reste 53% de **61** après 24 heures. Cette expérience semble suggérer néanmoins que le fer pouvait être en partie responsable de la dégradation des conjugués thiocarbamate.

Faute de temps pour effectuer une analyse similaire avec tous les constituants du DMEM, nous n'avons pas cherché à identifier l'ensemble des responsables de la rupture de la liaison thiocarbamate mais nous avons plutôt envisagé de changer de stratégie de synthèse des conjugués sulfonates. Pour ne pas remanier de façon radicale leur structure, notre choix s'est porté sur la ligation thioéther, car les conjugués ne posséderont qu'un méthylène supplémentaire par rapport à un lien thiocarbamate (Figure 175).

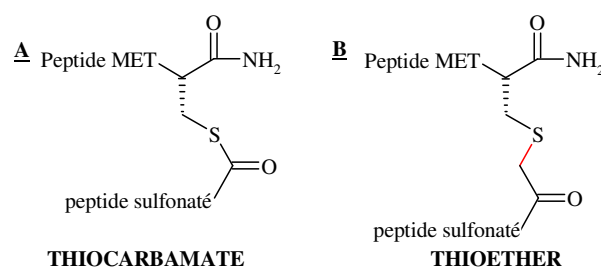


Figure 175 : Structures chimiques des liens thiocarbamate (A) et thioéther (B)

4°) Synthèse de la quatrième série de conjugués par ligation thioéther

Nous avons préparé en priorité les analogues « thioéther » des conjugués les plus intéressants de la chimiothèque : **57** (disulfonaté) et **80** (tétrasulfonaté), puis nous avons évalué leur stabilité dans le DMEM. Comme nous l'avons vu dans la partie 1 de ce manuscrit, la ligation thioéther fait intervenir la fonction thiol d'un cystéinyl-peptide et le groupement bromoacétyle ou chloroacétyle porté par l'amine α ou par la chaîne latérale d'un second fragment peptidique (Figure 176).

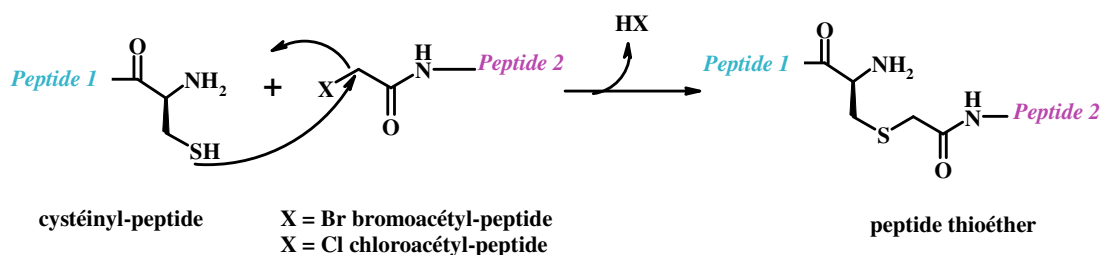


Figure 176 : Rappel du mécanisme de la ligation thioéther

Pour appliquer cette ligation, ce travail a impliqué le choix des cystéinyl-peptides puis la mise au point de la synthèse des peptides sulfonés.

4.1°) Choix des cystéinyl-peptides

Nous avons choisi les cystéinyl-peptides (**45**, **46**) utilisés pour la synthèse par ligation thiocarbamate des conjugués de la première série et ayant abouti aux meilleurs conjugués (**57**, **80**) et dans une moindre mesure le **60**). Pour rappel, ils sont issus des travaux de Zhao et coll et ont été modifiés par une extension « GGC » positionnée aux extrémités C- ou N-terminales de la séquence peptidique (Figure 177).

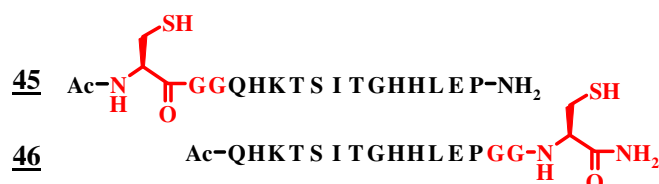


Figure 177 : Séquences des cystéinyl-peptides sélectionnés

(les résidus en rouge ont été rajoutés aux séquences déterminées par Zhao et coll)

4.2°) Stratégies de synthèse des peptides sulfonés

Concernant le second fragment peptidique, nous avons repris la structure du dendrimère de lysines présenté page 170 et nous avons introduit un groupement haloacétyle sur l'amine ε de la lysine K2 (Figure 178).

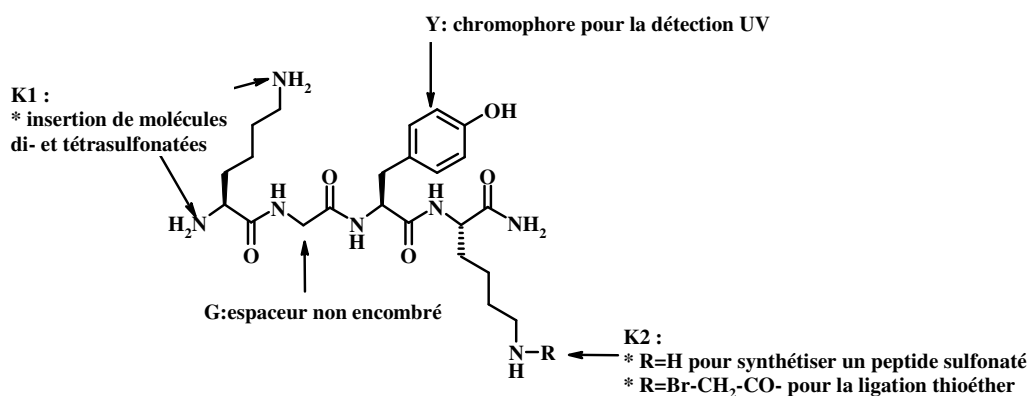


Figure 178 : Rappel de la structure du dendrimère de lysines

Les halogènes les plus fréquemment utilisés lors de la ligation thioéther sont le chlore et le brome. Ce dernier a retenu notre attention car, à pH égal, la ligation est plus rapide avec le bromoacétyle qu'avec le chloroacétyle²⁸³. En effet, lors de substitutions nucléophiles impliquant les halogènes comme nucléofuges, plus leur taille est importante, plus la liaison « carbone-halogène » est polarisable, plus sa rupture est facile et plus la réaction est rapide. Si l'on suit ce raisonnement, le brome permet de réaliser la ligation plus rapidement que le chlore et nous avons donc opté pour le bromoacétyle.

Pour rappel, la synthèse du dendrimère de lysines (peptidyl-résine **52**) a été effectuée par SPPS selon la stratégie Fmoc/t-butyle sur une résine NovaSyn TGR[®] (cf page 172). Les groupements sulfonates ont été introduits, dans un premier temps, par le biais des intermédiaires di- et tétrasulfonates **74** et **75**, ce qui a permis d'obtenir respectivement les peptidyl-résines **53** et **76** (Figure 179).

²⁸³ Englebretsen DR, Garnham B, Alewood PF. A cassette ligation strategy with thioether replacement of three Gly-Gly peptide bonds: total chemical synthesis of the 101 residue protein early pregnancy factor [$\Psi(\text{CH}_2\text{S})$]^{28-29, 56-57, 76-77}. *J. Org. Chem.* **2002**. 67, 5883-5890

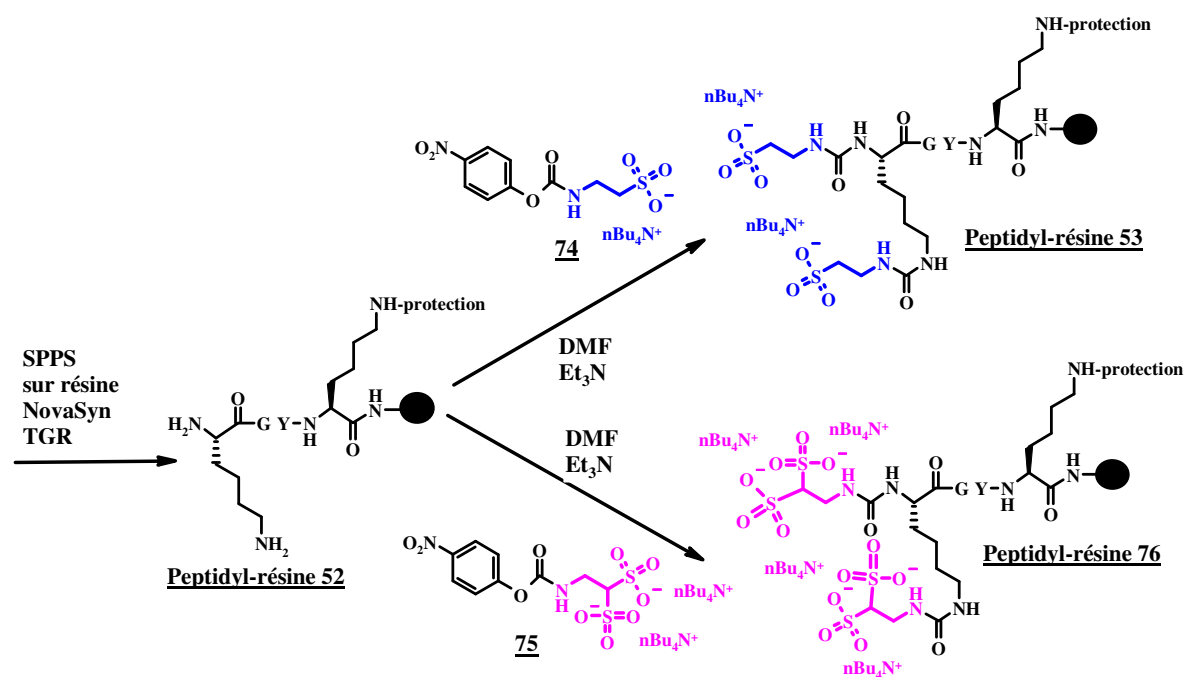


Figure 179 : Rappel de la synthèse des peptidyl-résines 53 et 76

Pour incorporer le groupement bromoacétyle, deux cas de figure ont été envisagés :

- * l'amine ϵ de K2 a été protégée par un groupement Mtt et, après sa déprotection sélective, la fonctionnalisation a lieu sur le support solide ;
- * elle peut être protégée par un Boc et, après déprotection des chaînes latérales et séparation du peptide de son support solide, elle a été fonctionnalisée en solution.

4.2.1°) Fonctionnalisation de l'amine ϵ de K2 sur support solide

Dans le cadre de ce travail, nous avons mis au point une méthode permettant d'introduire efficacement le bromoacétyle sur l'amine ϵ de K2. Classiquement, l'incorporation du bromoacétyle sur l'amine α ou ϵ d'une lysine d'un peptide se fait grâce à la formation d'un anhydride symétrique entre l'acide bromoacétique et un agent de couplage de type diisopropyl- ou dicyclohexylcarbodiimide^{284,285}. Néanmoins, lors de leur application aux peptides sulfonates, ces conditions réactionnelles ne nous ont pas permis d'aboutir au produit voulu. Après avoir testé différents agents de couplage, c'est le PyBrop (Bromo-tris-pyrrolidino phosphoniumhexafluorophosphate), qui a été finalement retenu car il est

²⁸⁴ Futaki S, Ishikawa T, Niwa M, Kitagawa K, Yagami T. Embodying a stable α -helical protein structure through efficient chemical ligation via thioether formation. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**. 5, 1883-1891

²⁸⁵ Azam F, Bladon CM. Synthetic approaches to macromolecular models for ion channel proteins. *Tet. Lett.* **1998**. 39, 6377-6380

fréquemment utilisé dans le cas de couplages difficiles²⁸⁶. L'activation de l'acide bromoacétique (10 équivalents) par le PyBrop (10 équivalents) génère l'acide bromoacétique activé qui réagira à son tour avec l'amine ϵ de K2. La réaction se déroule dans le DMF, solvant utilisé lors des couplages peptidiques, et en présence de DIEA (30 équivalents) (Figure 180).

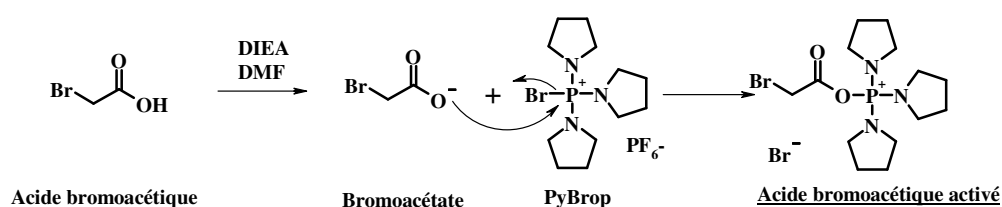


Figure 180 : Mécanisme d'activation de l'acide bromoacétique par le PyBrop

L'acide bromoacétique activé a été formé *in-situ* en ajoutant ces réactifs sur la peptidyl-résine **53** et **76**. Le schéma réactionnel de la déprotection sélective du Mtt de l'amine ϵ de K2 puis de sa fonctionnalisation par le bromoacétyle sur le support solide est présenté à la Figure 181 : nous avons ainsi obtenu les peptidyl-résines **101** et **102**.

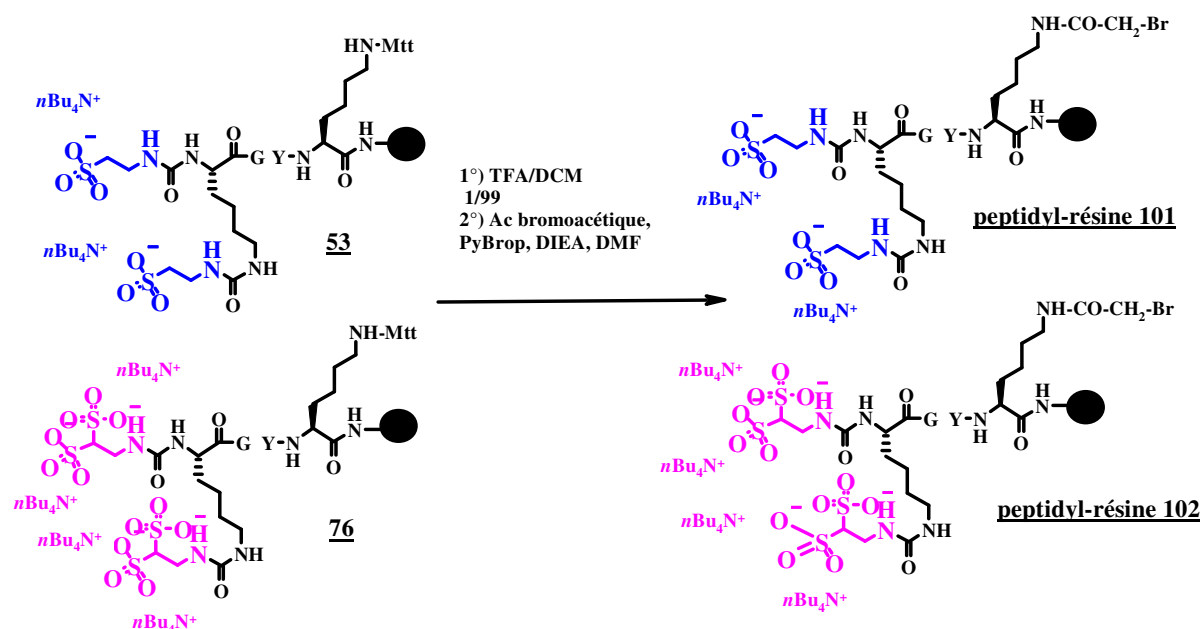


Figure 181 : Synthèse des peptidyl-résines 101 et 102

²⁸⁶ Frérot E, Coste J, Pantaloni A, Dufour MN, Jouin P. PyBOP[®] and PyBroP : two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, *Aib. Tet.* **1991**. 47, 259-270

Après traitement de chacune des peptidyl-résines **101** et **102** par une solution concentrée de TFA, nous avons obtenu les peptides di- et tétrasulfonaté, respectivement **103** et **104** (Figure 182).

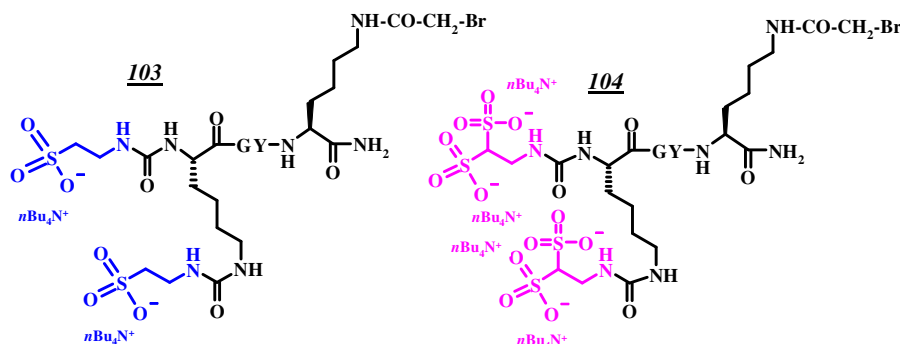


Figure 182 : Structure chimique des peptides 103 et 104

Les rendements de ces synthèses sont de 88% pour le peptide **103** non isolé par RP-HPLC et de 9% pour le peptide **104**, isolé par RP-HPLC. Une telle différence peut s'expliquer en partie par le fait que la pureté du peptide **103** après le traitement TFA (90%) ne justifiait pas de le purifier par RP-HPLC préparative, ce qui n'était pas le cas du peptide **104**, pour lequel la purification par RP-HPLC préparative s'est avérée assez difficile car elle a abouti à un peptide dont le rendement et la pureté (88%) se sont avérés assez faibles. Leur identité a été confirmée par MALDI-TOF.

4.2.2°) Fonctionnalisation de l'amine ε de K2 en solution

Le but de ces nouvelles synthèses a été de documenter l'influence de la substitution du lien thiocarbamate en thioéther sur la stabilité des composés dans le DMEM, mais également sur leur interaction avec le domaine extracellulaire de MET. Notre but a donc été de les obtenir le plus rapidement possible afin de valider la nouvelle stratégie de ligation. Lors de la synthèse des peptides **68** (substitution des sulfonates en acétyle) et **81** (substitution de la tyrosine en alanine), seule la moitié de la résine a été fonctionnalisée par le phénylthiocarbamate, l'autre partie a permis, après traitement de la peptidyl-résine par une solution concentrée de TFA, d'obtenir les dendrimères de lysines non fonctionnalisés. Ces derniers ont permis la fonctionnalisation de l'amine ε de K2 en solution par le bromoacétyle. Le même protocole qu'en phase solide a été appliqué : nous avons utilisé 10 équivalents de

l'acide bromoacétique et de PyBrop et 30 équivalents de DIEA dans le DMF. Les peptides **105** et **106** ont été ainsi obtenus (Figure 183).

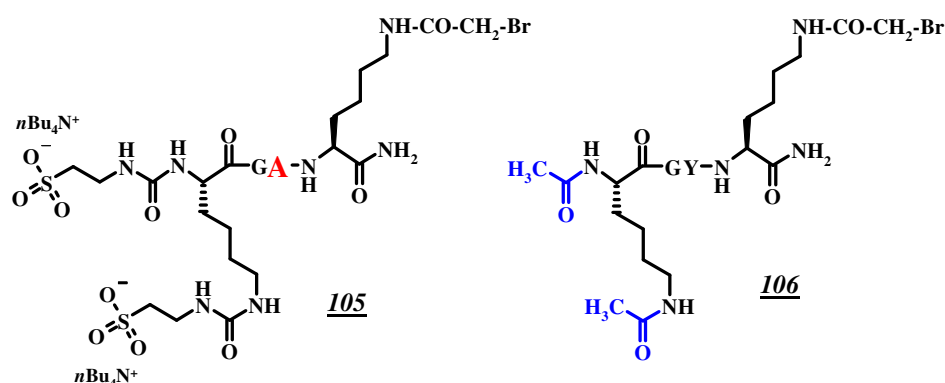


Figure 183 : Structure chimique des peptides sulfonés 105 et 106

Les rendements de synthèse et les puretés RP-HPLC de ces peptides sont présentés dans le Tableau 10.

Peptide	105	106
Rendement	95%	18%
Pureté RP-HPLC	84%	> 99%

Tableau 10 : Rendements et pureté RP-HPLC des peptides 105 et 106

Afin d'évaluer la stabilité des conjugués « thioéther » en présence de DMEM, seuls ceux ayant apporté les résultats les plus intéressants par biopuces ont été préparés.

4.3°) Synthèse des conjugués sulfonés de la quatrième série

D'un point de vue expérimental, la ligation thioéther se déroule dans un tampon phosphate de sodium à un pH compris entre 6 et 8. Comme pour la NCL et la ligation thiocarbamate, l'oxydation du cystéinyl-peptide peut être limitée par l'ajout de réducteurs tels que le thiophénol et l'utilisation d'une atmosphère inerte (réaction sous argon)²⁸⁷. Les essais

²⁸⁷ Muir TW, Williams MJ, Ginsberg MH, Kent SBH. Design and chemical synthesis of a neoprotein structural model for the cytoplasmic domain of a multisubunit cell-surface receptor: integrin α IIb β 3 (Platelet GPIIb-IIIa). *Biochem.* **1994**. 33, 7701-7708

préliminaires ont permis de montrer que la réaction a été optimale quand les ligations entre les peptides sulfonates 103, 104, 105, 106 (1,2 éq) et les cystéinyl-peptides sélectionnés (1 éq, 10 mM) ont été réalisées dans un tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH = 7,5), sous argon, à température ambiante.

Les résultats les plus intéressants des tests biopuces ont été obtenus avec les conjugués 57 et 80. Ces conjugués ont été formés par ligation thiocarbamate entre le cystéinyl-peptide 46 et les peptides sulfonates 55 et 78 respectivement.

Les conjugués thioéther préparés en priorité sont des analogues thiocarbamate des conjugués suivants :

* 57 et 60 qui possèdent la même séquence peptidique (« QHKTSITGHHLEP ») mais qui diffèrent par la position de l'extension « GGC » et donc du lien thiocarbamate (en C- et en N-terminal respectivement). Nous avons obtenu les conjugués thioéther analogues 107 et 108 ;

* 69 et 82 possèdent une structure proche de celle de 57 mais avec remplacement respectivement de la tyrosine par une alanine au niveau du peptide sulfonaté et des groupements sulfonates par des acétyles, soit les peptides 105 et 106. Nous avons alors obtenu les conjugués thioéther analogues 109 et 110 ;

* 80, qui présente deux groupements sulfonates supplémentaires par rapport à 57. Le conjugué thioéther analogue 111 a été ainsi obtenu.

Les structures de ces cinq conjugués thioéther analogues sont présentées à la Figure 184.

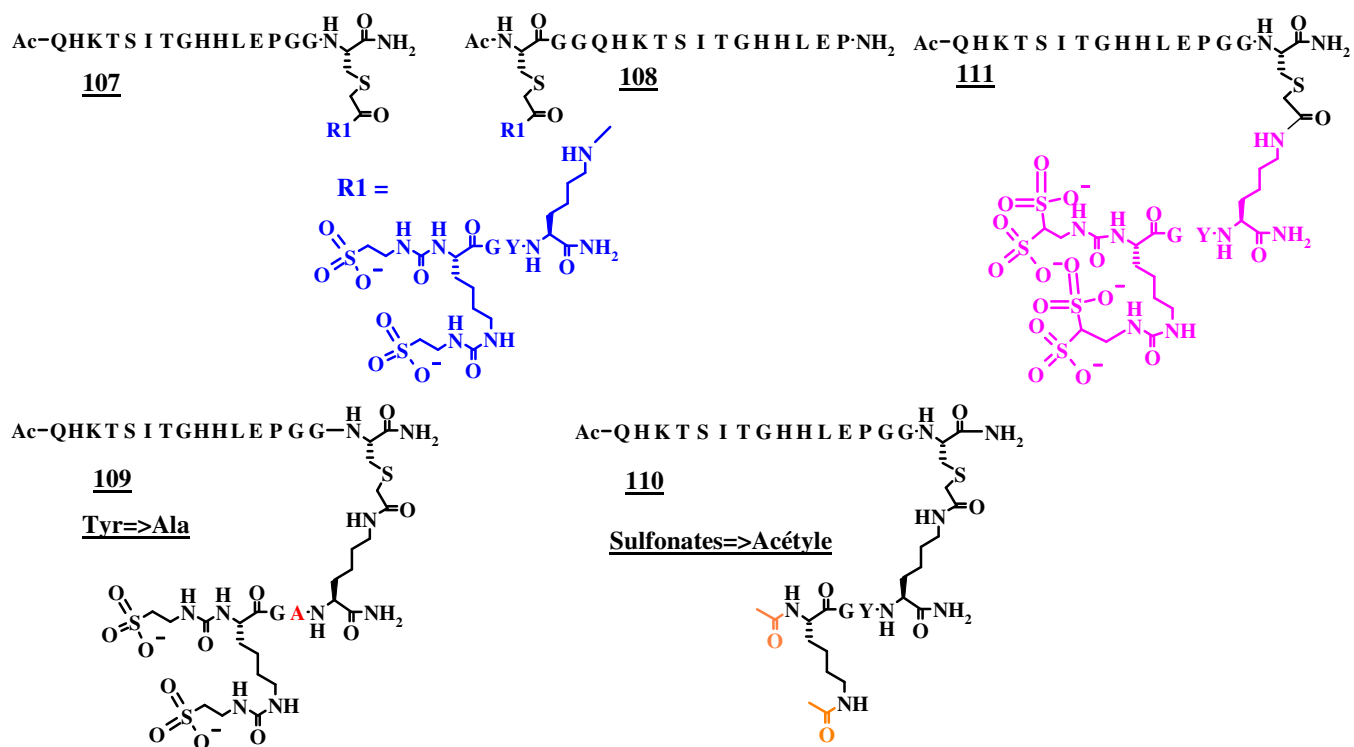


Figure 184 : Structure chimique des conjugués thioéther

Ces conjugués ont été analysés par MALDI-TOF et par RP-HPLC, ce qui a permis de déterminer leur identité et que leur pureté est satisfaisante. Les rendements de synthèse de ces cinq conjugués thioéther sont présentés dans le Tableau 11.

<u>Cystéinyl- Peptide</u>	<u>Dendrimère</u>	<u>Conjugué thioéther</u>	<u>Rendement</u>
46	Disulfonaté 103	107	52%
45	Disulfonaté 103	108	54%
46	disulfonaté Tyr=>Ala 105	109	34%
46	Diacétylé 106	110	42%
46	Tétrasulfonaté 104	111	52%

**Tableau 11 : Correspondances entre les numéros des conjugués thiocarbamate et thioéther.
Rendement en produits isolés**

4.4°) Stabilité des conjugués thioéther

La stabilité de certains conjugués thioéther a été évaluée en les plaçant dans différentes conditions et en effectuant un suivi par RP-HPLC et par MALDI-TOF en fonction du temps. Les conjugués, en particulier le **107**, semble stable après 24 heures dans le tampon phosphate de sodium (0,2M, pH 7,5) et dans le tampon bicarbonate de sodium (0,1 M, pH 8,5). Contrairement aux conjugués thiocarbamate, le lien thioether s'est avéré parfaitement stable dans le DMEM.

La ligation thioéther a donc généré des produits stables dans les conditions utilisées des tests biologiques. De plus, elle a été mise en œuvre assez facilement comme en témoignent les rendements de synthèse élevés des différents conjugués. Ces synthèses nous ont permis d'accéder à une librairie assez vaste de composés tels que des cystéinyl-peptides, des conjugués disulfonés et tétrasulfonés et qui ont été obtenus soit par ligation thiocarbamate soit par ligation thioéther. L'interaction de certains d'entre eux avec le domaine extracellulaire de MET, en particulier avec la protéine chimérique MET-Fc, a été évaluée au moyen de différents tests biochimiques et nous ont fournis des résultats prometteurs, notamment les conjugués **57** et **81**. Nous avons pu voir que **57** ne présenterait qu'une faible cytotoxicité, alors que **81** n'a pas encore été évalué dans cette optique. Malheureusement, les conjugués thiocarbamate se sont avérés peu stables dans le DMEM utilisé lors des tests cellulaires, et nous avons synthétisés leurs homologues thioéther, nommés **107** et **111**.

A ce stade de notre travail, nous ne disposions que d'une librairie assez restreinte de conjugués « thioéther » et c'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'évaluer directement leur activité biologique. Pour ce faire, le Docteur Gauthier Goormachtigh a mis au point un test d'activité kinase qui sera détaillé dans le prochain paragraphe.

4.5°) Tests d'activité kinase

4.5.1°) Comparaison thiocarbamate/thioéther

L'évaluation de la phosphorylation de MET en présence des peptides (100 µM) a été effectuée sur des cellules HeLa. Les puits (deux puits par condition) contenant les cellules ont été mis en présence des peptides pendant 5 minutes, puis l'HGF/SF (50 ng/mL) a été ajouté

durant 10 minutes. Les cellules ont été lysées et les protéines totales ont été dosées. Un test ELISA sandwich a permis d'évaluer, en fonction de la DO, la quantité de protéines MET phosphorylées. Le signal maximum a été obtenu grâce aux conditions « contrôles » :

signal max = (HeLa+HGF) - (HeLa-HGF), cette dernière valeur correspondant au bruit de fond du test ELISA.

Les résultats, rapportés au signal maximum, ont ensuite été calculés :

$$\% \text{ signal maximum} = \text{DO} / \text{pg de lysat cellulaire}$$

Le SU11274, un inhibiteur de la kinase de MET (voir Tableau 4), a également été utilisé comme contrôle afin de vérifier si une inhibition de l'autophosphorylation de MET était bien observée sur les cellules HeLa dans les conditions expérimentales mises en œuvre lors de ce test.

Les peptides testés ont été les suivants :

- * les peptides di- et tétrasulfonates 54 et 77 (notés PS) ;
- * les cystéinyl-peptides 45, 46, 48 (notés CP) ;
- * les conjugués thiocarbamate 57, 58, 60, 69, 80, 82 (notés ThioC) ;
- * les conjugués thioéther 107 à 110 (notés ThioE).

A la Figure 185, se trouvent les résultats obtenus lors du premier test.

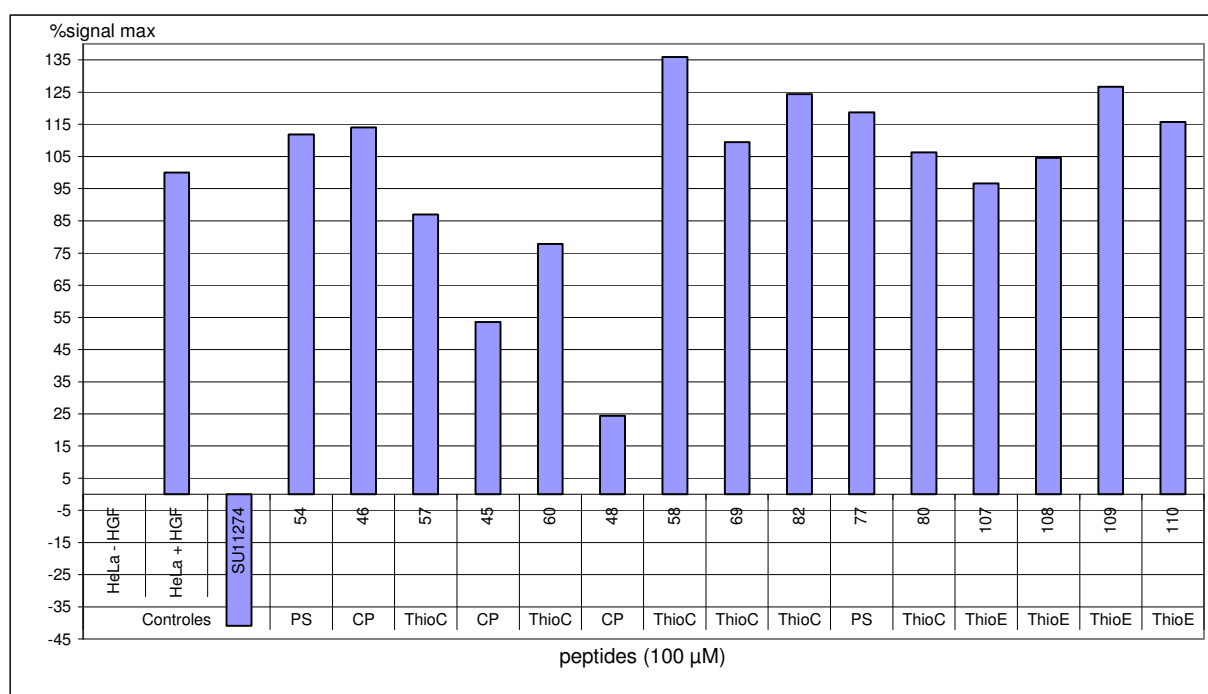


Figure 185 : Comparaison thiocarbamate/thioéther : test d'activité kinase de MET en présence d'HGF/SF et des peptides (100 µM)

De grandes tendances semblaient se dégager de ces résultats. Le conjugué 57 permettrait une diminution plus importante de la phosphorylation de MET comparativement à 54 et 46, qui sont les éléments de départ de ce conjugué. Une fois de plus, comme lors des tests biopuces, l'ajout du peptide sulfonaté à un cystéinyl-peptide permettrait d'obtenir un conjugué dont les propriétés, cette fois biologiques, seraient améliorées. Par contre, l'ajout du peptide tétrasulfonaté 77 au cystéinyl-peptide 46 (soit le conjugué 80) ne conduirait qu'à une très faible inhibition de la phosphorylation de MET. Ce résultat ne semble pas aller dans le même sens que celui obtenu par biopuces car, lors de ces tests, le conjugué 80, tétrasulfonaté interagissait plus avec le domaine extracellulaire de MET que le conjugué 57, disulfonaté.

De manière surprenante, les composés présentant un lien thioéther inhiberaient moins l'activité kinase de MET que leurs analogues thiocarbamate. Même s'ils sont plus stables dans le DMEM, le fait de modifier le lien présent dans les conjugués semblerait influencer significativement sur leur activité. Effectivement, d'après ces résultats, le conjugué thioéther 107, présenterait une activité plus faible comparativement à celle de l'analogue 57.

En dernier lieu, nous avons pu constater que les cystéinyl-peptides 45 et 48 sembleraient inhiber le plus la phosphorylation de MET et cette baisse semblerait s'accroître dans le temps, à l'occasion d'un second test dont les résultats ne sont pas représentés. Nous avons supposé que cet effet pourrait être dû à l'oxydation du cystéinyl-peptide lors de son stockage. Jusqu'à présent, nous nous sommes peu intéressés à ces composés dans la mesure où leur liaison avec le domaine extracellulaire de MET s'était révélée assez faible lors des tests biopuces. Afin de pouvoir vérifier ces résultats, un deuxième test a été réalisé dans les mêmes conditions. Ces seconds résultats (non présentés) n'ont malheureusement pas permis de confirmer aucune de ces précédentes observations. Face à un tel constat, il nous est paru nécessaire de revoir les conditions du test afin d'optimiser le test ELISA.

4.5.2°) Mise au point du test ELISA

Suite aux problèmes de reproductibilité observés, nous avons entrepris de modifier les conditions expérimentales et de ne plus utiliser celles du fournisseur du kit du test kinase, R&D. Dans chaque condition, la DO a été mesurée en fonction des concentrations croissantes de la protéine Met phosphorylée. Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 186.

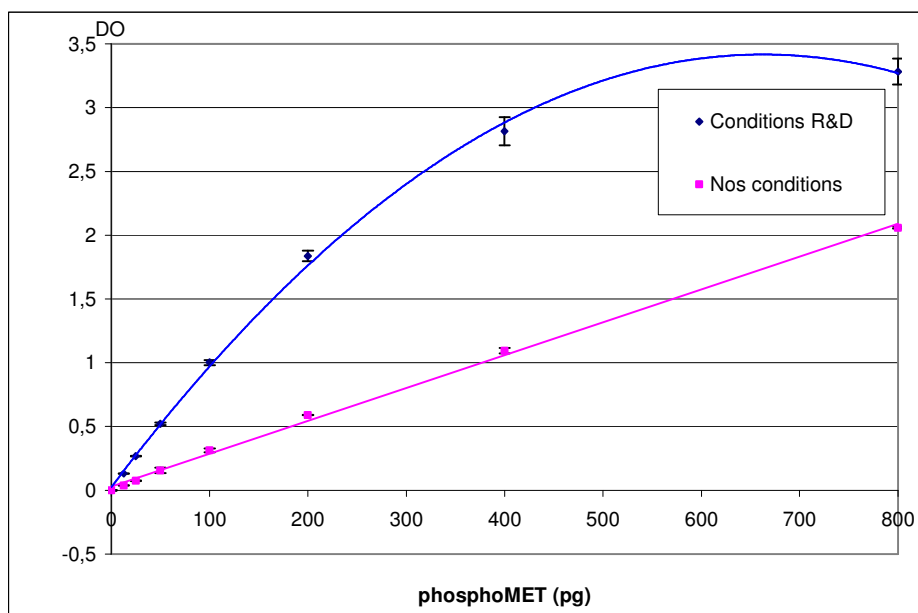


Figure 186 : Mesure de la DO en fonction des concentrations croissantes en phosphoMET

Avec les conditions expérimentales de R&D, nous avons constaté que la DO n'était pas directement proportionnelle à la concentration en phosphoMET, ce qui pourrait expliquer en partie le manque de reproductibilité du test kinase. Alors que dans les nouvelles conditions expérimentales, nous avons obtenu une relation linéaire directe entre la DO et la concentration en phosphoMET. Ces résultats indiquaient alors qu'il était préférable de changer les conditions du test kinase afin d'obtenir des résultats fiables.

4.5.3°) Tests d'activité kinase optimisé

Nous avons alors effectué une nouvelle série de tests en restreignant le nombre de composés testés :

- * la série de produits 54, 46 et 57, pour lesquels beaucoup de résultats (biopuces et biologiques) ont été obtenus ;

- * les conjugués contrôle du conjugué 57, à savoir le 69 (mutant sulfonates => acétyle) et le 82 (mutant tyrosine => alanine) ;

- * les peptides 45 et 48, pour vérifier si l'effet obtenu dans les précédents tests biologiques peut se confirmer ;

- * le SU11274 comme contrôle de l'inhibition de l'autophosphorylation de MET.

Afin de déterminer de façon plus fiable si certains d'entre eux sont actifs, nous nous sommes placés à plus forte concentration que les tests précédents, c'est-à-dire à 1 mM. Les

peptides sont sous forme de sels de trifluoroacétate car ils ont été purifiés par RP-HPLC préparative avec du TFA dans l'éluant. Dans le cas particulier de nos composés, pour neutraliser les charges positives des amines des chaînes latérales des résidus basiques (lysine, arginine et histidine), il y avait au plus quatre contre-ions TFA. Néanmoins, il a été montré que le trifluoroacétate pourrait être considéré comme un contaminant pour certaines cultures cellulaires car il semble inhiber la prolifération des ostéoblastes et des chondrocytes²⁸⁸. Dans le cas présent, les effets potentiels des contre-ions trifluoroacétate sur les cellules HeLa était inconnu. Pour étudier ce phénomène, nous avons testé l'effet d'une solution de sel de TFA à la concentration de 4 mM sur les cellules HeLa en présence ou non d'HGF/SF (Figure 187).

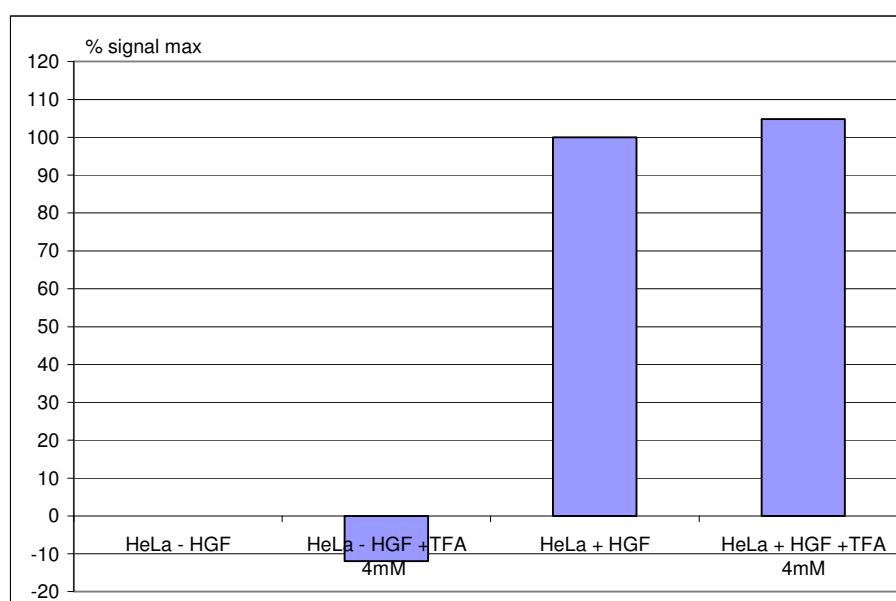


Figure 187 : Effet d'une solution de TFA (4 mM) en présence ou non de l'HGF/SF

Les résultats obtenus n'ont pas montré de variation significative de l'autophosphorylation de MET en présence de la solution à 4 mM en trifluoroacétate.

Ensuite, nous avons effectué deux tests à 24 heures d'intervalle en présence des composés (Figure 188 Figure 189).

²⁸⁸ Cornish J, Callon KE, Lin CQX, Xiao CL, Mulvey TB, Cooper GJS, Reid IR. Trifluoroacetate, a contaminant in purified proteins, inhibits proliferation of osteoblasts and chondrocytes. *Am. J. Physiol.* **1999**. 277, E779-E783

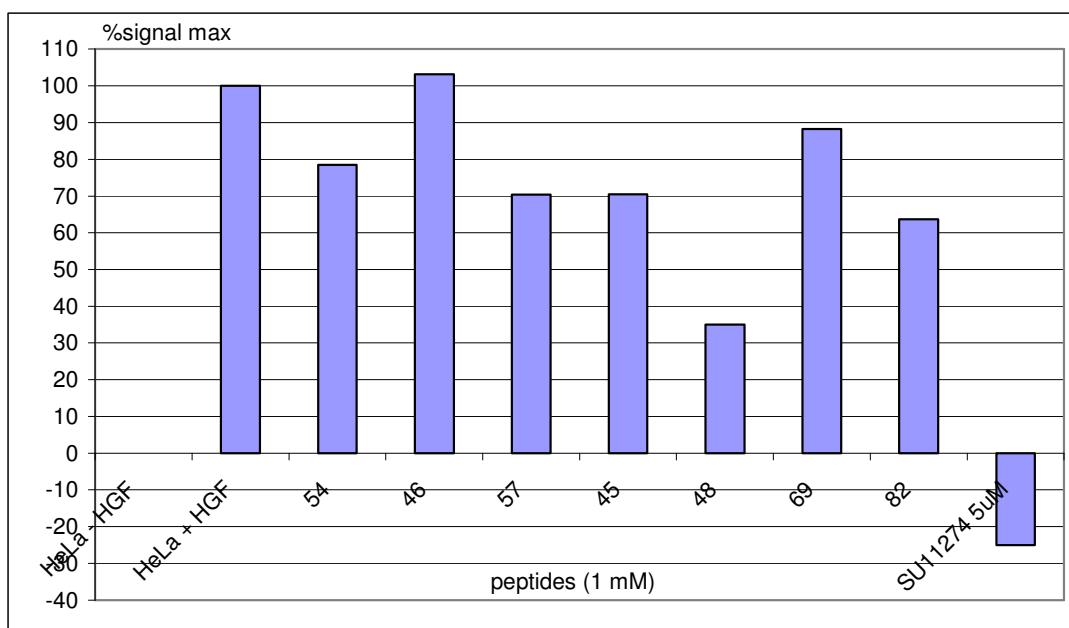


Figure 188 : Premier test kinase optimisé des produits thiocarbamate

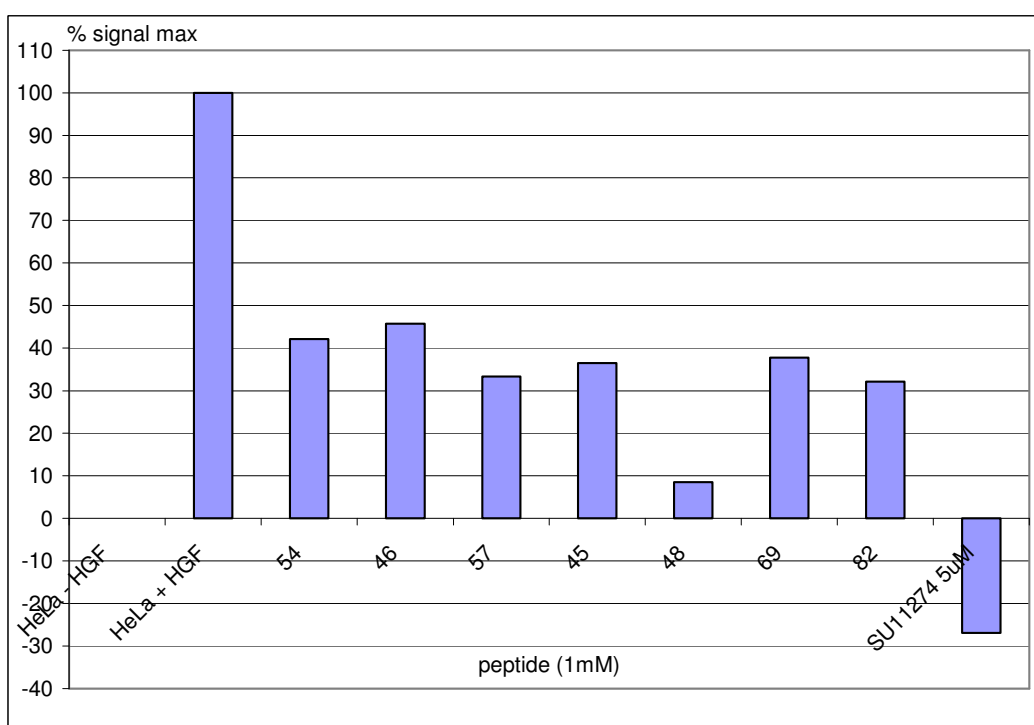


Figure 189 : Second test kinase optimisé des produits thiocarbamate

Les profils obtenus sont sensiblement les mêmes : le classement des produits est le même pour ces deux essais, ce qui nous a semblé rassurant. Néanmoins, de façon

incompréhensible, nous avons observé une baisse globale du signal maximal. L'ajout du peptide sulfonaté 54 au cystéinyl-peptide 46 permettrait, d'après ces résultats, d'augmenter, de façon assez modeste, la capacité d'inhibition du conjugué final (57). Ceci confirmerait notre hypothèse de base selon laquelle la signalisation d'HGF-SF/MET pourrait être inhibée par des mimes d'HS.

Les résultats sont plus contrastés pour les composés « contrôles ». En effet, l'activité du mutant acétylé (69) semblerait légèrement inférieure à celle de 57, alors que celle du mutant « alanine » (82) serait supérieure dans cet essai, à l'inverse de ce que nous avons pu observer à l'occasion des tests biopuces lors desquels nous avons pu observer que les sulfonates auraient un rôle plus important dans la liaison à MET-Fc (cf page 217). Le parallèle entre la capacité pour un composé à lier le domaine extracellulaire d'une protéine, comme le RTK MET, et à l'inhiber, n'est donc pas vérifié pour nos composés.

Dans cet essai, le cystéinyl-peptide 45 possède une activité proche de celle du conjugué 57. Ils possèdent en commun la séquence peptidique « QHKTSITGHHLEP », mais l'extension « GGC » n'est pas située en même position et le cystéinyl-peptide 45 ne porte pas de sulfonates. Ce constat pourrait s'expliquer par une possible dimérisation du cystéinyl-peptide 45 lors de l'oxydation à l'air qui peut avoir lieu quand le peptide est solubilisé en milieu aqueux. Dans le cas de la formation d'un pont disulfure, le thiol de la cystéine se trouve engagé dans une liaison covalente, comme c'est le cas pour le conjugué thiocarbamate 57. Nous avons alors émis l'hypothèse que la formation d'un pont disulfure par la cystéine pourrait être suffisante pour observer une activité comparable à celle d'un conjugué lié sur la cystéine par un lien thiocarbamate. Ce constat diffère clairement des résultats d'interaction des composés avec la protéine chimérique MET-Fc. En effet, aucun des cystéinyl-peptide n'avait montré une interaction significative avec le domaine extracellulaire de MET, alors que les conjugués, en particulier 57, avaient été capables d'interagir avec la protéine chimérique MET-Fc. Ces observations démontrent l'intérêt fondamental de déterminer à la fois la capacité d'interaction des composés avec le domaine extracellulaire de MET et leur activité.

Le meilleur composé de ces tests semblerait être le cystéinyl-peptide 48 comportant la séquence « TLPSPALLTVH ». S'agissant d'un cystéinyl-peptide, le thiol de la cystéine pourrait se retrouver engagé dans une liaison covalente lors de son oxydation à l'air. Néanmoins, d'après l'étude de Zhao et coll, la séquence peptidique correspondant à 48 s'est avérée être la séquence intermédiaire dans les tests ELISA compétitif. Les résultats d'inhibition de la liaison à MET des peptides identifiés par phage display et les cystéinyl-peptides dérivés sont rappelés dans le Tableau 12.

<u>Séquence peptidique</u>	<u>Cystéinyl-peptide</u> <u>dérivés</u>	<u>% de compétition avec</u> <u>l'HGF/SF</u>
QHKTSITGHHLEP	45 46	28,6%
TLPSPLALLTVH	47 48	39,1%
YLFSVHWPLKA	49 50	59,3%

Tableau 12 : Séquences peptidiques affines pour MET identifiées par Zhao et coll et leur pourcentage de compétition avec l'HGF/SF

A plusieurs reprises, nous avons émis l'hypothèse que la formation d'un pont disulfure pourrait être à l'origine d'un gain d'activité. Nous avons donc jugé utile d'effectuer une étude plus approfondie des cystéinyl-peptides et c'est ce qui a donné lieu à la synthèse de la cinquième série de composés.

5°) Synthèse de la cinquième série de composés

Les précédents résultats semblent montrer un effet inhibiteur important de certains peptides interagissant avec le domaine extracellulaire de MET. Cet effet semblerait s'intensifier au fil du temps, ce qui nous a laissé penser que leur dimérisation pourrait en être responsable. Dans la littérature, des cystéinyl-peptides, antagonistes de l' α -**M**elanocyte **S**timulating **H**ormone), ont montré une affinité plus importante pour leur récepteur lorsqu'un pont disulfure intermoléculaire entre les cystéines était présent²⁸⁹. Dans le cadre de ce travail, nous avons testé cette hypothèse en synthétisant les disulfures de l'ensemble des cystéinyl-peptides de la première série dont les séquences sont rappelées à la Figure 190.

²⁸⁹ Carrithers MD, Lerner MR. Synthesis and characterization of bivalent peptide ligands targeted to G-protein-coupled receptors. *Chem. Biol.* **1996.** 3, 537-542

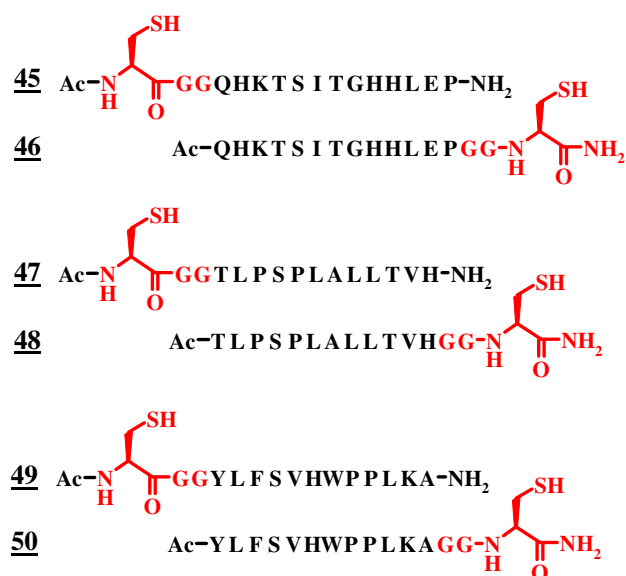


Figure 190 : Rappel des séquences des cystéinyl-peptides de la première série

5.1°) Synthèse des peptides

5.1.1°) Synthèse des disulfures

Les disulfures ont été préparés en solubilisant les cystéinyl-peptides dans un tampon bicarbonate de sodium (50 mM, pH 8,5). Après un suivi de la réaction par RP-HPLC, ils ont été purifiés par RP-HPLC préparative.

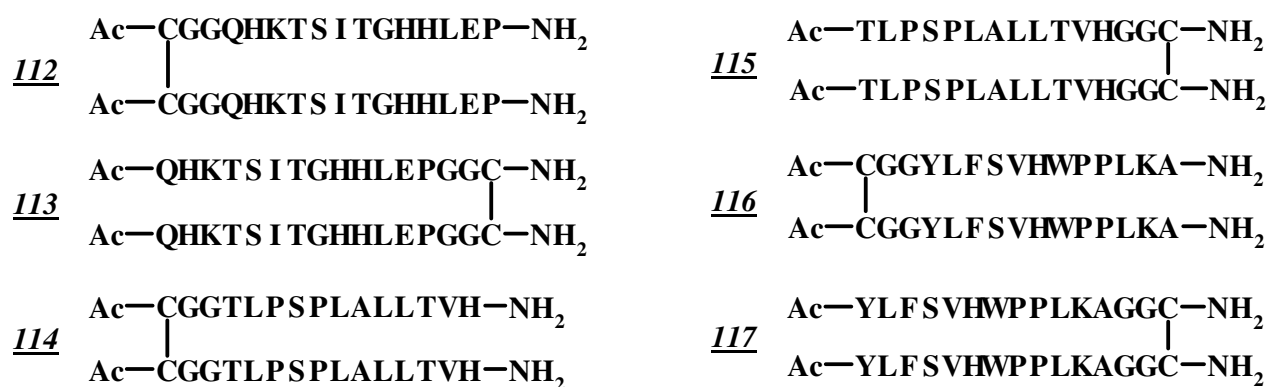


Figure 191 : Structure des disulfures

Ces peptides ont été contrôlés par MALDI-TOF et par RP-HPLC (pureté supérieure à 94%). Les rendements de synthèse sont regroupés dans le Tableau 13.

Peptide	112	113	114	115	116	117
Rdt	36%	26%	26%	19%	26%	33%

Tableau 13 : Rendements des synthèses des disulfures

5.1.2°) Synthèse des séryl-peptides

Nous avons également besoin de préparer des peptides contrôle afin de s'assurer que c'est bien la dimérisation des cystéinyl-peptides qui provoque la modification de leur activité biologique. Nous avons donc également préparé des séquences peptidiques proches des cystéinyl-peptides 45 à 50 en remplaçant la cystéine par un résidu de structure proche et qui ne pourra pas entraîner de dimérisation. Nous avons donc préparé les séryl-peptides présentés à la Figure 192.



Figure 192 : Structure des séryl-peptides

Ces peptides ont été contrôlés par MALDI-TOF et par RP-HPLC (pureté supérieure à 97%). Les rendements de synthèse sont regroupés dans le Tableau 14.

Peptide	118	119	120	121	122	123
Rdt	36%	25%	19%	5%	12%	13%

Tableau 14 : Rendements des synthèses des séryl-peptides

5.2°) Evaluations biologiques: tests d'activité kinase

La phosphorylation de MET a été évaluée sur des cellules HeLa en présence des composés et de l'HGF/SF selon le protocole déjà détaillé. Les cystéinyl- et les séryl-peptides ont été testés à trois concentrations : 10, 100, et 1000 μ M. Les peptides de cette série ont été solubilisés à 100 mM dans le DMSO stérile et ont ensuite été dilués en cascade dans le DMEM. Les concentrations des disulfures ont été à chaque fois divisées par deux afin d'obtenir une concentration comparable à celle du monomère de type cystéinyl-peptide. Les contrôles négatifs et positifs correspondent aux puits de cellules HeLa mise en présence ou non de l'HGF/SF.

Dans un premier temps, sont présentés les résultats pour les peptides comportant la séquence « QHKTSITGHHLEP », à savoir les cystéinyl-peptides **45** et **46**, les séryl-peptides **118** et **119** ainsi que les disulfures **112** et **113** (Figure 193).

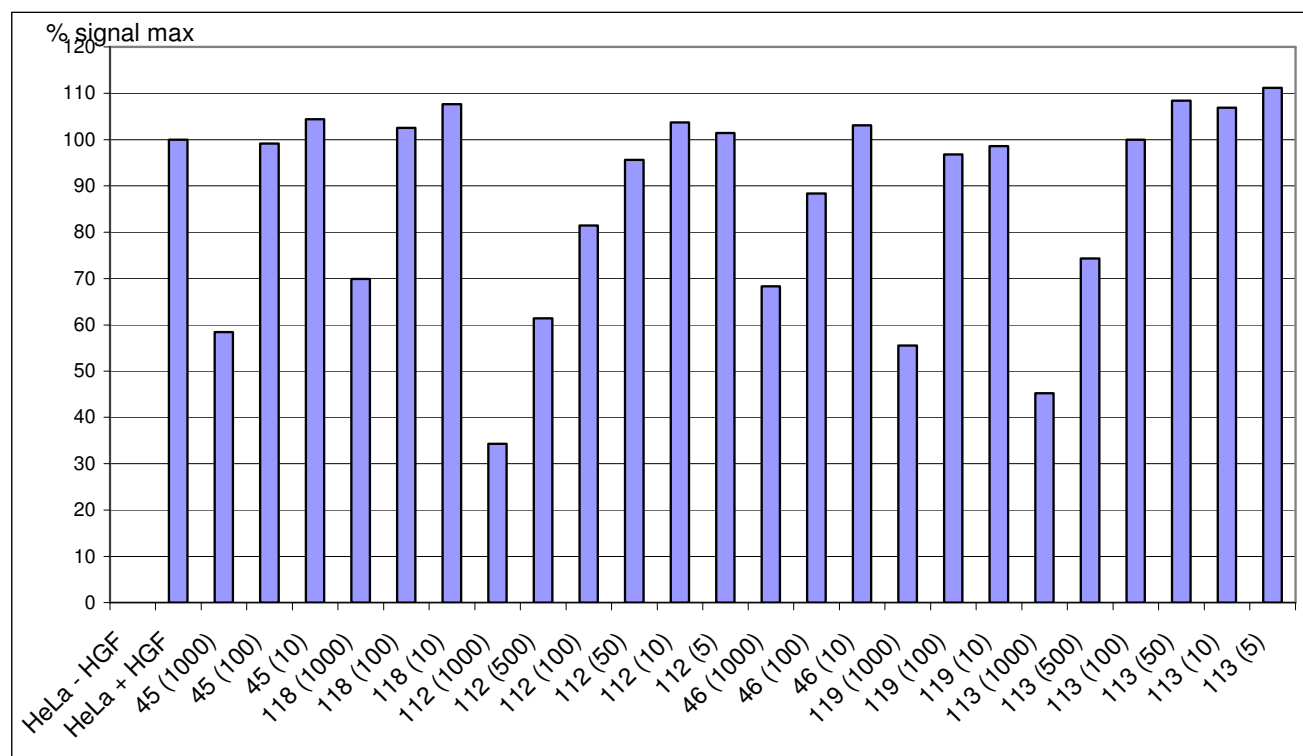


Figure 193 : Résultats du test kinase des peptides ayant en commun la séquence « QHKTSITGHHLEP »

Pour cette première série, l'activité des séryl-peptides (**118** et **119**) semblerait globalement plus faible que celle des cystéinyl-peptides (**45** et **46**) quelle que soit la

concentration. A la plus forte concentration (soit 1000 μM), il semble exister un effet inhibiteur du seryl-peptide **119** supérieur à celui du cystéinyl-peptide **46**, ce qui a paru très surprenant dans la mesure où il s'agit de peptide témoin. Nous avons supposé qu'il pouvait s'agir d'une mesure aberrante. Globalement, la phosphorylation de MET semblerait être inhibée quand la concentration en peptide augmente. Le fait de dimériser le cystéinyl-peptide ne permettrait pas d'augmenter l'inhibition. En effet, les résultats de **112** (500 μM) et **45** (1000 μM) seraient assez peu différents et il en irait de même pour **113** et **46**. Cette série de peptides nous a semblé très peu prometteuse dans la mesure où les effets observés sont faibles (inhibition d'environ 50%).

Dans un second temps, sont présentés les résultats pour l'ensemble des peptides comportant la séquence « TLPSPLALLTVH », à savoir les cystéinyl-peptides **47** et **48**, les seryl-peptides **120** et **121** ainsi que les disulfures **114** et **115** (Figure 194).

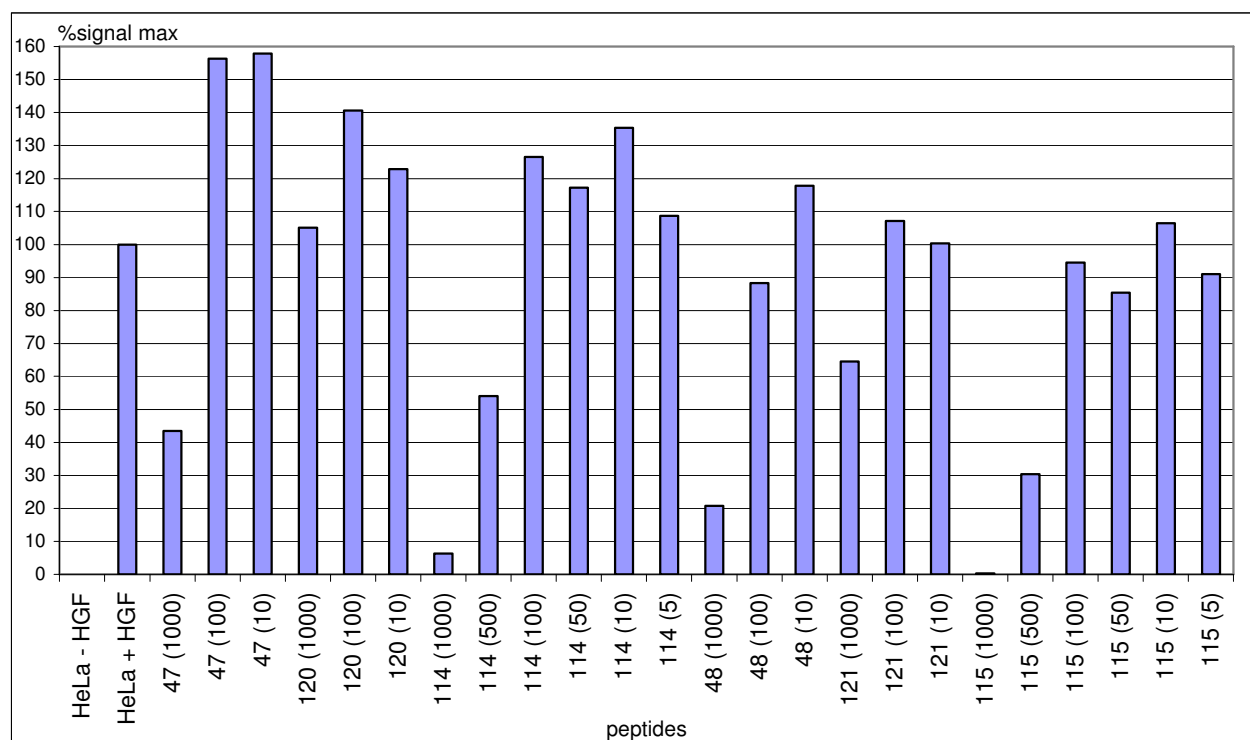


Figure 194 : Résultats des tests kinase des peptides possédant la séquence « TLPSPLALLTVH »

Pour cette seconde série, l'activité des seryl-peptides (**120** et **121**) semblerait plus faible que celle des cystéinyl-peptides (**47** et **48**) surtout à 1000 μM . En effet, aux autres

concentrations, le signal maximum est supérieur à celui des témoins, ce qui ne nous permet pas de conclure. Cette mutation de la cystéine en sérine semblerait générer un peptide ayant une activité plus faible, et nous avons alors supposé que ceci pourrait être dû à l'impossibilité de dimériser. Le fait de dimériser les peptides semblerait leur conférer une meilleure activité inhibitrice sur la kinase de MET. L'activité du peptide **48** semble supérieure à celle du **47** et cette série de composés semble présenter une activité supérieure à celle de la première série, ce qui va dans le sens de nos précédentes observations et ne nous permet pas de vérifier nos hypothèses de départ.

Dans un dernier temps, sont présentés les résultats pour l'ensemble des peptides comportant la séquence « YLFSVHWPLKA », à savoir les cystéinyl-peptides **49** et **50**, les séryl-peptides **122** et **123** ainsi que les disulfures **116** et **117** (Figure 195).

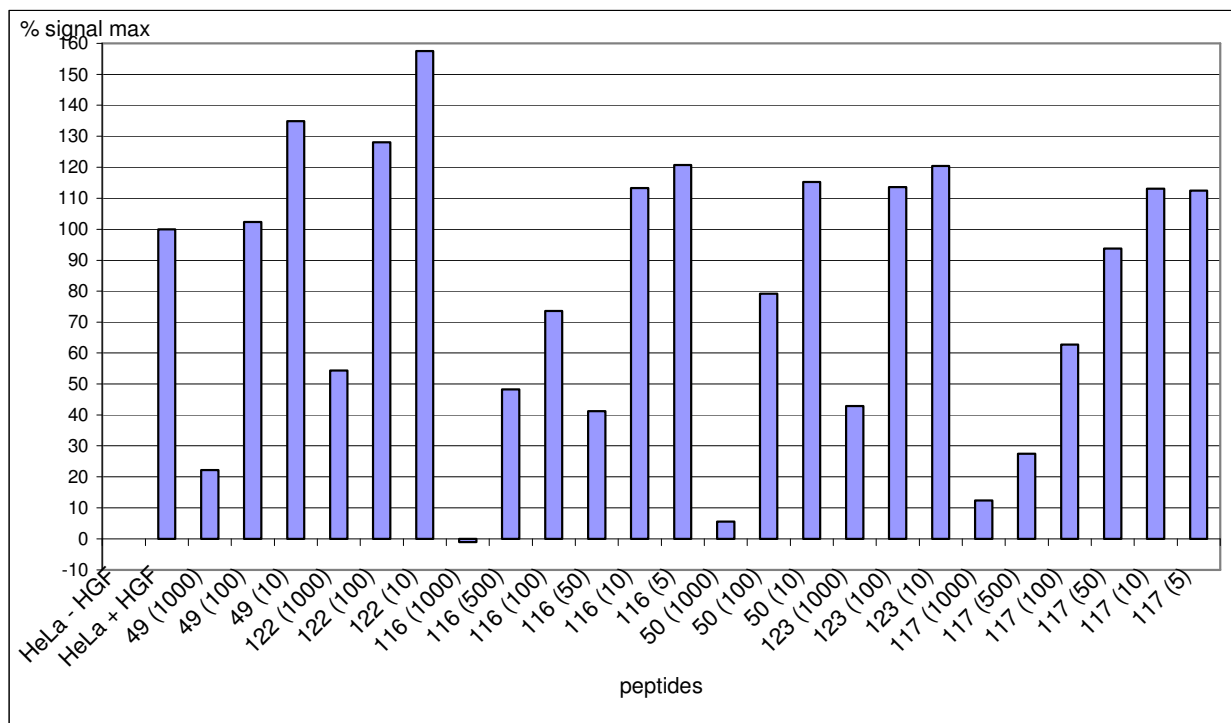


Figure 195 : Résultats des tests kinase des peptides possédant la séquence « YLFSVHWPLKA »

Les résultats de cette troisième série montrent que l'activité des séryl-peptides (**122** et **123**) semble être plus faible que celle des cystéinyl-peptides (**49** et **50**) quelle que soit la concentration, ce qui conforte une partie de notre hypothèse de départ. Néanmoins, la stratégie de dimérisation des cystéinyl-peptides ne semble pas augmenter l'activité de la

séquence peptidique. Ces résultats nous ont paru quelque peu contradictoires avec nos suppositions à l'issue des premiers tests kinase mais également les observations d'autres auteurs²⁹⁰ et qui avaient été à la base de cette dernière partie du travail. Il faut préciser que les peptides de cette série ont été correctement solubilisés à 100 mM dans le DMSO stérile et ont ensuite été dilués en cascade dans le DMEM. Lors de ces dilutions en cascade, il est apparu que les peptides étaient très peu solubles dans le milieu de culture et précipitaient dès la première dilution. De ce fait, une proportion inconnue a été effectivement solubilisée ce qui peut introduire un biais dans les résultats obtenus. De plus, il paraît alors dans ce cas difficile de comparer cette troisième série de peptides avec les deux autres, qui, au contraire, se sont avérées solubles lors des essais.

Toutes les interprétations de ces tests n'ont pas pu être vérifiées en réalisant d'autres tests d'activité kinase. Ces tests se sont donc avérés très décevants car ils ne nous ont pas permis ni de confirmer nos hypothèses de départ, à savoir qu'un cystéinyl-peptide présente une meilleure activité inhibitrice quand il est présenté sous forme dimérique et que ceci est empêché par la substitution de la cystéine en sérine. En effet, les séryl-peptides 118 à 123 ne seraient pas toujours moins actifs que les cystéinyl-peptides correspondants, à savoir les peptides 45 à 50. Les dimères 112 à 117 ne se seraient pas systématiquement plus actifs que les cystéinyl-peptides dont ils sont respectivement issus. Ce constat ne nous permet donc pas de confirmer notre hypothèse de départ, car les effets observés ne sont pas proportionnels aux concentrations en peptides. De plus, pour la troisième série de peptides comportant la séquence « YLFSVHWPLKA », un biais a été introduit dans l'expérience à cause d'une solubilité assez faible de ces peptides dans le milieu de culture, ce qui nous limite dans l'interprétation des résultats biologiques. Pour contrecarrer ce problème de solubilité et pouvoir refaire les tests biologiques dans des conditions où les comparaisons seraient possibles, il aurait pu être envisageable d'effectuer un couplage de ces peptides hydrophobes avec des composés hydrosolubles, tels que des PEG. De plus, les PEG sont fréquemment utilisés dans le développement de « peptides médicaments » car ils constituent un moyen efficace de protéger la structure peptidique.

²⁹⁰ Carrithers MD, Lerner MR. Synthesis and characterization of bivalent peptide ligands targeted to G-protein-coupled receptors. *Chem. Biol.* **1996.** 3, 537-542

E°) Partie expérimentale

1°) Synthèse de la première série de conjugués par ligation thiocarbamate

1.1°) Synthèse des cystéinyl-peptides 45 à 50

Protocole général de synthèse des peptides 45 à 50

Le peptide a été synthétisé à l'aide synthétiseur de peptides MultiPep RS (Intavis) sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,05 mmol, 0,27 mmol/g). Une solution TFA/H₂O/EDT/TIS (5 mL, 94/2,5/2,5/1; v/v/v/v) a été mise en contact avec la peptidyl-résine pendant 1h45. Le peptide a été précipité par d'un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (50 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans un minimum d'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Sa purification a été effectuée par RP-HPLC préparative (C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min).

Peptide 45 : Ac-CGGQHKTSTGGHLEP-NH₂

Purification : 0-10% de B en 5 minutes, 10-40% de B en 100 min.

47 mg de **45** ont été obtenus (Rdt = 43%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 93%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 98%, acétate (10 min, 10 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₇₃H₁₁₅N₂₅O₂₃S [M+H]⁺ = 1742.8, observée 1742.9

Peptide 46 : Ac-QHKTSITGGHLEPGGC-NH₂

Purification : 0-10% de B en 5 minutes, 10-40% de B en 100 min.

97 mg de **46** ont été obtenus (Rdt = 88%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 92%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 98%, acétate (10 min, 10 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₇₃H₁₁₅N₂₅O₂₃S [M+H]⁺ = 1742.8, observée 1742.8

Peptide 47 : Ac-CGGTLPSPLALLTVH-NH₂

Purification : 0-30% de B en 10 minutes, 30-60% de B en 100 min.

37 mg de **47** ont été obtenus (Rdt = 45%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 92%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₆₈H₁₁₄N₁₈O₁₉S [M+H]⁺ = 1519.8, observée 1519.8

Peptide 48: Ac-TLPSPLALLTVHGGC-NH₂

Purification : 0-30% de B en 10 minutes, 30-60% de B en 100 min.

22 mg de **48** ont été obtenus (Rdt = 27%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 96%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 99%, acétate (10 min, 10 kV) : 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₆₈H₁₁₄N₁₈O₁₉S [M+H]⁺ = 1519.8, observée 1519.8

Peptide 49 : Ac-CGGYLFSVHWPPLKA-NH₂

Purification : 0-30% de B en 10 minutes, 30-60% de B en 100 min.

76 mg de **49** ont été obtenus (Rdt = 74%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 50°C, C18 Nucléosil) : 94%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : >99%, acétate (10 min, 10 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₈₃H₁₁₈N₂₀O₁₈S [M+H]⁺ = 1715.9, observée 1715.6

Peptide 50 : Ac-YLFSVHWPPLKAGGC-NH₂

Purification : 0-30% de B en 10 minutes, 30-60% de B en 100 min.

73 mg de **50** ont été obtenus (Rdt = 71%).

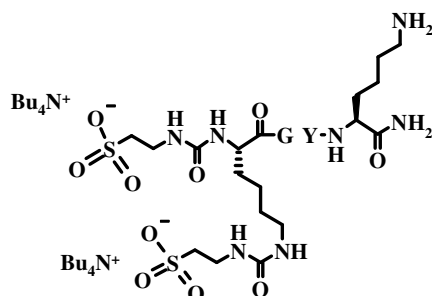
Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 50°C, C18 Nucléosil) : 99%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 97%, acétate (10 min, 10 kV) : 97%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₈₃H₁₁₈N₂₀O₁₈S [M+H]⁺ = 1715.9, observée 1715.7

1.2°) Synthèse des peptides sulfonates

Peptide 54



Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(t-Bu)K(Boc) a été synthétisé manuellement sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,14 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α et ε. La taurine (1 mg, 20 éq, 50 mM), solubilisée dans une

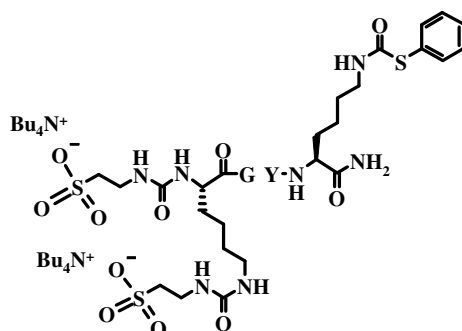
solution de $n\text{Bu}_4\text{N}^+\text{OH}^-$ (2,8 mL, 20 éq, 1M dans l'eau), et le CDI (454 mg, 20 éq, 50 mM) ont été dissous dans 2,8 mL de DMF. Après 2h d'agitation, la réaction a été contrôlée par CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 6/4 et révélation à la ninhydrine). Ce milieu réactionnel et l' Et_3N (390 μL , 20 éq) ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Après 19h d'agitation, elle a été lavée avec du DMF ($5 \times 2\text{min}$) et un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine. Une solution TFA/ $\text{H}_2\text{O}/\text{TIS}$ (5 mL, 95/2,5/2,5; v/v/v) a été mise en contact avec la peptidyl-résine pendant 1h30. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d' $\text{Et}_2\text{O}/n$ -heptane (100 mL, 1/1 ; v/v) et centrifugé (10 min, 3500 trs/min, 4°C). Le solide blanc obtenu a été solubilisé dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. 87 mg de **54** ont été obtenus (Rdt = 69%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 70°C, C18 Nucléosil) : 95%

CZE acétate (10 min 10 kV) : 94%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{N}_9\text{O}_{13}\text{S}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^- = 794.3$, observée 794.0

Peptide 55



Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(t-Bu)K(Mtt) a été synthétisé manuellement sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,1 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer le groupement protecteur Fmoc des amines α et ϵ . La taurine (733 mg, 20 éq, 50 mM), solubilisée dans une solution de $n\text{Bu}_4\text{N}^+\text{OH}^-$ (2 mL, 20 éq, 1M dans l'eau) et le CDI (325 mg, 20 éq, 50 mM) ont été dissous dans 2 mL de DMF. Après 2 h d'agitation, la réaction a été contrôlée par CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 6/4 et révélation à la ninhydrine). Ce milieu réactionnel et l' Et_3N (280 μL , 20 éq) ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Après 16h d'agitation, elle a été lavée avec du DMF ($5 \times 2\text{min}$) et un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine. La déprotection du groupement Mtt a été réalisée en lavant la résine avec une solution TFA/ CH_2Cl_2 (13 fois, 1/99 ; v/v ; 6 mL/lavage). La peptidyl-résine a ensuite été conditionnée dans le THF (8×2 min). Le THF (4 mL), l' Et_3N (56 μL , 4 éq) et le PhSCOCl (57 μL , 4 éq) ont été ajoutés dans cet ordre sur la peptidyl-résine. Après 1 h d'agitation, la peptidyl-résine a

été lavée avec le THF (3 × 2 min), puis le DMF (3 × 2 min). Un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine. Une solution TFA/H₂O/thioanisole (4 mL, 96,5/2,5/1, v/v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 1h30. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (100 mL, 1/1 ; v/v) et centrifugé (10 min, 3500 trs/min, 4°C). Le solide blanc obtenu a été solubilisé dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Le produit a été purifié par RP-HPLC (0-18% de B en 36 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 23 mg de **55** ont été obtenus (Rdt = 25%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (15 min, -15 kV) : > 99%

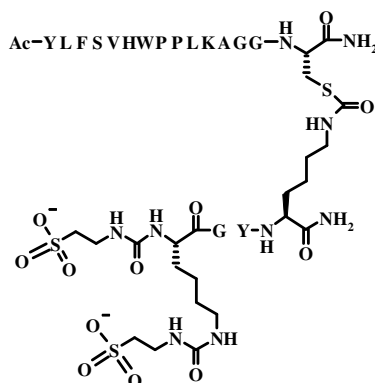
LC-MS (C18 Nucléosil, T°C source 120°C, T°C désolvation 350°C, cône 30V) masse monoisotopique calculée pour C₃₆H₅₁N₉O₁₄S₃ [M+H]⁺ = 932.3, observée 932.5, [M-H]⁻ = 930.3, observé 930.5

1.3°) Synthèse des conjugués de la première série

Protocole général de synthèse des conjugués 56 à 61

Les ligations entre le peptide sulfonaté **55** (1 éq) et les cystéinyl-peptides **45** à **50** (1 éq, 10 mM) ont été réalisées dans un tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH = 7,5) sous argon à température ambiante et sous agitation. L'évolution du milieu réactionnel a été suivie par RP-HPLC pendant une durée variant de 24h à 48h. Le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC préparative.

Peptide 56

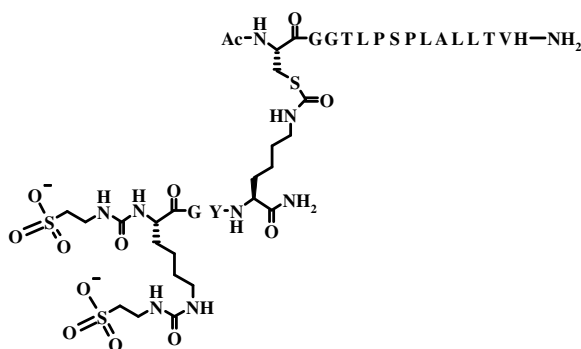


La ligation entre le peptide **55** (4,0 mg) et le peptide **50** (8,9 mg) a été effectuée selon le protocole général (page 263). Après 47 h d'agitation, le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC (0-30% de B en 10 min, 30-60% de B en 60 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 5 mg de **56** ont été obtenus (Rdt = 44%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 50°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE phosphate (10 min, 10 kV) : 99% ; borate (10 min, 15 kV) : 95%

Peptide 61



La ligation entre le peptide **55** (4,3 mg) et le peptide **47** (7,4 mg) a été effectuée selon le protocole général (page 263). Après 48h d'agitation, le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC (0-20% de B en 10 min, 20-60% de B en 60 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 5 mg de **61** ont été obtenus (Rdt = 44%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE phosphate (10 min, 10 kV) : > 99% ; borate (10 min, 15 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₉₈H₁₅₉N₂₇O₃₃S₃ [M-H]⁻ = 2337.1, observée 2336.6

2°) Synthèse de la seconde série de conjugués par ligation thiocarbamate

2.1°) Synthèse des cystéinyl-peptides 62 à 64

Protocole général de synthèse des peptides 62 à 64

Le peptide a été synthétisé sur le synthétiseur de peptides Liberty CEM sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,1 mmol, 0,25 mmol/g). Une solution TFA/H₂O/EDT/TIS (10 mL, 94/2,5/2,5/1; v/v/v/v) a été mise en contact avec la peptidyl-résine pendant 2h. Le peptide a été précipité par d'un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (100 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. La purification du peptide a été effectuée par RP-HPLC (C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min, température ambiante)

Peptide 62 : Ac-CLEGHGKTQSHIGPTH-NH₂

Purification : 0-10% de B en 10 min, 10-40% de B en 100 min

17 mg de **62** ont été obtenus (Rdt = 8%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 96%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 97% ; acétate (10 min, 10 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{73}H_{115}N_{25}O_{23}S$ $[M+H]^+ = 1742.8$, observée 1742.6

Peptide 63 : Ac-QHKMRMVLGVIVPGGC-NH₂

Après précipitation et lyophilisation, 194 mg du peptide brut ont été obtenus (Rdt = 92%). Ce peptide a été utilisé directement pour la ligation (82% de pureté en RP-HPLC). Seuls 24 mg ont été purifiés par RP-HPLC (0-10% de B en 10 min, 10-40% de B en 40 min). 8 mg de **63** ont été obtenus (Rdt = 34%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : 98% ; acétate (10 min, 10 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{76}H_{132}N_{24}O_{18}S_3$ $[M+H]^+ = 1765.9$, observée 1765.4

Peptide 64 : Ac-QHKMRMVLGVIVPGRGC-NH₂

Après précipitation et lyophilisation, 238 mg du peptide brut ont été obtenus (Rdt = 98%). Ce peptide a été utilisé directement pour effectuer la ligation (85% de pureté en RP-HPLC). Seuls 22 mg ont été purifiés par RP-HPLC (0-10% de B en 10 min, 10-40% de B en 40 min). 9 mg de **64** ont été obtenus (Rdt = 40%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

Pureté CZE citrate (15 min, 15 kV) : 98% ; acétate (10 min, 10 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{82}H_{144}N_{28}O_{19}S_3$ $[M+H]^+ = 1922$, observée 1921.4

2.2°) Synthèse des peptides sulfonates

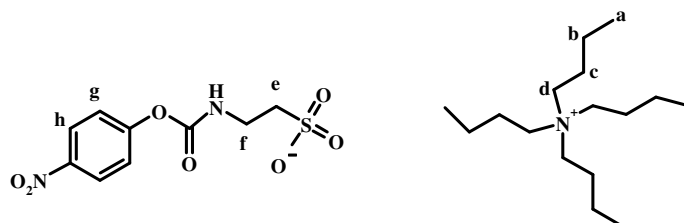
Intermédiaire 74

La taurine (1 éq, 22 mg) a été dissoute dans une solution de $nBu_4N^+ OH^-$ (1 éq, 172 μ L, 1M dans l'eau) et du CH_2Cl_2 a été rajouté pour obtenir une concentration finale en taurine de 10 mM. Ce mélange a été ajouté sur le BPNPC (1 éq, 52 mg). Après 1h d'agitation à température ambiante, la formation de **74** a été contrôlée par CCM ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9/1). Le solvant a été évaporé à sec et le produit a été purifié par RP-HPLC (0-10% de B en 10 min, 10-20% de B en 30 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 30 mg de **74** ont été obtenus (Rdt = 60%).

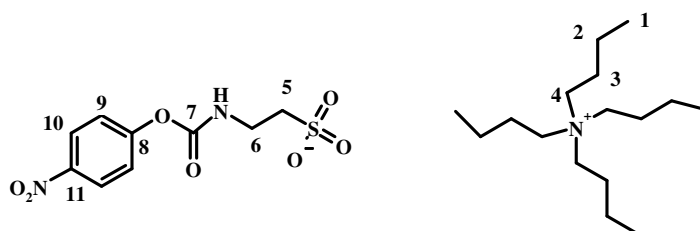
LC-MS (C18 Nucléosil, T°C source = 120°C, T°C désolvation = 350°C, cône 30V) : > 99% ; masse monoisotopique calculée pour $C_9H_9N_2O_7S$ $[M-H]^- = 289.02$, observée 289.00

Rf ($CH_2Cl_2/MeOH$, 9/1) = 0,2

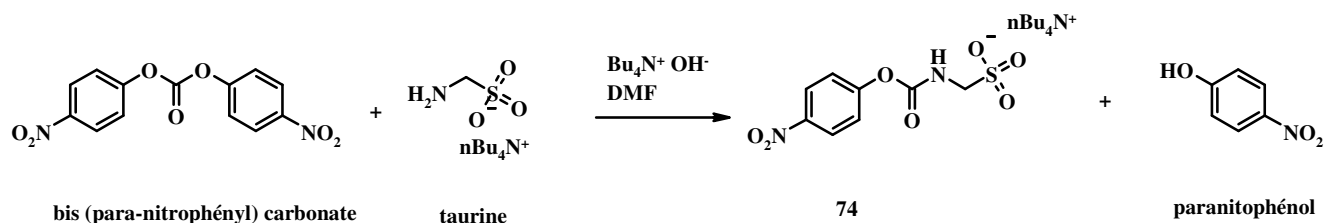
RMN ^1H (300 MHz, DMF-d7) δ ppm : 0,97 (3H, t, 7,2 Hz, CH_3 a), 1,41 (2H, sextuplet, CH_2 b), 1,77 (2H, massif, CH_2 c), 2,82 (2H, t, 6,6 Hz, CH_2 e), 3,39 (8H, massif, CH_2 d), 3,56 (2H, td, CH_2 f), 7,51 (2H, d, 9,3 Hz, CH g), 7,83 (1H, t large, NH), 7,51 (2H, d, 9,3Hz, CH g)



RMN ^{13}C (75,4 MHz, DMF-d7) δ ppm : 15,63 (C1), 22,05 (C2), 26,05 (C3), 40,71 (C6), 52,71 (C5), 60,74 (C4), 125,05 (C9), 127,61 (C10), 146,97 (C11), 155,48 (C7), 159,29 (C8)



Protocole général de la formation de 74 (Réaction de la taurine avec le bis(para-nitrophényl)carbonate (BPNPC))



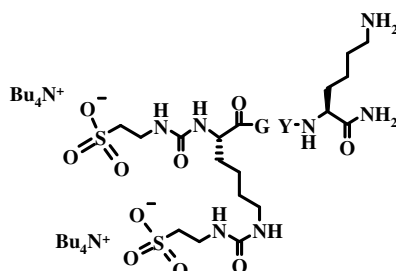
Pour préparer **74**, un excès de 2 éq de taurine par amine de la lysine a été utilisé. La taurine (1 éq) a été solubilisée dans une solution de $n\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{OH}^-$ (1 éq, 1M dans l'eau), du DMF a été rajouté sur l'ensemble pour obtenir une concentration finale en taurine de 100 mM. La solution obtenue a été ajoutée sur le BPNPC (1 éq). Au bout de 30 min, le milieu réactionnel a été analysé par RP-HPLC (C18 Nucléosil, 30°C, 0-100% de B en 30 min) afin de confirmer la formation de **74**. Ce milieu réactionnel a été utilisé sans purification intermédiaire pour le couplage sur la peptidyl-résine.

Protocole général d'acétylation des amines α et ϵ

La peptidyl-résine a été lavée avec le DMF (5 \times 2 min). Le TBTU (10 éq), solubilisé dans le minimum de DMF, a été ajouté sur l'AcOH glacial (10 éq). La DIEA (10 éq) a été ajoutée sur l'ensemble. Après une minute d'agitation, ce mélange a été ajouté sur la peptidyl-

résine. Après 1h d'agitation, la peptidyl-résine a été lavée avec le DMF (5 × 2 min). Un test TNBS a permis de mettre en évidence l'absence d'amines libres sur la résine.

Peptide 54



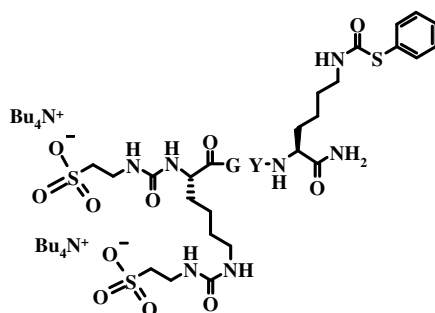
Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(*t*-Bu)K(Boc)-résine a été synthétisé manuellement sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,1 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α et ϵ . L'intermédiaire **74** (4 éq) a été préparé selon la procédure générale décrite page 268. Ce milieu réactionnel et l'Et₃N (28 μ L, 2 éq) ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Après 12h d'agitation et un test TNBS révélant la présence d'amine primaire sur la résine, un second couplage a été effectué dans les mêmes conditions. Une solution TFA/H₂O/TIS (5 mL, 95/2,5/2,5 ; v/v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 1h30. Le peptide a été précipité par d'un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (100 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Le composé a été isolé à l'aide d'une colonne Chromabond[®] C18. 40 mg de **54** ont été obtenus (Rdt = 44%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE acétate (10 min, 10 kV) : > 99% ; phosphate (10 min, 10 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₂₉H₄₉N₉O₁₃S₂ [M-H]⁻ = 794,3, observée 793,8

Peptide 55



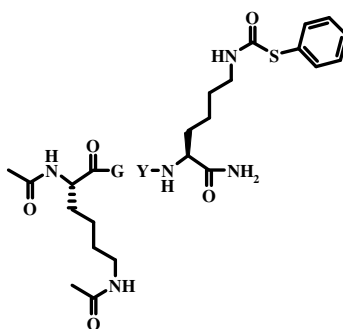
Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(*t*-Bu)K(Mtt)-résine a été synthétisé manuellement sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,1 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements

protecteurs Fmoc des amines α et ϵ . L'intermédiaire **74** (4 éq) a été préparé selon la procédure générale décrite page 268. Ce milieu réactionnel et l' Et_3N (28 μL , 2 éq) ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Après 16h d'agitation et un test TNBS révélant la présence d'amines primaires sur la résine, un second couplage a été effectué dans les mêmes conditions. Les éventuelles amines libres ont été acétylées selon le protocole décrit page 268. La déprotection du groupement Mtt a été réalisée en lavant la peptidyl-résine avec une solution de $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (19 fois, 1/99, v/v, 6 mL/lavage). La peptidyl-résine a ensuite été conditionnée dans le THF (8 \times 2 min). Le THF (4 mL), l' Et_3N (56 μL , 4 éq) et le PhSCOCl (57 μL , 4 éq) ont été ajoutés dans cet ordre sur la peptidyl-résine. Après 1h d'agitation, la peptidyl-résine a été lavée avec le THF (3 \times 2 min), puis le DMF (3 \times 2 min). Un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine. Une solution $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}/\text{thioanisole}$ (7 mL, 96,5/2,5/1, v/v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 2h. Le peptide a été précipité par d'un mélange froid d' $\text{Et}_2\text{O}/n$ -heptane (100 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Le peptide a été purifié par RP-HPLC (0-20% de B en 30 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 34 mg de **55** ont été obtenus (Rdt = 36%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : >99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{N}_9\text{O}_{14}\text{S}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^- = 930.3$, observée 929.9

Peptide 68



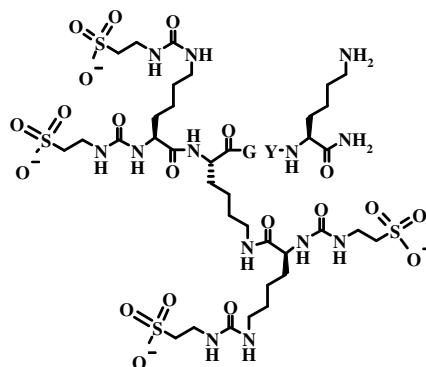
Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(*t*-Bu)K(Mtt)-résine a été synthétisé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,2 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α et ϵ . Les amines ont été acétylées selon le protocole décrit page 268. La peptidyl-résine a été séparée en 2 parties égales : la première partie a été fonctionnalisée par le PhSCOCl et la deuxième partie par le bromacétyle (cf page 287). L'élimination du groupement Mtt a été réalisée en lavant la peptidyl-résine avec une solution de $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (19 fois, 1/99, v/v, 6 mL/lavage). La peptidyl-résine a ensuite été conditionnée dans le THF (8

× 2 min). Le THF (4 mL), l'Et₃N (56 µL, 4 éq) et le PhSCl (57 µL, 4 éq) ont été ajoutés dans cet ordre sur la peptidyl-résine. Après 1h d'agitation, la peptidyl-résine a été lavée avec le THF (3× 2 min), puis le DMF (3 × 2 min). Un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine. Une solution TFA/H₂O/thioanisole (6 mL, 96,5/2,5/1 ; v/v/v) ont été mis en contact avec la résine pendant 1h45. Le peptide a été précipité par d'un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (200 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. 38 mg du peptide **68** ont été obtenus (Rdt = 53%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 97%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₃₄H₄₇N₇O₈ [M+H+Na]⁺ = 736.3, observée = 736.0

Peptide 72



Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(*t*-Bu)K(Boc)-résine a été synthétisé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,1 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α et ε. La Fmoc-K(Fmoc)-OH (8 éq) a été ajoutée manuellement selon la procédure générale décrite page 96. La taurine (733 mg, 20 éq, 50 mM) solubilisée dans une solution de *n*Bu₄N⁺ OH⁻ (1 M dans l'eau) et le CDI (324 mg, 20 éq, 50 mM) ont été dissous dans 5 mL de DMF. Au bout de 2h, la réaction a été contrôlée par CCM (CH₂Cl₂/MeOH, 6/4 et révélation à la ninhydrine). Ce milieu réactionnel et l'Et₃N (280 µL, 20 éq) ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Après 19h d'agitation et un test TNBS révélant la présence d'amine primaire sur la résine, 4 couplages ont été effectués dans les mêmes conditions. Un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine. Une solution TFA/H₂O/TIS (3 mL, 95/2,5/2,5 ; v/v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 1h30. Le peptide a été précipité par d'un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (100 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Sa purification a

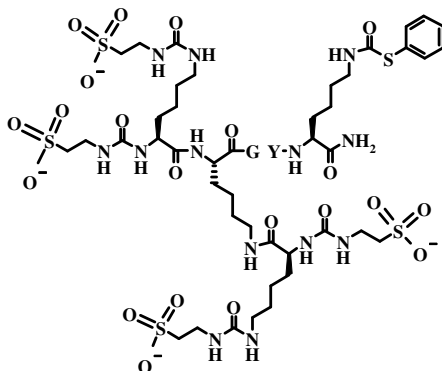
été effectuée par RP-HPLC (0-20% de B en 30 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 12 mg de 72 ont été obtenus (Rdt = 11%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE phosphate (10 min ; 10 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{47}H_{79}N_{15}O_{23}S_4$ $[M-H]^- = 1349.4$, observée 1351.1

Peptide 73



Utilisation du CDI comme agent de couplage

Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(*t*-Bu)K(Boc)-résine a été synthétisé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,1 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α et ϵ . La Fmoc-K(Fmoc)-OH (8 éq) a été ajoutée selon la procédure générale décrite page 96. La taurine (733 mg, 20 éq, 50 mM) solubilisée dans une solution de $nBu_4N^+ OH^-$ (1M dans l'eau) et le CDI (324 mg, 20 éq, 50 mM) ont été dissous dans 5 mL de DMF. Après 2h d'agitation, la réaction a été contrôlée par CCM ($CH_2Cl_2/MeOH$, 6/4 et révélation à la ninhydrine). Ce milieu réactionnel et l' Et_3N (280 μ L, 20 éq) ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Après 19h d'agitation, un test TNBS a montré la présence d'amine primaire sur la résine. 4 couplages ont été effectués dans les mêmes conditions. Un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine. La peptidyl-résine a été lavée avec du DMF (5 \times 2 min). La déprotection du groupement Mtt a été réalisée en lavant la résine avec une solution de TFA/ CH_2Cl_2 (25 fois, 1/99, v/v, 6 mL/lavage). La peptidyl-résine a ensuite été conditionnée dans le THF (8 \times 2 min). Le THF (4 mL), l' Et_3N (56 μ L, 4 éq) et le PhSCl (57 μ L, 4 éq) ont été ajoutés dans cet ordre sur la peptidyl-résine. Après 1h d'agitation, la peptidyl-résine a été lavée avec le THF (3 \times 2 min), puis le DMF (3 \times 2 min). Un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine. Une solution TFA/ H_2O /thioanisole (4,6 mL, 96,5/2,5/1, v/v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 1h30. Le peptide a été précipité par d'un mélange froid d' Et_2O/n -heptane (100 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10

min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Sa purification a été effectuée par RP-HPLC (0-20% de B en 40 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 24 mg de **73** ont été obtenus (Rdt = 16%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₅₄H₈₃N₁₅O₂₄S₅ [M-H]⁻ = 1486.7, observée 1486.9

Utilisation du BPNPC comme agent de couplage

Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(*t*-Bu)K(Boc)-résine a été synthétisé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,1 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α et ε. La Fmoc-K(Fmoc)-OH (8 éq) a été ajoutée selon la procédure générale décrite page 96. L'intermédiaire **74** (8 éq) a été préparé selon la procédure générale décrite page 268. Ce milieu réactionnel et la DIEA (66 μL, 4 éq) ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Après 19h d'agitation et un test TNBS révélant la présence d'amine primaire sur la résine, 2 couplages ont été effectués dans les mêmes conditions. Les éventuelles amines libres ont été acétylées selon le protocole décrit page 268. La déprotection du groupement Mtt a été réalisée en lavant la peptidyl-résine avec une solution de TFA/CH₂Cl₂ (20 fois, 1/99, v/v ; 6 mL/lavage). La peptidyl-résine a ensuite été conditionnée dans le THF (8 × 2 min). Le THF (4 mL), l'Et₃N (56 μL, 4 éq) et le PhSCOCl (57 μL, 4 éq) ont été ajoutés dans cet ordre sur la peptidyl-résine. Après 1h d'agitation, la peptidyl-résine a été lavée avec le THF (3 × 2 min), puis le DMF (3 × 2 min). Un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine. Une solution TFA/H₂O/thioanisole (6 mL, 96,5/2,5/1 ; v/v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 1h45. Le peptide a été précipité par d'un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (100 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Sa purification a été effectuée par RP-HPLC (0-20% de B en 40 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 24 mg du **73** ont été obtenus (Rdt = 16%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₅₄H₈₃N₁₅O₂₄S₅ [M-H]⁻ = 1486.7, observée 1487.1

Intermédiaire 75

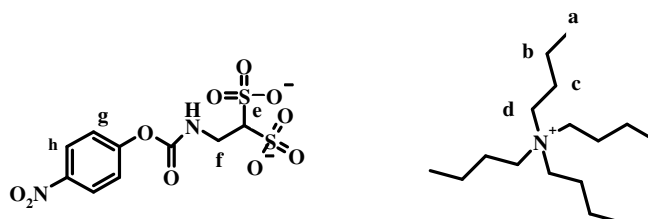
L'AAEDS (15 mg, 1 éq) a été solubilisé dans une solution de *n*Bu₄N⁺ OH⁻ (1 éq, 73 μL, 1M dans l'eau) et du CH₂Cl₂ a été ajouté sur l'ensemble pour obtenir une concentration finale de 30 mM en AAEDS. Ce mélange a été ajouté sur le BPNPC (22 mg 1 éq.). Après 1h d'agitation, la formation de **75** a été contrôlée par CCM (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1) et par RP-

HPLC. Le solvant a été évaporé à sec et le produit a été purifié par RP-HPLC (0-25% de B en 30 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 13 mg de **75** ont été obtenus (Rdt = 49%).

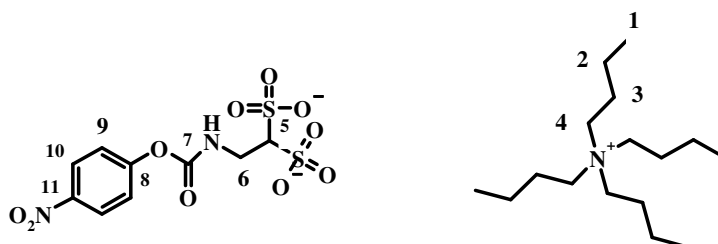
Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 91%

MALDI-TOF (DHB) masse monoisotopique calculée pour $C_9H_8N_2O_{10}S_2$ $[M-H]^- = 368.9$, observée 368.6

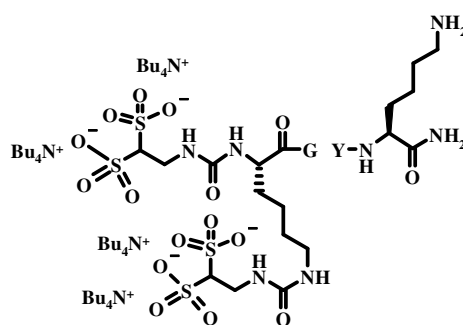
RMN 1H (300 MHz, DMF-d7) δ ppm : 0,97 (3H, t, 7,2 Hz, CH_3 a), 1,42 (2H, sextuplet, CH_2 b), 1,77 (2H, massif, CH_2 c), 3,39 (8H, massif, CH_2 d), 3,78 (1H, t, 6 Hz, CH e), 3,96 (2H, td, CH_2 f), 7,52 (2H, d, 9,3 Hz, CH g), 7,61 (1H, massif large, NH), 8,32 (2H, d, 9,3Hz, CH g)



RMN ^{13}C (75,4 MHz, DMF-d7) δ ppm : 15,62 (C1), 22,03 (C2), 26,03 (C3), 43,93 (C6), 60,71 (C4), 125,05 (C9), 127,52 (C10), 146,97 (C11), 155,47 (C7), 159,29 (C8)



Peptide 77



Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(*t*-Bu)K(Boc)-résine a été synthétisé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,1 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α et ϵ . L'intermédiaire **75** (4 éq) a été préparé selon la procédure générale décrite page 273. Ce milieu réactionnel et l' Et_3N (28 μ L, 2 éq) ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Deux autres couplages ont été effectués dans les mêmes conditions. Une solution

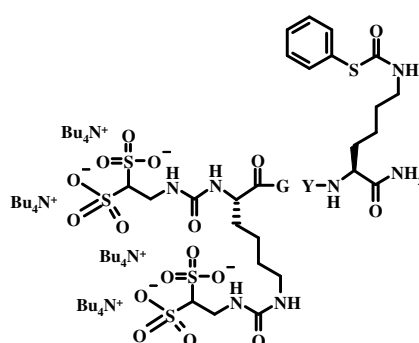
TFA/H₂O/TIS (3 mL, 95/2,5/2,5 ; v/v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 1h30. Le peptide a été précipité par d'un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (100 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Sa purification a été effectuée par RP-HPLC (0-20% de tampon B en 30 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 11 mg de 77 ont été obtenus (Rdt = 10%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE phosphate (10 min, 10 kV) : 95%; citrate (15 min, 15 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₂₉H₄₉N₉O₁₉S₄ [M-H]⁻ = 954.2, observée 953.3

Peptide 78

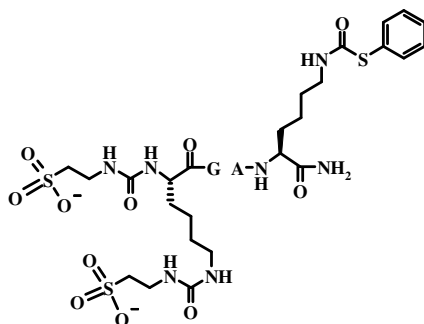


Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(*t*-Bu)K(Mtt)-résine a été synthétisé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,1 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α et ε. L'intermédiaire 75 (4 éq) a été préparé selon la procédure générale décrite page 273. L'Et₃N (28 μL, 2 éq) et ce milieu réactionnel ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. 5 couplages ont été effectués dans les mêmes conditions. Les éventuelles amines libres ont été acétylées selon le protocole décrit page 268. Une solution TFA/H₂O/thioanisole (6 mL, 96,5/2,5/1 ; v/v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 1h45. Pour le fonctionnaliser en solution, le peptide 77 (73 mg, 25 mM) a été dissous dans le DMF, l'Et₃N (38 μL, 4 éq) puis le PhSCl (39 μL, 4 éq) ont été ajoutés. Après 30 min d'agitation, le peptide a été précipité dans l'Et₂O, centrifugé, lavé à l'Et₂O (2 fois). Il a été purifié directement par RP-HPLC (0-20% de B en 40 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 32 mg de 78 ont été obtenus (Rdt = 43%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₃₆H₅₃N₉O₂₀S₅ [M-H]⁻ = 1090.2, observée 1090.1

Peptide 81



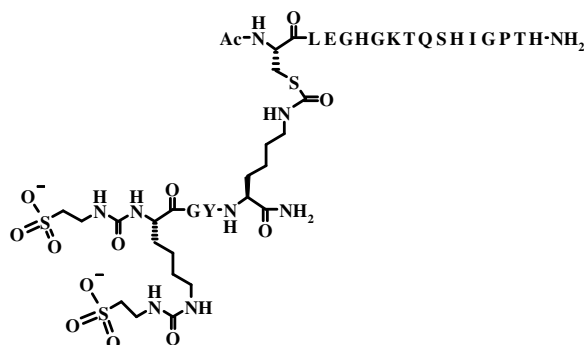
Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GAK(Mtt)-résine a été synthétisé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,2 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α et ϵ . L'intermédiaire **74** (4 éq) a été préparé selon la procédure générale décrite page 273. L'Et₃N (112 μ L, 4 éq) et ce milieu réactionnel ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Un second couplage a été effectué dans les mêmes conditions. Les éventuelles amines libres ont été acétylées selon le protocole décrit page 268. La peptidyl-résine a été séparée en 2 parties égales : la première partie a été fonctionnalisée par le PhSCl et la deuxième partie par le bromacétyle (cf page 287). La déprotection du groupement Mtt a été réalisée en lavant la peptidyl-résine avec une solution de TFA/CH₂Cl₂ (19 fois, 1/99, v/v, 6 mL/lavage). La peptidyl-résine a ensuite été conditionnée dans le THF (8 \times 2 min). Le THF (4 mL), l'Et₃N (56 μ L, 4 éq) et le PhSCl (57 μ L, 4 éq) ont été ajoutés dans cet ordre sur la peptidyl-résine. Après 1h d'agitation, la peptidyl-résine a été lavée avec le THF (3 \times 2 min), puis le DMF (3 \times 2 min). Un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine. Une solution TFA/H₂O/thioanisole (5,5 mL, 96,5/2,5/1, v/v/v) ont été mis en contact avec la résine pendant 1h45. Le peptide a été précipité par d'un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (200 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Sa purification a été effectuée par RP-HPLC préparative (0-25% de B en 40 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 32 mg du peptide **81** ont été obtenus (Rdt = 39%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₃₀H₄₉N₉O₁₃S₃ [M-H]⁻ = 838.2, observée 837.4

2.3°) Synthèse des conjugués

Peptide 65



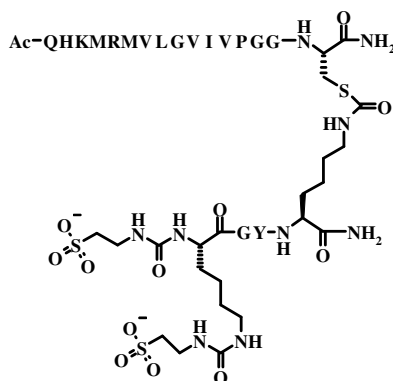
La ligation entre le peptide **55** (1 éq, 3,6 mg) et le peptide **62** (1 éq, 8,3 mg) a été effectuée selon le protocole général page 263. Après 16h d'agitation, le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC (0-10% de B en 5 min, 10-30% de B en 60 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min, température ambiante). 8 mg de **65** ont été obtenus (Rdt = 70%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE phosphate (10 min, 10 kV) : 92,6% ; borate (10 min, 15 kV) : 94,2%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{103}H_{160}N_{34}O_{37}S_3$ $[M-H]^- = 2560.0$, observée 2559.8

Peptide 66



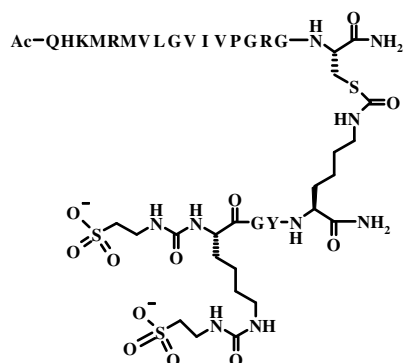
La ligation entre le peptide **55** (1 éq, 4,8 mg) et le peptide **63** (1 éq, 11,0 mg) a été effectuée selon le protocole général page 263. Après 20h d'agitation, le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC (0-20% de B en 10 min, 20-40% de B en 40 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 6 mg de **66** ont été obtenus (Rdt = 40%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 96%

CZE phosphate (10 min, 10 kV) : 95,6% ; borate (10 min, 15 kV) : 84%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{106}H_{177}N_{33}O_{32}S_5$ $[M-H]^- = 2583.2$, observée 2582.9

Peptide 67



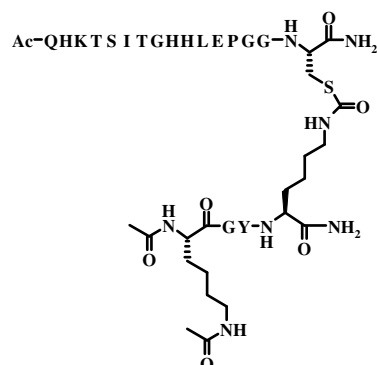
La ligation entre le peptide **55** (1 éq, 4,9 mg) et le peptide **64** (1 éq, 12,4 mg) a été effectuée selon le protocole général page 263. Après 20h d'agitation, le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC (0-20% de B en 10 min, 20-40% de B en 40 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 4 mg de **67** ont été obtenus (Rdt = 25%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (15 min, 15 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₁₁₂H₁₈₉N₃₇O₃₃S₅, [M-H]⁻ = 2739.3, observée 2738.7

Peptide 69



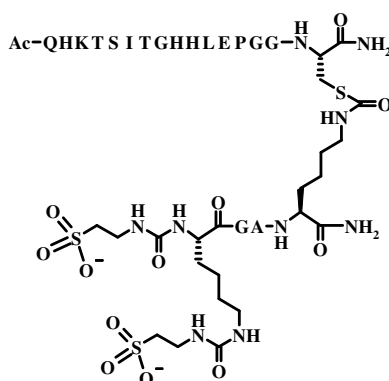
La ligation entre le peptide **68** (1 éq, 3,7 mg) et le peptide **46** (1 éq, 11,1 mg) a été effectuée selon le protocole général page 263. Après 20h d'agitation, le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC (0-10% de B en 10 min, 10-40% de B en 100 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 3,4 mg de **69** ont été obtenus (Rdt = 25%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE acétate (10 min, 10 kV): > 99%; citrate (15 min, 15 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₁₀₁H₁₅₆N₃₂O₃₁S [M+H]⁺ = 2346.1, observée 2346.2

Peptide 82



La ligation entre le peptide **81** (1 éq, 4,3 mg) et le peptide **46** (1 éq, 11,2 mg) a été effectuée selon le protocole général page 263. Après 23h d'agitation, le peptide a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC (0-10% de B en 5 min, 10-40% de B en 100 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 9 mg de **82** ont été obtenus (Rdt = 60%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE borate (10 min, 15 kV) : > 99% ; phosphate (10 min, 10 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₉₇H₁₅₆N₃₄O₃₆S₃ [M-H]⁻ = 2468.0, observée 2469.4

3°) Synthèse de la troisième série de conjugués par ligation thiocarbamate

3.1°) Synthèse des cystéinyl-peptides 83 à 85

Protocole général du couplage de la Fmoc-K(Biot)-OH

La peptidyl-résine a été lavée avec le NMP (5 × 2 min). La Fmoc-K-(Biot)-OH (1,5 éq) et le TBTU (0,95 éq) ont été solubilisés dans le NMP. La DIEA (3 éq) a été ajoutée sur le TBTU et le tout a été additionné sur la Fmoc-K-(Biot)-OH. Après une minute d'agitation, ce mélange a été ajouté sur la peptidyl-résine placée dans un réacteur équipé d'un fritté. Après 2h d'agitation, la peptidyl-résine a été lavée avec le NMP (5 × 2 min). Un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine.

Protocole général de synthèse des peptides 83 à 85

Les peptides ont été synthétisés sur le synthétiseur de peptides Intavis sur une résine NovaSyn TGR[®] (20 μmol, 0,2 mmol/g). La peptidyl-résine a été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer le groupement protecteur Fmoc de l'amine α. Un mélange de Fmoc-K(Biot)-OH (1,5 éq), TBTU (0,95 éq) et de DIEA (3 éq) dans le NMP a

permis de coupler la lysine biotinyllée selon le protocole page 280. La peptidyl-résine a été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer le groupement Fmoc protecteur de l'amine α . Cette dernière a été acétylée selon le protocole décrit page 268. Une solution TFA/H₂O/EDT/TIS/Thioanisole (2 mL, 90/2,5/2,5/2,5/2,5; v/v/v/v/v) a été mise en contact avec la peptidyl-résine pendant 2h. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (20 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé.

Peptide 83 : Ac-K(Biot)GGC-NH₂

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 82%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₂₅H₄₂N₈O₇S₂ [M+H]⁺ = 631.2, observée 631.0

Peptide 84 : Ac-K(Biot)PGGC-NH₂

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 93%.

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₃₀H₄₉N₉O₈S₂Na [M+H]⁺ = 750.3, observée 750.1

Peptide 85 : Ac-K(Biot)EPGGC-NH₂

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 92%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₃₅H₅₆N₁₀O₁₁S₂Na [M+H]⁺ = 879.2, observée 879.3

Peptide 86 : Ac-K(Biot)LEPGGC-NH₂

Même protocole de synthèse que celui des peptides 83 à 85. Synthèse sur 10 μ mol.

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 87%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₄₁H₆₇N₁₁O₁₂S₂Na [M+H]⁺ = 992.3, observée 992.4

Peptide 87 : Ac-K(Biot)HLEPGGC-NH₂

Le peptide Fmoc-H(Trt)LE(*Or*-Bu)PGGC(Trt)-résine a été synthétisé sur le synthétiseur de peptides Intavis sur une résine NovaSyn TGR[®] (5 μ mol, 0,2 mmol/g). La peptidyl-résine a été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer le groupement protecteur Fmoc de l'amine α . Un mélange de Fmoc-K(Biot)-OH (1,5 éq), TBTU (0,95 éq) et de DIEA (3 éq) dans le NMP a permis de coupler la lysine biotinyllée selon le protocole page 280. La peptidyl-résine a été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer le groupement protecteur Fmoc de l'amine α , qui a été acétylée selon le protocole décrit page 268. Une solution

TFA/H₂O/EDT/TIS/Thioanisole (600 µL, 90/2,5/2,5/2,5/2,5; v/v/v/v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 2h. Le peptide a été précipité dans un mélange froid *t*-butylméthyl éther/*n*-heptane (5 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), et lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé.

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 83%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₄₇H₇₄N₁₄O₁₃S₂ [M+H]⁺ = 1107.5, observée 1107.4

Peptide 88 : Ac-K(Biot)HHLEPGGC-NH₂

Même mode opératoire que le peptide 87.

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 91%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₅₃H₈₁N₁₇O₁₄S₂ [M+H]⁺ = 1244.6, observée 1244.3

Le peptide Fmoc-H(Trt)H(Trt)LE(O*t*-Bu)PGGC(Trt)-résine a été synthétisé sur le synthétiseur de peptides Intavis sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,05 mmol, 0,2 mmol/g). La suite du protocole est identique mis à part la précipitation qui a eu lieu dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (50 mL, 1/1 ; v/v). 28 mg de 88 ont été obtenus (Rdt = 38%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 90%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₅₃H₈₁N₁₇O₁₄S₂ [M+H]⁺ = 1244.6, observée 1244.6

3.2°) Synthèse des conjugués de la troisième série

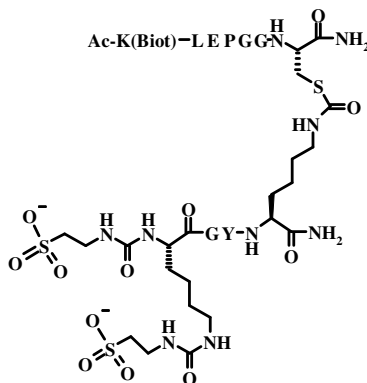
Protocole général de ligation thiocarbamate des conjugués de la troisième série

La ligation entre le peptide sulfonaté 55 ou 78 (1 éq) et les cystéinyl-peptides 83 à 88 (1 éq, 10 mM) a été réalisée dans un tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH = 7,5) contenant 10 mM en TCEP. Après 32h d'agitation, le peptide a été purifié à l'aide d'une colonne Sep-Pak[®] C18. La colonne a été conditionnée avec le tampon B (3 × 1 mL) puis avec le tampon A (5 × 1 mL). Le milieu réactionnel a été déposé sur la colonne Sep-Pak[®] C18. Cette dernière a été lavée avec le tampon A (1 × 1 mL), puis avec le tampon B (3 × 1 mL). Cette dernière fraction a été congelée et lyophilisée afin d'obtenir le conjugué sulfonaté sur forme d'une poudre blanche. Après lyophilisation, il a été repris dans l'eau désionisée (10 mM) puis il a été adsorbé directement sur le support biopuce.

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 81%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{65}H_{101}N_{19}O_{25}S_4$ $[M+H]^+ = 1674.6$,
observée 1674.8

Peptide 95

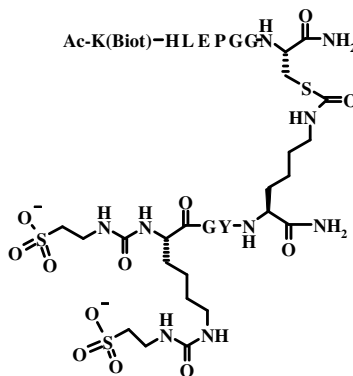


Quantités : 55 (1,2 mg), 86 (1,3 mg).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 79%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{71}H_{112}N_{20}O_{26}S_4$ $[M+H]^+ = 1787.7$,
observée 1787.6

Peptide 97

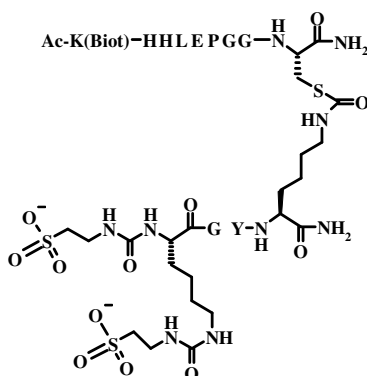


Quantités : 55 (1,1 mg), 87 (1,5 mg).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 77%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{77}H_{119}N_{23}O_{27}S_4$ $[M+H]^+ = 1924.7$,
observée 1925.3

Peptide 99



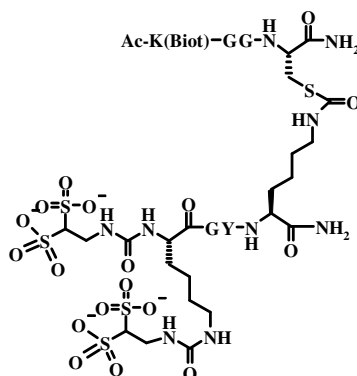
Quantités : 55 (0,4 mg), 88 (0,7 mg).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 81%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₈₃H₁₂₆N₂₆O₂₈S₄ [M+H]⁻ = 2061.8, observée 2062.9

3.2.2°) Ligations avec le peptide 78

Peptide 90

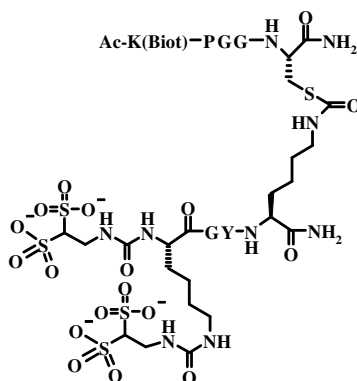


Quantités : 78 (1,9 mg), 83 (1,1 mg).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 90%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₅₅H₈₉N₁₇O₂₇S₆ [M+H]⁻ = 1610.4, observée 1609.9

Peptide 92

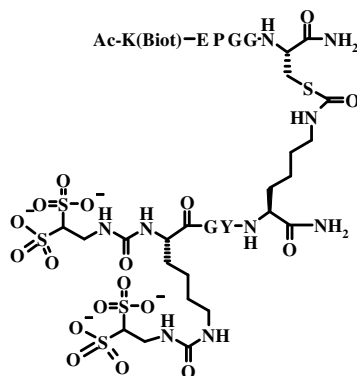


Quantités : **78** (1,6 mg), **84** (1,2 mg).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 88%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₆₀H₉₆N₁₈O₂₈S₆ [M+H]⁻ = 1707.4,
observée 1705.8

Peptide 94

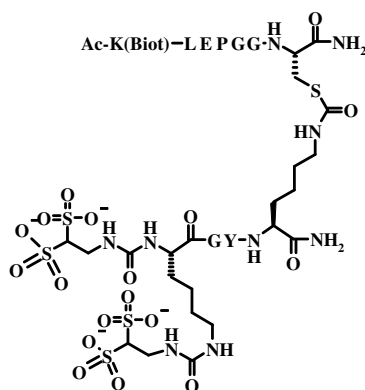


Quantités : **78** (1,7 mg), **85** (1,3 mg)

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 97%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₆₅H₁₀₃N₁₉O₃₁S₆ [M+H]⁻ = 1836.5,
observée 1835.7

Peptide 96

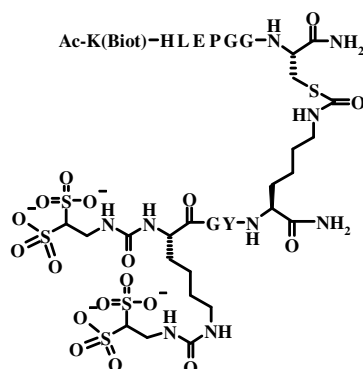


Quantités : **78** (1,4 mg), **86** (1,2 mg)

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 92%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₇₁H₁₁₄N₂₀O₃₂S₆ [M+H]⁻ = 1949.6,
observée 1949.5

Peptide 98

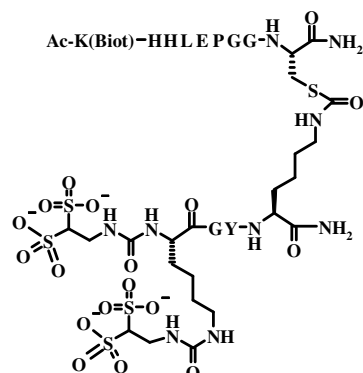


Quantités : 78 (1,1 mg), 87 (1,2 mg)

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 71%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₇₇H₁₂₁N₂₃O₃₃S₆ [M+H]⁺ = 2086.6, observée 2085.3

Peptide 100



Quantités : 78 (0,5 mg), 88 (0,7 mg)

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 87%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₈₃H₁₂₈N₂₆O₃₄S₆ [M+H]⁺ = 2223.7, observée 2222.8

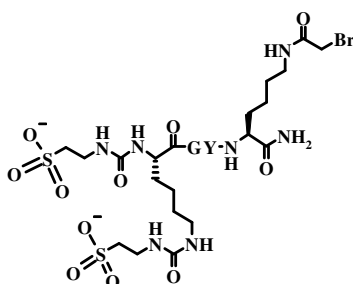
4°) Synthèse de la quatrième série de conjugués par ligation thioéther

4.1°) Synthèse des peptides sulfonates

Couplage du bromoacétyle sur l'amine ε de K2

L'acide bromoacétique (10 éq) et le PyBrop (10 éq) ont été dissous dans un minimum de DMF. L'acide, le PyBrop et la DIEA (30 éq) ont été ajoutés dans cet ordre sur la peptidyl-résine. Après 1h de réaction sous agitation et des lavages au DMF (5 × 2 min), un test TNBS a montré l'absence d'amine primaire sur la résine.

Peptide 103

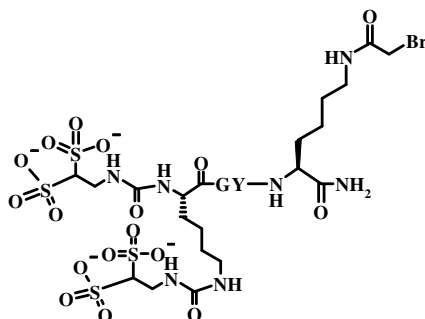


Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(*t*-Bu)K(Mtt)-résine a été synthétisé manuellement sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,1 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer le groupement protecteur Fmoc des amines α et ϵ . L'intermédiaire **74** (4 éq) a été préparé selon la procédure générale décrite page 268. Ce milieu réactionnel et l'Et₃N (112 μ L, 4 éq) ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Un test TNBS a montré la présence d'amine primaire sur la résine et un second couplage a été effectué dans les mêmes conditions. Les éventuelles amines restantes ont été acétylées selon le protocole décrit page 1268. La déprotection du groupement Mtt a été réalisée en lavant 19 fois la résine à l'aide d'une solution de TFA/CH₂Cl₂ (1/99, v/v, 6 mL par lavage). Le bromoacétyle a été couplé sur l'amine selon le protocole décrit page 287. Une solution TFA/Anisole (5 mL, 10 mL/200 μ L ; v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 2H. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (100 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. 64,7 mg du peptide **103** ont été obtenus (R = 88%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 90%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₃₁H₄₈BrN₉O₁₄S₂ [M-H]⁻ = 913.8, observée 913.8

Peptide 104



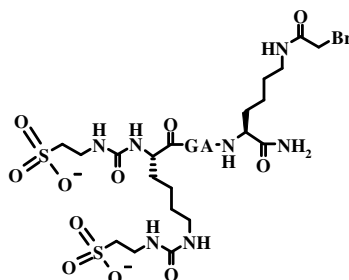
Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(*t*-Bu)K(Mtt)-résine a été synthétisé manuellement sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,05 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer le groupement protecteur Fmoc des amines α et ϵ . L'intermédiaire **75** (4 éq) a été préparé selon la procédure générale décrite

page 273. Ce milieu réactionnel et l'Et₃N (112 µL, 4 éq) ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Un test TNBS a montré la présence d'amine primaire sur la résine et deux autres couplages ont été effectués dans les mêmes conditions. Les éventuelles amines restantes ont été acétylées selon le protocole décrit page 268. La déprotection du groupement Mtt a été réalisée en lavant 16 fois la résine à l'aide d'une solution de TFA/CH₂Cl₂ (2/98, v/v, 3 mL par lavage). Le bromoacétyle a été couplé sur l'amine selon le protocole décrit page 287. Une solution TFA/Anisole (3,5 mL, 10 mL/200µL ; v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 2H. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (50 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Il a été purifié par RP-HPLC (0-15% de B en 30 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 4,85 mg du peptide **104** ont été obtenus (R = 9%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 82%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₃₁H₅₀BrN₉O₂₀S₄ [M-H]⁻ = 1073.9, observée 1074.0

Peptide 105



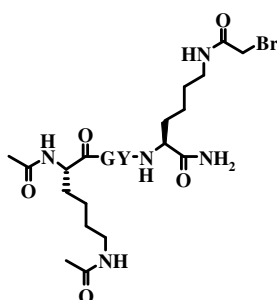
Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GAK(Mtt)-résine a été synthétisé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,2 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer le groupement protecteur Fmoc des amines α et ε. Ce milieu réactionnel et l'Et₃N (112 µL, 4 éq) ont été ajoutés sur la peptidyl-résine. Un test TNBS a montré la présence d'amine primaire sur la résine et un second couplage a été effectué dans les mêmes conditions. Les éventuelles amines restantes ont été acétylées selon le protocole décrit page 268. La peptidyl-résine a été séparée en 2 parties égales : la première partie a été fonctionnalisée par le PhSCOCl (peptide 81) et la deuxième partie par le bromoacétyle en solution selon le protocole général décrit page 287. Une solution TFA/H₂O/TIS (5 mL, 95/2,5/2,5 ; v/v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 2H. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (200 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans l'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Après précipitation et lyophilisation, le peptide a été purifié par RP-HPLC préparative (0-25%

de B en 40 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). L'acide bromoacétique (13,6 mg, 10 éq), le PyBrop (45,7 mg, 10 éq) ont été dissous chacun dans 650 µL de DMF. Ils ont été ajoutés sur le peptide non fonctionnalisé (7,9 mg, 1 éq, 10 mM) ainsi que la DIEA (32,4 µL, 20 éq). Après 2H d'agitation, le peptide a été précipité dans l'Et₂O froid (25 mL), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé 2 fois à l'Et₂O froid. Le peptide a été purifié sur une colonne Chromabond[®] C18. 7,62 mg du peptide **105** ont été obtenus (R = 95%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 84%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₂₅H₄₄BrN₉O₁₃S₂ [M-H]⁻ = 821.7, observée 822.2

Peptide 106



Le peptide Fmoc-K(Fmoc)GY(*t*-Bu)K(Mtt)-résine a été synthétisé sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,2 mmol, 0,25 mmol/g). La peptidyl-résine a ensuite été traitée avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF afin d'éliminer les groupements protecteurs Fmoc des amines α et ε. Les amines ont été acétylées. La peptidyl-résine a été séparée en 2 parties égales : la première partie a été fonctionnalisée par le PhSCOCl et la deuxième partie par le bromoacétyle selon le protocole décrit page 287. Une solution TFA/H₂O/TIS (5 mL, 95/2,5/2,5 ; v/v/v) a été mise en contact avec la résine pendant 2H. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (200 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans un minimum d'eau désionisée, congelé et lyophilisé.

L'acide bromoacétique (9,5 mg, 4 éq), le PyBrop (31,7 mg, 4 éq) ont été dissous chacun dans 1 mL de DMF. Ils ont été ajoutés sur le peptide non fonctionnalisé (11,7 mg, 1 éq, 10 mM) ainsi que la DIEA (11,2 µL, 4 éq). Après 2H d'agitation, le peptide a été précipité dans 25 mL d'Et₂O froid, centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé 2 fois à l'Et₂O froid. Il a été purifié par RP-HPLC (0-20% de B en 40 min, C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min). 2,07 mg du peptide **106** ont été obtenus (R = 18%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

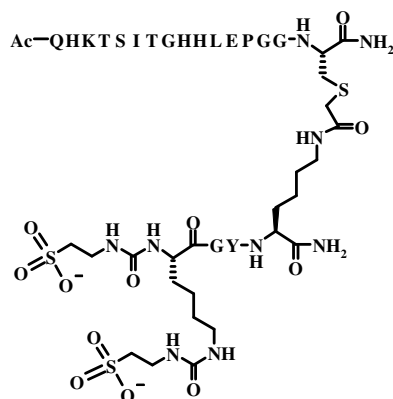
MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₂₉H₄₄BrN₇O₈ [M-H]⁻ = 697.6, observée 697.9

4.2°) Synthèse des conjugués de la quatrième série

Protocole général de la ligation thioéther

La ligation entre les peptides sulfonates **103** à **106** (1,2 éq) et les cystéinyl-peptides (1 éq, 10 mM) a été effectuée dans un tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH 7,5) sous agitation et sous argon. Le conjugué a été isolé du milieu réactionnel par RP-HPLC préparative (C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min).

Peptide 107

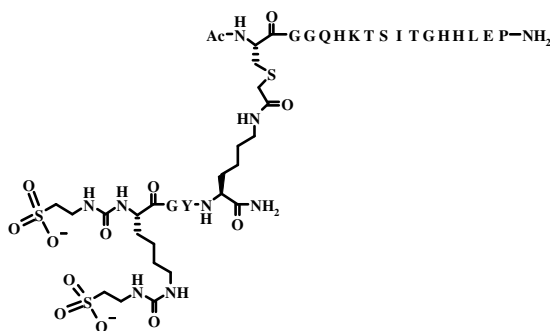


Quantités : **103** (7,82 mg), **46** (15,35 mg), Purification : 0-10% de B en 5 min, 10-30% de B en 40 min, 6 mg de **107** ont été obtenus (Rdt = 52%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{104}H_{162}N_{34}O_{37}S_3$ $[M-H]^- = 2574.1$, observée 2573.6

Peptide 108

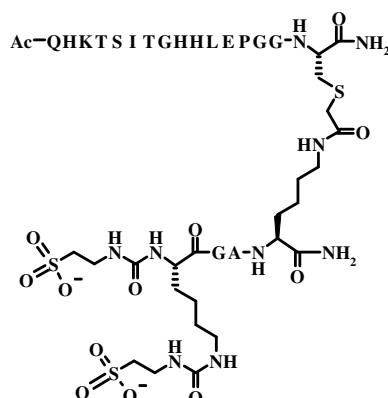


Quantités : **103** (5,16 mg), **45** (10,04 mg), Purification : 0-10% de B en 5 min, 10-30% de B en 40 min, 7,4 mg de **108** ont été obtenus (Rdt = 54%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{104}H_{162}N_{34}O_{37}S_3$ $[M-H]^- = 2574.1$, observée 2573.9

Peptide 109

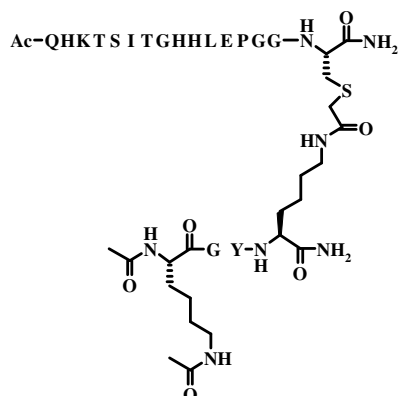


Quantités : **105** (6,06 mg), **46** (8,2 mg), Purification : 0-10% de B en 5 min, 10-30% de B en 40 min, 3,6 mg de **109** ont été obtenus (Rdt = 34%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 98%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₁₀₄H₁₆₂N₃₄O₃₇S₃ [M-H]⁻ = 2483.7, observée 2483.7

Peptide 110

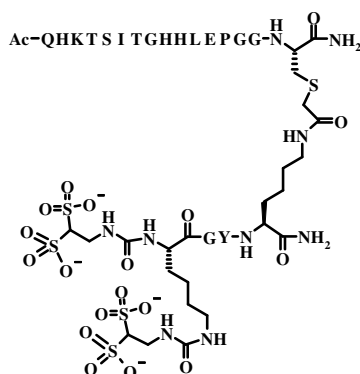


Quantités : **106** (6,06 mg), **46** (8,2 mg), Purification : 0-10% de B en 5 min, 10-30% de B en 30 min, 3,5 mg de **110** ont été obtenus (Rdt = 42%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₁₀₂H₁₅₈N₃₂O₃₁S [M-H]⁻ = 2360.1, observée 2360.0

Peptide 111



Quantités : **104** (5,57 mg), **46** (7,60 mg), Purification : 0-10% de B en 5 min, 10-30% de B en 60 min, 5,7 mg de **111** ont été obtenus (Rdt = 52%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

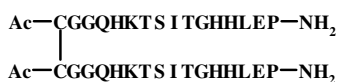
MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₁₀₄H₁₆₀N₃₄O₄₃S₅ [M-H]⁻ = 2731.9, observée 2731.6

5°) Synthèse de la cinquième série de composés

5.1°) Synthèse des disulfures 112 à 117

Les cystéinyl-peptides **45** à **50** (1 mM) ont été mis en solution dans un tampon bicarbonate de sodium (50 mM, pH = 8,5). A l'issue de la réaction, le disulfure a été isolé par RP-HPLC préparative (C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min) selon un gradient selon les cas.

Peptide 112



Purification : 0-10% de B en 10 min, 10-40% en 50 min

11,4 mg de **112** ont été obtenus (R = 36%)

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 97,4%

CZE citrate (10 min, 20 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour C₁₄₆H₂₂₈N₅₀O₄₆S₂ [M+H]⁺ = 3482.6, observée 3482.8

Peptide 113



Purification : 0-10% de B en 10 min, 10-40% en 50 min

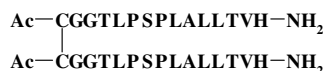
9,76 mg de **113** ont été obtenus (R = 26%)

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 97%

CZE citrate (10 min, 20 kV) : 96%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{146}H_{228}N_{50}O_{46}S_2$ $[M+H]^+ = 3482.6$, observée 3483.0

Peptide 114



Purification : 0-30% de B en 10 min, 30-60% en 50 min

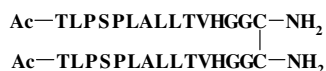
6,25 mg de **114** ont été obtenus (R = 26%)

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (10 min, 20 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{136}H_{226}N_{36}O_{38}S_2$ $[M+H]^+ = 3036.6$, observée 3036.7

Peptide 115



Purification : 0-30% de B en 10 min, 30-60% en 60 min

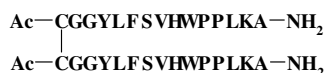
4,73 mg de **115** ont été obtenus (R = 19%)

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (10 min, 20 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{136}H_{226}N_{36}O_{38}S_2$ $[M+H]^+ = 3036.6$, observée 3036.6

Peptide 116



Purification : 0-30% de B en 10 min, 30-60% en 30 min

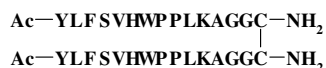
7,53 mg de **116** ont été obtenus (R = 26%)

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 94%

CZE phosphate (10 min, 20 kV) : 95%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{166}H_{234}N_{40}O_{36}S_2$ $[M+H]^+ = 3428.7$, observée 3429.1

Peptide 117



Purification : 0-30% de B en 10 min, 30-60% en 30 min

9 mg de **117** ont été obtenus (R = 33%)

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 97%

CZE phosphate (10 min, 20 kV) : 97%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{166}H_{234}N_{40}O_{36}S_2$ $[M+H]^+ = 3428.7$, observée 3428.0

5.2°) Synthèse des séryl-peptides

Les peptides ont été synthétisés à l'aide du synthétiseur de peptides Intavis sur une résine NovaSyn TGR[®] (0,05 mmoles, 0,2 mmol/g). Une solution TFA/H₂O/TIS (5 mL, 95/2,5/2,5; v/v/v) ont été mis en contact avec la résine pendant 1h45. Le peptide a été précipité dans un mélange froid d'Et₂O/*n*-heptane (50 mL, 1/1 ; v/v), centrifugé (3500 trs/min, 10 min, 4°C), lavé (2 fois), repris dans un minimum d'eau désionisée, congelé et lyophilisé. Le peptide a été purifié par RP-HPLC préparative (C18 Nucléosil, 215 nm, 6 mL/min, 0-30% de B en 5 min, 30-50% de B en 40 min).

Peptide 118: Ac-SGGQHKTSITGHHLEP-NH₂

13 mg de **118** ont été obtenus (R = 36%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (10 min, 20 kV) : 63%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{73}H_{115}N_{25}O_{24}$ $[M+H]^+ = 1726.8$, observée 1726.5

Peptide 119 : Ac-QHKTSITGHHLEPGGS-NH₂

27 mg de **119** ont été obtenus (R = 25%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (10 min, 20 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{73}H_{115}N_{25}O_{24}$ $[M+H]^+ = 1726.8$, observée 1726.8

Peptide 120 : Ac-SGGTLPSPLALLTVH-NH₂

15 mg de **120** ont été obtenus (R = 19%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (10 min, 20 kV) : 97%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{68}H_{114}N_{18}O_{20}$ $[M+H]^+ = 1503.8$, observée 1503.8

Peptide 121 : Ac-TLPSPLALLTVHGGGS-NH₂

4 mg de **121** ont été obtenus (R = 5%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE citrate (10 min, 20 kV): > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{68}H_{114}N_{18}O_{20}$ $[M+H]^+ = 1503.8$,
observée 1503.8

Peptide 122 : Ac-SGGYLFSVHWPPLKA-NH₂

11,5 mg de **122** ont été obtenus (R = 12%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : 97%

CZE phosphate (10 min, 20 kV) : 98,7%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{83}H_{118}N_{20}O_{19}$ $[M+H]^+ = 1699.9$,
observée 1700.0

Peptide 123 : Ac-YLFSVHWPPLKAGGS-NH₂

12 mg de **123** ont été obtenus (R = 13%).

Pureté RP-HPLC (0-100% de B en 30 min, 30°C, C18 Nucléosil) : > 99%

CZE phosphate (10 min, 20 kV) : > 99%

MALDI-TOF masse monoisotopique calculée pour $C_{83}H_{118}N_{20}O_{19}$ $[M+H]^+ = 1699.9$,
observée 1699.9

CONCLUSION

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit s'articule autour de deux chapitres portant, sur la mise au point de nouvelles méthodologies de ligation peptidique d'une part, et, d'autre part, sur les applications de ces méthodes de ligation à la synthèse d'inhibiteurs extracellulaires de la signalisation HGF/SF-MET.

Dans la première partie de notre travail, l'objectif a été la mise au point de deux méthodes de ligation complémentaires de celles existantes et faisant intervenir des dérivés soufrés : la ligation thiocarbamate et la ligation azaGly.

La première stratégie de ligation permet de former de manière rapide et chimiosélective un lien alkylthiocarbamate entre un cystéinyl-peptide et un peptide phénylthiocarbamate. A l'occasion de ce travail, nous avons mis au point la synthèse de peptides phénylthiocarbamate sur support solide ainsi que les conditions expérimentales de la ligation thiocarbamate, qui sont proches des conditions de la ligation native. Des expériences complémentaires (RMN, essais de dimérisation et d'alkylation du peptide final) nous ont ensuite permis de prouver la formation, au point de jonction des deux peptides, d'un lien alkylthiocarbamate et non d'un lien urée, comme nous le pressentions au départ du projet. Différents types de peptides ont été préparés grâce à cette méthode de ligation : un cyclopeptide, dont les propriétés pharmacologiques peuvent être meilleures que le peptide bioactif linéaire correspondant, et des MAPs di- et tétravalents, qui sont des dendrimères ramifiés de lysines qui présentent un nombre plus ou moins important de copies d'un peptide et qui peuvent être utilisés, entre autres pour générer des anticorps dirigés contre les peptides qui y sont greffés.

La seconde méthode de ligation, nommée ligation azaGly, permet la formation d'azapeptides, qui sont des analogues peptidiques dans lesquels le carbone α d'un ou plusieurs résidu(s) est remplacé par un atome d'azote. Cette modification permet d'améliorer la sélectivité du peptide ainsi que ses propriétés pharmacocinétiques (absorption, transport, distribution et stabilité). La réaction se déroule dans un mélange de solvant organique et de tampon aqueux en présence d'argent afin d'activer le groupement alkyl- ou arylthiocarbonyle. Deux voies de synthèse ont été étudiées :

* la première fait intervenir un peptide thioester et un hydrazinocarbonyl-peptide. Cette stratégie s'est avérée très efficace mais nous avons constaté une racémisation au point de jonction de la ligation, notamment au niveau de l'alanine voisine de l'azaGly ;

* la seconde passe par l'utilisation d'un peptide hydrazide et un peptide phénylthiocarbamate. Dans cette seconde voie de synthèse, la réaction s'est déroulée de manière très efficace mais cette fois-ci, aucune racémisation n'a été observée.

Nous avons abouti à la mise au point de deux méthodes de ligation suffisamment fiables et efficaces pour envisager, par la suite, de les appliquer à la préparation de peptides potentiellement bioactifs.

Dans la seconde partie du travail, nous avons appliqué la ligation thiocarbamate à un projet se situant à l'interface entre la chimie et la biologie en visant le RTK MET et son ligand, l'HGF/SF, cibles de choix d'une thérapie anticancéreuse. La dérégulation de la signalisation HGF/SF-MET conduit à la progression tumorale (carcinomes, sarcomes,...), notamment en favorisant l'invasion et la métastase. Nous nous sommes basés sur la capacité de liaison de l'héparine et des héparanes sulfates à l'HGF/SF et à MET. Nous avons envisagé la préparation d'une chimiothèque de peptides sulfonates obtenus par ligation thiocarbamate et thioéther entre des cystéinyl-peptides affins pour le domaine extracellulaire de MET et des peptides sulfonates, dendrimères de lysines mimes des chaînes hautement sulfatées des héparanes sulfates. Grâce à la possibilité d'effectuer rapidement des tests d'interaction au format biopuce entre la protéine chimérique MET-Fc et les peptides synthétisés par ligation, nous avons été en mesure de classer les peptides en fonction de leur capacité d'interaction avec le domaine extracellulaire de MET, puis la séquence minimale impliquée. A chaque résultat obtenu par biopuces, il a été possible de procéder à de nouvelles synthèses de peptides potentiellement plus affins pour le domaine extracellulaire de MET et, par la suite, d'augmenter nos chances d'accéder à un peptide bioactif. Il nous a paru indispensable ensuite de procéder à des tests d'activité biologiques (test de cytotoxicité, d'activité kinase). Néanmoins, le manque de stabilité du lien thiocarbamate dans le milieu de culture cellulaire nous a incité à remplacer le lien thiocarbamate présent dans nos conjugués sulfonates par un lien thioéther, plus stable. De manière surprenante, les tests d'activité kinase nous ont ensuite orientés vers la préparation de dimères de cystéinyl-peptides, qui globalement ne sont pas révélés plus actifs que les cystéinyl-peptides dont ils sont issus.

Faute de temps, nous n'avons pas été en mesure de l'appliquer à la synthèse d'azapeptides inhibiteurs de la signalisation HGF/SF-MET mais elle aurait permis

éventuellement d'augmenter l'affinité et/ou la spécificité des peptides de la chimiothèque pour MET, ainsi que sa stabilité dans les milieux biologiques.

Enfin, un problème de solubilité introduisant un biais dans les résultats des tests d'activité kinase est apparu pour certains peptides hydrophobes. Un travail de couplage de ces peptides à un composé hydrophobe, tel un PEG, serait envisageable à la fois pour augmenter la solubilité et la stabilité de ces peptides.