



HAL
open science

Système VEGF/VEGFR : conception et évaluation de molécules ciblées et régulation potentielle par les métaux

Marie Reille-Seroussi

► **To cite this version:**

Marie Reille-Seroussi. Système VEGF/VEGFR : conception et évaluation de molécules ciblées et régulation potentielle par les métaux. Pharmacologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05P614 . tel-01138456

HAL Id: tel-01138456

<https://theses.hal.science/tel-01138456v1>

Submitted on 2 Apr 2015

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.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ECOLE DOCTORALE 436

« MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE, ENVIRONNEMENT »

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Spécialité : Pharmacochimie moléculaire

Marie REILLE-SEROUSSI

**Systeme VEGF/VEGFR : Conception et évaluation de molécules ciblées et
régulation potentielle par les métaux**

Thèse effectuée sous la direction du Pr. Michel VIDAL

Soutenue le 24 Septembre 2014

Membres du jury :

M. le Professeur	Philippe KAROYAN	Rapporteur
M. le Professeur	Vincent LISOWSKI	Rapporteur
Mme le Professeur	Sandrine ONGERI	Examineur
Mme le Docteur	Genevieve PRATVIEL	Examineur
M. le Professeur	Ernest GIRALT	Examineur
M. le Docteur	Florent HUGUENOT	Examineur
M. le Docteur	Sylvain BROUSSY	Examineur
M. le Professeur	Michel VIDAL	Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Paris Descartes, au sein de l'unité de recherche de Synthèse et Structure de Molécules d'Intérêt Pharmacologique (UMR 8638). Ce projet a été financé par une bourse ministérielle ainsi que par l'Association de la Recherche contre le Cancer (ARC) pendant la dernière année. Je leur en suis très reconnaissante et les en remercie.

Je souhaite dans un premier temps remercier sincèrement l'ensemble des membres du jury, le Pr. Vincent Lisowski, le Pr. Philippe Karoyan, rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Pr. Sandrine Onger, le Dr. Geneviève Pratviel et le Pr. Ernest Giralt, qui ont tous accepté de lire, évaluer et discuter ce travail de thèse.

Je remercie grandement Michel Vidal pour son accueil chaleureux dès mon arrivée dans son laboratoire, pour la confiance qu'il m'a accordée au fil de ces années, pour tous les échanges scientifiques fructueux que nous avons eu ainsi que pour l'autonomie qu'il m'a offerte pour mener ce projet pendant ces quatre années.

Je remercie très sincèrement Sylvain Broussy pour sa présence de tous les jours, les meilleurs comme les moins bons. Merci pour ton aide, ta disponibilité, ta rigueur scientifique et ta passion de la recherche. Merci pour toutes nos longues discussions scientifiques et pour tous tes conseils, qu'il soit question de manips ou de rédaction. Un grand merci pour m'avoir fait confiance et m'avoir guidé dans le projet peptide mais également dans les autres.

Je tiens aussi à remercier Florent Huguenot pour m'avoir accompagné dans mes premiers pas au laboratoire lors de mon stage de master, de m'avoir fait franchir l'étape de la thèse et de m'avoir ouvert la voie des petites molécules. Merci pour tous tes conseils.

Je souhaite ensuite remercier très fortement Nathalie Gagey-Eilstein pour son implication tout au long de cette thèse. Merci pour ta présence sans faille, pour tes nombreux et précieux conseils, pour toutes nos longues discussions où tu as toujours su trouver les mots scientifiques et humains. Merci également pour mes premiers pas dans le labo de bio et pour toutes ces heures passées devant une plaque 96 puits, un gel ou encore une caméra à attendre de voir apparaître une bande ! Merci pour ton écoute et pour avoir su parler quand je n'y arrivais pas. Enfin, merci pour tous les bons moments.

Un grand merci à Wang-Quing Liu pour sa présence, son attention discrète et délicate, ses conseils, son aide en synthèse peptidique ainsi que pour sa gentillesse.

Ce travail de thèse a également débordé les frontières du laboratoire et a été rendu possible grâce à de nombreuses collaborations indispensables et avisées. Je remercie tout d'abord l'équipe de biologie structurale (Equipe Isabelle Broutin, UMR 8015), et tout particulièrement Jean-François Gaucher pour m'avoir permis de faire des obstacles rencontrés avec les métaux un véritable projet. Merci pour la confiance et le sérieux avec lequel il s'est penché à nos côtés sur « la question du

cuivre », pour son investissement sur l'approche peptide ainsi que pour son regard bien veillant jusqu'au terme de l'écriture. Je remercie également Serge Bouaziz et Pascale Coric de l'équipe de RMN (UMR 8015), pour leurs appuis et expertises en RMN, ainsi que pour m'avoir donné accès à l'appareil de dichroïsme circulaire et de m'avoir guidé dans son usage. Merci également pour cette après-midi épiluchage de spectres! Je remercie aussi Yohann Corvis (UTCBS, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques) pour ses analyses comparatives des deux lots de 4321.

Merci à Elise Prost et Pascale Leproux pour leurs disponibilités et leurs appuis en RMN et spectrométrie de masse, tout particulièrement lorsque je cherchais à mettre en évidence la présence de cuivre dans mes composés. Merci également à Pascale Lemoine de m'avoir permis d'obtenir des structures RX de quelques petites molécules et à toutes les personnes que j'ai rencontrées dans les différents labos de biologie qui m'ont permis de cultiver au mieux mes cellules.

Je remercie très chaleureusement tous les membres des équipes de pharmacie ou des Saint Pères qui de près ou de plus loin ont été présents au fil de ces quatre années. Merci à Lei, mon co-thésard, pour sa gentillesse et tous les bons moments passés ensemble pendant cette année commune. Bonne continuation pour la suite de ta thèse! Merci également à Benoit pour ses conseils pour faire marcher un blot ou une manip de bio et pour toutes les pauses partagées. Merci à Eric pour sa bonne humeur communicative, pour tout les déjeunés communs ainsi que pour sa présence pendant toute la fin de ma thèse (même de Bordeaux dans les derniers temps!). Merci également à Aurélien pour sa présence et son soutien. Un grand merci également à Aurélie pour sa bonne humeur et pour tous les moments passés ensemble (et pour les futurs bien sûr !). Je souhaite également adresser un grand merci à Melissa pour son amitié depuis le partage de notre hotte il y a quelques années maintenant! C'est difficile de détailler et de faire une liste alors juste merci. Enfin, je n'oublie pas tous les autres thésards ou post-doc qui par leur bonne humeur et leur présence ont su créer un très agréable environnement.

Un merci également à tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire pour leur enthousiasme et bonne humeur. Je souhaite adresser une attention particulière à Salah, Sina, Laure-Anne, Julie, Benoit et Claudia qui ont participé à faire avancer ce travail de thèse.

Je souhaiterais également adresser un très grand merci à Cécile et Xiaoshi pour leur amitié, leur soutien sans faille et leur présence. Merci de la patience que vous avez eu à souvent m'écouter parler de thèse, de post doc et encore de thèse ces derniers temps... Merci !

Enfin, je tiens à remercier très sincèrement ma famille qui d'un peu partout (Paris, Nantes, Auxerre ou Montpellier) a su être à mes côtés. Je souhaite tout particulièrement remercier ma petite famille parisienne. Un très grand merci à mes parents pour leur soutien permanent, leur présence (et pour leur accueil ces derniers mois !!). Merci pour tout ! Un grand merci à mes trois petits frères Nathan, Jules et Gaspard pour avoir su me changer les idées et qui, chacun à leur manière, ont été d'une aide très précieuse pendant ce temps de rédaction!

J'adresse un dernier merci à Pierrick pour tout le chemin fait ensemble depuis des années et pour tout ce qui nous reste à partager.

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	1
LISTE ABRÉVIATION	5
PRÉAMBULE	9
INTRODUCTION : AXE VEGF/VEGFR, CIBLE THÉRAPEUTIQUE DE CHOIX	11
I. VERS DE NOUVELLES APPROCHES DE THÉRAPIES ANTICANCÉREUSES	11
1. APPROCHES DITES « CLASSIQUES »	11
2. APPROCHE DE THÉRAPIE CIBLÉE	12
3. RECHERCHES DE NOUVELLES CIBLES THÉRAPEUTIQUES	12
II. INHIBITION DE L'ANGIOGÈNE EN THÉRAPEUTIQUE	14
1. QU'EST CE QUE L'ANGIOGÈNE ?	14
2. ANGIOGÈNE TUMORALE	15
2.1 Découverte du lien angiogène/cancer	15
2.2 Croissance tumorale et transition angiogène	15
2.3 Réseau vasculaire tumoral	17
2.4 Régulateurs de l'angiogène : facteurs pro et anti-angiogènes	18
3. PRINCIPAUX ACTEURS DE L'ANGIOGÈNE : SYSTÈME VEGF/VEGFR	19
3.1 Le VEGF : caractéristiques structurales et biologiques	19
3.2 VEGFRs : caractéristiques structurales et activation par le VEGF	21
3.3 Signalisation cellulaire : VEGFR1 vs VEGFR2	25
4. INHIBITION DE L'ANGIOGÈNE TUMORALE ET SYSTÈME VEGF/VEGFR	29
4.1 Thérapie anti-angiogène : agents ciblant l'axe VEGF/VEGFR	29
4.2 Limites des traitements anti-angiogènes et perspectives	32
III. INHIBITEURS DE L'INTERACTION VEGF/VEGFR1	34
1. INTERACTIONS PROTÉINE/PROTÉINE : UN INTÉRÊT THÉRAPEUTIQUE GRANDISSANT	35
1.1 Interaction protéine/protéine	35
1.2 Développement d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine	36
2. APPLICATION AU CAS DE L'INTERACTION VEGF/VEGFR	37
2.1 Interaction VEGF/VEGFR1	37
2.2 Inhibiteurs connus de l'interaction VEGF/VEGFR	39
IV. OBJECTIF DE LA THÈSE	45
CHAPITRE 1 : TESTS DE DÉPLACEMENT DE L'INTERACTION VEGF/VEGFR	47
I. MÉTHODES EXISTANTES POUR ÉTUDIER L'EFFET D'UN COMPOSÉ SUR L'INTERACTION VEGF/VEGFR	47
1. TEST DE COMPÉTITION SUR DES EXTRAITS CELLULAIRES	47
2. TEST DE COMPÉTITION SUR DES PROTÉINES ISOLÉES	48
II. MÉTHODES UTILISÉES DANS LE CADRE DE CE PROJET : TESTS DE COMPÉTITION DE TYPE ELISA	50
1. TESTS ELISA DISPONIBLES AU LABORATOIRE	50

2. DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU TEST ELISA : VEGFR1-d2-HRP/VEGF	51
ARTICLE 1	53
CHAPITRE 2 : DU DÉVELOPPEMENT DE PETITES MOLÉCULES HÉTÉROCYCLIQUES ANTAGONISTES DU VEGFR1 À LA DÉCOUVERTE DE L'EFFET DES MÉTAUX SUR L'INTERACTION VEGF/VEGFR1.....	55
I. RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES : IDENTIFICATION DU COMPOSÉ SR 4321 PAR CRIBLAGE <i>IN SILICO</i> ET PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.	55
1. CRIBLAGE <i>IN SILICO</i> ET IDENTIFICATION DE NOUVEAUX COMPOSES ANTAGONISTES DU VEGFR1	55
1.1 Généralités sur le criblage <i>in silico</i>	56
1.2 Détermination de la zone de criblage sur le domaine d2 du VEGFR1	56
1.3 Protocole du criblage <i>in silico</i>	57
1.4 Evaluation de l'activité des molécules sélectionnées et découverte du sr 4321	58
2. ETUDE DU COMPOSE SR 4321 ¹³⁰	59
3. CONCLUSION	61
II. DÉVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE VOIE DE SYNTHÈSE POUR LE SR 4321 ET LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES.	62
1. VOIE DE SYNTHÈSE DEVELOPPEE AU CERMN POUR LES COMPOSES DE TYPE UREIDO-THIOPHENES.....	62
1.1 Synthèse de (3-carboxy-2-uréido) thiophènes	62
1.2 Généralisation de la voie de synthèse	64
1.3 Optimisation des conditions réactionnelles et « méthode de parallélisation ».....	65
2. DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE VOIE DE SYNTHÈSE POUR LE SR 4321 ET LA SYNTHÈSE D'ANALOGUES	66
3. LIMITATIONS DE LA VOIE DE SYNTHÈSE ET ETUDE METHODOLOGIQUE: THIENOPYRIMIDINEDIONE VS ACIDE CARBOXYLIQUE	68
3.1 Mécanisme envisagé	68
3.2 Série (3-carboxy-2-uréido) thiophène	69
3.3 Variation de la nature de l'hétérocycle	70
3.4 Réaction d'hydrolyse enzymatique.....	73
3.5 Conclusion de l'étude méthodologique	73
III. SYNTHÈSE ET ÉTUDE DU COMPOSÉ SR 4321.....	74
1. NOUVELLE SYNTHÈSE AU LABORATOIRE ET EVALUATION DE L'ACTIVITE DU COMPOSE SR 4321.....	74
2. ANALYSE COMPARATIVE DES DEUX LOTS DE COMPOSES.....	75
2.1 Caractérisation des deux lots de sr 4321 et observation d'impuretés dans celui du CERMN..	75
2.2 Caractérisation de l'interaction avec le VEGFR1 et mise en évidence de sels dans le composé du CERMN.....	79
2.3 Recherche d'impuretés métalliques	84
2.4 Conclusion de cette étude comparative	85
IV. SYNTHÈSE D'ANALOGUES DU COMPOSÉ SR 4321.....	86
1. MODIFICATIONS DU SQUELETTE CYCLIQUE DU COMPOSE SR 4321	86
1.1 Synthèse des analogues.....	86
1.2 Evaluation de l'activité de ces analogues sur le test VEGFR1-d1-d3	91
2. MODIFICATION DE LA CHAÎNE LATÉRALE DU COMPOSE SR 4321 PAR RÉACTION DE CHIMIE CLICK.....	91
2.1 Chimie click et réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen.....	91

2.2 Synthèse des analogues par chimie click.....	92
2.3 Evaluation de l'activité de ces analogues sur le test VEGFR1-d1-d3.....	96
3. ELABORATION DE NOUVEAUX ANALOGUES, RELATION STRUCTURE-ACTIVITE FINALE.....	97
3.1 Synthèse des différents analogues.....	97
3.2 Evaluation de l'activité de ces nouveaux analogues sur le test VEGFR1-d1-d3.....	103
V. ETUDE DU COMPOSÉ 60 ET DÉCOUVERTE DE L'ACTIVITÉ DU CUIVRE.....	106
1. PREMIERS TESTS CELLULAIRES, RE-SYNTHESE DU COMPOSE 60 ET PROBLEMES DE REPRODUCTIBILITE.....	106
2. ANALYSE DES DEUX LOTS DE COMPOSE 60.....	107
3. ACTIVITE DU CUIVRE RESIDUEL.....	110
VI. FIN DU DÉVELOPPEMENT DE PETITES MOLÉCULES.....	113
VII. CONCLUSION.....	114
ARTICLE 2.....	117
CHAPITRE 3 : IMPLICATION DE LA DIMÉRISATION DU VEGFR1-D2 INDUITE PAR LES IONS MÉTALLIQUES DANS LE CONTRÔLE DE L'ANGIOGÈNESE.....	119
I. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES : IONS MÉTALLIQUES ET ANGIOGÈNESE.....	119
1. IONS METALLIQUES ET ANGIOGENESE.....	119
2. CUIVRE, ANGIOGENESE ET TRANSDUCTION DU SIGNAL.....	120
2.1 Découverte de l'effet du cuivre sur l'angiogénèse.....	121
2.2 Développement d'agents chélateurs du cuivre pour inhiber l'angiogénèse tumorale.....	122
2.3 Cibles et mécanisme d'action du cuivre sur l'angiogénèse.....	124
3. CONCLUSION.....	131
II. RÉSULTATS : DIMÉRISATION DU DOMAINE D2 DU VEGFR1 INDUITE PAR LES MÉTAUX ET RÉGULATION DE L'ANGIOGÈNESE.....	132
1. DEPLACEMENT DE L'INTERACTION VEGF/VEGFR1 PAR DES METAUX DIVALENTS : TEST ELISA.....	132
2. DIMERISATION DU VEGFR1-D2 EN PRESENCE DE METAUX.....	135
2.1 Cristallisation du VEGFR1-d2 en présence de métaux divalents.....	135
2.2 Dimérisation du récepteur induite par les métaux en solution.....	136
2.3 Surface d'interaction : Complexe VEGFR1/VEGFR1 vs VEGFR1/VEGF.....	138
3. EFFETS DES METAUX DIVALENTS SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES HUVE.....	139
III. DISCUSSION : IMPLICATION DE LA DIMÉRISATION DU VEGFR1 INDUITE PAR LES MÉTAUX DANS LE CONTRÔLE DE L'ANGIOGÈNESE.....	140
IV. CONCLUSION.....	143
ARTICLE 3.....	145
CHAPITRE 4 : CONCEPTION, SYNTHÈSE ET DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX PEPTIDES CIBLANT LE VEGF CIRCULANT.....	146
I. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES : DÉCOUVERTE ET ÉTUDE DES PEPTIDES V107, V114 ET V114* CIBLANT LE VEGF.....	147
1. PEPTIDES CIBLANT LE VEGF.....	147
1.1 Découverte de peptides ciblant le VEGF par phage display.....	147

1.2. Recherche de peptides ciblant le VEGF par bacterial display et confirmation des données obtenues par phage display	155
1.3. Conclusion.....	156
2. PEPTIDES V107 ET V114	157
2.1. Peptide v107 : cyc-GGNECDIARMWEWECFERL	157
2.2. Peptides v114/v114* : cycl-VEPNCDIHVXWEWECFERL (X=M ou ⁿ L)	160
II. RÉSULTATS : CONCEPTION ET DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX PEPTIDES ET PEPTIDOMIMÉTIQUES CIBLANT LE VEGF	163
1. STRATEGIE: SYNTHÈSE PEPTIDIQUE ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ.....	163
1.1 Méthode de synthèse	163
1.2 Evaluation de l'activité des peptides synthétisés	167
1.3 Détermination de la structuration des peptides par dichroïsme circulaire	170
2. PEPTIDE V114* ET PREMIÈRES MODIFICATIONS STRUCTURALES.....	172
2.1 Synthèse et évaluation de l'activité du peptide de référence v114*	172
2.2 Raccourcissement de la séquence du peptide v114*	173
2.3 Introduction de variations en position N-terminale du peptide 63	175
2.4 Modification de la phénylalanine sur le peptide 64	179
3. EXPLORATION DE LA TAILLE DU CYCLE ET DE LA NATURE DU LIEN	183
3.1 Variation de la taille du cycle.....	184
4. STABILISATION DU SEGMENT HELICE α	195
4.1 Données bibliographiques : méthodes pour stabiliser les hélices α	196
4.2 Résultats : stabilisation du fragment en hélice α des peptides dérivant du v114*	200
5. ÉTUDES COMPLÉMENTAIRES ET VALORISATION DES PEPTIDES DÉRIVANT DU V114*	207
5.1 Structure cristallographique du complexe VEGF/peptide 88.....	207
5.2 Etude de l'activité des peptides v114* et 88 sur un panel de kinases.....	210
5.3 Etude de la stabilité des peptides en présence de protéinase K.....	213
III. CONCLUSION	215
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	216
ANNEXE 1 : RÉSULTATS ITC	220
ANNEXE 2 : RÉSULTATS DICHROÏSME CIRCULAIRE	226
PARTIE EXPÉRIMENTALE	230
PART 1: SR4321 AND ANALOGS.....	230
PART 2: V114* AND ANALOGS	272
PART 3: BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL ASSAYS	302
PART 4: CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY	304
BIBLIOGRAPHIE	306

Liste Abréviation

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ahx	Acide 6-aminohexanoïque
Akt (PKB)	Protéine kinase B
BSA	Bovin Serum Albumine fraction IV
btVEGF	VEGF ₁₆₅ biotynilé
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CCS	Copper Chaperone for Superoxide dismutase 1
CERMN	Centre d'Etude et de Recherche sur le Médicament de Normandie
CI₅₀	Concentration Inhibitrice 50
DC	Dichroïsme Circulaire
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DEPBT	3-(Diethoxy-phosphoryloxy)-3H-benzo[d][1,2,3] triazin-4-one
DIC	Diisopropylcarbodiimide
DIEA	N,N-Diisopropylethylamine
DMF	Diméthylformamide
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
ECD	Extracellular domain
EDT	Ethanedithiol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF Receptor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
eNOS	Nitric Oxide Synthase endothelial
Eq.	Equivalent
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1 et 2
ESI	Electrospray ionization
Et	Ethyle
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FAK	Kinase d'adhésion focale
FAXS	Fluorine chemical shift anisotropy and exchange for screening
FDA	Food and drug administration
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	FGF receptor
FIH-1	Factor inhibiting hypoxia-inducible factor
Flt-1	Fms-like tyrosine kinase 1
Flt-4	Fms-like tyrosine kinase 4
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GIST	Gastro intestinal stromal tumors
h	Heure
HATU	1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HBS	Hydrogen-bonding surrogates

HIF	Hypoxia inducible facteur
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMVEC	Cellules endothéliale microvasculaire humaine
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	High-pressure liquid chromatography
HRE	Hypoxia response element
HRP	Horseradish peroxydase
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HTS	High-throughput screening
HUVEC	Human umbilical vascular endothelial cell
IC 95 %	Intervalle de confiance à 95 %
IgG	Domaine d'immunoglobuline de type G
ITC	Isothermal titration calorimetry
JMD	Juxtamembrane domains
Kd	Constante de dissociation
KDR	Kinase-insert domain receptor
MACS	Magnetic-activated cell Sorting
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
Me	Méthyle
MEC	Matrice extracellulaire
MeCN	Acetonitrile
MMP	Métalloprotéase matricielle
MOE	Molecular operating environment
Motif GP	Motif glycine-proline
MS	Mass spectrometry
MTT	Methyl thiazol tetrazolium
mtt	Methyltrityl
MW	Microwave
NEt3	Triéthylamine
NFκB	Nuclear factor-kappa B
NO	Oxyde nitrique
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
NRP	Neuropilin
PBS	Phosphate buffered saline
PDB	Protein Data Bank
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PE	Phényléphrine
pH	Potentiel hydrogène
PHD	Prolyl Hydroxylase Domain-containing protein
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinases
PLC-γ	Phospholipase C gamma-protéine
PLE	Pig Liver Esterase
PIGF	Placental Growth Factor
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Rt	Retention time
RTK	Récepteurs à activité tyrosine kinase
RX	Rayons X

SAXS	Small-angle X-ray scattering
SD	Standart deviation
siARN	Small interfering ARN
SOD	Superoxyde dismutase
SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
SPR	Surface plasmon resonance
SSAOs amine oxydase	Semicarbazide-sensitive amine oxidase
sVEGFR : VEGFR-1 soluble	VEGFR soluble
TA	Température ambiante
TFA	Acide trifluoacétique
TFE	Trifluoroéthanol
THF	Tétrahydrofurane
TIPS	Triisopropylsilane
TM	Tétrathiomolybdate
TMD	Domaine transmembranaire
TOCSY	Total correlated spectroscopy
TPS-1	Thrombospondine-1
UMR	Unité Mixte de Recherche
UV	Ultra Violet
VE-cadherin	Cadhérine de l'endothélium vasculaire
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VEGFR1-d1-d3	Domaines 1 à 3 du VEGFR-1
VEGFR1-d2	Domaine 2 du VEGFR-1
VEGFR1-ECD	Domaine extracellulaire du VEGFR-1
VPF	Vascular Permeability Factor
Water LOGSY	Water-ligand observed via gradient spectroscopy

Préambule

En raison du nombre croissant de cas diagnostiqués ainsi que de la multitude de formes existantes, le cancer apparaît aujourd'hui comme un enjeu important de santé publique. Les progrès en biologie moléculaire et cellulaire ainsi que l'essor des connaissances en cancérologie ont permis, ces dernières années, l'émergence de nouvelles thérapies dites « ciblées ». Ces traitements, agissant sur des cibles moléculaires spécifiques, ont pour caractéristiques de distinguer au maximum les cellules saines des cellules malignes, limiter ainsi les effets secondaires et augmenter le confort du patient. Dans le cadre de ces thérapies, cibler l'angiogenèse et donc le réseau vasculaire tumoral apparaît comme une stratégie de choix.

Dans ce contexte, le projet développé au cours de ce travail de thèse s'inscrit dans une démarche de recherche de nouveaux composés anti-angiogéniques et de compréhension du mécanisme de régulation de l'angiogenèse.

Une première partie introductive sera consacrée à définir l'angiogenèse et exposer son rôle dans la croissance et le développement tumoral. Les principaux acteurs de l'angiogenèse, à savoir le facteur de croissance VEGF et ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2, seront décrits à la fois d'un point de vue structural et biologique. Les agents anti-angiogéniques utilisés en cliniques ainsi que d'un point de vue plus global les différentes stratégies anti-angiogéniques existantes seront ensuite présentées. Parmi ces stratégies, l'accent sera porté sur l'intérêt de développer des inhibiteurs de l'interaction entre le VEGF et ses récepteurs. Cette dernière partie nous conduira à définir les objectifs de ce travail de thèse.

L'ensemble des résultats seront décrits dans quatre chapitres. Afin de faciliter la lecture de ce manuscrit, un premier chapitre sera consacré à la présentation des principaux tests biochimiques utilisés tout au long de ce travail de thèse pour évaluer l'activité des composés synthétisés. Nous décrirons ainsi brièvement leurs principes et intérêts, en incluant le développement d'un nouveau test chimioluminescent.

Dans un second chapitre, nous présenterons l'approche mise en œuvre dans le but de concevoir de nouveaux antagonistes du récepteur 1 au VEGF, basée sur la synthèse de différents composés hétérocycliques. Nous montrerons que malgré des réactivités chimiques intéressantes, cette approche n'a pas permis d'obtenir des composés susceptibles d'inhiber la fixation du VEGF sur son récepteur. En fin de chapitre, l'accent sera porté sur la découverte, suite à des aléas de synthèse, de l'effet inhibiteur du cuivre sur l'interaction VEGF/VEGFR1.

Suite à cette dernière découverte, un troisième chapitre sera consacré à l'étude de certains ions métalliques dans l'angiogenèse. Une première partie de ce chapitre aura pour objet de présenter, à l'aide d'éléments bibliographiques, le rôle de ces ions métalliques dans la régulation de l'angiogenèse. Nous détaillerons ensuite une étude portant sur l'effet de métaux divalents sur l'interaction VEGF/VEGFR1. Celle-ci, réalisée en étroite collaboration avec deux équipes de biologie

structurale, s'inscrit dans une démarche de compréhension du mécanisme de régulation de l'angiogenèse par les ions métalliques.

Un quatrième chapitre sera ensuite consacré à présenter la seconde stratégie envisagée au cours de ce travail de thèse pour concevoir de nouveaux inhibiteurs peptidiques de l'interaction VEGF/VEGFR. Après avoir exposé les travaux sur lesquels nous nous sommes appuyés pour développer des peptides ciblant le VEGF, nous présenterons les résultats obtenus. Ces derniers seront appuyés par différentes études biochimiques, structurales et biologiques.

Enfin, dans un dernier temps nous poserons les limites et perspectives de ce travail de thèse.

Introduction

Axe VEGF/VEGFR : Cible thérapeutique de choix

I. Vers de nouvelles approches de thérapies anticancéreuses

Le cancer apparaît aujourd'hui comme un enjeu important de santé publique. Cette pathologie se caractérise par une prolifération anormale et incontrôlée de cellules malignes dans un tissu sain.

1. Approches dites « classiques »

Différentes approches et traitements anticancéreux sont actuellement utilisés en clinique pour lutter contre le cancer. On distingue deux grandes catégories de traitements. D'une part les approches dites « locales » (chirurgie et radiothérapie), et d'autre part celles dites « générales » (chimiothérapie, hormonothérapie et immunothérapie). Afin d'améliorer leurs efficacités ces différents traitements sont parfois utilisés en association et de manière séquentielle.

La chirurgie a pour but d'extraire la tumeur. Dans un souci d'efficacité de l'intervention, l'ablation d'une partie des tissus sains entourant la tumeur est généralement effectuée.

La radiothérapie consiste, quant à elle, à irradier la tumeur et ainsi à occasionner des dommages au niveau de l'ADN conduisant à la mort cellulaire. La source d'irradiation est généralement apportée par voie externe (dispositif à proximité des patients) mais peut également être implantée en interne dans l'organisme.

La chimiothérapie est une approche plus généralisée qui consiste à administrer au patient des agents dits cytotoxiques qui vont interférer avec le métabolisme des cellules cancéreuses et ainsi freiner ou stopper leur prolifération. Ces agents agissent principalement sur les cellules cancéreuses car elles prolifèrent très rapidement. Cependant, certaines cellules saines à renouvellement rapide telles que les cellules des muqueuses ou encore les cellules de la moelle osseuses peuvent également subir des dommages. Ces traitements induisent donc de nombreux effets secondaires indésirables. Suite à cette constatation de nouveaux traitements dit « ciblés » ont émergés ces dernières années.

Enfin, d'autres thérapies telles que l'hormonothérapie ou l'immunothérapie existent également. L'hormonothérapie s'applique à des cancers dits « hormonosensibles ». Ce traitement consiste à bloquer l'action de certaines hormones en inhibant leurs productions ou encore les empêchant d'atteindre leurs cibles. L'approche d'immunothérapie consiste à stimuler le système immunitaire afin de lutter contre les cellules cancéreuses.

2. Approche de thérapie ciblée

Bien que les progrès de la recherche et de la médecine aient permis d'améliorer significativement le diagnostic et le traitement du cancer, de nombreux cas de résistances et récurrences persistent encore. Du fait de cette évolution constante de la réponse aux anti-tumoraux ainsi que des effets indésirables liés aux approches classiques les efforts actuels portent sur le développement de nouveaux traitements anticancéreux.

Les progrès en biologie moléculaire et cellulaire ainsi que l'essor des connaissances en cancérologie ont permis, ces dernières années, l'émergence de nouvelles thérapies dites « ciblées ». Ce terme s'inspire du concept de « magic bullet », imaginé il y a plus de 100 ans par P. Ehrlich^{1,2} et désigne une nouvelle classe de médicaments qui agit sur des cibles spécifiques connues pour être dérégulées et jouer un rôle majeur dans le développement et la croissance tumorale. Cette approche contraste avec les stratégies classiques de chimiothérapie utilisant des agents cytotoxiques non spécifiques. Les thérapies ciblées agissent sur des cibles moléculaires bien définies alors que les agents cytotoxiques classiques agissent sur les cellules se divisant rapidement qu'elles soient saines ou cancéreuses. De plus, ces nouveaux agents sont parfois cytostatiques (blocage de prolifération cellulaire) alors que les médicaments utilisés en chimiothérapie classique sont cytotoxiques (induction de la mort des cellules). Par conséquent, l'objectif de ces nouvelles thérapies est de distinguer les cellules saines des cellules malignes afin de limiter les effets secondaires.³

3. Recherches de nouvelles cibles thérapeutiques

La connaissance du mécanisme de tumorigenèse et des facteurs induisant le passage d'une cellule saine vers un état cancéreux est le point de départ pour identifier de nouvelles cibles et ainsi développer de nouveaux agents thérapeutiques.

Les tumeurs sont bien plus que des masses cellulaires capables de proliférer. Il s'agit de tissus composés de nombreux types cellulaires qui interagissent entre eux. Par conséquent, le développement tumoral est un phénomène complexe. Le passage d'une cellule saine à un état cancéreux fait suite à un nombre important d'altérations génétiques et de dérégulations des voies de signalisation. En partant du principe que l'ensemble des cancers acquièrent des capacités communes pour se développer, Hanahan et Weinberg ont recensé dix caractéristiques principales (« hallmarks of cancer ») (Figure 1).⁴

¹ K. Strebhardt and A. Ullrich, *Nature Reviews Cancer*, **2008**, *8*, 473-480

² E. E. Takeuchi and D. L. Alison, *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, **2008**, *8*, 37-38

³ C. Sayers, *Nature*, **2004**, *432*, 294-297

⁴ D. Hanahan and R. A. Weinberg, *Cell*, **2011**, *144*, 646-674

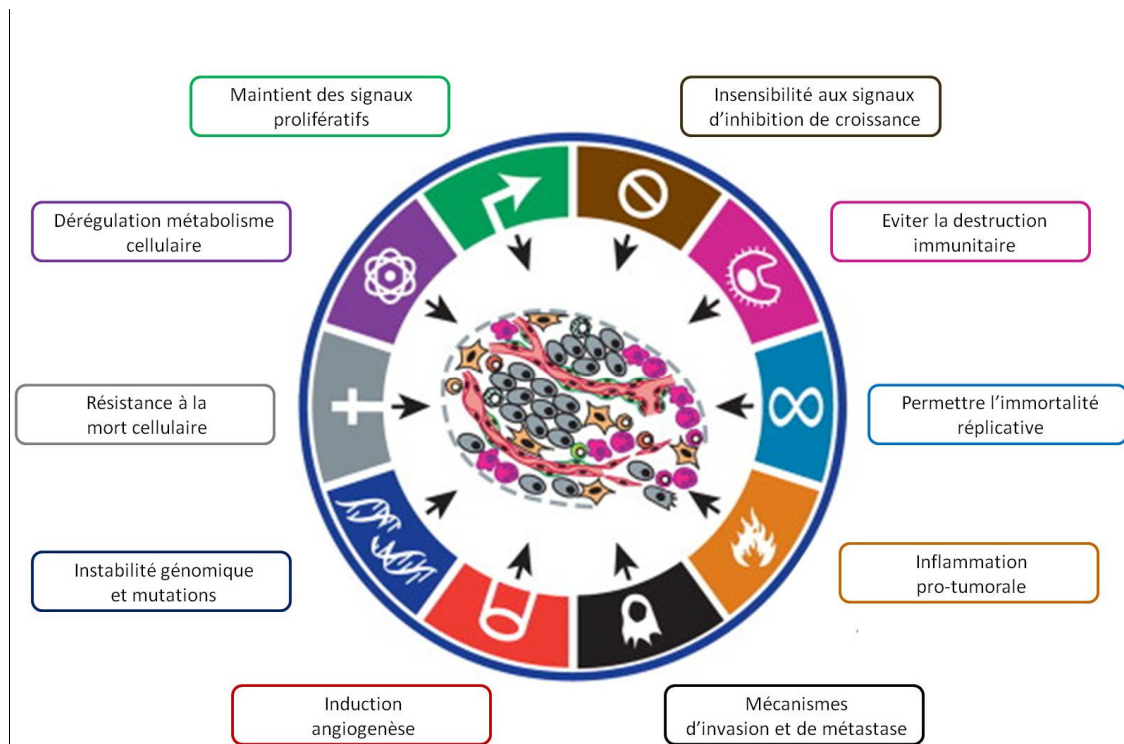


Figure 1 : Caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses pour se développer. D'après D. Hanahan and R.A. Weinberg, *Cell*, 2011.4

Le développement tumoral se définit comme une prolifération anormale et incontrôlée des cellules au sein d'un ou plusieurs tissus sains. Par conséquent, les six premières caractéristiques essentielles répertoriées ont été le maintien et l'activation des signaux de prolifération, une insensibilité aux facteurs conduisant à l'inhibition de la croissance, une immortalité répliquative, une résistance à la mort cellulaire, une activation des mécanismes d'invasion et de dissémination métastatique ainsi que nécessairement une induction du processus d'angiogénèse qui permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Suite à la mise en évidence de ces premières caractéristiques et grâce aux progrès réalisés en cancérologie, deux nouvelles catégories de caractéristiques ont été ajoutées. La première contient les phénomènes d'instabilité génétique et d'inflammation. Ces caractéristiques semblent essentielles pour assister la transition d'un état normal à oncogène des cellules. Enfin, la dernière catégorie regroupe la reprogrammation du métabolisme énergétique de la cellule ainsi que la résistance à la destruction par le système immunitaire.

Hormis une meilleure connaissance des mécanismes régulant le cancer, ces différentes caractéristiques ont permis l'identification de nombreuses cibles spécifiques de la croissance tumorale et par conséquent l'accès au développement de nouveaux agents thérapeutiques dit ciblés.

Notre travail de recherche s'intègre dans cette perspective de découverte de nouveaux agents thérapeutiques. Pour notre étude, nous nous sommes intéressés à l'angiogénèse, qui est une caractéristique fondamentale et indispensable au développement tumoral et à la dissémination métastatique.

II. Inhibition de l'angiogenèse en thérapeutique

1. Qu'est ce que l'angiogenèse ?

L'angiogenèse se définit comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ceci est avant tout un phénomène physiologique indispensable à de nombreux processus biologiques. L'activité angiogénique est prédominante lors du développement embryonnaire et post natal. La formation du réseau vasculaire s'établit selon deux étapes distinctes (Figure 2). Une première étape de vasculogenèse permet la formation d'un réseau primitif à partir de cellules progénitrices endothéliales (ou angioblastes). Ce phénomène est restreint à une étape précoce du développement vasculaire. L'étape d'angiogenèse, à proprement parler, permet ensuite de créer de nouveaux vaisseaux sanguins et donc d'étendre le réseau vasculaire. Le développement de ce réseau mature se fait par élongation, bourgeonnement, division et remodelage des vaisseaux existants.^{5,6}

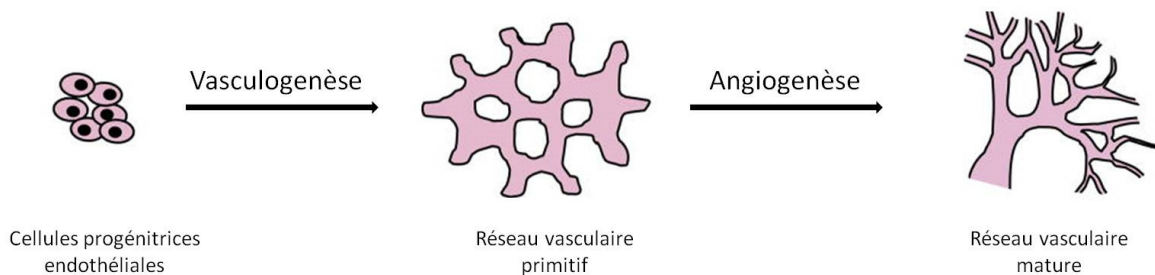


Figure 2: Formation du réseau vasculaire : étapes de vasculogenèse et d'angiogenèse. D'après C. T. Griffin, *Cell Mol Life Sci.* 2013.⁷

En raison de la longévité des cellules endothéliales, à l'âge adulte, le système vasculaire est généralement à l'état quiescent (0,01 % des cellules endothéliales en division). En effet, l'activité angiogénique n'intervient que de façon locale ou transitoire. On retrouve notamment ce phénomène lors des menstruations, de la grossesse⁸, du processus de cicatrisation⁹, de la réparation osseuse ou encore au niveau des cellules musculaires lors d'exercices physiques prolongés¹⁰. Bien qu'à l'état quiescent, l'angiogenèse peut donc être activée à l'âge adulte lors de stimuli particuliers.

L'angiogenèse est un processus finement régulé par un nombre important de facteurs activateurs ou inhibiteurs. Lors de dérèglement ou dysfonctionnement du système de régulation, ce phénomène

⁵ M. R. Swift and B. M. Weinstein, *Circ. Res.* **2009**, *104*, 576-588

⁶ P. Carmeliet, *Nature medicine*, **2000**, *6*, 389-395

⁷ C. D. Curtis, R. B. Davis, K. G. Ingram and C. T. Griffin, *Cell Mol Life Sci.* **2013**, 1-20

⁸ N. Otani, S. Minami, M. Yamoto, T. Shikone, H. Otani, R. Nishiyama, T. Otani and R. Nakano, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 3845-3851

⁹ M. G. Tonnesen, X. Feng and R. A. F. Clark, *J Investigative Dermatology*, **2000**, *5*, 40-46

¹⁰ T. Gustafsson, A. Puntschart, L. Kaijser, E. Jansson and C. J. Sundberg, *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)* **1999**, *276*, 679-685

peut devenir pathologique et être impliqué dans le développement de nombreuses maladies. Comme précisé précédemment, l'angiogenèse est nécessaire au développement tumoral. Ce phénomène est également impliqué dans d'autres processus pathologiques tels que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), certains problèmes cardiaques ou respiratoires, les phénomènes d'inflammations, certaines infections, ou encore l'obésité.¹¹

2. Angiogenèse tumorale

2.1 Découverte du lien angiogenèse/cancer

Le lien entre cancer et angiogenèse est établi depuis longtemps. Il y a plus d'un siècle, il a été mis en évidence que la croissance tumorale était généralement accompagnée d'une augmentation de la vascularisation.¹² Plus tard, il a été proposé que la croissance tumorale était fortement dépendante du développement vasculaire.¹³ En 1968, il a été postulé que les cellules cancéreuses pouvaient produire des substances « angiogéniques » et ainsi induire, à distance, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.^{14,15} Enfin, en 1971, le lien entre cancer et angiogenèse a été confirmé par le Dr. Folkman. Ainsi, il émit l'hypothèse qu'inhiber l'angiogenèse et donc la croissance vasculaire priverait la tumeur en oxygène et nutriments et donc bloquerait le développement tumoral.¹⁶ A partir de ce postulat est né le concept de thérapie anti-angiogénique ciblée. Suite à ces observations et hypothèses, de nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer les facteurs responsables de l'angiogenèse. Ceci a conduit à l'identification de nombreux régulateurs de l'angiogenèse dont certains représentent aujourd'hui des cibles thérapeutiques.

2.2 Croissance tumorale et transition angiogénique

Il est établi que la croissance tumorale n'est pas linéaire et se déroule selon deux phases distinctes : une première étape dite « avasculaire » suivie d'une seconde dans laquelle la vascularisation, et donc l'angiogenèse, jouent un rôle essentiel.¹⁷

Dans la plupart des cas, les cellules tumorales entament leur croissance dans un environnement avascularisé. Jusqu'à une taille généralement de quelques millimètres cube, l'apport en nutriment et en oxygène est assuré par simple diffusion passive. Les tumeurs atteignent ensuite un « état dormant » qui se caractérise par un équilibre entre prolifération et apoptose (ou nécrose). Cette phase de dormance tumorale a été mise en évidence lors d'autopsie de patients décédés suite à des

¹¹ P. Carmeliet and R. K. Jain, *Nature*, **2000**, 407, 249-257

¹² E. Goldmann, *Proc. Royal Acad. Med. (Surg. Section)*, **1908**, 1, 1-13

¹³ H. Algire and W. Chalkley, *J. Natl. Cancer. Inst. USA*, **1945**, 6, 73-85

¹⁴ M. Greenblatt and P. Shubik, *J. Natl. Cancer Inst.* **1968**, 41, 111-124

¹⁵ R. L. Ehrmann and M. Knoth, *J. Natl. Cancer Inst.* **1968**, 41, 1329-1341

¹⁶ J. Folkman, *N. Engl. J. Med.* **1971**, 285, 1182-1186

¹⁷ G. Bergers and L. E. Benjamin, *Nature Reviews Cancer*, **2003**, 3, 401-410

causes autres que le cancer.¹⁸ Ce résultat supporte donc l'idée que seule une partie des tumeurs dormantes entre dans la seconde phase de croissance vascularisée.

Afin de se développer pleinement, les tumeurs acquièrent ensuite un «phénotype angiogénique».¹⁹ Le passage des cellules cancéreuses dites dormantes vers un état plus invasif est appelé transition angiogénique («angiogenic switch»)²⁰ Ce phénomène se traduit par la libération de facteurs pro-angiogéniques. Ceci conduit à une rupture de l'équilibre entre les régulateurs pro et anti-angiogéniques et ainsi à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires au développement tumoral et à la dissémination métastatique (Figure 3).¹⁷

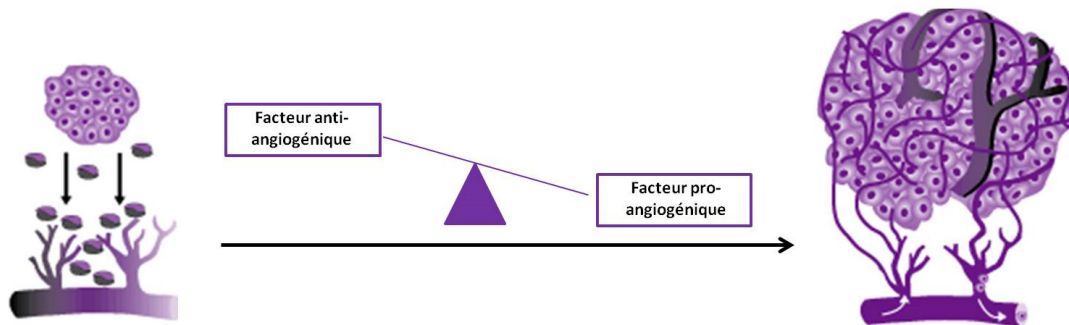


Figure 3: Transition angiogénique. Passage d'un état dormant avascularisé à une croissance tumorale vascularisée suite à un déséquilibre de la balance entre facteurs pro et anti-angiogéniques en faveur des facteurs pro-angiogéniques.

Différents stimuli peuvent être à l'origine de cette transition et de l'initiation de l'angiogenèse : stress métabolique (situation d'hypoxie, baisse du pH, chute de la glycémie), stress mécanique (pression induite par la prolifération cellulaire), réponse immune et inflammatoire, ou encore par exemple des mutations géniques (activation d'oncogènes ou délétion de gènes suppresseurs de tumeurs).^{21,22}

Parmi ces différents facteurs, l'hypoxie semble être un élément indispensable. Comme toutes cellules, les cellules cancéreuses ont besoin d'apport en oxygène et nutriments pour leur croissance. A partir d'un certain stade de développement de la tumeur, des cellules tumorales se trouvent trop éloignées des vaisseaux sanguins et l'apport par simple diffusion passive ne peut plus avoir lieu (limite de diffusion : 100-200 μ M). Ces cellules se retrouvent donc en situation d'hypoxie, libèrent des facteurs pro-angiogéniques et ainsi induisent le phénomène d'angiogenèse.¹¹ Cette transition angiogénique peut avoir lieu à différents stades de la progression tumorale en fonction du type de tumeurs et de l'environnement. Elle peut notamment avoir lieu à des stades précoces de la progression (lésions précancéreuses).¹⁷

¹⁸ W. C. Black and H. G. Welch, *N. Engl. J. Med.* **1993**, 328, 1237-1243

¹⁹ P.M. Gullino, *J. Natl. Cancer Inst.* **1978**, 61, 639-43

²⁰ D. Hanahan, J. Folkman, *Cell*, **1996**, 86, 353-64

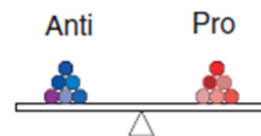
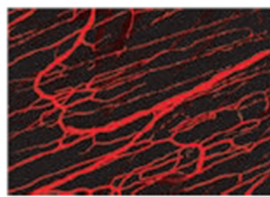
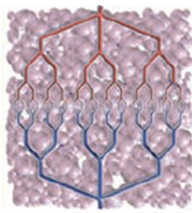
²¹ R. S. Kerbel, *Carcinogenesis*, **2000**, 21, 505-515

²² P. Carmeliet, *Nature*, **1999**, 401, 657-658

2.3 Réseau vasculaire tumoral

Les vaisseaux sanguins produits lors de l'angiogenèse tumorale sont anormaux à la fois d'un point de vue structural et fonctionnel (*Figure 4*).¹¹ Contrairement aux vaisseaux normaux, ils sont hautement désorganisés, tortueux, gonflés et leurs diamètres irréguliers. Ils sont caractérisés par des branchements et interconnexions excessifs. Leurs parois sont également fragiles et irrégulières. Elles présentent des ouvertures en raison de jonctions intercellulaires lâches et élargies. La membrane basale est discontinue et incomplète ce qui conduit à une perméabilité accrue de ces vaisseaux.¹¹

Conditions normales



Conditions pathologiques

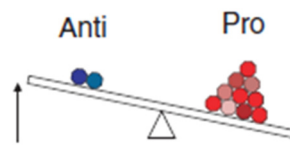
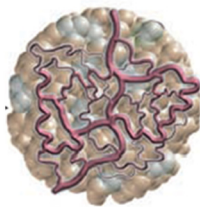


Figure 4 : Réseau vasculaire « normal » (haut) et pathologique (bas). A gauche : schéma présentant la structure du réseau vasculaire ; Au centre : Imagerie par microscopie biphotonique de ce réseau ; A droite : Représentation schématisée de la balance entre facteurs pro et anti-angiogéniques. D'après R. K. Jain, *Science*, 2005.²⁴

Ces anomalies structurales ont des conséquences fonctionnelles. La structure de ces vaisseaux conduit à un flux sanguin irrégulier et chaotique.²³ Ceci conduit, malgré la néovascularisation, à maintenir un état d'hypoxie et une acidité dans certaines régions des tumeurs. Ce phénomène favorise donc une surproduction de facteurs pro-angiogéniques et participe ainsi à une persistance et une exacerbation de l'architecture anormale de ces vaisseaux. De plus, la paroi des vaisseaux au sein des tumeurs comprend également des cellules tumorales. L'ensemble de ces caractéristiques favorisent l'invasion des cellules tumorales et donc le processus métastatique.

Ces anomalies structurales et fonctionnelles ont également un effet sur les traitements anticancéreux classiques. La détérioration de l'apport sanguin ainsi que l'hypertension interstitielle (élévation de la pression à la surface des vaisseaux due à la croissance des cellules cancéreuses) qui résulte de l'architecture de ce réseau interfèrent non seulement avec l'apport en oxygène mais également avec la diffusion des agents thérapeutiques cytotoxiques. L'hypoxie et les différences de

²³ J.W. Baish and R.K. Jain, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3683-3688

pH au sein des tumeurs induisent l'apparition de résistances aux traitements par chimiothérapie et radiothérapies.^{24,25} Bien que pouvant à première vue sembler contre intuitif, l'un des avantages de l'utilisation d'agents anti-angiogéniques est de conduire transitoirement à une normalisation du réseau vasculaire tumoral. Celle-ci peut ainsi réduire les problèmes d'hypoxie et ainsi accroître non seulement la diffusion en oxygène mais également celle en agents cytotoxiques. Par conséquent, l'utilisation de thérapies anti-angiogéniques en association avec des traitements plus conventionnels peut ainsi renforcer l'efficacité des traitements de chimiothérapie et radiothérapie.²⁴

2.4 Régulateurs de l'angiogenèse : facteurs pro et anti-angiogéniques

L'angiogenèse apparait donc comme un phénomène complexe, finement régulé par divers activateurs (facteurs pro-angiogéniques) et inhibiteurs (facteurs anti-angiogéniques). Depuis la mise en évidence du rôle clé de l'angiogenèse dans la croissance tumorale, un nombre abondant de régulateurs endogènes ont été identifiés et étudiés.

De nombreux facteurs pro-angiogéniques agissant directement ou non sur la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales ont été mis en évidence, en particulier : le VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor »), le FGF (« Fibroblast Growth Factor »), le PDGF (« Platelet-Derived Growth Factor »), l'angiogenine, le NO.²⁶ De la même manière, un large nombre de facteurs endogènes anti-angiogéniques ont été caractérisés ces dernières années : la TPS-1 (thrombospondine-1), l'angiostatine, les VEGFR solubles, l'endostatine.²⁷

Ces différents régulateurs peuvent être produits soit par les cellules tumorales, soit par les cellules de l'environnement (cellules du stroma, de la matrice extracellulaire). Parmi ces régulateurs, les deux molécules les plus étudiées sont d'une part le facteur pro-angiogénique VEGF et d'autre part le facteur anti-angiogénique TPS-1.

Comme précisé précédemment, en conditions pathologiques et en particulier lors de cancers, l'équilibre entre ces facteurs pro et anti-angiogéniques est rompue en faveur des inducteurs de l'angiogenèse.^{28,17} Ces régulateurs, et notamment le VEGF, induisent une cascade d'événements (dégradation de la membrane basale, augmentation de la perméabilité, dégradation de la matrice extracellulaire) conduisant à la migration, l'invasion et la prolifération cellulaires nécessaires au mécanisme de l'angiogenèse et donc à la croissance tumorale.²⁶

²⁴ R. K. Jain, *Science*, **2005**, *307*, 58-62

²⁵ G. Helmlinger, F. Yuan, M. Dellian and R.K. Jain, *Nature Med.* **1997**, *3*, 177-182

²⁶ R. N. Gacche, R. J. Meshram, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2014**, *1846*, 161-179

²⁷ D. Ribatti, *Leukemia Research*, **2009**, *33*, 638-644

²⁸ V. Baeriswyl and G. Christofori, *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 329-337

3. Principaux acteurs de l'angiogenèse : Système VEGF/VEGFR

Parmi les facteurs pro-angiogéniques, le VEGF semble être l'un des acteurs principaux de l'angiogenèse tumorale. Il exerce son activité pro-angiogénique en se fixant à la surface de récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR).

3.1 Le VEGF : caractéristiques structurales et biologiques

Dans les années 1980, deux équipes de recherche indépendantes ont découvert ce facteur de croissance VEGF. En 1983, l'équipe de Senger mis en évidence un composé capable d'induire une forte perméabilité vasculaire, ils l'appelèrent VPF (« Vascular Permeability Factor »).²⁹ Peu de temps après, en 1989, Ferrara et Henzel, ont quant à eux identifié un nouveau facteur de croissance appelé VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor »).³⁰ Plus tard, il a été admis que ces deux molécules correspondaient en réalité à un même et unique facteur de croissance connu aujourd'hui sous le nom de VEGF.

La famille des VEGFs est constituée de sept protéines, les VEGFs A, B, C, D, E, F et le PlGF (« Placental Growth Factor »). Chacune de ces protéines a un rôle et un mode d'action différent. Le VEGF A (appelé VEGF) est un des membres de la famille des VEGFs les plus étudiés.

Différents isoformes de cette protéine existent³¹ : VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. Ces isoformes résultent d'un épissage alternatif. Elles ont en commun les 115 premiers acides aminés en position N-terminale ainsi que pour la plupart les six résidus en C-terminal. Le VEGF₁₆₅ est la forme dominante chez l'homme. Celui-ci est donc couramment appelé VEGF.

Structuralement, le VEGF est une glycoprotéine homodimérique antiparallèle de 45 kDa dont les deux monomères sont reliés par deux ponts disulfures (cystéines 51 et 60). Chaque monomère est constitué de 7 brins β et de 2 hélices α . La structure de chaque monomère est formée d'un domaine central en feuillet β composé de quatre brins β antiparallèles (β 1, β 3, β 5, β 6). Les brins β 1 et β 3 sont reliés entre eux par un fragment contenant l'hélice α 2 et le brin β 2. La région N-terminale du VEGF est constituée de l'hélice α 1. Un autre motif particulier de la structure des monomères de VEGF est une région appelée nœud à cystéines. Cette structure est commune à de nombreux facteurs de croissance et est constituée de 6 cystéines formant des ponts disulfures entre les résidus C₅₇-C₁₀₂, C₆₁-C₁₀₄ et C₂₆-C₆₈ (Figure 5).³²

²⁹ D. R. Senger, S. J. Galli, A. M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V. S. Harvey and H. F. Dvorak, *Science*, **1983**, 219, 983-985

³⁰ N. Ferrara and W. J. Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 161, 851-858

³¹ H. Takahashi and M. Shibuya, *Clinical Science*, **2005**, 109, 227-241

³² Y. A. Muller, H. W. Christinger, B. A. Keyt and A. M. de Vos, *Structure*, **1997**, 5, 1325-1338

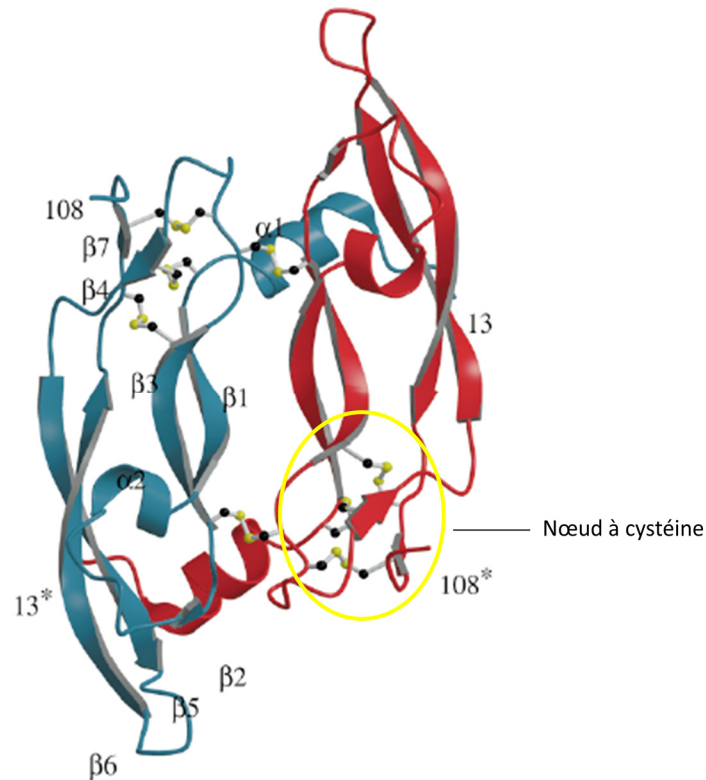


Figure 5 : Structure du VEGF (PDB 2VPF). Le monomère 1 est représenté en bleu et le monomère 2 en rouge. Une des deux régions en nœud à cystéine est cerclée en jaune. D'après Y. A. Muller et al., *Structure*, 1997.³²

Le VEGF joue un rôle essentiel dans l'angiogenèse. Au niveau physiologique, le VEGF est indispensable au développement du réseau embryonnaire^{33,34} et est aussi impliqué dans les phénomènes d'angiogenèse survenant à l'âge adulte.

Ce facteur de croissance est également impliqué dans le développement de différentes pathologies telles que l'arthrite, les maladies cardiovasculaires, certaines complications du diabète, la rétinopathie, le psoriasis ou encore le cancer.²⁶

Le VEGF joue un rôle clé dans l'angiogenèse tumorale. Ce facteur de croissance est surexprimé dans de nombreux cancers.³⁵ Son expression est fortement régulée. L'hypoxie a un rôle essentiel dans sa régulation via le facteur de transcription HIF-1 α (« Hypoxia Inducible Facteur »).^{36,37} De plus, le VEGF peut être séquestré dans la matrice extracellulaire (MEC). Sa libération est régulée par différentes protéines telles que les héparinases, la plasmine ou encore des métalloprotéases matricielles

³³ P. Carmeliet, V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau and A. Nagy, *Nature*, **1996**, *380*, 435-439

³⁴ N. Ferrara, K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan and M.W. Moore, *Nature*, **1996**, *380*, 439-442

³⁵ N. Ferrara, *The Oncologist*, **2004**, *9*, 2-10

³⁶ R. S. Kerbel, *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 2039-2049

³⁷ N. Ferrara and T. Davis-Smyth, *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 4-25

(MMPs). Ce mécanisme de séquestration/libération participe à la régulation de ce facteur de croissance.³⁸

Initialement identifié pour ses propriétés de perméabilité des vaisseaux, le VEGF induit également de nombreux autres effets.^{35,37} Notamment, il assure la migration, l'invasion, la prolifération et la survie des cellules endothéliales. Il exerce également un effet sur d'autres types cellulaires dont les monocytes, les cellules progénitrices de la moelle osseuse ainsi que les cellules du système immunitaire.

3.2 VEGFRs : caractéristiques structurales et activation par le VEGF

3.2.1 Généralités

Surexprimé dans de nombreux de cancers, le VEGF assure son activité pro-angiogénique en se fixant sur la partie extracellulaire de récepteurs membranaires présents à la surface des cellules endothéliales, et ainsi permet le développement de nouveaux vaisseaux.

Chez l'homme, on dénombre trois récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3) ainsi que deux corécepteurs dépourvus d'activité tyrosine kinase (NRP1 et NRP2). Les membres de la famille des VEGFs se lient avec des affinités différentes sur les trois récepteurs à activité tyrosine kinase et activent des voies de signalisation différentes. Ceci conduit, par conséquent, à des effets cellulaires différents (*Figure 6*).^{39,40,41,42}

Tous les isoformes du VEGF-A se lient à la fois au VEGFR1 (Flt1) et au VEGFR2 (KDR). Le VEGF-B ainsi que le PlGF (PlGF-1 et 2) se lient spécifiquement au VEGFR1. Des hétérodimères de VEGF-A et PlGF ont également été identifiés, et il a été démontré qu'ils activaient le VEGFR2. Le VEGF-E interagit spécifiquement avec le VEGFR2, et les facteurs de croissances VEGF-C et D se lient, quant à eux, aux récepteurs VEGFR2 et VEGFR3.³⁹

Il a été mis en évidence que les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 jouent un rôle primordial dans l'angiogenèse tandis que le VEGFR3 active des voies de signalisation conduisant à la lymphangiogenèse.⁴³

Contrairement aux VEGFRs, les neuropilines ne possèdent pas de domaine à activité tyrosine kinase et par conséquent ne peuvent à elles seules activer des voies de signalisation. Il est suggéré que

³⁸ S. Lee, S. M. Jilani, G. V. Nikolova, D. Carpizo and M. L. Iruela-Arispe, *J. Cell. Biol.* **2005**, *169*, 681-691

³⁹ D. J. Hicklin and L. M. Ellis, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1011-1027

⁴⁰ S. Koch, S. Tugues, X. Li, L. Gualandi and L. Claesson-Welsh, *Biochem. J.* **2011**, *437*, 169-183

⁴¹ S. Koch and L. Claesson-Welsh, *Cold Spring Harb Perspect. Med.* **2012**, *2*:a006502

⁴² M. Shibuya, *Biomol. Ther.* **2014**, *22*, 1-9

⁴³ A. Kaipainen, J. Korhonen, T. Mustonen, V. W. M. Van Hinsbergh, G. H. Fang, D. Dumont, M. Breitman and K. Alitalo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 3566-3570

NRP1 et NRP2 agissent comme corécepteurs des VEGFRs en augmentant l'affinité des ligands pour ces récepteurs et aient ainsi un rôle dans la régulation de l'angiogenèse.^{44,45}

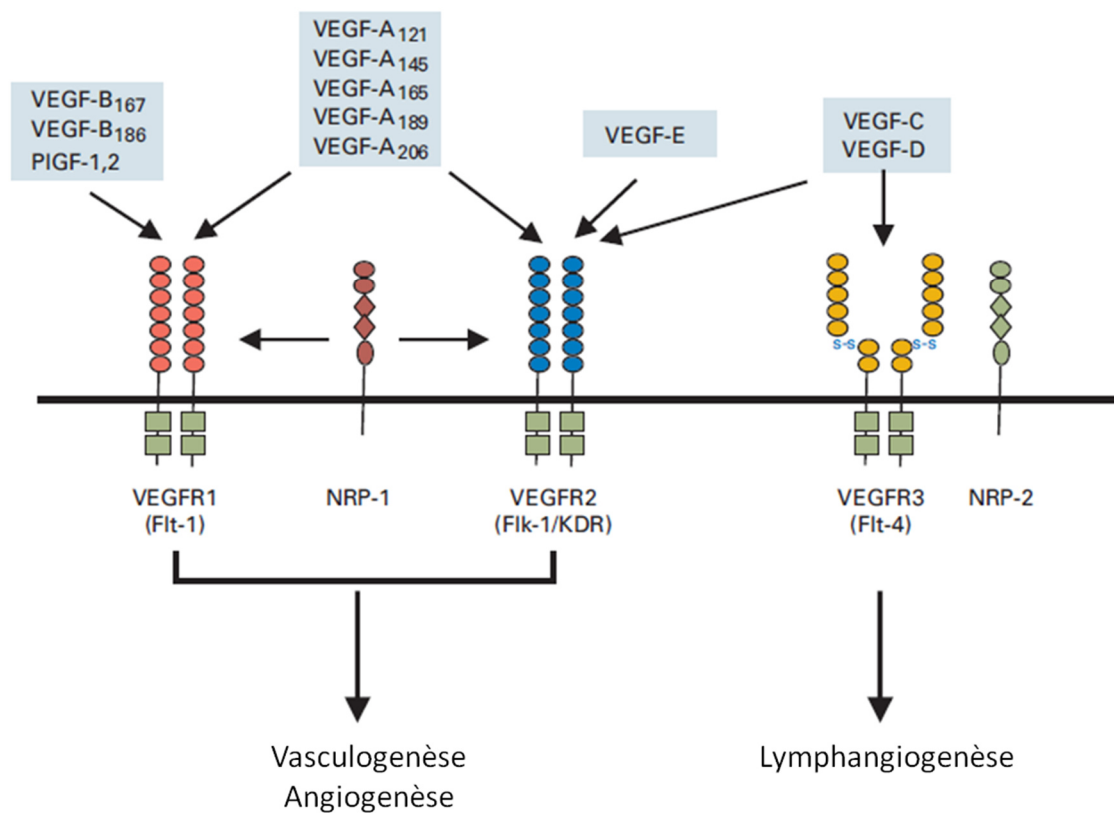


Figure 6 : Spécificité de liaisons des différents membres de la famille des VEGFs sur les trois récepteurs à activité tyrosine kinase VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3 et effets de ces récepteurs sur la vasculogenèse, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. D'après D. J. Hicklin and L. M. Ellis, *J. Clin. Oncol.* 2005.³⁹

Dans la suite de cette introduction nous nous intéresserons particulièrement au facteur de croissance VEGF et par conséquent à ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2.

3.2.2 VEGFR1 / VEGFR2 et mécanisme d'activation par le VEGF

Les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 sont des récepteurs transmembranaires présents à la surface des cellules endothéliales. Initialement sous forme de monomères, ces récepteurs sont actifs sous forme de dimères. Ces deux récepteurs au VEGF présentent 44 % d'homologie de séquence. Chaque monomère est formé de trois régions distinctes (Figure 7). La région extracellulaire est composée de sept domaines de type immunoglobuline et permet non seulement la fixation du ligand et la dimérisation du récepteur mais également le maintient sous forme monomérique en absence de

⁴⁴ S. Soker, S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld and M. Klagsbrun, *Cell*, **1998**, 92,735-745

⁴⁵ S. Soker, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2001**, 33, 433-437

ligand via des forces répulsives.⁴⁶ La région centrale du récepteur correspond au domaine transmembranaire. Enfin, la région intracellulaire contient les domaines à activité tyrosine kinase.

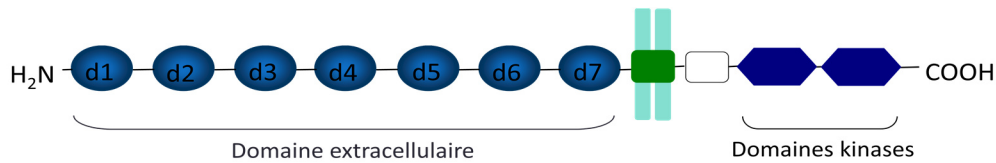


Figure 7 : Structure schématique d'un monomère de VEGFR

Le mécanisme d'activation de ces deux récepteurs est similaire à celui observé pour l'ensemble des récepteurs à activité tyrosine kinase. Les grandes étapes sont donc : fixation du ligand, mécanisme de dimérisation, et activation des domaines intracellulaires à activité tyrosine kinase par changement conformationnel puis phosphorylation de résidus tyrosines. Cependant, ce mécanisme d'activation n'est pas aussi simple. La fixation seule du ligand ne permet pas d'induire l'activation des voies de signalisation. Diverses interactions supplémentaires et points de contacts entre les monomères de récepteurs sont nécessaires pour stabiliser le complexe et induire son activation. En s'appuyant sur la revue écrite par E. Stuttfeld et K. Ballmer-Hofer, la partie qui suit vise à résumer les différentes étapes et éléments indispensables à l'activation.⁴⁷

Des études biochimiques, génétiques et structurales ont été réalisées afin de caractériser au mieux l'interaction entre le VEGF et ses récepteurs à activité tyrosine kinase. Ces différentes études ont mis en évidence que pour le VEGFR1, le domaine d2 du récepteur était suffisant pour fixer le VEGF. Cependant, les domaines d1 et d3 peuvent participer à la liaison du ligand et améliorer l'affinité. Au contraire, pour le VEGFR2, les domaines d2 et d3 sont nécessaires à la liaison du VEGF.

Bien que cela ne soit pas encore clairement défini, et que certaines études tendent à montrer que le récepteur pourrait se pré-dimériser avant fixation du ligand,⁴⁸ il est historiquement établi que la liaison du VEGF, lui-même dimérisé, à un monomère de récepteur induit le recrutement d'un second monomère et entraîne ainsi leur dimérisation.

Une fois le ligand fixé et le récepteur dimérisé, différentes interactions viennent stabiliser le complexe et permettre l'activation des voies de signalisation (*Figure 8*).

⁴⁶ Q. Tao, M. V. Backer, J. M. Backer and B.I. Terman, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 21916-21923

⁴⁷ E. Stuttfeld and K. Ballmer-Hofer, *IUBMB Life*, **2009**, 61, 915-922

⁴⁸ F. Mac Gabhann and A. S. Popel, *Biophysical Chemistry*, **2007**, 128, 125-139

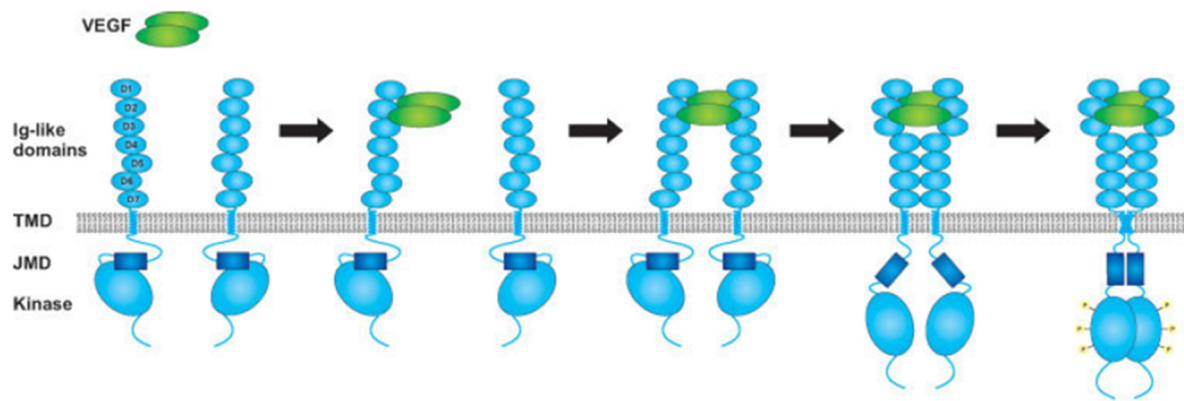


Figure 8 : Représentation schématique du mécanisme d'activation des VEGFRs. D'après E. Stuttfeld and K. Ballmer-Hofer, *IUBMB Life*, 2009.⁴⁷

Au niveau extracellulaire (ECD), il a notamment été montré pour le VEGFR2 par microscopie électronique que le domaine d7 (adjacent à la membrane) est impliqué dans des interactions stabilisantes.⁴⁹ La mutation de ce domaine du VEGFR2 réduit significativement l'activité du récepteur.⁵⁰ De façon additionnelle, le domaine d4 est également impliqué dans la dimérisation du VEGFR1. En effet, la délétion ou mutation de ce domaine conduit à une perte considérable de l'activité.^{51,50} Ces différentes interactions entre les domaines extracellulaires de ces monomères induisent donc des modifications structurales de la région extracellulaire du récepteur. Celles-ci peuvent ensuite se répercuter au niveau intracellulaire et donc conduire au bon positionnement des domaines à activité tyrosine kinases au niveau intracellulaire.

Le domaine transmembranaire (TMD) joue également un rôle pivot dans l'activation du récepteur. En effet, différentes interactions au niveau de ce domaine conduisent à une bonne orientation des domaines intracellulaires et donc à une activation. Des études de mutations ont été réalisées au niveau de ce domaine transmembranaire. Elles ont conduit à l'obtention de récepteurs actifs ou inactifs.⁵²

Le domaine intracellulaire adjacent à la membrane (JMD : juxtamembrane domains) est également connu pour réguler l'activité tyrosine kinase. Cette activation peut se faire soit, comme pour le domaine extracellulaire, en favorisant une orientation correcte, ou en interagissant directement avec la boucle d'activation. Si cette région n'est pas phosphorylée, alors elle inhibe l'activité kinase en interagissant avec la boucle d'activation. Au contraire, la phosphorylation de résidus tyrosines de ce domaine va déstabiliser l'interaction avec la boucle d'activation et permettre une réorientation de la boucle afin de conduire à l'activation du récepteur. De plus, cette région contient généralement de

⁴⁹ C. Ruch, G. Skinnotis, M. O. Steinmetz, T. Walz and K. Ballmer-Hofer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 249-250.

⁵⁰ C. A. C. Hyde, A. Giese, E. Stuttfeld, J. A. Saliba, D. Villemagne, T. Schleier, H. K. Binz and K. Ballmer-Hofer, *Molecular and Cellular Biology*, **2012**, *32*, 3802-3813

⁵¹ A. Shinkai, M. Ito, H. Anazawa, S. Yamaguchi, K. Shitara and M. Shibuya, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31283-31288

⁵² D. D. Dosch and K. Ballmer-Hofer, *FASEB journal*, **2010**, *24*, 32-38

nombreux résidus basiques qui peuvent interagir avec les résidus polaires de la membrane. Ces interactions semblent essentielles pour positionner correctement les domaines kinases.

Enfin, le domaine kinase lui-même semble pouvoir établir des interactions additionnelles. Cela a notamment été mis en évidence au niveau des récepteurs à l'EGF.^{53,54}

En conclusion, l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase est un processus complexe qui nécessite bien entendu la fixation du ligand et la dimérisation du récepteur mais également de nombreuses interactions additionnelles. Par conséquent, un défaut dans ces interactions peut conduire à une inactivation des récepteurs ou à une réponse partielle même en présence de VEGF (Figure 9).

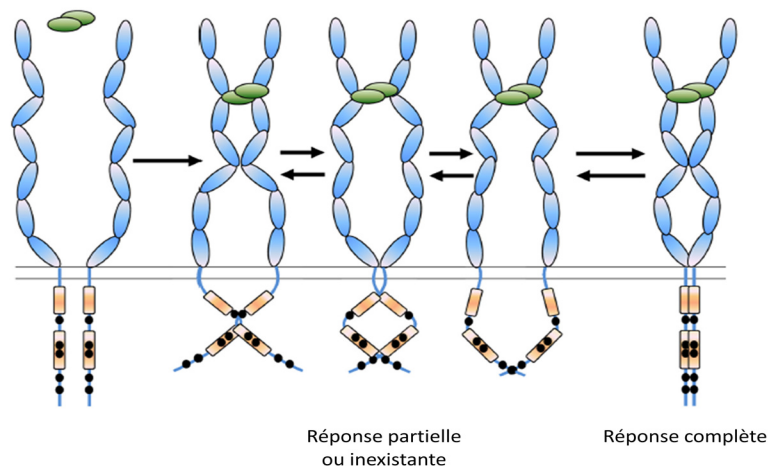


Figure 9 : Positionnement correcte des différents domaines des VEGFRs afin d'induire une réponse cellulaire. D'après C.A.C. Hyde et al., *Molecular and Cellular Biology*, 2012.⁵⁰

3.3 Signalisation cellulaire : VEGFR1 vs VEGFR2

Bien que structurellement proches, le VEGFR1 et le VEGFR2 ont des affinités différentes pour le VEGF et induisent des effets cellulaires et biologiques différents.

3.3.1 Le VEGFR2

Le VEGFR2 est une glycoprotéine de 210-230 kDa. Elle lie le VEGF avec une affinité de 750 pM et est responsable de la plupart des effets cellulaires du VEGF. La fixation du VEGF sur ce récepteur induit une perméabilité vasculaire accrue, une survie cellulaire, ainsi que la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire.⁴⁰ Ce récepteur est majoritairement présent à la surface des cellules endothéliales. Il est principalement exprimé lors du développement embryonnaire. A l'âge adulte son

⁵³ X. Zhang, K. A. Pickin, R. Bose, N. Jura, P. A. Cole and J. Kuriyan, *Nature*, **2007**, 450, 741-744

⁵⁴ X. Zhang, J. Gureasko, K. Shen, P.A. Cole and J. Kuriyan, *Cell*, **2006**, 125, 1137-1149

expression diminue mais est réactivée lors de phénomènes physiologiques ponctuels ainsi que dans des pathologies telles que le cancer.

Le VEGFR2 semble donc être le médiateur principal de l'activité angiogénique. Par conséquent, il est fortement impliqué dans le développement embryonnaire. Il a été montré que l'inactivation du gène codant pour ce récepteur (VEGFR2^{-/-}) bloque la vasculogénèse et conduit à une détérioration du développement des cellules endothéliales et hématopoïétiques. Ceci induit la mort des embryons de souris (J = 8,5).⁵⁵ Ce résultat est similaire à celui obtenu lors de l'inactivation du VEGF (VEGF^{-/-}). Ces données confirment donc l'importance et le rôle essentiel de ce récepteur lors du développement. Il a également été montré que le VEGFR2 est impliqué dans l'angiogénèse pathologique. En effet, une surexpression du VEGFR2 a été observée au niveau du système vasculaire tumoral de diverses tumeurs malignes.^{56,57,40}

D'un point de vue biochimique, la fixation du VEGF induit la phosphorylation de plusieurs tyrosines impliquées dans différentes voies de signalisations et conduit donc à diverses réponses biologiques. Parmi elles, la tyrosine 1175 joue un rôle crucial. La prolifération cellulaire induite par le VEGFR2 implique notamment l'activation des voies de signalisation de la phospholipase C gamma-protéine (PLC- γ) et des MAP kinases (C-Raf-MAP kinase). La survie serait, quant à elle, en partie due à l'activation de PI3K, et la migration cellulaire à la kinase d'adhésion focale FAK.⁴⁰

3.3.2 Le VEGFR1

Le VEGFR1 est une glycoprotéine de 180-185 kDa qui lie le VEGF avec une affinité beaucoup plus importante que le VEGFR2 (Kd = 15 pM, comparé à 750 pM).

Malgré cette très forte affinité pour le VEGF, l'activité tyrosine kinase du VEGFR1 est faible. La présence d'une séquence inhibitrice au niveau de la région intracellulaire JMD du VEGFR1 pourrait expliquer ce résultat. Il a notamment été mis en évidence que le remplacement de cette région JMD du VEGFR2 par celle du VEGFR1 induit une perte d'activité significative. Au contraire, le remplacement de la région JMD du VEGFR1 par celle du VEGFR2 conduit à une amélioration de l'activité tyrosine kinase.⁵⁸

Les fonctions et implications de ce récepteur au niveau biologique sont controversées. Certaines études ont mis en évidence que, *in vitro*, le VEGFR1 n'était pas indispensable pour la prolifération ou la migration des cellules endothéliales.^{59,60,61} D'autres études utilisant notamment des anticorps

⁵⁵ F. Shalaby, J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.F. Wu, M.L. Breitman and A.C. Schuh, *Nature*, **1995**, 376, 62–66

⁵⁶ K.H. Plate, G. Breier, H.A. Weich, H.D. Mennel and W. Risau, *Int. J. Cancer*, **1994**, 59, 520-529

⁵⁷ H. Youssoufian, D.J. Hicklin and E.K. Rowinsky, *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 5544-5548

⁵⁸ H. Gille, J. Kowalski, L. Yu, H. Chen, M.T. Pisabarro, S.T. Davis and N. Ferrara, *EMBO J.* **2000**, 19, 4064-4073

⁵⁹ H. Gille, J. Kowalski, B. Li, J. LeCouter, B. Moffat, T.F. Zioncheck, N. Pelletier and N. Ferrara, *J. Biol. Chem.* **2001** 276, 3222-3230

⁶⁰ N. Rahimi, V. Dayanir and K. Lashkari, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 16986–16992

⁶¹ J. Waltenberger, L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya and C.H. Heldin, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 26988-26995

neutralisant du VEGFR1 ont, au contraire, montré l'implication de ce récepteur dans les processus de migration et de réorganisation du réseau d'actine sur des cellules endothéliales.⁶²

Le rôle du VEGFR1 est complexe et n'est à l'heure actuelle pas encore entièrement élucidé. Initialement, il a été envisagé que ce récepteur agisse comme un régulateur négatif des effets du VEGF et donc de l'angiogenèse. En raison de sa forte affinité pour le VEGF ainsi que de sa faible activité kinase, il a été envisagé que ce récepteur agisse comme réservoir de VEGF et module ainsi son activité.⁶³ Il est intéressant de noter qu'il existe une forme soluble de ce récepteur. Ce VEGFR1 soluble est constitué uniquement de la partie extracellulaire et n'a par conséquent pas d'activité tyrosine kinase. Ce dernier présente également une affinité pour le VEGF nettement supérieure au VEGFR2, et sert donc à priori également de régulateur des voies du VEGF.

Il apparaît aujourd'hui qu'une partie importante de l'activité de ce récepteur semble due à sa capacité à moduler celle du VEGFR2. Différents mécanismes peuvent être à l'origine de cette régulation du VEGFR2 par le VEGFR1.

Les récepteurs au VEGF peuvent former non seulement des homodimères VEGFR1 et VEGFR2 mais également des hétérodimères VEGFR1/2 lorsque la cellule co-exprime les deux récepteurs. De plus, le VEGFR1 étant présent en plus faible quantité que le VEGFR2, la majorité des VEGFR1 dans les cellules endothéliales semblent exister sous forme d'hétérodimère VEGFR1/2.⁴⁸

Ces différents dimères de récepteurs (homo ou hétéro dimères) activent des voies de signalisation différentes.^{64,65} Il a notamment été montré récemment que contrairement à l'homodimère VEGFR2, l'activation de l'hétérodimère VEGFR1/2 n'induit pas d'effets sur la prolifération cellulaire. Partant de ces constatations, il a été proposé que le VEGFR1 régule négativement le VEGFR2 en formant des hétérodimères VEGFR1/2, et maintienne ainsi l'homéostasie des cellules endothéliales.⁶⁶ De plus, ces hétérodimères peuvent être activés soit par le VEGF soit par un hétérodimère constitué d'un monomère de VEGF et un de PlGF. Ceci participe donc également à la régulation de la signalisation du VEGF.⁶⁴ Le VEGFR1 soluble peut également dimériser avec le VEGFR2, formant des récepteurs non fonctionnels, et induisant ainsi une régulation négative de la signalisation.⁶⁷

Le VEGFR1 peut également induire la transphosphorylation du VEGFR2 même en absence d'hétéro-dimérisation, et ainsi moduler son activité. Il a notamment été montré que la fixation du PlGF sur le

⁶² S. Kanno, N. Oda, M. Abe, Y. Terai, M. Ito, K. Shitara, K. Tabayashi, M. Shibuya and Y. Sato, *Oncogene*, **2000**, *19*, 2138–2146

⁶³ S. Hiratsuka, O. Minowa, J. Kuno, T. Noda and M. Shibuya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 9349-9354

⁶⁴ M. Autiero, J. Waltenberger, D. Communi, A. Kranz, L. Moons, D. Lambrechts, J. Kroll, S. Plaisance, M. De Mol, F. Bono, S. Kliche, G. Fellbrich, K. Ballmer-Hofer, D. Maglione, U. Mayr-Beyrle, M. Dewerchin, S. Dombrowski, D. Stanimirovic, P. Van Hummelen, C. Dehio, D. J. Hicklin, G. Persico, J.-M. Herbert, D. Communi, M. Shibuya, D. Collen, E. M. Conway and P. Carmeliet, *Nature medicine*, **2003**, *9*, 936-943

⁶⁵ K. Huang, C. Andersson, G. M. Roomans, N. Ito, L. Claesson-Welsh, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2001**, *33*, 315-324

⁶⁶ M.J. Cudmore, P.W. Hewett, S. Ahmad, K.-Q. Wang, M. Cai, B. Al-Ani, T. Fujisawa, B. Ma, S. Sissaoui, W. Ramma, M.R. Miller, D.E. Newby, Y. Gu, B. Barleon, H. Weich and A. Ahmed, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1-12

⁶⁷ R. L. Kendall, G. Wang, J. DiSalvo and K.A. Thomas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *201*, 326-330

VEGFR1 pouvait induire, de façon complémentaire à l'activation du VEGFR1, la phosphorylation du VEGFR2 et ainsi son activation.⁶⁴

Enfin, le VEGFR1 peut moduler l'activité du VEGFR2, et donc les réponses biologiques, en régulant l'expression du VEGFR2.^{60,68}

Le rôle et la fonction du VEGFR1 semblent très dépendant non seulement du type cellulaire, des ligands activateurs mais également du stade de développement ainsi que de l'état physiologique ou pathologique.

Lors du développement embryonnaire, ce récepteur a un effet de régulateur négatif. Cet effet s'explique comme décrit précédemment. La présence du VEGFR1 soluble peut de plus piéger le VEGF. L'inactivation du gène codant pour le VEGFR1 chez des embryons de souris (VEGFR1^{-/-}) induit la mort des souris (J = 9) en raison d'une prolifération excessive des cellules endothéliales et de sévères désorganisations et dysfonctionnement du système vasculaire.⁶⁹ De plus, la délétion du domaine intracellulaire du récepteur est compatible avec un développement vasculaire normal.⁶³ Ces expériences et résultats appuient donc et confirment d'une part son rôle de régulateur négatif et d'autre part sa fonction de stockage des facteurs de croissance.

En dehors de ce rôle de régulateur négatif, il a été mis en évidence que le VEGFR1 avait, au contraire, un rôle de régulateur positif de l'angiogenèse en situation pathologique et notamment lors de cancers.⁷⁰ En effet, il a été montré que le VEGFR1 était exprimé dans des cellules tumorales et impliqué dans la croissance et la progression des tumeurs.⁷¹ De nombreux travaux témoignent du rôle de ce récepteur dans l'angiogenèse tumorale. Seuls quelques exemples sont présentés ici. L'inactivation du VEGFR1 (VEGFR1^{-/-}) sur des souris xenogreffées induit une diminution de la croissance tumorale⁷⁰ ainsi que de la dissémination métastatique.⁷² L'utilisation d'anticorps neutralisant induit par exemple une inhibition de la croissance des gliomes chez la souris,⁷³ ainsi qu'un effet anti-tumoral sur des tumeurs de l'épiderme.⁷⁴ De plus, l'activation du VEGFR1 avec des ligands spécifiques induit, *in vitro*, sur des cellules malignes colorectales, une signalisation intracellulaire accrue, une augmentation de la migration et de l'invasion cellulaire, ainsi que la formation de nouvelles colonies cellulaires.⁷¹

⁶⁸ R. Kou, S. SenBanerjee, M.K. Jain and T. Michel, *Biochemistry*, **2005**, *44*, 15064-15073

⁶⁹ G. H. Fong, J. Rossant, M. Gertsenstein and M.L. Breitman, *Nature*, **1995**, *376*, 66-70

⁷⁰ S. Hiratsuka, Y. Maru, A. Okada, M. Seiki, T. Noda and M. Shibuya, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1207-1213

⁷¹ F. Fan, J.S. Wey, M.F. McCarty, A. Belcheva, W. Liu, T.W. Bauer, R.J. Somcio, Y. Wu, A. Hooper, D. J. Hicklin and L. M. Ellis, *Oncogene*, **2005**, *24*, 2647-2653

⁷² S. Hiratsuka, K. Nakamura, S. Iwai, M. Murakami, T. Itoh, H. Kijima, J.M. Shipley, R.M. Senior and M. Shibuya, *Cancer Cell*, **2002**, *2*, 289-300

⁷³ D.F. Stefanik, W.K. Fellows, L.R. Rizkalla, W.M. Rizkalla, P.P. Stefanik, A.B. Deleo, W.C. Welch, *J Neurooncol.* **2001**, *55*, 91-100

⁷⁴ A. Luttun, M. Tjwa, L. Moons, Y. Wu, A. Angelillo-Scherrer, F. Liao, J.A. Nagy, A. Hooper, J. Priller, B. De Klerck, V. Compennolle, E. Daci, P. Bohlen, M. Dewerchin, J.M. Herbert, R. Fava, P. Matthys, G. Carmeliet, D. Collen, H.F. Dvorak, D.J. Hicklin, P. Carmeliet, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 831-840

3.3.3 VEGFR1 vs VEGFR2

En raison de son rôle prépondérant dans la signalisation du VEGF, le VEGFR2 a fait l'objet de nombreuses études et investigations. Cependant, le revers de cette activité est que ce récepteur n'est pas spécifique de l'angiogenèse tumorale. Il régule également des fonctions physiologiques telles que par exemple la pression sanguine ou l'hypertension pulmonaire.

Contrairement au VEGFR2, l'activité pro-angiogénique du VEGFR1 semble, quant à elle, plus restreinte à des phénomènes pathologiques. Dans ce contexte, il apparaît comme une cible thérapeutique intéressante. En conséquence, cibler ce récepteur semble une stratégie de choix pour bloquer la croissance tumorale sans induire trop d'effets secondaires.

4. Inhibition de l'angiogenèse tumorale et système VEGF/VEGFR

Au vu du rôle primordial de l'angiogenèse dans la croissance tumorale ainsi que des données présentées ci-dessus, cibler l'angiogenèse apparaît comme un choix judicieux en thérapeutique. Par conséquent, de nombreux agents anti-angiogéniques ont été développés dans le cadre de nouvelles thérapies ciblées anticancéreuses.

4.1 Thérapie anti-angiogénique : agents ciblant l'axe VEGF/VEGFR

Les thérapies anti-angiogéniques sont de plus en plus développées et utilisées en clinique. En raison de son rôle primordial dans le développement de l'angiogenèse, la plupart des stratégies ciblent l'axe VEGF / VEGFR. Les différentes stratégies ciblant ce système sont présentées sur la figure 10.

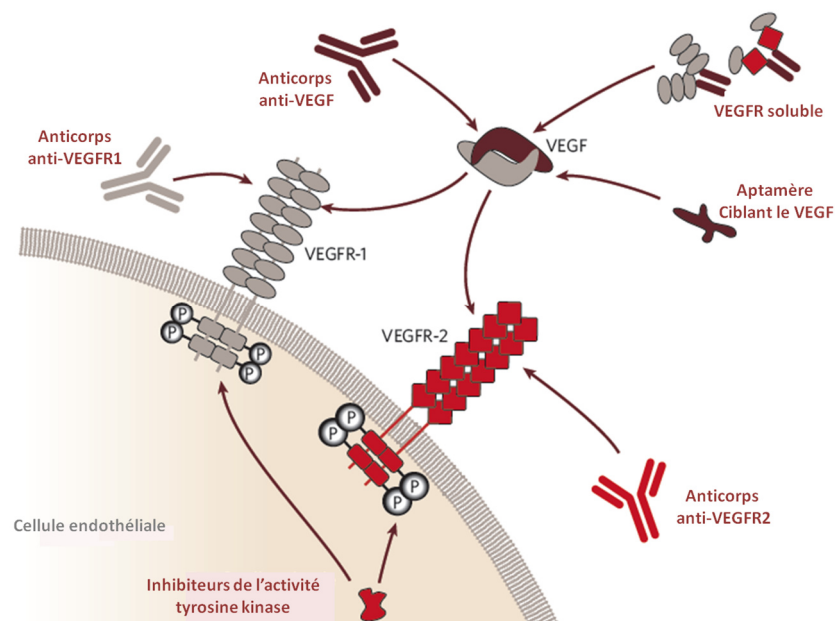


Figure 10: Principales approches anti-angiogéniques ciblant l'axe VEGF/VEGFR. D'après N. Ferrara and R.S. Kerbel, *Nature*, 2005.⁷⁵

⁷⁵ N. Ferrara and R.S. Kerbel, *Nature*, 2005, 438, 967-974

Dans le cadre des traitements anticancéreux, il est aujourd'hui admis que les traitements anti-angiogéniques améliorent significativement la survie des patients. Ces agents peuvent être classés en deux catégories :

-Molécules agissant au niveau extracellulaire : anticorps monoclonal ou protéine de fusion recombinante, dirigés spécifiquement contre le VEGF ou ses récepteurs, généralement utilisés en association avec d'autres agents cytotoxiques.

-Molécules agissant au niveau intracellulaire : petites molécules organiques inhibitrices de l'activité tyrosine kinase des récepteurs aux facteurs de croissances, utilisés en mono-chimiothérapie.

A l'heure actuelle, différents agents ciblant cet axe sont utilisés ou testés en clinique dans le cadre de thérapies anticancéreuses. On dénombre un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF (bevacizumab, Avastin®), une protéine de fusion recombinante ciblant également le VEGF (aflibercept, Zaltrap®) et différents inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des récepteurs au VEGF (axitinib (Inlyta®), cabozantinib (Cometriq®), pazopanib (Votrient®), regorafenib (Stivarga®), sorafenib (Nexavar®), sunitinib (Sutent®) et vandetanib (Caprelsa®).⁷⁶

Parmi les anticorps monoclonaux utilisés dans le cadre des traitements anti-angiogéniques, le bevacizumab (Avastin®, commercialisé par Genentech) est le plus généralement prescrit en clinique. Cet anticorps se lie au VEGF au niveau de la zone de reconnaissance des VEGFRs, bloque la liaison du facteur de croissance sur ses récepteurs et ainsi inhibe les effets biologiques du VEGF. Il est indiqué en association avec des agents dits cytotoxiques dans un grand nombre de cancers (*Tableau 1*).

En 2012, la FDA a approuvé l'utilisation de l'aflibercept (Zaltrap®), commercialisé par Sanofi-Regeneron Pharmaceuticals, Inc). Il s'agit d'une protéine de fusion agissant également en ciblant le VEGF. Il est notamment prescrit lors du cancer colorectal métastatique en association avec d'autres traitements. (*Tableau 1*)

Sept inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase sont présentés dans le tableau 1. Ces agents anti-angiogéniques sont peu spécifiques et ciblent de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase. Ils sont également prescrits dans différents types de cancers. Ils ont de plus l'avantage pour le patient, comme tous les inhibiteurs d'activité tyrosine kinase, d'être administrés per os.

⁷⁶ Site internet de la fondation de l'angiogenèse (www.angio.org)

Agent	Cible et indications
Bevacizumab (Avastin®) Genentech	Anticorps ciblant le VEGF Cancer métastatique du colon, cancer du poumon non à petites cellules, cancer métastatique du rein, cancer ovarien avancé mais nouvellement détecté (Europe).
Aflibercept (Zaltrap®) Sanofi-Regeneron	Protéine de fusion recombinante ciblant le VEGF Cancer colorectal métastatique
Axitinib (Inlyta®) Pfizer	Inhibiteur multi-kinase : VEGFR1, 2 et 3 Carcinome avancé des cellules rénales (après échec d'un traitement systémique)
Cabozantinib (Cometriq®) Exelixis	Inhibiteur multi-kinase : VEGFR2 et c-Met Cancer métastatique médullaire de la thyroïde
Pazopanib (Votrient®) GlaxoSmithKline	Inhibiteur multi-kinase : VEGFR et PDGFR, c-kit Carcinome avancé des cellules rénales
Regorafenib (Stivarga®) Bayer	Inhibiteur multi-kinase : VEGFR1, 2 et 3 et TIE2, PDGFR, FGFR, KIT, RET, RAF, BRAF, BRAFV600E Cancer métastatique du colon (stade avancé ou lors de récurrence après plusieurs traitements)
Sorafenib (Nexavar®) Bayer, Onyx	Inhibiteur multi-kinase : VEGFR1, 2 et 3 (PDGFR-β, Raf-1) Carcinome avancé des cellules rénales et hépatocytaires, Carcinome des cellules de la thyroïde (lors d'échecs à l'iode radioactif)
Sunitinib (Sutent®) Pfizer	Inhibiteur multi-kinase : VEGFR1, 2 et 3 (PDGFR-β, RET) Carcinome avancé des cellules rénales, tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) (après progression de la maladie ou d'intolérance à l'imatinib mésylate), tumeurs cancéreuses du pancréas (lors d'échecs par chirurgie ou métastases)
Vandetanib (Caprelsa®) AstraZeneca	Inhibiteur multi-kinase : VEGFRs (et EGFR) Cancer médullaire de la thyroïde (stade métastatique avancé)

Tableau 1: Agents anti-angiogéniques ciblant l'axe VEGF/VEGFR utilisés en clinique

La recherche de nouveaux agents anti-angiogéniques est en constante évolution. Suite aux résultats obtenus avec le bevacizumab, de nombreux anticorps sont développés. On retrouve notamment le HuMV833 ciblant le VEGF ainsi que l'isoforme VEGF₁₂₁ ou encore les anticorps IMC- 18F1, IMC-1121B, ImClone qui sont dirigés contre les récepteurs VEGFR1 et 2. Ces différents composés sont en cours d'évaluation à différents stades d'essais cliniques.⁷⁷ Récemment, un nouvel anticorps humanisé anti-VEGF, le MIL60, a également été développé. Il présente de nombreux avantages tant d'un point de vue économique que clinique. Cet anticorps semble avoir une affinité pour le VEGF similaire au bevacizumab et induire l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules induite par le VEGF. De plus, *in vivo* sur des modèles humains de cancer du colon et de l'ovaire, cet anticorps inhibe l'angiogenèse ainsi que la croissance tumorale.⁷⁸

Outre ces anticorps, de nombreuses molécules sont développées chaque année dans le but d'obtenir de nouveaux traitements anti-angiogéniques. Récemment, l'institut national de la santé américain recensait plus 3954 études d'essais cliniques se rapportant à des molécules ciblant, entre autre, l'angiogenèse.²⁶

L'ensemble de ces données met en évidence l'intérêt de l'angiogenèse comme cible thérapeutique et explique donc les initiatives développées pour trouver de nouveaux agents anti-angiogéniques.

4.2 Limites des traitements anti-angiogéniques et perspectives

Malgré les avantages et les bienfaits significatifs des thérapies anti-angiogéniques, quelques limitations subsistent.

4.2.1 Phénomènes de résistance

Le problème principal est l'existence de résistance à ces traitements. Deux types de résistances ont été observés.⁷⁹ La régression du développement tumoral est parfois transitoire et généralement de courte durée (quelques mois). Après cette période, les tumeurs semblent s'adapter aux traitements et développer des mécanismes de résistance. Ceci conduit à une reprise de la croissance tumorale et du développement métastatique. Ce phénomène est appelé **résistance adaptative par mécanisme d'échappement**. Dans d'autres cas, au contraire, certains patients ne répondent pas aux traitements anti-angiogéniques, et ce dès le début de la thérapie. Par conséquent, on observe une progression du cancer malgré l'administration d'agents anti-angiogéniques. On parle alors de **résistance intrinsèque**.

Le phénomène de résistance adaptative aux traitements anti-angiogéniques diffère du concept classique de résistance aux médicaments. Il n'est généralement ni du à des mutations ou altérations des gènes codants pour la protéine cible ni même à des modifications de l'absorption ou de l'efflux des médicaments. Le phénomène d'échappement est en grande partie indirect. Il implique l'activation de voies de développement alternatives. La cible reste quant à elle inhibée. A partir de

⁷⁷ F. Fan, A. Schimming, D. Jaeger and K. Podar, *J Oncol.* **2012**, 2012, ID281261

⁷⁸ X. Yang, X.F. Zhang, X. Lu, H.L. Jia, L. Liang, Q.Z. Dong, Q.H. Ye and L.X. Qin, *Hepatology*, **2014**, 59, 1874-1885

⁷⁹ G. Bergers and D. Hanahan, *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, 8, 592-603

données expérimentales, un certain nombre de mécanismes distincts et interdépendants ont été envisagés :

- Revascularisation consécutive à un recrutement de facteurs pro-angiogéniques alternatifs incluant le FGF, l'éphrine ou encore par exemple l'angiopoïétine (*Figure 11, voie A*).
- Recrutement de cellules progénitrices vasculaires et monocytes pro-angiogénique à partir de la moelle osseuse. Le manque d'oxygénation causé par la régression des vaisseaux lors de traitements anti-angiogéniques peut conduire au recrutement de cellules de moelle osseuse. Celles-ci ont la capacité d'alimenter la tumeur en formant de nouveaux vaisseaux et ainsi d'induire la reprise de la progression tumorale (*Figure 11, voie B*).
- Protection des vaisseaux par recrutement de péricytes. Ceci conduit à une diminution du signal de survie et ainsi au développement tumoral (*Figure 11, voie C*).
- Accentuation des mécanismes d'invasion des tumeurs dans les tissus sains et de dissémination métastatique. Les cellules tumorales peuvent migrer en longeant les vaisseaux et ainsi infiltrer de nouveaux tissus (*Figure 11, voie D*).

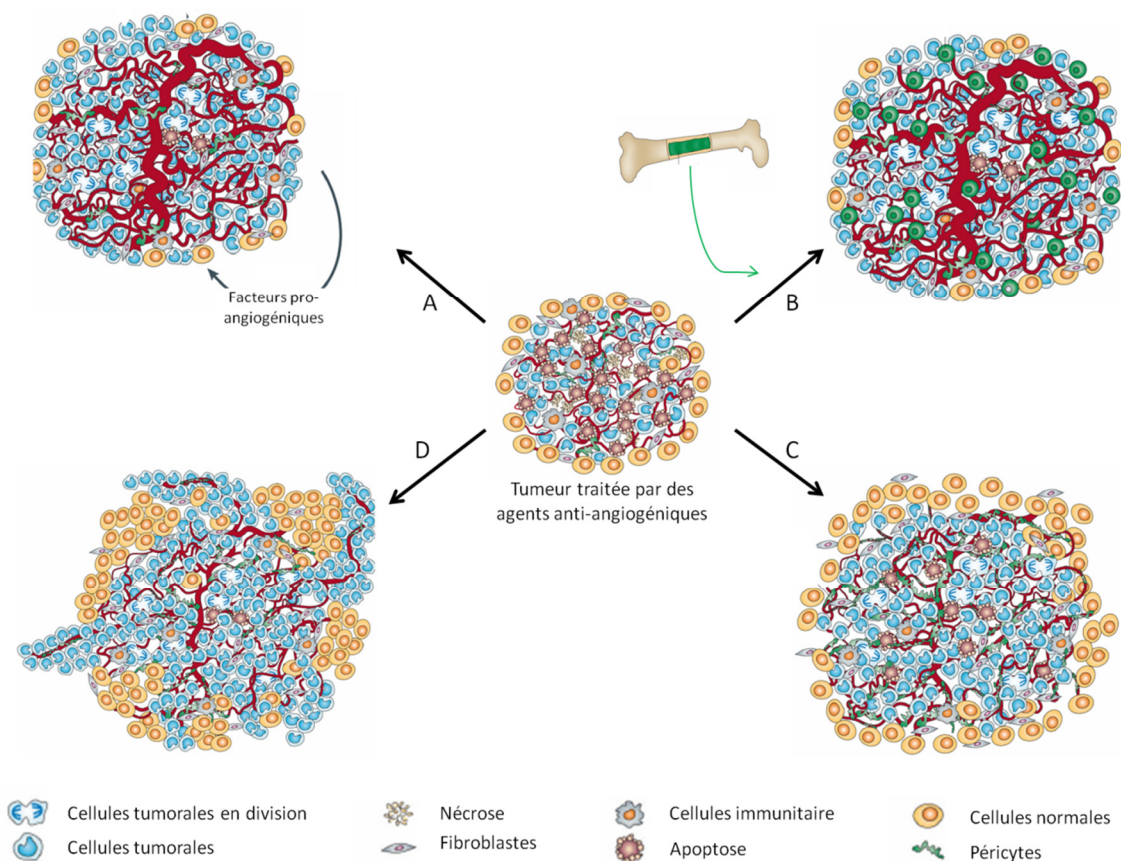


Figure 11 : Mécanismes possibles de résistance adaptative par échappement lors de traitements anti-angiogéniques. D'après G. Bergers and D. Hanahan, *Nat. Rev. Cancer*, 2008.⁷⁹

Ces phénomènes de résistance limitant l'efficacité des traitements anti-angiogéniques actuels, une meilleure connaissance de ces mécanismes semble indispensable afin de développer de nouvelles thérapies plus actives. Une solution envisagée est d'utiliser plusieurs traitements différents en parallèle. La combinaison d'agents anti-angiogéniques ayant des modes d'action différents, et notamment des agents ciblant les mécanismes de résistance, pourrait induire une meilleure efficacité. Enfin, il apparaît également important de réussir à identifier des marqueurs de l'angiogenèse tumorale ainsi que de la normalisation des vaisseaux afin d'améliorer les traitements existants.

4.3.2 Toxicité et effets secondaires

En raison du caractère quiescent de l'angiogenèse à l'âge adulte, il a longtemps été envisagé que les thérapies anti-angiogéniques n'induraient pas d'effets secondaires. Cependant, ces conclusions ont été remises en question et divers effets néfastes peuvent être notés : hypertension artérielle, hémorragies, problèmes de cicatrisation, protéinurie, ou encore risques de thrombose et perforations digestives. Ces effets secondaires varient en fonction des agents utilisés (inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase ou agents ciblant le VEGF). Ces complications, moins néfastes que celles décrites pour les traitements dits cytotoxiques, ont conduit, dans quelques cas particuliers, au retrait de certains traitements. Notamment, en 2010, la FDA a retiré son approbation pour l'utilisation du bevacizumab dans le cadre du traitement de cancer du sein métastatique en raison de sa toxicité ainsi que de l'absence d'effet net sur la survie des patients.⁸⁰

Malgré ces complications, cibler l'angiogenèse reste une approche privilégiée. Les recherches actuelles s'orientent vers le développement de nouveaux composés plus spécifiques et capables de distinguer les cellules saines des cellules cancéreuses. En raison de sa spécificité pour l'angiogenèse tumorale, cibler le VEGFR1 semble une approche prometteuse. C'est dans cette perspective que s'inscrit une partie de notre travail.

III. Inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR1

Une approche pour développer de nouveaux agents anti-angiogénique consiste à concevoir des molécules pouvant moduler ou bloquer l'interaction VEGF/VEGFR et ainsi inhiber les voies de signalisation conduisant au processus de l'angiogenèse. C'est dans ce cadre que s'inscrit la thématique développée au laboratoire. Celle-ci repose sur le développement rationnel de nouveaux composés peptidiques ou hétérocycliques capables de se lier au VEGF ou au VEGFR1 et ainsi inhiber cette interaction.

⁸⁰ M. Wehland, J. Bauer, M. Infanger and D. Grimm, *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 4244-4257

1. Interactions protéine/protéine : un intérêt thérapeutique grandissant

Les interactions protéiques peuvent être regroupées en deux grandes classes : d'une part celles dites « catalytiques » qui correspondent aux systèmes enzymatiques et d'autre part celles dites « non catalytiques ». Dans le cadre de ce travail, seules les interactions ne possédant pas d'activité catalytique seront présentées. Ces interactions protéines-protéines jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques. La diversité de ces interactions ainsi que la spécificité de chaque interface de liaison offrent de nombreuses possibilités pour développer de nouveaux agents thérapeutiques.

1.1 Interaction protéine/protéine

En dépit de la diversité des interactions protéines-protéines, différentes caractéristiques générales peuvent être établies. La surface d'interaction entre deux protéines est, dans la plupart des cas, plane et étendue (1500-3000Å). La formation de complexe entre deux protéines repose généralement essentiellement sur des interactions de type hydrophobes (contacts de van der Waals entre des résidus non polaires). Cependant, diverses liaisons hydrogènes et interactions électrostatiques peuvent également jouer un rôle important.

L'ensemble des résidus présents au niveau de la surface d'interaction ne contribuent pas équitablement à la formation du complexe. Généralement, seuls quelques résidus induisent la majeure partie des interactions. Ces résidus, appelés « hot spots », se caractérisent par une perte d'énergie significative lors du remplacement par une alanine. Il est admis que la mutation d'un acide aminé définit comme un « hot spot » par une alanine induit généralement une perte d'énergie libre de liaison $\Delta G > 2 \text{ kcal. mol}^{-1}$. L'expérience consistant à remplacer un à un tous les acides aminés afin de déterminer leur importance pour la formation du complexe est appelé alanine scan. Certains résidus tels que le tryptophane, l'arginine et la tyrosine apparaissent de façon beaucoup plus fréquente que les autres acides aminés dans les « hot spots » et contribuent fortement aux interactions protéine-protéine. Les « hot spots » ne sont pas répartis de façon aléatoire sur l'ensemble de la surface d'interaction. Ils sont généralement regroupés dans des zones appelées « hot regions ». Le regroupement de ces résidus facilite ainsi le départ des molécules d'eau lors de l'interaction. Une ou plusieurs « hot regions » peuvent participer à la stabilisation d'un complexe. La contribution énergétique entre deux régions peut être additive ou coopérative. Enfin, il est important de noter que les sites de liaisons sont généralement dynamiques, ce qui permet de faciliter l'interaction des protéines entre elles.^{81,82,83}

⁸¹ H. Yin and A.D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4130-4163

⁸² W. Guo, J.A. Wisniewski and H. Ji, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2546-2554

⁸³ O. Keskin, B. Ma and R. Nussinov, *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 1281-1294

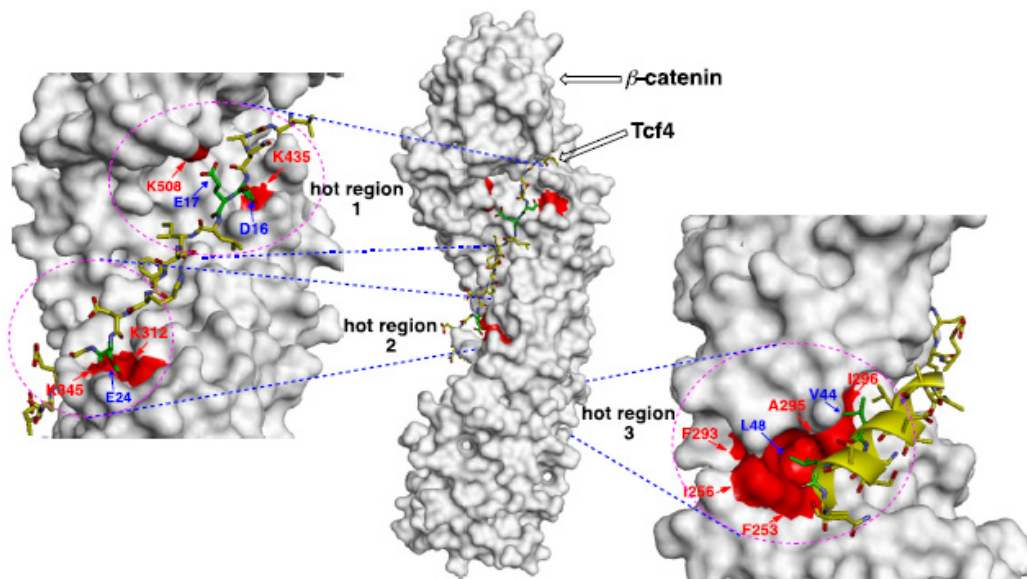


Figure 12: Exemple de « hot spot » et « hot region ».

Structure de la β -caténine en complexe avec le facteur T cellulaire (Tcf) (PDB IDs, 1G3J and 2GL7). Mise en évidence de trois « hot regions ». D'après W. Guo et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**.⁸²

Cette notion de « hot spot » est très importante lors de la recherche de modulateurs de ces interactions protéiques. En raison de leurs rôles prédominants dans les interactions et leurs surfaces assez restreintes, cibler ces régions plus précisément facilite le développement d'inhibiteurs de petites tailles.

1.2 Développement d'inhibiteurs d'interactions protéine-protéine

Malgré l'attrait pharmaceutique grandissant, cibler des interactions protéine-protéine reste aujourd'hui encore compliqué. En effet, l'identification et le développement de petites molécules capables de moduler ou d'inhiber ces interactions sont limités par un certains nombre facteurs :

Les surfaces d'interactions sont souvent très étendues ce qui rend compliqué le développement de petites molécules. Cette première limitation confirme l'importance d'identifier les « hot spost » sur une protéine. Cependant ceci n'est pas toujours aisé. Ces régions sont également souvent très planes. Le manque de relief rend difficile l'identification de zones où pourrait s'amarrer un ligand. De plus, les régions d'interactions ne sont souvent pas contiguës. Par conséquent, elles ne peuvent pas être mimées simplement par des peptides synthétiques classiques. A ces premières limitations s'ajoute souvent des problèmes de faux positifs et donc la difficulté de distinguer une réelle fixation d'artefacts de liaison. Enfin, contrairement aux enzymes, il est parfois difficile de tester l'activité des ligands développés. Dans de nombreux cas, l'activité des ligands doit être mesurée par des méthodes de liaison directe de type ITC (« Isothermal Titration Calorimetry ») ou SPR (« Surface Plasmon Resonance ») par exemple.⁸¹

De nombreuses stratégies ont été développées ces dernières années pour identifier et concevoir de nouveaux inhibiteurs d'une interaction protéine-protéine. Elles peuvent, principalement, être divisées en trois grandes approches.⁸⁴

- Approche biologique : La première stratégie, qui a fait ses preuves en clinique, est de développer des anticorps thérapeutiques pour cibler un des deux partenaires protéiques. Plus récemment, des petites protéines recombinantes (type récepteurs solubles ou « trap ») ont également été développées et utilisées pour inhiber ces interactions.

- Approche par criblage : Une des limitations pour concevoir des inhibiteurs protéiques est le manque de composés de départ. Afin de palier ce problème, une stratégie très employée est de réaliser des criblages de banques de composés, qu'ils soient de nature peptidique ou hétérocyclique. Différentes méthodes existent : techniques biochimiques, RMN, bacterial ou phage display, microarrays, chimie combinatoire. Ces stratégies peuvent être automatisées afin de réaliser des criblages dits à haut débit (« high-throughput screening », HTS) et ainsi tester en un minimum de temps un maximum de composés. De plus, toujours dans le but de faciliter la découverte de nouveaux inhibiteurs, des criblages dits virtuels ou *in silico* peuvent être réalisés. Quelques unes de ces techniques seront détaillées dans la suite du manuscrit.

- Conception rationnelle : La troisième approche consiste à concevoir de manière rationnelle de nouveaux ligands en s'appuyant sur les données structurales connues (structure cristallographique, RMN, modélisation). Pour les raisons citées précédemment, il ne s'agit généralement pas de mimer exactement le ligand naturel mais son organisation tridimensionnelle ainsi que les quelques interactions essentielles. Cette approche fait classiquement appel à l'utilisation de peptides, peptidomimétiques, foldamères ou encore squelettes organiques mimant des structures secondaires de type hélice α ou coudes β par exemple.

Ces différentes techniques et approches ont conduit avec succès à l'identification et au développement de différentes molécules capables de moduler des interactions protéines-protéines.^{84,81}

2. Application au cas de l'interaction VEGF/VEGFR

2.1 Interaction VEGF/VEGFR1

En raison du rôle prépondérant du VEGFR1 dans l'angiogenèse tumorale ainsi que des données structurales initialement disponibles, nous nous concentrerons, dans cette partie, sur l'interaction de ce récepteur avec le VEGF.

Comme précisé précédemment, différentes expériences de délétions ont mis en évidence que le VEGF (protéine homodimérique antiparallèle) interagit avec le VEGFR1 au niveau du domaine d2

⁸⁴ A. J. Wilson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3289-3300

extracellulaire. La structure du complexe entre le VEGF et le domaine d2 du VEGFR1 (VEGFR1-d2) a été résolue en 1997 par Wiesmann et son équipe (Figure 13).⁸⁵

Cette structure apporte de nombreuses informations sur le mode d'interaction du VEGF avec le récepteur. De façon classique la formation de ce complexe repose principalement sur des interactions de nature hydrophobe. Une seule interaction électrostatique est établie entre l'arginine 224 du VEGFR1-d2 et l'aspartate 63 du VEGF.

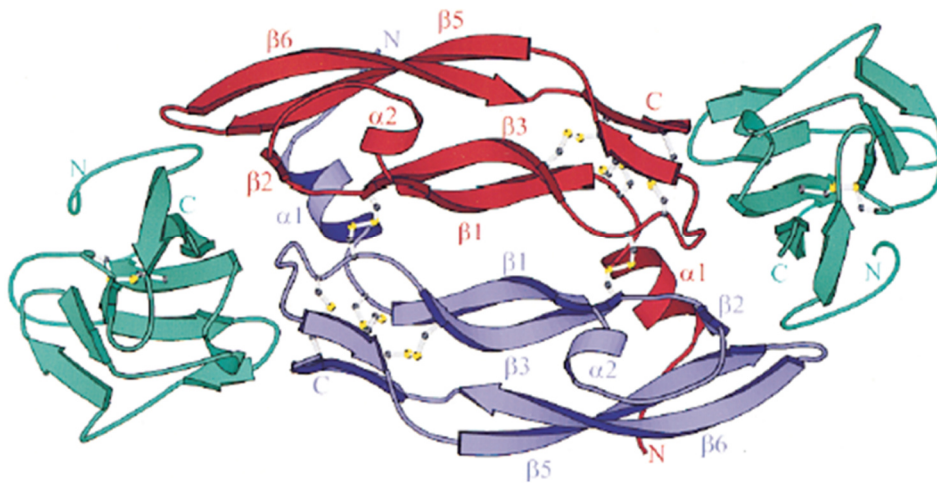


Figure 13 : Structure du complexe VEGF/VEGFR1-d2 déterminée par cristallographie RX. Le dimère de VEGF est représenté en rouge et bleu et les deux domaines VEGFR1-d2 en vert. D'après C. Wiesmann et al., *Cell*, 1997.⁸⁵

Les deux monomères de VEGF participent à l'interaction avec le domaine d2 du VEGFR1. Au niveau du monomère 1 de VEGF, les principaux domaines de liaison sont situés sur l'hélice $\alpha 1$ terminale (résidus 16-27), sur la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$ (résidus 61-66), ainsi que sur le feuillet $\beta 7$ (résidus 103-106). Au niveau du monomère 2, les zones d'interactions sont plus restreintes et se situent principalement sur le feuillet $\beta 2$ (résidus 46-48) et la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ (résidus 79-91).

Des études de mutagenèse dirigée ont permis de confirmer ces résultats ainsi que de déterminer différents « hot spots » sur le VEGF.^{86,87,88} Ces études ont notamment mis en évidence que les résidus F₁₇, M₁₈, Y₂₁, Y₂₅ et Q₂₂ présents au niveau de l'hélice $\alpha 1$ sont fortement impliqués dans l'interaction avec le domaine d2 du VEGFR1. Parmi ces résidus, la glutamine 22 semble plus spécifique du récepteur 1. De même, au niveau de la boucle $\beta 3$ - $\beta 4$, les résidus D₆₃, E₆₄, E₆₇ et L₆₆ semblent essentiels pour cette interaction. La mutation de plusieurs de ces acides aminés en même temps induit une perte importante de l'affinité. De plus, il est intéressant de noter que cette région semble

⁸⁵ C. Wiesmann, G. Fuh, H.W. Christinger, C. Eigenbrot, J. A. Wells and A. M. de Vos, *Cell*, **1997**, *91*, 695-704

⁸⁶ Y. A. Muller, B. Li, H.W. Christinger, J. A. Wells, B.C. Cunningham and A.M. De Vos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 7192-7197

⁸⁷ B.A. Keyt, H.V. Nguyen, L.T. Berleau, C.M. Duarte, J. Park, H. Chen, N. Ferrara, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5638-5646

⁸⁸ B. Li, G. Fuh, G. Meng, X. Xin, M.E. Gerritsen, B. Cunningham, A.M. de Vos, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29823-29828

assez spécifique de l'interaction avec le VEGFR1. Enfin, la région de la boucle $\beta 5$ - $\beta 6$ semble, quant à elle, plus fortement impliquée dans l'interaction avec le VEGFR2. Les acides aminés R₈₂, K₈₄, H₈₆, Q₇₉, et I₈₃ sont essentiels pour la liaison avec le VEGFR2. Cependant, leur remplacement par une alanine n'a que peu d'impact sur la liaison avec le VEGFR1. Ces différents résultats ainsi que les acides aminés du domaine d2 du VEGFR1 en interaction avec le VEGF sont présentés sur la figure 14.

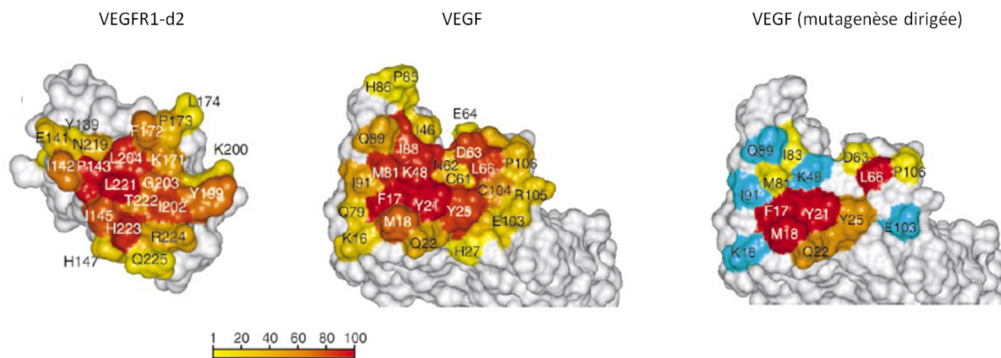


Figure 14: Surface d'interaction VEGF / VEGFR1-d2.

A gauche : surface du VEGFR1-d2 en interaction avec le VEGF, les résidus colorés correspondent en fonction du degré d'enfouissement dans l'interface VEGF/VEGFR1 (les couleurs plus foncées correspondent aux résidus les plus enfouis). Au centre : surface du VEGF. A droite : données de mutagenèse dirigée sur le VEGF. Les résidus en rouge correspondent à une perte d'affinité supérieure à 30 fois, en orange de 10 à 30 fois, en jaune de 3 à 10 fois et en bleu inférieure à 3 fois. D'après B. Pan et al., *J. Mol. Biol.* **2002**.²⁰³

2.2 Inhibiteurs connus de l'interaction VEGF/VEGFR

A l'heure actuelle, seules des macromolécules inhibant l'interaction VEGF/VEGFR sont utilisées en clinique (anticorps, protéines recombinantes). Cependant, depuis quelques années la recherche se tourne vers le développement de molécules plus petites, plus faciles à préparer, moins coûteuses et pouvant être administrées au patient facilement (idéalement par voie orale).

2.2.1 Composés anti-angiogéniques ciblant les récepteurs au VEGF

Une première approche pour inhiber l'interaction VEGF/VEGFR consiste à développer des composés ciblant le domaine extracellulaire du récepteur. Dans le cadre de notre étude, nous nous intéresserons uniquement aux récepteurs VEGFR1 et VEGFR2.

La majorité des molécules ciblant ces récepteurs sont de nature peptidique. Les principaux peptides capables d'inhiber cette interaction et dont l'activité anti-angiogénique a été confirmée sont présentés dans le tableau 2 (bien que certains de ces peptides aient conduit à la synthèse d'analogues ou de peptides dérivés, seul un exemple de chaque série est présenté dans ce tableau.) Ces composés ont, pour la plupart, été identifiés par des techniques de criblage de type « phage display ». Seul quelques uns sont issus d'une conception rationnelle.

En s'appuyant sur les données structurales décrites précédemment, Deleris et son équipe ont développé un peptide cyclique de 17 résidus, le cyclo-VEGI, mimant la boucle β 5- β 6 du VEGF. Ce peptide a un effet inhibiteur sur la prolifération, la migration et la différenciation des cellules.⁸⁹

D'Andréa et son équipe ont également conçu de façon rationnelle deux peptides possédant des propriétés anti-angiogéniques intéressantes. Le premier (Pep.1) a été développé en mimant l'hélice α du VEGF⁹⁰ tandis que le second (HPIC) s'appuie sur la structure de la boucle β 5- β 6 du PlGF.⁹¹

De même, une des thématiques du laboratoire est de développer de façon rationnelle des peptides antagonistes du VEGFR1. Dans ce contexte, différents peptides ont été synthétisés en s'appuyant sur la structure du complexe VEGF/VEGFR1-d2. Les « hot regions » du VEGF étant discontinues, une approche originale a été de concevoir des peptides mimant plusieurs de ces régions à la fois. Pour ce faire, un premier peptide cyclique mimant à la fois la boucle β 3- β 4 et l'hélice α terminale a été synthétisé (Pep.7). Celui-ci s'est avéré capable de bloquer l'interaction VEGF/VEGFR1 ainsi que les voies de signalisations dépendantes du VEGF (Figure 15).⁹² Toujours dans cette optique, un second peptide mimant l'hélice α , le brin β 7 ainsi que la boucle β 3- β 4 a été préparé.⁹³

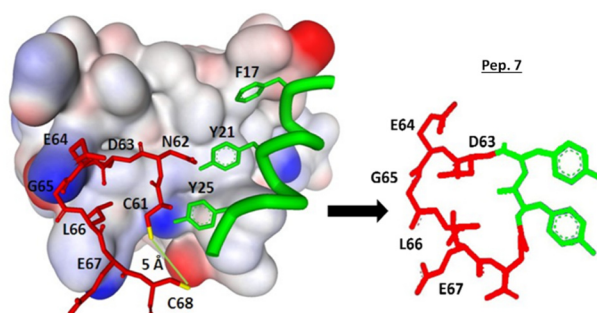


Figure 15: peptide Pep.7, développé au laboratoire, mimant la boucle β 3- β 4 et l'hélice α du VEGF.⁹²

Outre les peptides présentés dans le tableau 2, d'autres peptides ciblant les récepteurs au VEGF sont également décrits dans la littérature.^{94,95} Cependant, bien que leurs aptitudes à bloquer l'interaction VEGF/VEGFR aient été confirmées, aucune information sur leurs effets cellulaires ne sont, à l'heure actuelle, décrites.

⁸⁹ L. Zilberberg, S. Shinkaruk, O. Lequin, B. Rousseau, M. Hagedorn, F. Costa, D. Caronzolo, M. Balke, X. Cannon, O. Convert, G. Laïn, K. Gionnet, M. Goncalvès, M. Bayle, L. Bello, G. Chassaing, G. Deleris and A. Bikfalvi, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35564-35573

⁹⁰ A. Basile, A. Del Gatto, D. Diana, R. Di Stasi, A. Falco, M. Festa, A. Rosati, A. Barbieri, R. Franco, C. Arra, C. Pedone, R. Fattorusso, M.C. Turco and L.D. D'Andrea, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1391-1400

⁹¹ L. De Rosa, D. Diana, A. Basile, A. Russomanno, C. Isernia, M.C. Turco, R. Fattorusso, L.D. D'Andrea, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *73*, 210-216

⁹² V. Goncalves, B. Gautier, P. Coric, S. Bouaziz, C. Lenoir, C. Garbay, M. Vidal and N. Inguibert, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5135-5146

⁹³ V. Goncalves, B. Gautier, C. Garbay, M. Vidal and N. Inguibert, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 767-772

⁹⁴ M. García-Aranda, S. González-López, C. Santiveri, N. Eilstein, M. Reille-Seroussi, M. Martín-Martínez, N. Inguibert, M. Vidal, M. García-López, M. Angeles Jiménez, R. González-Muñiz and M.J. Pérez de Vega, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1896-1905

⁹⁵ M. Isabel García-Aranda, Y. Mirassou, B. Gautier, M. Martín-Martínez, N. Inguibert, M. Vidal, M.T. García-López, M. A. Jiménez, R. González-Muñiz, M. J. Pérez de Vega, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7526-7533

Nom	Structure ou séquence	Cible	Identification	Ref.
K237	HTMYHHYQHHL	VEGFR2	Criblage	96
D2 ^A	P3: Ac-AGPTWCEDDWWYCWLFGTGGGK-NH ₂ P4: Ac-VCWEDSWGGEVCFRYDPGGGK-NH ₂	VEGFR2	Criblage et optimisation	97
V1/A7R	ATWLPPR	VEGFR2	Criblage	98
GU40C4	Peptoïde dimérique	VEGFR2	Criblage	99
	QKRKRKKSRYKS	VEGFR2	Conception rationnelle	100
VEGF-P3	Ac-ITMQCGIHQQHPKICEMSF-NH ₂	VEGFR2	Conception rationnelle	101
SPV5.2	NGYEIEWYSWVTHGMY	VEGFR1	Criblage	102
F56	WHSDMEWWYLLG	VEGFR1	Criblage	103
	<u>CPQPRPLC</u>	VEGFR1	Criblage	104
Pep.7	<i>cycl.</i> [YYDEGLEE]-NH ₂	VEGFR1	Conception rationnelle	97
VG3F	KFMDVYQRSY(Ahx)elGedncs(Ahx)ECRPK-NH ₂	VEGFR1	Conception rationnelle	98
BP1	SHRYRLAIQLHASDSSSSCV	VEGFR1	Criblage	105
	GNQWFI	VEGFR1	Criblage	106
HPIC	KQCLWIRSGDRPWYCTS	VEGFR1	Conception rationnelle	91
4-23-5	Peptoïde tétramérique	VEGFR1	Chimie combinatoire	107
Cyclo-VEGI	<i>cycl.</i> [fPQIMRIKPHQGQHIGE]	VEGFR1 / VEGFR2	Conception rationnelle	89
Pep.1	Ac-KLTWMELYQLAYKGI-NH ₂	VEGFR1 / VEGFR2	Conception rationnelle	90

Tableau 2: Principaux peptides et peptoïdes ciblant les VEGFRs. Résidus soulignés : impliqués dans un cycle. Résidus en minuscule : résidus D. Ahx=acide 6-aminohexanoïque. ^A Hétérodimère formé des peptides P3 et P4.

⁹⁶L. Hetian, A. Ping, S. Shumei, L. Xiaoying, H. Luowen, W. Jian, M. Lin, L. Meisheng, Y. Junshan and S. Chengchao, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 43137-43142

⁹⁷A. Shrivastava, M.A. von Wronski, A.K. Sato, D.T. Dransfield, D. Sexton, N. Bogdan, R. Pillai, P. Nanjappan, B. Song, E. Marinelli, D. De Oliveira, C. Luneau, M. Devlin, A. Muruganandam, A. Abujoub, G. Connelly, Q.L. Wu, G. Conley, Q. Chang, M.F. Tweedle, R.C. Ladner, R.E. Swenson and A.D. Nunn, *Protein Eng. Des. Sel.* **2005**, *18*, 417-424

⁹⁸R. Binetruy-Tournaire, C. Demangel, B. Malavaud, R. Vassy, S. Rouyre and M. Kraemer, *EMBO J.* **2000**, *19*, 1525-1533

⁹⁹D.G. Udugamasooriya, S.P. Dineen, R.A. Brekken, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5744-5752

¹⁰⁰H. Jia, S. Jezequel, M. Lohr, S. Shaikh, D. Davis, S. Soker, D. Selwood and I. Zachary, *Biochem. Biophys Res Commun.* **2001**, *283*, 164-173

¹⁰¹D. Vicari, K.C. Foy, E.M. Liotta and P.T.P. Kaumaya, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 13612-13625

¹⁰²M. El-Mousawi, L. Tchistiakova, L. Yurchenko, G. Pietrzynski, M. Moreno, D. Stanimirovic, D. Ahmad and V. Alakhov, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46681-46691

¹⁰³P. An, H. Lei, J. Zhang, S. Song, L. He, G. Jin, X. Liu, J. Wu, L. Meng, M. Liu and C. Shou, *Int. J. Cancer*, **2004**, *111*, 165-173

¹⁰⁴R.J. Giordano, M. Cardo-Vila, J. Lahdenranta, R. Pasqualini and W. Arap, *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1249-1253

¹⁰⁵A.P. Taylor and D.M. Goldenberg, *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 524-531

¹⁰⁶D.G. Bae, T.D. Kim, G. Li, W.H. Yoon and C.B. Chae, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 2651-2661

¹⁰⁷S. Ponticelli, D. Marasco, V. Tarallo, R.J.C. Albuquerque, S. Mitolai, A. Takeda, J.M. Stassen, M. Prestai, J. Ambati, M. Ruvo and S. De Falco, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34250-34259

Bien que la majorité des composés anti-angiogéniques ciblant les récepteurs au VEGF soient de nature peptidique, quelques petites molécules de faibles poids moléculaires ont été identifiées.

Deux petites molécules, le VGA 1155 ^{108,109} et le VGA 1102 ¹¹⁰, ont été identifiées grâce à un criblage à haut débit (Figure 16). Ces deux molécules se lient aux récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. Elles ont fait l'objet de différentes études *in vitro* et *in vivo* et leurs propriétés anti-angiogéniques ont été confirmées.^{109,110} De plus, bien qu'initialement développées pour bloquer l'angiogenèse tumorale, l'effet de ces molécules a également été étudié dans le cadre de traitements de pathologies cérébrales (ischémie et œdèmes).^{111,112,113} Cependant, leur site de fixation sur les récepteurs au VEGF n'a pas été décrit.

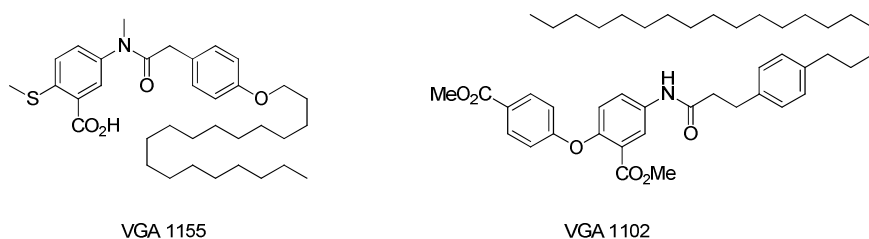


Figure 16 : Structure des molécules VGA 1155 et VGA 1102

La philinopside E est un produit naturel marin isolé à partir du concombre de mer *pentacta quadrangularis* (Figure 17). Il a été mis en évidence que cette molécule présente à la fois un effet anti-angiogénique et anti-tumoral. Cette activité a été démontrée sur différents modèles *in vitro* ainsi qu'*in vivo*. Ces effets sont induits, en grande partie, par la liaison de ce composé sur le domaine extracellulaire du VEGFR2. Cette liaison bloque la fixation du VEGF et inhibe ainsi l'activation des voies de signalisations conduisant au processus d'angiogenèse.^{114,115}

¹⁰⁸ Y. Ueda, T. Yamagishi, K. Samata, H. Ikeya, N. Hirayama, H. Takashima, S. Nakaike, M. Tanaka and I. Saiki, *Mol. Canc. Ther.* **2003**, *2*, 1105-1111

¹⁰⁹ Y. Ueda, T. Yamagishi, H. Ikeya, N. Hirayama, T. Itokawa, Y. Aozuka, K. Samata, S. Nakaike, M. Tanaka, M. Ono and I. Saiki, *Anticancer Research*, **2004**, *24*, 3009-3018

¹¹⁰ Y. Ueda, T. Yamagishi, K. Samata, H. Ikeya, N. Hirayama, T. Okasaki, S. Nishihara, K. Arai, S. Yamaguchi, M. Shibuya, S. Nakaike and M. Tanaka, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2004**, *54*, 16-24

¹¹¹ J. Koyama, S. Miyake, T. Sasayama, T. Kondoh and E. Kohmura, *Kobe J. Med. Sci.* **2007**, *53*, 199-207

¹¹² Y. Chiba, T. Sasayama, S. Miyake, J. Koyama, T. Kondoh, K. Hosoda and E. Kohmura, *Kobe J. Med. Sci.* **2008**, *54*, E136-E146

¹¹³ J. Koyama, S. Miyake, T. Sasayama, Y. Chiba, T. Kondoh and E. Kohmura, *Kobe J. Med. Sci.* **2010**, *56*, E1-E11

¹¹⁴ F. Tian, C. Zhu, X. Zhang, X. Xie, X. Xin, Y. Yi, L. Lin, M. Geng and J. Ding, *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72*, 545-552

¹¹⁵ F. Tian, X. Zhang, Y. Tong, Y. Yi, S. Zhang, L. Li, P. Sun, L. Lin and J. Ding, *Cancer Biology & Therapy*, **2005**, *4*, 874-882

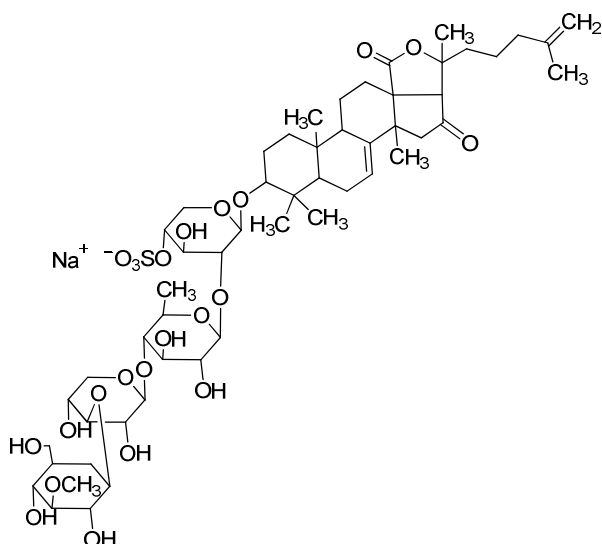


Figure 17: Structure de la philinopsine E

Enfin, plus récemment, notre laboratoire a identifié grâce à un criblage *in silico* une molécule de faible poids moléculaire, le sr 4321, susceptible d'inhiber spécifiquement l'interaction du VEGF sur le VEGFR1 (Figure 18). Cette molécule ayant servi de point de départ pour une partie de mon travail de thèse, une description plus détaillée de cette molécule ainsi que de ces propriétés anti-angiogénique sera présentée ultérieurement (Cf. Chapitre 2).¹³⁰

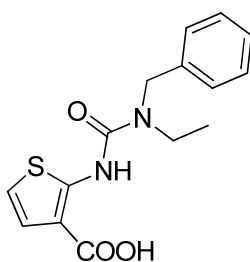


Figure 18: Structure du composé sr 4321

2.2.2 Composés anti-angiogéniques ciblant le VEGF

Une seconde approche pour inhiber l'interaction VEGF/VEGFR consiste à cibler le VEGF au niveau de la zone de reconnaissance des récepteurs. A l'heure actuelle, il n'y a que peu de molécules de faible poids moléculaire décrites dans la littérature et la plupart sont de nature peptidique.

En s'appuyant sur la séquence du domaine d3 du VEGFR2, Piossek et son équipe ont décrit la conception d'un peptide de 18 résidus (**RTELNVGIDFNWEYPASK**) capable de bloquer l'interaction du

VEGF sur le VEGFR2. Ce peptide inhibe la phosphorylation de ce récepteur induite par le VEGF et par conséquent la prolifération et la migration des cellules endothéliales.¹¹⁶

A la même période, en 2000, un hexapeptide riche en arginine (**RRKRRR**) a été identifié par criblage d'une banque de peptide. Celui-ci se lie au VEGF au niveau de la zone de reconnaissance des VEGFRs et interfère par conséquent avec la fixation des récepteurs. Il a été démontré que ce peptide inhibe *in vivo* la néovascularisation induite par le VEGF sur des modèles de cornées de lapins et prévient la croissance tumorale et la dissémination métastatique de cellules cancéreuses de colon humain sur des souris.¹¹⁷

En utilisant la technique de phage display, Fairbrother et son équipe ont identifiés trois séries de peptides capables de se lier au VEGF.²⁰² Après plusieurs séries d'optimisations, ils ont obtenu un peptide cyclique de 19 acides aminés, le v114 (**VEPNQIHVMWEWECFERL-NH₂**), possédant une affinité sub-micromolaire pour le VEGF et des propriétés biologiques intéressantes. Ce peptide, ainsi que le peptide parent v107 et de nouveaux dérivés, ont fait l'objet de nombreuses études structurales et biologiques. La structure du peptide v107 en complexe avec le VEGF a notamment été résolue par RMN. Le v114 ayant servi de composé de départ pour développer de nouveaux peptides ciblant le VEGF circulant, ce peptide ainsi que les dérivés qui ont été synthétisés seront décrit plus en détail ultérieurement (*Cf. chapitre 4*).

Plus récemment, un bacterial display a été réalisé sur le VEGF et a conduit à l'identification de nouveaux peptides (exemple : **GPGPCSRLVMWEWECFAAL-NH₂**). Il est intéressant de remarquer que ces derniers présentent des similitudes de séquence avec ceux de la série du v107. Ces peptides seront également présentés plus en détails ultérieurement (*Cf. chapitre 4*).²⁰⁵

Enfin, en 2013, douze petites molécules organiques de type hétérocycliques ont été identifiées grâce à la technique de « microarray ». Elles ont été sélectionnées parmi 7961 composés. Ces molécules se lient au VEGF et bloquent la liaison du facteur de croissance sur le récepteur VEGFR2 avec des CI_{50} comprises entre 0,3 et 60 μ M. Le potentiel biologique de ces molécules a été confirmé en étudiant la phosphorylation du VEGFR2.¹¹⁸ Les trois molécules les plus actives sont représentées sur la figure 19.

¹¹⁶ C. Piossek, J. Schneider-Mergener, M. Schirner, E. Vakalopoulou, L. Germeroth and K.H. Thierauch, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5612-5619

¹¹⁷ D.G. Bae, Y.S. Gho, W.H. Yoon and C.B. Chae, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13588-13596

¹¹⁸ J.P. Landry, Y. Fei, X. Zhu, Y. Ke, G. Yu and P. Lee, *ASSAY and Drug Development Technologies*, **2013**, *11*, 326-332

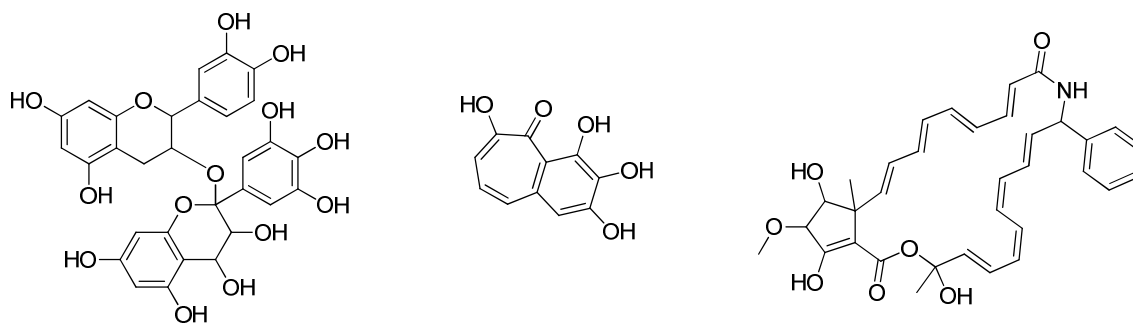


Figure 19: Molécules organiques ciblant le VEGF identifiées par « microarray ». ¹¹⁸

IV. Objectif de la thèse

La recherche de traitements anticancéreux dits ciblés nécessite non seulement le développement de nouvelles molécules mais également une meilleure connaissance des mécanismes biologiques fondamentaux régulant la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse s'inscrit à la fois dans une démarche de développement de nouveaux composés anti-angiogéniques et de compréhension du mécanisme de régulation de l'angiogenèse.

L'objectif principal de ce travail de thèse a été de développer de nouveaux inhibiteurs potentiels de l'interaction VEGF/VEGFR. Dans ce but, deux grandes approches ont été initiées. En raison du rôle essentiel du VEGFR1 dans l'angiogenèse pathologique, nous avons tout d'abord souhaité développer de nouvelles molécules capables d'interagir spécifiquement avec ce récepteur. Dans la continuité des travaux initiés au laboratoire, l'approche choisie a été de concevoir de nouveaux analogues hétérocycliques du composé sr 4321. La seconde stratégie envisagée a, quant à elle, été de concevoir des composés ciblant le VEGF au niveau de la zone de reconnaissance des récepteurs. En s'appuyant sur les données de la littérature, de nouveaux peptides et peptidomimétiques ont ainsi été développés.

Lors du développement de ces composés, nous avons mis en évidence que le cuivre (Cu^{2+}) possède un fort pouvoir inhibiteur sur l'interaction VEGF/VEGFR1. Les ions métalliques et en particulier le cuivre sont connus pour jouer un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse. Par conséquent, suite à cette découverte, un second objectif a été d'étudier leurs effets sur cette interaction. Cette partie a été réalisée en étroite collaboration avec deux équipes de biologie structurale dans le but d'apporter de nouveaux éléments de réponse sur le rôle de ces ions dans la régulation de l'angiogenèse ainsi que sur leurs mécanismes d'action.

Chapitre 1

Tests de déplacement de l'interaction VEGF/VEGFR

Ce travail de thèse s'inscrit dans une démarche de développement de nouveaux inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR. Trois principaux tests ont été utilisés au laboratoire, pour déterminer la capacité des molécules synthétisées à inhiber cette interaction. Afin de faciliter la compréhension des résultats obtenus lors de ce projet de thèse, ces différents tests seront décrits en détail dans ce premier chapitre.

I. Méthodes existantes pour étudier l'effet d'un composé sur l'interaction VEGF/VEGFR

Comme précisé dans l'introduction, le développement de molécules capable de moduler ou bloquer l'interaction VEGF/VEGFR est une approche attrayante pour concevoir de nouveaux agents anti-angiogéniques. Différentes techniques sont décrites dans la littérature pour évaluer *in vitro* les propriétés inhibitrices des composés synthétisés. La partie qui suit ne vise pas à être exhaustive mais à présenter quelques exemples représentatifs de méthodes permettant d'identifier des molécules capables de bloquer la liaison du VEGF sur ces récepteurs.

1. Test de compétition sur des extraits cellulaires

Une technique classiquement utilisée consiste à observer l'effet inhibiteur d'un composé sur la fixation de VEGF radio-marqué ($[^{125}\text{I}]$ VEGF) sur des récepteurs (VEGFRs) présents à la surface de cellules endothéliales (généralement de type HUVEC). Ce test de compétition peut s'effectuer directement sur des cultures cellulaires^{119,106,120} ou sur des préparations membranaires de cellules fixées sur support solide¹²¹. Cette méthode peut être adaptée à des molécules ciblant soit le VEGF¹¹⁹ soit les récepteurs.^{106,121} Elle présente cependant certains inconvénients. Lorsque les molécules testées sont des antagonistes des récepteurs au VEGF, cette technique n'apporte pas de réponse sur la nature du récepteur ciblé (VEGFR1 vs VEGFR2). Cette limitation peut cependant être contournée en utilisant des cellules surexprimant spécifiquement un type de récepteur. Une seconde limitation

¹¹⁹ B. Barleon, F. Totzke, C. Herzog, S. Blanke, E. Kremmer, G. Siemeister, D. Marmé and G. Martiny-Baron, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 10382-10388

¹²⁰ D.G. Bae, T.D. Kim, G. Li, W.H. Yoon and C.B. Chae, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 2651-2661

¹²¹ L.D. D'Andrea, G. Iaccarino, R. Fattorusso, D. Sorriento, C. Carannante, D. Capasso, B. Trimarco, and C. Pedone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 14215–14220

est l'utilisation de VEGF radiomarqué. En effet, bien que la radioactivité soit une méthode de détection très sensible, celle-ci nécessite un équipement et un savoir-faire particulier. Enfin, l'utilisation d'extraits cellulaires est contraignante et ne permet pas l'utilisation de ce test en routine dans tous les laboratoires.

2. Test de compétition sur des protéines isolées

Une seconde approche, permettant de s'affranchir du problème de la culture cellulaire, consiste à utiliser des protéines isolées et purifiées. Cette stratégie présente également l'avantage de pouvoir obtenir plus facilement des informations sur la spécificité d'action des composés. Différentes classes de tests utilisant des protéines purifiées sont décrites dans la littérature. Ces tests peuvent être réalisés en solution ou en immobilisant un des partenaires protéiques sur une surface solide.

- Test en solution

Un test de compétition en solution permettant d'identifier des molécules capables de se lier au VEGF au niveau de la zone de reconnaissance du récepteur a été développé par Gellman et son équipe. Celui-ci utilise comme méthode de détection la polarisation de fluorescence et le principe du test repose sur la compétition de fixation sur le VEGF d'un ligand potentiel avec un peptide traceur fluorescent (dérivé du peptide v114, cf. *chapitre 4*).²⁰⁸ Ce test présente l'avantage d'être réalisé en solution mais est cependant limité à des molécules ciblant le VEGF au niveau d'une zone restreinte.

- Test sur support solide

La majeure partie des tests utilisés sont réalisés sur support solide. Deux grandes catégories de tests de compétition sont décrites dans la littérature : d'une part celle reposant sur la technique de SPR (« Résonance Plasmonique de Surface ») et d'autre part celle utilisant la technique ELISA (« Enzyme-Linked Immunosorbent Assay »).

La technique de SPR a notamment été utilisée par Fairbrother et son équipe afin d'identifier des peptides capables d'interagir avec du VEGF immobilisé sur la surface métallique.¹²²

Parmi les tests sur support solide, la technique la plus répandue reste l'ELISA. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir être miniaturisée, automatisée et réalisée par exemple en plaque 96 puits (ou plus), ce qui permet de pouvoir tester de nombreux composés en parallèle. Plusieurs exemples de tests de compétition immobilisant soit le VEGF soit le récepteur sont décrits dans la littérature.

Une première possibilité consiste à immobiliser le VEGF sur support solide, l'incuber avec les composés à tester et le récepteur, puis détecter la quantité de récepteur fixé. Cette technique a

¹²² C. Wiesmann, H.W. Christinger, A.G. Cochran, B.C. Cunningham, W.J. Fairbrother, C.J. Keenan, G. Meng and A.M. de Vos, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 17765-17772

notamment été utilisée, en 2004, par Gho et son équipe.¹²³ Dans ce test, les auteurs révèlent le récepteur (VEGFR1 ou VEGFR2) lié au VEGF en utilisant un anticorps reconnaissant le domaine IgG du récepteur. Cet anticorps est couplé à une peroxydase, la HRP (« horseradish peroxydase »), qui en présence d'eau oxygénée et de substrat de type luminol émet de la lumière. Il s'agit donc d'une méthode de détection par chimioluminescence. Selon le même principe, Fairbrother et son équipe ont développé un test de compétition permettant d'identifier des composés capables d'inhiber spécifiquement la liaison du VEGF sur le domaine d2 du VEGFR1 (VEGFR1-d2).²⁰³ Dans ce test, du VEGF₈₋₁₀₉ est immobilisé sur le support solide et les molécules testées sont incubées en présence du VEGFR1-d2 biotinylé (btVEGFR1-d2). Lorsqu'il est fixé au VEGF, ce btVEGFR1-d2 peut être révélé par chimioluminescence en utilisant un système streptavidine-HRP (la streptavidine interagissant spécifiquement avec la biotine).

Une seconde possibilité pour identifier par ELISA des composés qui inhibent l'interaction VEGF/VEGFR consiste à immobiliser le récepteur sur support solide. Il est ensuite incubé avec du VEGF et les composés à tester. Le VEGF fixé sur le récepteur peut ensuite être révélé. Un test utilisant du VEGF radio-marqué ([¹²⁵I] VEGF) a notamment été développé par Shou et son équipe.¹⁰³ Au sein du laboratoire, deux tests ELISA utilisant du VEGFR1 immobilisé sur support solide ont été développés de façon antérieure à mon arrivée en thèse. Ces tests mettent en compétition les composés à tester avec du VEGF biotinylé (btVEGF) et sont donc révélés par réaction de chimioluminescence à l'aide d'un système streptavidine-HRP. Le premier test est réalisé sur l'ensemble du domaine extracellulaire du VEGFR1 (VEGFR1-ECD)¹²⁴ tandis que dans le second seuls les domaines d1 à d3 du récepteur (VEGFR1-d1-d3)¹²⁵ sont fixés sur le support solide.

Ces deux derniers tests ELISA ainsi qu'un nouveau système développé au cours de ce projet de thèse dans lequel du VEGF est fixé sur support solide ont été utilisés tout au long de mon travail de thèse pour évaluer d'une part l'activité des composés synthétisés et d'autre part l'effet de différents métaux sur l'interaction VEGF/VEGFR1.

¹²³ S.J. Lee, H.M. Lee, S.T. Ji, S.R. Lee, W. Mar and Y.S. Gho, *Cancer Lett.* **2004**, *208*, 89-94

¹²⁴ V. Goncalves, B. Gautier, C. Garbay, M. Vidal and N. Inguibert, *Anal. Biochem.* **2007**, *366*, 108-110

¹²⁵ B. Gautier, V. Goncalves, D. Diana, R. Di Stasi, F. Teillet, C. Lenoir, F. Huguenot, C. Garbay, R. Fattorusso, L.D. D'Andrea, M. Vidal and N. Inguibert, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4428-4440

II. Méthodes utilisées dans le cadre de ce projet : Tests de compétition de type ELISA

1. Tests ELISA disponibles au laboratoire

Les deux tests ELISA, VEGFR1-ECD/btVEGF et VEGFR1-d1-d3/btVEGF) présentés brièvement précédemment sont réalisés en plaques 96 puits, ce qui permet de tester en parallèle différents composés. L'ensemble des protéines recombinantes utilisées pour réaliser ces tests sont commerciales et disponibles chez R&D. La méthode de détection étant de la chimioluminescence, ces tests ne nécessitent pas de conditions opératoires contraignantes et peuvent ainsi être utilisés en routine au laboratoire.

Le principe général de ces tests est représenté sur la figure 20. Le récepteur, qu'il s'agisse du domaine extracellulaire du VEGFR1 (20 ng/puits) ou seulement des domaines d1-d3 (15 ng/puits), est adsorbé sur une plaque « high binding » 96 puits. Après plusieurs lavages, la surface libre est bloquée avec de la BSA (« Bovine Serum Albumine ») afin de limiter le signal non spécifique. Les composés sont ensuite pré-incubés à la concentration souhaitée (Cette étape est effectuée uniquement lorsque les composés testés ciblent le récepteur). Le VEGF biotinylé (20 pM/puits) est ensuite additionné et entre en compétition avec les composés testés. Après cette phase d'incubation, des lavages sont effectués pour éliminer l'excès de réactifs non fixé. Afin de détecter le btVEGF lié au récepteur, un conjugué streptavidine-HRP est additionné. La plaque est ensuite lavée et le substrat de la HRP est ajouté. L'émission de lumière associée à la conversion enzymatique du substrat (eau oxygénée/luminol) est mesurée sur un lecteur de plaque. Cette dernière étape de révélation par chimioluminescence permet ainsi de déterminer le pourcentage d'inhibition de l'interaction VEGF/VEGFR1 du composé lorsqu'il est testé à une dose unique ou la valeur de CI_{50} lorsqu'il est testé en effet dose.

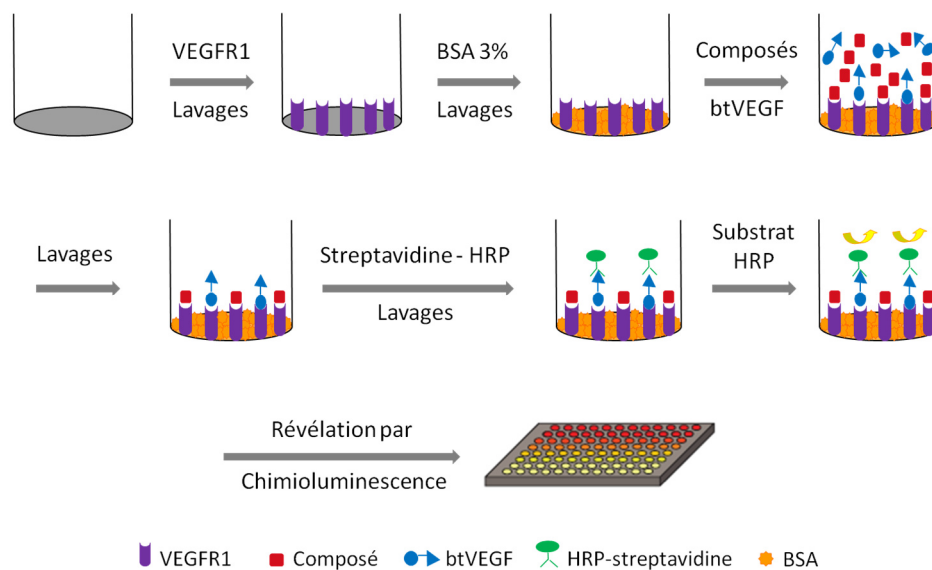


Figure 20 : Principe des tests de déplacements VEGFR1-ECD et VEGFR1-d1-d3. ¹²⁴

2. Développement d'un nouveau test ELISA : VEGFR1-d2-HRP/VEGF

Récemment, un nouveau test ELISA a été développé au laboratoire. Il est complémentaire des deux premiers et permet d'identifier des composés qui perturbent spécifiquement l'interaction entre le domaine d2 du VEGFR1 et le VEGF. Dans le cadre du développement de ce test, j'ai optimisé les conditions expérimentales (temps de pré-incubations et d'incubations, quantités de protéines utilisées et conditions de stockage des réactifs) et validé son utilisation à l'aide de différents composés et contrôles. Ce test faisant l'objet d'une publication en cours de soumission seul un résumé est présenté. L'article complet (article 1) contenant l'ensemble des détails expérimentaux et des résultats obtenus est inséré dans les pages suivantes.

Afin de développer ce test, une première approche a été d'essayer de fixer le domaine d2 du VEGFR1 sur support solide et d'utiliser, comme dans les tests VEGFR1-ECD et VEGFR1-d1-d3, du VEGF biotinyllé. Cependant ce premier essai s'est révélé infructueux. En présence de btVEGF, le signal obtenu s'est avéré très faible et inexploitable. Afin d'expliquer cette absence de signal, il a été envisagé que le VEGFR1-d2 interagisse avec le support solide au niveau de la zone de reconnaissance du VEGF et par conséquent empêche ainsi la fixation du btVEGF. Dans ces conditions, une nouvelle approche a été envisagée. Celle-ci a consisté à fixer le VEGF sur la plaque et à mettre en compétition les molécules à tester avec le domaine d2 du récepteur. Une telle stratégie avait déjà été validée par Fairbrother et son équipe.²⁰³ Comme précisé précédemment, un test reposant sur l'utilisation du VEGFR1-d2 biotinyllé avait déjà été décrit. Cependant le peu de données expérimentales et le fait que cette protéine biotinyllée ne soit pas commerciale nous a poussés à envisager une autre stratégie. La structure cristallographique du complexe VEGFR1-d2/VEGF₉₅ indique que les six lysines présentes sur ce domaine du récepteur sont localisées en dehors de la zone d'interaction avec le VEGF. Par conséquent, l'approche choisie a été d'utiliser une de ces lysines pour coupler chimiquement la HRP directement au VEGFR1-d2 (Figure 21). Le couplage de cette peroxydase sur le domaine d2 du VEGFR1 ainsi que la purification du complexe formé a été réalisé dans l'équipe par le Dr. Sylvain Broussy en collaboration avec le Dr. Jean-François Gaucher et Billy Seijo (Equipe Isabelle Broutin, UMR 8015, Université Paris Descartes).

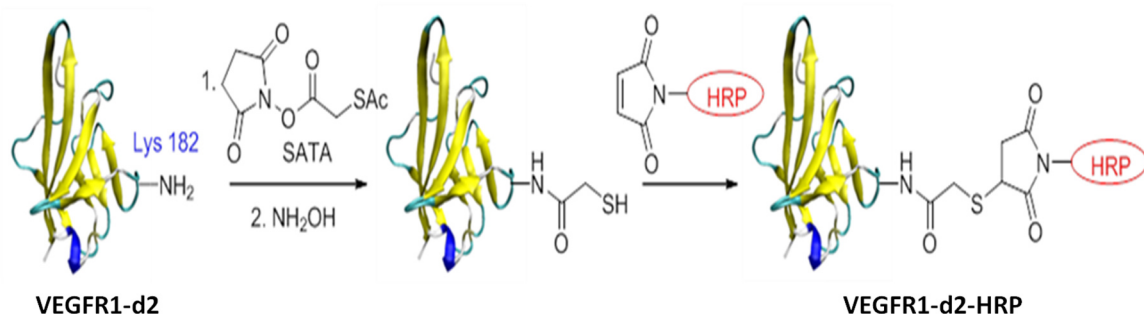


Figure 21: Couplage du VEGFR1-d2 à la HRP

Une fois couplé à la HRP, l'affinité du VEGFR1-d2 pour le VEGF a été déterminée par ELISA. Cette mesure a été effectuée en incubant du VEGF₉₅ immobilisé sur support solide (VEGF produit par le Dr. Jean-François Gaucher) avec le VEGFR1-d2-HRP. La liaison de ce récepteur sur le VEGF a été quantifiée par chimioluminescence après addition du substrat de la HRP. Un Kd de 5,3 nM [Intervalle

de confiance à 95% = 3,6 à 8,0 nM] a ainsi été obtenu. Cette valeur est en accord avec celles décrites dans la littérature.^{126,127} Suite à ce résultat, ce conjugué VEGFR1-d2-HRP a été utilisé pour développer le test de compétition (Figure 22). Différentes étapes d'optimisations (quantités de VEGF et de VEGFR1-d2-HRP, temps d'incubation et de pré-incubation en particulier) ont été réalisées afin de déterminer les conditions expérimentales optimales. La première étape consiste à immobiliser le VEGF₉₅ au fond des puits (40 ng/puits). De façon classique, la BSA est ensuite ajoutée afin de limiter le signal non spécifique. L'étape de pré-incubation des composés semblant inutile, le VEGF est ensuite incubé en présence des composés à tester et du VEGFR1-d2-HRP (1 nM/puits). Après lavages, le substrat de la HRP est additionné et la plaque est ensuite révélée par chimioluminescence.

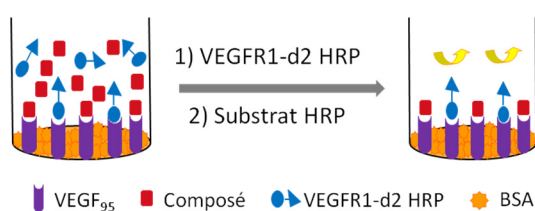


Figure 22 : Principe du test de déplacement VEGFR1-d2-HRP

Afin de valider ce test compétition, l'activité de différents composés connus pour se lier au VEGF ou au domaine d2 a été évaluée et comparée aux données de la littérature ou aux valeurs obtenues sur les tests VEGFR1-ECD et VEGFR1-d1-d3: VEGFR1-d2, VEGF₉₅, Bevacuzimab, anticorps anti VEGF utilisé en clinique (Avastin®), peptide v114 et dérivés, métaux divalents. Nous avons ainsi démontré que ce test permet d'identifier des molécules capables de bloquer la liaison du VEGF sur le domaine d2 du récepteur.

En conclusion, nous avons développé un nouveau test spécifique de l'interaction VEGFR1-d2/VEGF. Celui-ci présente des avantages et des inconvénients par rapport aux autres tests déjà décrits. Il est en effet potentiellement plus sensible aux résultats « faux positifs » résultants d'une interaction imprévue entre les composés et la HRP, qui sont présents de façon concomitante dans les puits. Cet aspect doit être vérifié pour chaque série de molécules étudiée. De façon intéressante, ce test est en revanche complémentaire des tests VEGFR1-ECD et d1-d3, car il permet de définir plus précisément le site d'interaction des composés testés. De plus, le couplage de la HRP directement sur le récepteur permet de réduire le nombre d'étapes et par conséquent la durée de l'expérience. Enfin, l'ensemble des protéines est préparé en collaboration avec le Dr. Jean-François Gaucher, au sein de la faculté, ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation de protéines commerciales.

Ces trois tests ont été utilisés tout au long de ce travail de thèse pour évaluer l'activité des composés synthétisés. Dans la suite du manuscrit, ces tests seront nommés VEGFR1-ECD, VEGFR1-d1-d3 et d2-HRP.

¹²⁶ R. Di Stasi, D. Diana, D. Capasso, R. Palumbo, A. Romanelli, C. Pedone, R. Fattorusso and L.D. D'Andrea, *Biopolymers (Peptides Science)*, **2010**, *94*, 800-809

¹²⁷ J.E. Stefano, J. Bird, J. Kyazike, A.W.M. Cheng, E. Boudanova, M. Dwyer, L. Hou, H. Qiu, G. Matthews, M. O'Callaghan and C.Q. Pan, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2354-2364

ARTICLE 1

**Covalent labeling of VEGFR1 domain 2 with horseradish peroxidase:
development of a displacement assay on VEGF**

Sylvain BROUSSY, Jean-François GAUCHER, Marie REILLE-SEROUSSI, Laure-Anne
CUSSAC, Isabelle BROUTIN, Michel VIDAL

En preparation

Title

Covalent labeling of VEGFR1 domain 2 with horseradish peroxidase: development of a displacement assay on VEGF.¹

Authors and Affiliations

Sylvain BROUSSY^a, Jean-François GAUCHER^b, Marie REILLE-SEROUSSE^a, Laure-Anne CUSSAC^a, Isabelle BROUTIN^b, Michel VIDAL^{a,c}

^a UMR 8638 CNRS Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'Observatoire, Paris 75006 France

^b UMR 8015 CNRS Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'Observatoire, Paris 75006 France

^c UF Pharmacocinétique et pharmacochimie, hôpital Cochin, AP-HP, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, Paris 75014, France

Short title

A screening assay for VEGFR1_{d2} / VEGFA inhibitors (max 55 characters)

Corresponding author

sylvain.broussy@parisdescartes.fr, Phone number : (+33) 1 53 76 15 64, Fax number : (+33) 1 43 29

14 03

Subject category: Enzymatic Assays and Analyses ; Labeling Procedures

¹ Financial support from the ANR (ANR-2010-BLAN-1533-03), the University Paris Descartes, the CNRS ("Chaire de Partenariat CNRS" to S. B.) and the ARC (grant to M. R.-S.) is acknowledged. We thank the Dr. D. Scherman for the use of a chemiluminescence plate reader.

Abstract (max 100 words)

The VEGFR1 has been shown to play a role in the deregulation of angiogenesis, and has therefore been associated to several pathologies. In order to extend our toolbox of screening methods for the identification of compounds disrupting the VEGFR1 / VEGF interaction, we developed an ELISA type assay for the specific assessment of the VEGFR1_{d2} / VEGF interaction, in which the VEGFR1_{d2} was directly labeled with an enzyme. A description of this straightforward strategy is provided here, including its advantages and disadvantages. Optimization of the reagents preparation, purification and conservation, and displacement assay with known molecular entities are presented.

Keywords (up to five separated by /)

Angiogenesis / VEGFR1_{d2} / VEGF / HRP conjugate / screening

The deregulation of angiogenesis is involved in cancer and inflammatory diseases like atherosclerosis, rheumatoid arthritis, and age-related macular degeneration (AMD) [1; 2]. The development of molecules able to control angiogenesis is therefore the subject of intense research [3]. Vascular endothelial growth factor A (VEGF) is the main pro-angiogenic factor, which interacts with two cellular receptors (VEGFR1 and VEGFR2) [4]. Among the strategies developed to stop abnormal angiogenesis, disrupting the interaction of the VEGF with its receptors has led to the clinical use of the VEGF₁₆₅ targeting antibodies bevacizumab (Avastin) and ranibizumab (Lucentis) for the treatment of cancer and AMD, respectively [5]. Therefore, the identification of peptides, peptidomimetics and small molecules able to block these protein / protein interactions, either through binding to the receptor or to the VEGF, has been actively pursued. For this purpose, several biochemical assays have been employed for an *in vitro* evaluation of molecules. A classical assay format was based on radioactive labeled VEGF [6; 7; 8]. Another homogeneous assay used fluorescent peptides competing for the VEGF₁₆₅ at the receptor binding site and detection by fluorescence polarization [9]. ELISA type strategies with chemiluminescence-based detection systems for the screening of compounds targeting the VEGFR1 / VEGF interaction have been widely employed in our group using both the whole extracellular domain (ECD) and the d1-d3 domains [10; 11; 12; 13; 14; 15]. Genentech has described two assays for the specific evaluation of the VEGFR1_{d2} / VEGF interaction. The first one used biotinylated VEGF (btVEGF₈₋₁₀₉) and a coated anti-VEGF monoclonal antibody that competes with VEGFR1_{d2} binding [7]. The second one used btVEGFR1_{d2} and coated VEGF₈₋₁₀₉, but few details on the experimental procedures have been disclosed [16]. This assay holds some interesting features. First, it allows for the identification of compounds that bind either the VEGF₈₋₁₀₉ or the VEGFR1_{d2} domain, it is therefore complementary to the previously described fluorescence polarization assay which only detects compounds binding to the VEGF₁₆₅. Moreover, it is complementary to the VEGFR1_{d1-d3} or VEGFR1_{ECD} / btVEGF₁₆₅ assays, which may detect compounds binding outside the targeted interface, on the whole d1-d3 or ECD surface. In order to develop such a method with the material available in our laboratories, we tried to bind the VEGFR1_{d2} onto an ELISA plate and to incubate with btVEGF. Unfortunately, random and weak signal was obtained instead of the expected

saturation binding curve. We hypothesize that the VEGFR1_{d2} interacts with the high binding surface of the plates through its hydrophobic VEGF binding area, therefore preventing further btVEGF fixation. Interestingly, inspection of the VEGFR1_{d2} / VEGF₉₅ crystal structure [7] shows that all six lysine residues of the VEGFR1_{d2} are located outside the binding interface. This encouraged us to try a direct chemical labeling with an enzyme, ensuring high sensitivity through signal amplification. Therefore, we decided to use VEGF₉₅ or VEGF₁₆₅ coated onto the plates and a single incubation step with a VEGFR1_{d2}-HRP (horseradish peroxidase) conjugate. We provide here a detailed description of the procedures required to perform the assay, and of its usefulness and limitations.

VEGFR1_{d2}-HRP conjugation

The VEGFR1_{d2} was covalently linked to commercially available horseradish peroxidase (HRP). The chemical coupling procedure followed a known two-steps method for the preparation of conjugates for immunoassay [17]. It was mediated through the introduction of a protected thiol group onto one of the six lysine residues of the domain 2, by the *N*-hydroxysuccinimide ester of *S*-acetylthioglycolic acid (SATA). After removal of the thiol protecting group, the resulting functionalized protein was covalently conjugated to maleimide activated HRP. Interestingly, as observed by SDS-PAGE, the mono-conjugated adduct was obtained as the major product at approximately 50 kDa. Other bands were attributed to excess HRP (40 kDa) and d2 (10 kDa), as well as some poly-conjugation products d2-(HRP)_n (90 kDa and above, figure S1). To optimize the reaction conditions, several runs have been carried out with 1, 2 and 4 equivalents of SATA for 1 equivalent of VEGFR1_{d2}. The best compromise appeared to be 2 equivalents of SATA, giving a labeling of 1.1 thiol groups per protein and a low quantity of poly-conjugated products, while keeping the unreacted VEGFR1_{d2} and the total protein recovery to acceptable levels (see SI for details). Although the crude mixture obtained at this point was suitable for binding and displacement assays, we purified further the conjugate by SEC, to remove the unreacted VEGFR1_{d2} and most of the poly-conjugated VEGFR1_{d2}-(HRP)_n. Finally, the VEGFR1_{d2}-HRP conjugate containing a small amount of free HRP was obtained.

Binding.

In order to measure the affinity of the VEGFR1_{d2}-HRP conjugate for the VEGF₉₅, an ELISA type assay was carried out. The VEGF₉₅ was coated onto white high binding 96-well plates following established procedures, and increasing concentrations of the conjugate were added to the wells. Its concentration was measured conveniently by UV at 403 nm, using an extinction coefficient of $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for the heme HRP (neglecting a slight excess of free HRP) [18]. After 1 hour incubation, the plate was revealed with a chemiluminescent substrate and we were pleased to obtain a saturation curve corresponding to the specific signal (total signal – non-specific signal) allowing to calculate a K_d of 5.3 nM (95% confidence interval (CI) 3.6 to 8.0 nM, figure 1). This result showed the high affinity of the conjugate for the VEGF₉₅ and was compatible with previously reported values, in the low nanomolar range, for the binding of VEGF to monomeric VEGFR1_{d2}. These values were determined by surface plasmon resonance assays using VEGF₁₆₅ ($K_d = 2.9 \pm 0.2 \text{ nM}$ [19], and $K_d = 19.8 \text{ nM}$ for VEGFR1_{d2}-HPC4 [20]) and ELISA-based assays using biotinylated VEGF₈₋₁₀₉ and coated anti-VEGF monoclonal antibody that competes with VEGFR1_{d2} binding ($IC_{50} = 1.4 \text{ nM} \pm 15\%-25\%$ [7]). Therefore, at least within a fraction of the VEGFR1_{d2}-HRP conjugate, the presence of the conjugated HRP does not prevent VEGF binding. As a control experiment, we verified by the same procedure that free HRP at concentrations up to 100 nM did not interact with coated VEGF₉₅. Finally, the effect of incubation time on signal intensity was evaluated more precisely. It appeared that with 1 nM VEGFR1_{d2}-HRP and 40 ng per well of VEGF₉₅ coated, at 37°C, the maximum signal was achieved after about 30 minutes and was stable for at least 1 hour. A slight decrease was observed after 2 hours. Therefore, an incubation time of 45 minutes was chosen for the subsequent displacement experiments, to ensure equilibrium conditions and maximum signal.

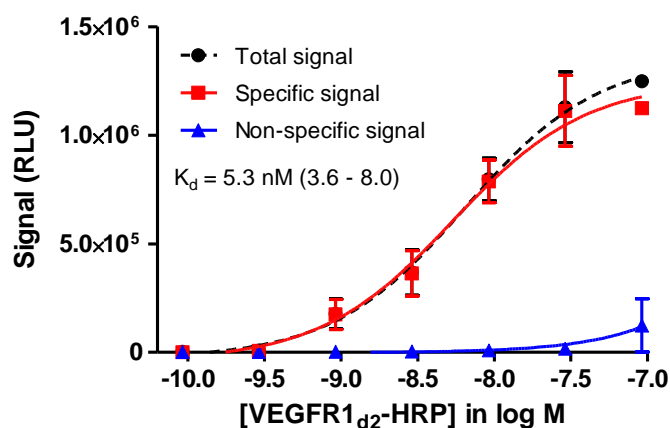


Figure 1. Binding assay of the VEGFR1_{d2}-HRP conjugate with coated VEGF₉₅. Total and non-specific signal curves correspond to signal observed in the presence and in the absence of VEGF₉₅, respectively. The analysis was performed with the software Graphpad Prism using a “log [inhibitor] vs. response” non-linear regression. Mean numbers from triplicate wells are plotted. Error bars represent standard deviations. The 95% confidence interval is given in parenthesis.

Displacement.

Displacement assays were carried out using a sub-saturating concentration of VEGFR1_{d2}-HRP (typically 1 nM) in the presence of competing molecules. Compounds known to bind to the VEGF₉₅ or to the VEGFR1_{d2} domain were chosen for assay validation. An IC₅₀ of 58 nM (95% CI from 53 to 64 nM, R² = 0.99) was obtained for unlabelled VEGFR1_{d2}, compatible with previously reported affinity values in the low nanomolar range (see above). The humanized antibody bevacizumab binds to all isoforms of human VEGF with a K_d of 1.1 nM [21; 22]. A high affinity was indeed observed in the present competition assay, with an IC₅₀ of 0.28 nM (95% CI from 0.21 to 0.37 nM, R² = 0.95). In addition, the evaluation of peptides able to bind the VEGF at the VEGFR1_{d2} interacting surface, identified by Genentech, was envisioned [23]. The peptide v114* (VEPNCDIHVⁿLWEWECFERL-NH₂, with the two cysteines involved in a disulfide bond) was chosen because a potent K_i of 60 nM has recently been determined by competitive fluorescence polarization assay [24]. The IC₅₀ obtained here for v114* was 0.51 μM (95% CI from 0.42 to 0.62 nM, R² = 0.98). For further validation of the assay, peptides modified by N-terminal deletion (CDIHVⁿLWEWECFERL-NH₂ (**1**), with the two

cysteines involved in a disulfide bond) and by replacement of the cysteines by serines (linear peptide SDIHVⁿLWEWESFERL-NH₂ (**2**)) were evaluated. As expected [9], (**1**) displayed slightly decreased activity (IC₅₀ = 2.7 μM, 95% CI from 2.3 to 3.2 nM, R² = 0.98) and (**2**) was inactive. The peptides v114*, (**1**) and (**2**) gave comparable results when tested in a previously described assay with VEGFR1_{ECD} coated and btVEGF₁₆₅ [10]: 1.8 μM (95% CI from 1.1 to 3.0 nM), 5.2 μM (95% CI from 3.6 to 7.5 nM) and no activity, respectively. The effect of incubation time was then checked for peptide (**1**). The IC₅₀ values increased slightly from 15 minutes to 45 minutes, and remained stable at 60 minutes (figure S2A). Finally, we observed for peptide (**1**) that an additional pre-incubation time of 45 minutes in the absence of VEGFR1_{d2}-HRP had no effect on the IC₅₀ in the optimized conditions used (figure S2B).

Ligands binding the VEGFR1_{d2}-HRP conjugate should also induce a displacement of the interaction, which was confirmed with the VEGF₉₅ (IC₅₀ = 45 nM, 95% CI from 37 to 53 nM, R² = 0.98). Moreover, some peptides have been described to bind the VEGFR1_{d2} at the VEGF binding site. Unfortunately, for the cyclic peptide c[YYDEGLEE]-NH₂ [11; 25], no activity was detected up to 100 μM. This synthetic peptide was also inactive in our hands when assayed with the previously described system using coated VEGFR1_{ECD} and btVEGF₁₆₅ [10]. This variability of the displacement activity among batches of the same compound prompted us to test metal complexes, which may be present as trace amounts and lead to false positive hits. Pd(OAc)₂ was a potent inhibitor with an IC₅₀ of 47 nM (95% CI from 32 to 70 nM, R² = 0.85). CuSO₄ had also some activity, but did not reach 100% displacement, even above 30 μM. We hypothesize that copper may not act by directly blocking the VEGFR1_{d2} / VEGF interface, but through a different mechanism with a different site of interaction. The position of the HRP on the VEGFR1_{d2} in a fraction of the conjugate might therefore block copper access or prevent its inhibition activity. CoCl₂ and FeSO₄ were not able to displace the interaction. These results correlate fairly well with those obtained with the VEGFR1_{ECD} / btVEGF₁₆₅ assay [10]: Pd(OAc)₂ IC₅₀ = 0.36 μM (95% CI 0.27 to 0.48 μM), CuSO₄ IC₅₀ = 0.97 μM (95% CI 0.63 to 1.5 μM), a weak activity for CoCl₂ and no activity for FeSO₄. Finally, we verified that the displacement observed was not due to interference with the HRP detection system at the low concentrations used (see supporting information). A detailed structural investigation of the transition metal mediated

inhibition of the VEGF-VEGFR1 interaction and the corresponding biological implications will be reported elsewhere.

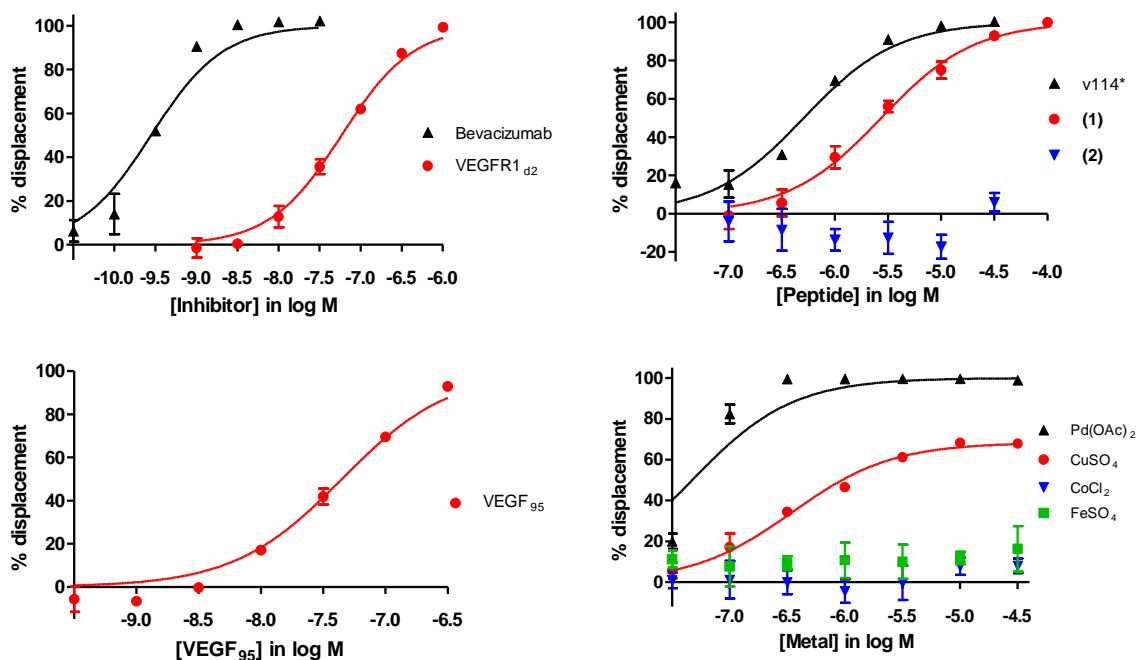


Figure 2. Competition assays between the indicated inhibitors and the VEGFR1_{d2}-HRP conjugate (1 nM) for binding to coated VEGF₉₅ (40 ng/well). Data are presented as percentages of displacement of VEGFR1_{d2}-HRP. The analysis was performed with the software Graphpad Prism using a “log [inhibitor] vs. response” non-linear regression, with bottom and top values fixed at 100 and 0% respectively (excepted for CuSO₄ where the value was not fixed at 100%). Mean numbers from at least triplicate wells are plotted. Error bars represent standard deviations. The assay was performed in the presence of 1% DMSO for the metals and the peptides (1), (2) and v114*.

The direct chemical modification of the VEGFR1_{d2} domain through one of its 6 lysine residues is possible and produces a conjugate which retains some affinity for the VEGF. The conjugate can be used in an ELISA-based assay which bypasses the widely used streptavidin-biotin interaction system. It accelerates therefore the process by avoiding the HRP-streptavidin incubation step and the following washing steps. The optimized assay can be carried out in only 2.5 hours after the VEGF coating step.

Conveniently, we did not observe any significant loss in activity for the VEGFR1_{d2}-HRP conjugate over a period of one year, when stored in 50% glycerol and PBS buffer (v:v). Some potential disadvantages exist. In particular, the assay may lead to false positive for molecules that bind tightly to HRP and inhibits it in spite of the washing steps. However, such molecules have not been found during the course of the optimization study. In any case, adventitious HRP inhibition can be checked *a posteriori* in separate wells with the substrate and plate reader required for the assay. Finally, the functional VEGFR1_{d2}-HRP conjugate described herein may constitute a powerful tool for the screening of peptides and small molecules attached to various types of solid supports (pins, lanterns, sepharose beads) and may find applications in cell-based assays.

References

- [1]D. Hanahan, and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (2011) 646-674.
- [2]P. Carmeliet, and R.K. Jain, Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407 (2000) 249-257.
- [3]P. Carmeliet, and R.K. Jain, Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473 (2011) 298-307.
- [4]N. Ferrara, Vascular Endothelial Growth Factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 789-791.
- [5]D.F. Williams, and al., Ranibizumab and Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 1897–1908.
- [6]L.D. D'Andrea, G. Iaccarino, R. Fattorusso, D. Sorriento, C. Carannante, D. Capasso, B. Trimarco, and C. Pedone, Targeting angiogenesis: Structural characterization and biological properties of a de novo engineered VEGF mimicking peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 14215-14220.
- [7]C. Wiesmann, G. Fuh, H.W. Christinger, C. Eigenbrot, J.A. Wells, and A.M. de Vos, Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 91 (1997) 695-704.
- [8]B. Barleon, F. Totzke, C. Herzog, S. Blanke, E. Kremmer, G. Siemeister, D. Marme, and G. Martiny-Baron, Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10382-10388.
- [9]K.J. Peterson, J.D. Sadowsky, E.A. Scheef, S. Pal, K.D. Kourentzi, R.C. Willson, E.H. Bresnick, N. Sheibani, and S.H. Gellman, A fluorescence polarization assay for identifying ligands that bind to vascular endothelial growth factor. *Anal. Biochem.* 378 (2008) 8-14.
- [10]V. Goncalves, B. Gautier, C. Garbay, M. Vidal, and N. Inguibert, Development of a chemiluminescent screening assay for detection of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligands. *Anal. Biochem.* 366 (2007) 108-10.
- [11]V. Goncalves, B. Gautier, P. Coric, S. Bouaziz, C. Lenoir, C. Garbay, M. Vidal, and N. Inguibert, Rational design, structure, and biological evaluation of cyclic peptides mimicking the vascular endothelial growth factor. *J. Med. Chem.* 50 (2007) 5135-5146.

- [12]V. Goncalves, B. Gautier, C. Garbay, M. Vidal, and N. Inguibert, Structure-based design of a bicyclic peptide antagonist of the vascular endothelial growth factor receptors. *J. Pept. Sci.* (2007).
- [13]V. Goncalves, B. Gautier, A. Regazzetti, P. Coric, S. Bouaziz, C. Garbay, M. Vidal, and N. Inguibert, On-resin cyclization of peptide ligands of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 by copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17 (2007) 5590-4.
- [14]M.I. García-Aranda, S. González-López, C.M. Santiveri, N. Gagey-Eilstein, M. Reille-Seroussi, M. Martín-Martínez, N. Inguibert, M. Vidal, M.T. García-López, M.A. Jiménez, R. González-Muñiz, and M.J. Pérez de Vega, Helical peptides from VEGF and Vammin hotspots for modulating the VEGF-VEGFR interaction. *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 1896-1905.
- [15]B. Gautier, M.A. Miteva, V. Goncalves, F. Huguenot, P. Coric, S. Bouaziz, B. Seijo, J.-F. Gaucher, I. Broutin, C. Garbay, A. Lesnard, S. Rault, N. Inguibert, B.O. Villoutreix, and M. Vidal, Targeting the proangiogenic VEGF-VEGFR protein-protein interface with drug-like compounds by in silico and in vitro screening. *Chem. Biol.* 18 (2011) 1631-1639.
- [16]B. Pan, B. Li, S.J. Russell, J.Y.K. Tom, A.G. Cochran, and W.J. Fairbrother, Solution structure of a phage-derived peptide antagonist in complex with vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Biol.* 316 (2002) 769-787.
- [17]R.J.S. Duncan, P.D. Weston, and R. Wrigglesworth, A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl groups into proteins, and its use in the preparation of conjugates for immunoassay. *Anal. Biochem.* 132 (1983) 68-73.
- [18]H. Delincée, and B.J. Radola, Fractionation of horseradish peroxidase by preparative isoelectric focusing, gel chromatography and ion-exchange chromatography. *Eur. J. Biochem.* 52 (1975) 321-330.
- [19]R. Di Stasi, D. Diana, D. Capasso, R. Palumbo, A. Romanelli, C. Pedone, R. Fattorusso, and L.D. D'Andrea, VEGFR1_{D2} in drug discovery: expression and molecular characterization. *Biopolymers (Pept Sci)* 94 (2010) 800-809.
- [20]J.E. Stefano, J. Bird, J. Kyazike, A.W.-M. Cheng, E. Boudanova, M. Dwyer, L. Hou, H. Qiu, G. Matthews, M. O'Callaghan, and C.Q. Pan, High-affinity VEGF antagonists by oligomerization of a minimal sequence VEGF-binding domain. *Bioconjugate Chem.* 23 (2012) 2354-2364.
- [21]H.-P. Gerber, and N. Ferrara, Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.* 65 (2005) 671-680.
- [22]L.G. Presta, H. Chen, S.J. O'Connor, V. Chisholm, Y.G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, and N. Ferrara, Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 57 (1997) 4593-4599.
- [23]W.J. Fairbrother, H.W. Christinger, A.G. Cochran, G. Fuh, C.J. Keenan, C. Quan, S.K. Shriver, J.Y.K. Tom, J.A. Wells, and B.C. Cunningham, Novel peptides selected to bind vascular endothelial growth factor target the receptor-binding site. *Biochemistry* 37 (1998) 17754-17764.
- [24]H.S. Haase, K.J. Peterson-Kaufman, S.K. Lan Levengood, J.W. Checco, W.L. Murphy, and S.H. Gellman, Extending foldamer design beyond α -helix mimicry: α/β -peptide inhibitors of Vascular Endothelial Growth Factor signaling. *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 7652-7655.
- [25]B. Gautier, V. Goncalves, D. Diana, R. Di Stasi, F. Teillet, C. Lenoir, F. Huguenot, C. Garbay, R. Fattorusso, L.D. D'Andrea, M. Vidal, and N. Inguibert, Biochemical and structural analysis of the binding determinants of a vascular endothelial growth factor receptor peptidic antagonist. *J. Med. Chem.* 53 (2010) 4428-4440.

Supporting information for:

Direct covalent labeling of VEGFR1 domain 2 with horseradish peroxidase: development of a displacement assay on VEGF.

Sylvain BROUSSY^a, Jean-François GAUCHER^b, Marie REILLE-SEROUSSE^a, Laure-Anne CUSSAC^a, Isabelle BROUTIN^b, Michel VIDAL^{a,c}

^a UMR 8638 CNRS Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'Observatoire, Paris 75006 France

^b UMR 8015 CNRS Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Sorbonne Paris Cité, 4 avenue de l'Observatoire, Paris 75006 France

^c UF Pharmacocinétique et pharmacochimie, hôpital Cochin, AP-HP, 27 rue du Faubourg Saint Jacques, Paris 75014, France

Materials and methods

1- Protein expression, purification and refolding

The human VEGFR1_{d2} protein (residues 132-225, estimated molecular mass = 11000 g.mol⁻¹ and ϵ_{280} = 10810 L.mol⁻¹.cm⁻¹) was obtained as previously described [1] and stored at -20°C as 1 mg dry aliquots (protein content based on UV absorption at 280 nm) lyophilized from a 5 mM HEPES pH 6.8 solution.

The human VEGF₉₅ homodimer (residues xxx-xxx, estimated molecular mass = 23056 g.mol⁻¹ and ϵ_{280} = 12920 L.mol⁻¹.cm⁻¹) was expressed and stored at -80°C as 10 μ L working aliquots at 10 μ M.

2- VEGFR1_{d2}-HRP conjugation

The coupling procedure was adapted from the recommended method provided by the HRP maleimide activated supplier (Sigma Aldrich), using SATA (*S*-acetylthioglycolic acid *N*-hydroxysuccinimide ester) to introduce an additional thiol functional group [2]. One VEGFR1_{d2} aliquot (1 mg, 91 nmol) was dissolved in 100 μ L water to reconstitute the original buffer composition, and further diluted to 1 mL with Na/KPO₄ buffer 50 mM pH 7.5 with 1 mM EDTA. To the resulting 91 μ M VEGFR1_{d2} solution was added a 100 mM solution of SATA in DMF (typically 1.8 μ L for 2 equivalents SATA). Some precipitate was observed and its quantity increased for higher SATA to VEGFR1_{d2} ratios. After 10 minutes at room temperature, the protein was separated from small molecules by gel filtration into the reaction buffer on an Econo-Pac[®] 10DG column (Bio-Rad). Fractions containing the protein were identified by UV, pooled and concentrated to 1 mL by ultracentrifugation (MWCO 3000, Millipore). The thiol groups were deprotected by addition of 100 μ L of a solution of hydroxylamine (prepared from 50 mmol of H₂NOH.HCl and 2.5 mmol of EDTA in 100 mL of water, with the pH adjusted to 7.5 with solid Na₂HPO₄) [2]. After 1 hour at room temperature in the dark, thiol content was titrated by Ellman analysis using ϵ_{412} = 14150 L.mol⁻¹.cm⁻¹ [3; 4] and total protein content was determined by

UV at 280 nm (see table S1 for an optimization study of the ratio SATA / VEGFR1_{d2}). Typically, about 30% of recovered protein functionalized with 1.0 to 1.2 thiol group per protein was obtained with 2 equivalents of SATA.

Ratio SATA / d2	n _[SH] (nmol)	n _{d2*} (nmol)	% d2* recovery	n _[SH] / n _{d2}
1 : 1	2.7	9.8	36	0.28
2 : 1	8.4	7.8	29	1.1
4 : 1	7.5	6.1	23	1.2

Table S1. Effect of the SATA / VEGFR1_{d2} ratio on the extent of protein functionalization and recovery. Each experiment was carried out starting with 27 nmol VEGFR1_{d2}. d2* denotes VEGFR1_{d2} functionalized with a thiol group.

Solid HRP maleimide activated (1 equivalent corresponding to the measured thiol content, 25 nmol, 1.0 mg, the molecular mass of HRP was 40 kDa) was added and the reaction mixture was kept in the dark at room temperature for 3 hours. β -mercaptoethanol was then added to a final concentration of 1.5 mM, and after 15 minutes at room temperature, *N*-ethyl maleimide was added to a final concentration of 3.0 mM. After 15 additional minutes, the mixture was purified as above by gel filtration into the reaction buffer on an Econo-Pac[®] 10DG column. Fractions containing the peroxidase were pooled and analyzed by SDS-PAGE (crude mixture, figure S1).

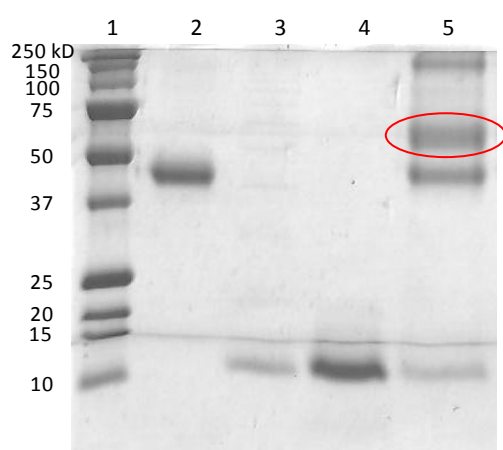


Figure S1. SDS-PAGE analysis (15% acrylamide, 37.5:1 cross link) of the crude VEGFR1_{d2}-HRP conjugate (spot circled in red). Line 1: molecular weights standards; line 2: HRP; line 3: VEGFR1_{d2}; line 4: VEGFR1_{d2}-SATA; line 5: crude mixture.

The VEGFR1_{d2}-HRP conjugate obtained was further purified by SEC on a Superdex™ 75 HR 10/30 (Amersham) with Na₂PO₄ buffer pH 7.2 50 mM. Fractions containing the desired product (as determined by the elution profile and SDS-PAGE analysis) were pooled and concentrated. Some fractions contained small amounts of non-conjugated HRP and/or traces of VEGFR1_{d2}-(HRP)_n. The proportion of remaining non-conjugated HRP was estimated by SDS-PAGE and usually considered negligible to calculate the final concentration of the conjugate. An alternative method consisting in the comparison of the UV absorptions at 275 and 403 nm using the Rz of pure HRP (“Reinheitszahl“, $A_{403}/A_{275} = 3.0$) has been described for antibody conjugates [2]. This method did not seem convenient here because of the low extinction coefficient of the VEGFR1_{d2} at 275 nm, resulting in a small difference in the Rz values ($\epsilon_{275} = 33000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ for HRP and $\epsilon_{275} = 43810 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ for the VEGFR1_{d2}-HRP conjugate).

For long term storage, an equal volume of glycerol was added and the VEGFR1_{d2}-HRP solution was stored at -20°C.

3- Displacement assays

Bevacizumab (Avastin™) was obtained from Roche. The nominal concentration was 25 mg/mL and a molecular mass of 149 kD was used to calculate the molar concentrations. Transition metals, DMSO, Tween 20 and bovine serum albumin fraction IV (BSA) were obtained from Sigma-Aldrich.

A white high-binding 96-well plate (Costar) was coated overnight at 4°C with (VEGF₉₅)₂ (40 ng in 100 µL PBS per well). The plate was washed 3 times with PBS containing 0.1% Tween 20 (v/v, buffer A) and 200 µL of 3% BSA in PBS (w/v) were added. After 1.5 h at 37°C, the plates were washed 3 times with buffer A, and the compounds were added at twice the desired final concentration in 50 µL of PBS with or without 2% DMSO. If desired, a pre-incubation period could be inserted at this point. A solution of VEGFR1_{d2}-HRP at twice the desired final concentration (typically 2 nM) in 50 µL PBS was added to each well and the resulting solutions were mixed with 2 micropipette actions. After 45 minutes incubation at 37°C, the plate was washed 4 times with buffer A and 100 µL SuperSignal West

Pico Substrate (Pierce) were added. The plate chemiluminescence (as relative lights units, RLU) was rapidly read on a Perkin Elmer Victor 2 spectrophotometer. The percentages of displacement were calculated using the formula: % displacement = 100 x [1 - (S - NS) / (MS - NS)], where S is the measured signal, NS and MS are non-specific (no VEGF₉₅ coated) and maximum (no inhibitor) signals, respectively. Data were analyzed with the software Graphpad Prism using a “log [inhibitor] vs. response” non-linear regression.

The effects of incubation and pre-incubation time were investigated for the VEGFR1_{d2}-HRP / VEGF₉₅ interaction displacement by peptide (1) (figure S2 and table S2). The correlation coefficient was poor at 15 minutes, due to a steeper Hills slope (1.8 for the best fit with a variable slope analysis), probably because the equilibrium between VEGF₉₅/VEGFR1_{d2}-HRP had not been reached. The IC₅₀ remained constant after 45 minutes.

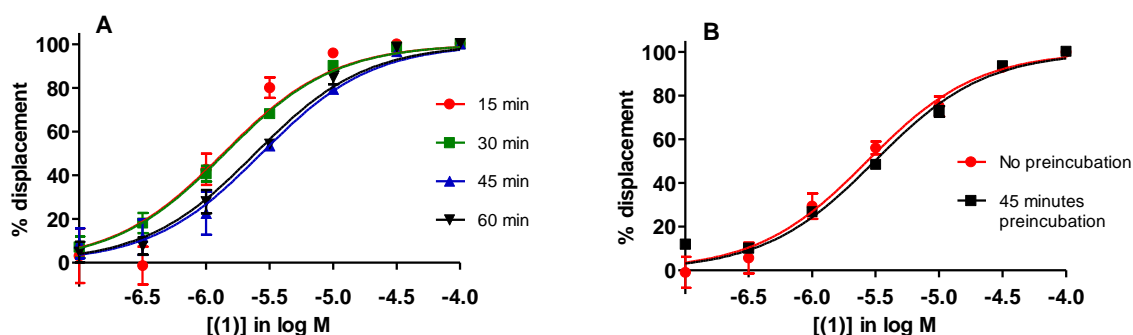


Figure S2. Effects of the incubation time (A) and the pre-incubation time (B) on the VEGFR1_{d2}-HRP / VEGF₉₅ interaction displacement by peptide (1). The analysis was performed with the software Graphpad Prism using a “log [inhibitor] vs. response” non-linear regression. Mean numbers from triplicate wells are plotted. Error bars represent standard deviations.

Incubation time (minutes)	IC ₅₀ (μM)	95% CI (μM)	R ²
15	1.4	0.96 – 1.9	0.93
30	1.4	1.3 – 1.6	0.99
45	2.7	2.3 – 3.3	0.98

60	2.4	2.1 – 2.8	0.99
----	-----	-----------	------

Table S2. Effects of the incubation time on the VEGFR1_{d2}-HRP / VEGF₉₅ interaction displacement by peptide (**1**).

Control experiments for transition metals

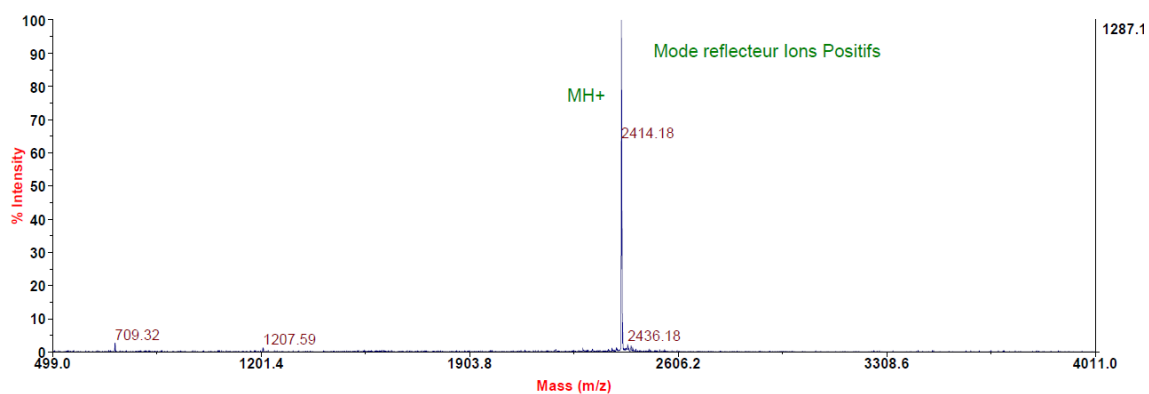
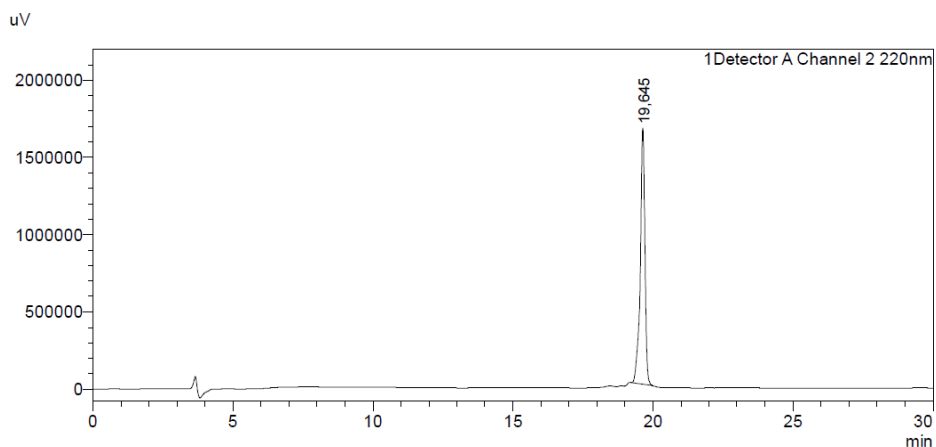
Using the same substrate system as above, the metals were tested for their intrinsic catalytic activity and for their ability to modulate that of HRP [5]. Pd(OAc)₂, CuSO₄ and FeSO₄ displayed only a weak intrinsic activity and a weak inhibition of HRP at 30 μM. In the case of CoCl₂, however, a strong signal was observed in the presence of the substrate, even without peroxidase. Thus, additional control experiments were carried out. VEGF₉₅ was coated on a 96-well plate as described above, followed by BSA blocking and 45 minutes incubation with the metals. After 3 washing steps with buffer A, no signal was obtained upon addition of the substrate. Therefore, 3 washing steps were sufficient to eliminate completely the metals and in particular CoCl₂.

4- Peptide synthesis

N^α-Fmoc amino acids with standard side chains protections, HOBt and solvents (HPLC grade CH₃CN, peptide synthesis grade DMF and DIEA) were purchased from SDS Carlo-Erba. All other reagents were purchased from Aldrich, unless otherwise specified. Peptides were synthesized on solid phase using a CEM Liberty 1 synthesizer at a 0.1 mmol scale with NovaSyn[®] TGR resin (0.25 mmol / g, from Novabiochem). Microwave irradiation was employed following the synthesizer provider recommendations for both coupling and deprotection steps. Coupling reactions were performed using N^α-Fmoc amino acids (5 eq. related to the resin) activated with DIC (4.9 eq.) and HOBt (10 eq.). After each coupling step, Fmoc removal was effected by treating the resin with 20% piperidine in DMF. The deprotection and cleavage of the peptide from the resin was done by treatment with 10 mL of TFA/water/EDC/TIPS 94/2.5/2.5/1.0 for 3 h at room temperature. After removal of the resin the filtrate was concentrated under a stream of argon and precipitated with cold diethyl ether. The precipitate was isolated by centrifugation and washed with diethyl ether, affording the crude peptide.

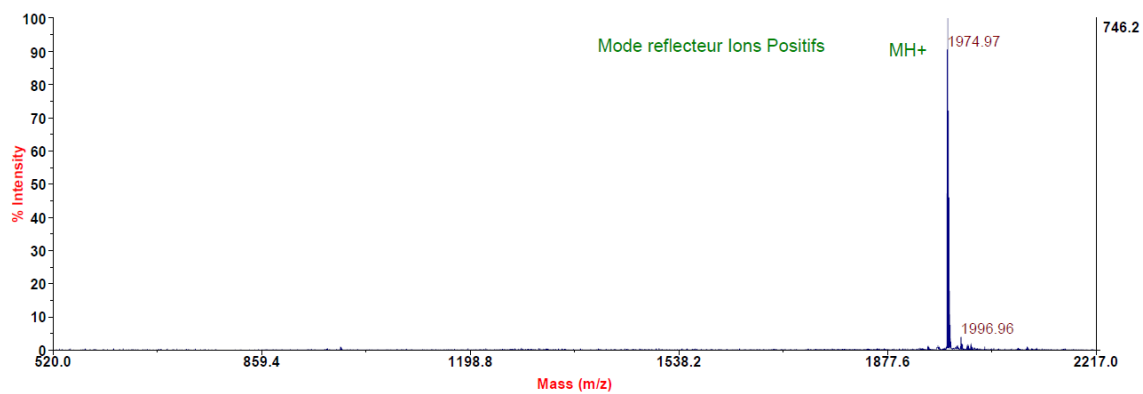
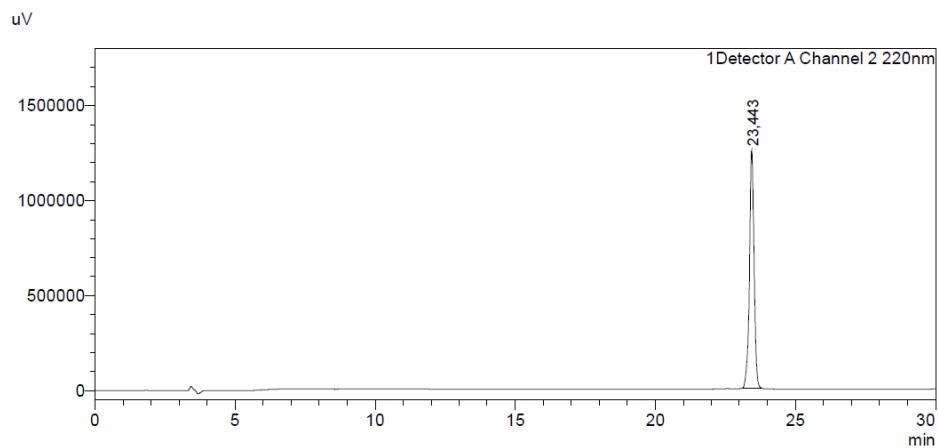
For cyclic peptides v114* and (1), the cyclization was carried out at 1 mM peptide concentration by addition of a 100 mM solution of NH_4HCO_3 . The reaction was monitored by HPLC and Ellman analysis [3; 4]. After completion of the reaction, the solvent was evaporated and the crude peptides were purified by semi-preparative HPLC on a Grace Alltima C18 column (5 μm , 10 x 250 mm) using a gradient program beginning at 20% B and rising to 100% B in 60 min at a flow rate of 2 mL/min (solvent A was water with 0.1% TFA, solvent B was 70% acetonitrile aqueous solution with 0.09% TFA). The products were detected at 220 and 254 nm, collected, and analyzed by HPLC using a Phenomenex Luna C18 column (5 μm , 2.5 x 250 mm). Pure fractions were pooled and lyophilized to yield the peptides as white solids.

Peptide v114*: VEPNCDIHVⁿLWEWECFERL-NH₂ (two cysteines involved in a disulfide bond).
MALDI-MS [M+H]⁺ calculated 2414.10; found 2414.18. HPLC Rt = 19.6 min (20-100% of solvent B
in 30 min).

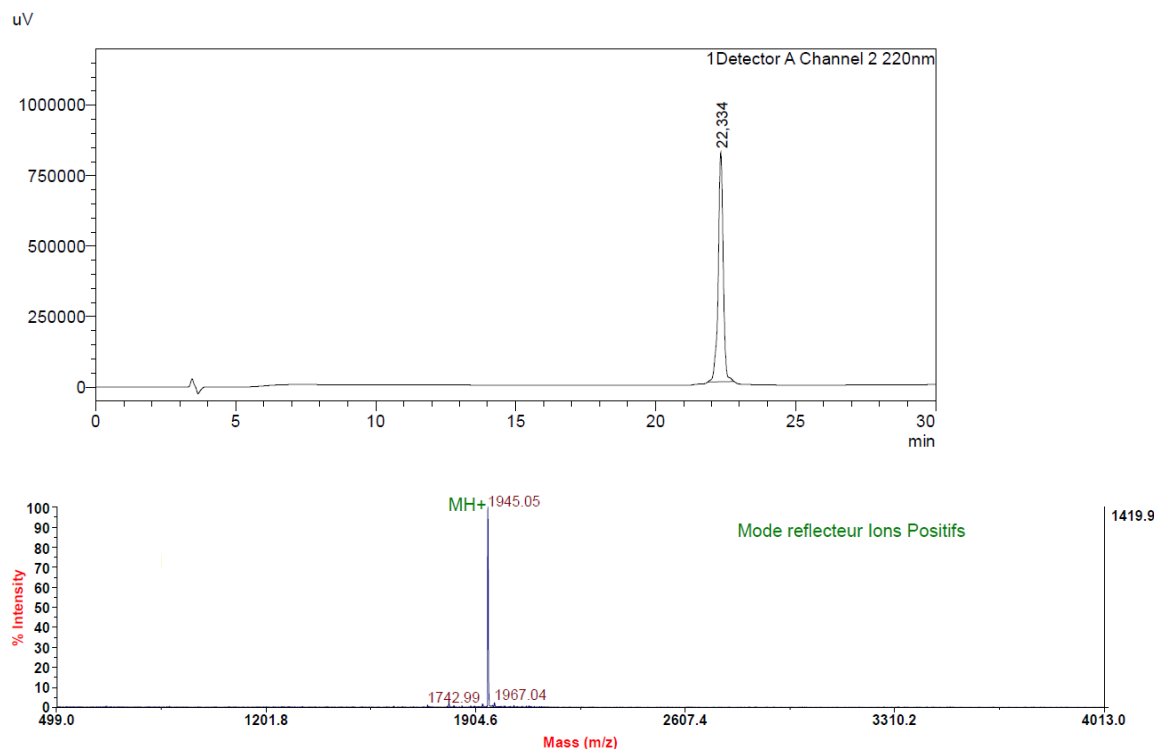


Peptide (**1**): CDIHVⁿLWEWECFERL-NH₂ (two cysteines involved in a disulfide bond). MALDI-MS

[M+H]⁺ calculated 1974.90; found 1974.97. HPLC Rt = 23.4 min (20-80% of solvent B in 30 min).



Peptide (2): SDIHVⁿLWEWESFERL-NH₂. MALDI-MS [M+H]⁺ calculated m/z 1944.94; found 1945.05. HPLC Rt = 22.3 min (20-80% of solvent B in 30 min).



References

- [1] B. Gautier, M.A. Miteva, V. Goncalves, F. Huguenot, P. Coric, S. Bouaziz, B. Seijo, J.-F. Gaucher, I. Broutin, C. Garbay, A. Lesnard, S. Rault, N. Inguibert, B.O. Villoutreix, and M. Vidal, Targeting the proangiogenic VEGF-VEGFR protein-protein interface with drug-like compounds by in silico and in vitro screening. *Chem. Biol.* 18 (2011) 1631-1639.
- [2] R.J.S. Duncan, P.D. Weston, and R. Wrigglesworth, A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl groups into proteins, and its use in the preparation of conjugates for immunoassay. *Anal. Biochem.* 132 (1983) 68-73.
- [3] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70-77.
- [4] P.W. Riddles, R.L. Blakeley, and B. Zerner, Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) - a reexamination. *Anal. Biochem.* 94 (1979) 75-81.
- [5] A. Mahmoudi, K. Nazari, N. Mohammadian, and A.A. Moosavi-Movahedi, Effect of Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, and Cu²⁺ on Horseradish Peroxidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 104 (2003) 81-94.

Chapitre 2 : Du développement de petites molécules hétérocycliques antagonistes du VEGFR1 à la découverte de l'effet des métaux sur l'interaction VEGF/VEGFR1

I. Résultats préliminaires : Identification du composé sr 4321 par criblage *in silico* et propriétés biologiques.

L'identification et le développement de petites molécules modulant les interactions protéine-protéine a fortement évolué depuis les années 2000. Cependant, en dépit des progrès et des différents exemples décrits dans la littérature, la découverte de nouvelles molécules reste aujourd'hui un défi scientifique important.¹²⁸

De nombreux facteurs limitant subsistent. Ceux-ci incluent le manque de molécules de départ pour la conception de nouveaux composés, la surface généralement plane et étendue des protéines ou encore par exemple, la difficulté de distinguer une réelle fixation des petites molécules sur les protéines d'artefacts de liaison.¹²⁹

Différentes stratégies incluant des criblages à haut débit (HTS), la préparation combinatoire de bibliothèques de composés, ou bien encore des criblages virtuels dits *in silico* sont généralement développées lors de recherche de nouveaux antagonistes d'interaction protéine-protéine.⁸¹

Afin de concevoir de nouveaux antagonistes du VEGFR1, le laboratoire s'est orienté il y a quelques années vers l'identification de nouveaux composés par criblage *in silico*.

1. Criblage *in silico* et identification de nouveaux composés antagonistes du VEGFR1¹³⁰

La zone de fixation du VEGF sur le VEGFR1 étant essentiellement localisée sur le domaine d2 extracellulaire, le criblage *in silico* a été réalisé sur ce domaine à partir de la chimiothèque du CERMN (Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie) par l'équipe du Dr. B. Villoutreix (Dr. B. Villoutreix et Dr. M. Miteva) au sein de l'unité Inserm U648 où se trouvait également l'équipe du Pr. M. Vidal.

¹²⁸ J. A. Wells and C. L. McClendon, *Nature*, **2007**, *450*, 1001-1009

¹²⁹ M. R. Arkin and J. A. Wells, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301-317

¹³⁰ B. Gautier, M. A. Miteva, V. Goncalves, F. Huguenot, P. Coric, S. Bouaziz, B. Seijo, J. F. Gaucher, I. Broutin, C. Garbay, A. Lesnard, S. Rault, N. Inguibert, B. O. Villoutreix and M. Vidal, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1631-1639

1.1 Généralités sur le criblage *in silico*

Le criblage *in silico* est un criblage virtuel qui consiste à soumettre une protéine cible de structure connue à une banque de molécules en 3D afin de déterminer, à l'aide de différents logiciels, les composés susceptibles d'interagir avec celle-ci. Cette méthode fait appel à une étape dite de « docking » qui est généralement réalisée avec une protéine relativement figée (possibilité de mouvement des chaînes latérales réduite) en présence de ligands flexibles, avec ou sans solvant explicite. Cette approche permet donc de présélectionner un certain nombre de molécules qui seront ensuite évaluées *in vitro*.^{131,132}

Bien que connaissant certaines limitations,¹³¹ cette méthode de criblage permet de présélectionner, rapidement et à coûts réduits, des molécules potentiellement bioactives.

Cette technique, alternative au criblage à haut débit, est donc devenue ces dernières années une méthode de choix pour identifier de nouveaux ligands d'intérêts thérapeutiques.

1.2 Détermination de la zone de criblage sur le domaine d2 du VEGFR1

La zone d'interaction du VEGF sur le domaine d2 du VEGFR1 est une surface plane, très étendue (>800Å²) et exposée au solvant. Cependant, l'analyse de la structure cristallographique du domaine d2 du VEGFR1⁸⁵ a permis de mettre en évidence que la surface du récepteur en interaction avec l'hélice α 1 du VEGF présentait les qualités requises pour le criblage.

En effet, il s'agit d'une zone enfouie du récepteur composée de résidus hydrophobes, polaires et aromatiques susceptibles d'interagir avec des molécules. L'analyse détaillée de cette région a permis l'identification de trois sous-poches : A, B et C (*Figure 23*).

La poche A (formée des résidus K₁₇₀, T₂₀₆, E₂₂₈ et K₂₁₇) est assez éloignée de la zone d'interaction avec l'hélice α et n'interagit donc qu'avec la glutamine 22 du VEGF. Cependant, cette poche au caractère polaire forme un sillon dans lequel pourraient s'ancrer les molécules à tester.

La poche B, essentiellement composée d'acides aminés hydrophobes et aromatiques (Y₁₃₉, I₁₄₂, P₁₄₃, N₂₁₉, et L₂₂₁), interagit directement avec les résidus F₁₇ et M₁₈ de l'hélice α du VEGF.

La poche C est une surface plane et fortement hydrophobe (résidus Y₁₉₉, K₁₇₁, F₁₇₂, P₁₇₃, et L₂₀₄). Cette dernière région est en interaction avec deux résidus aromatiques (Y₂₁ et Y₂₅) de l'hélice α du VEGF.

¹³¹ B. K. Shoichet, *Nature*, **2004**, 432, 862-865

¹³² S. Ekins, J. Mestres and B. Testa, *British Journal of Pharmacology*, **2007**, 152, 9–20

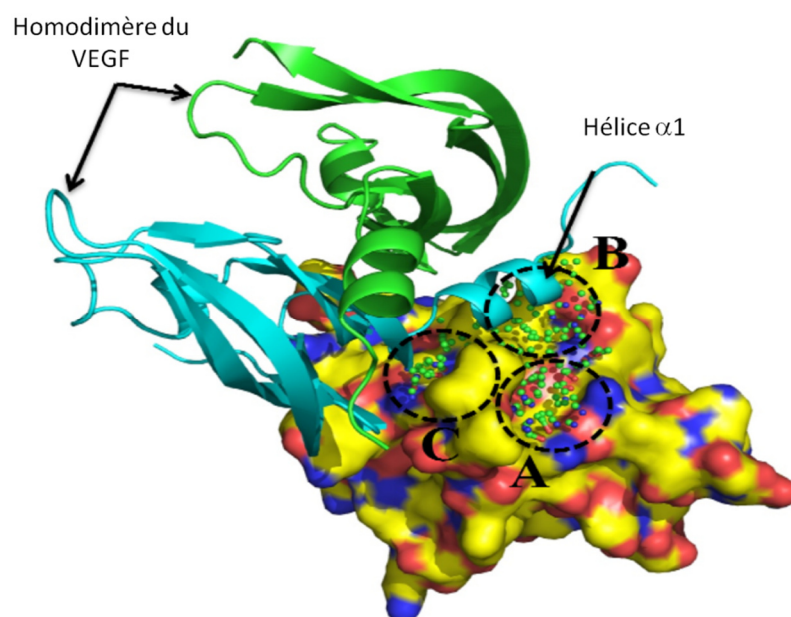


Figure 23: Structure cristallographique du complexe VEGF₈₋₁₀₉/VEGFR1.

Illustration des trois sous-poches (A, B et C) du domaine d2 du VEGFR1 ayant servi au criblage *in silico* de la chimiothèque du CERMN. L'homodimère du VEGF₈₋₁₀₉ est représenté en vert et bleu et le domaine d2 du VEGFR1 sous forme de surface électrostatique (jaune : résidus hydrophobes/aromatiques, rouge : atomes d'oxygène/résidus chargés négativement, bleu : atomes d'azote/ résidus chargés positivement).

1.3 Protocole du criblage *in silico*

Une fois la zone déterminée, le criblage *in silico* a été effectué en plusieurs étapes. Les 8000 molécules de la librairie du CERMN ont tout d'abord été soumises à un premier filtre (FAF-drug). Celui-ci permet de trier les composés en fonction de critères physico-chimiques afin de ne sélectionner que les molécules respectant entre autre les règles de Lipinski. Différents conformères des molécules sélectionnées ont ensuite été générés par le programme Frog. L'étape de criblage (docking/scoring) a été réalisée à l'aide du programme Surflex. Celle-ci a ainsi permis de classer les 6500 molécules retenues en fonction de leur énergie d'interaction calculée avec le VEGFR1. Enfin, sur les 600 molécules retenues après docking, une dernière étape d'analyse visuelle des molécules a été réalisée afin d'éliminer les structures aberrantes et de ne sélectionner que 206 molécules (Figure 24).

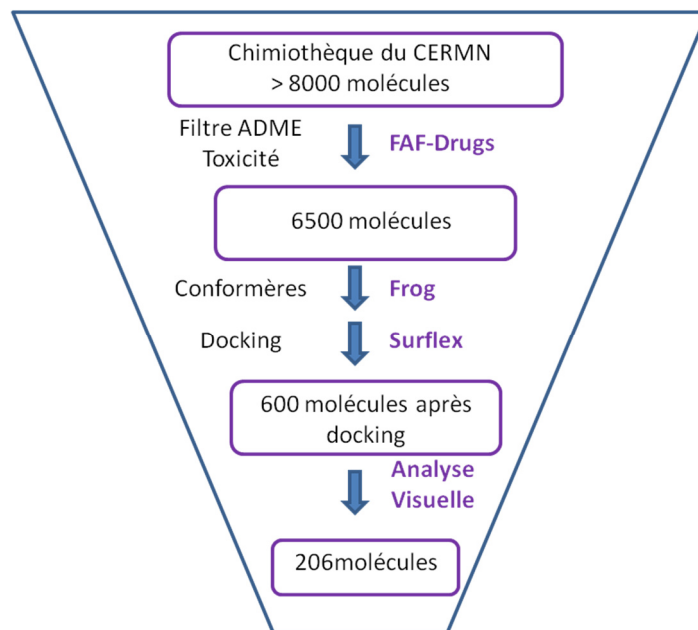


Figure 24: Schématisation du protocole multi-étapes du criblage *in silico*.

1.4 Evaluation de l'activité des molécules sélectionnées et découverte du sr 4321

A l'issue de ce criblage *in silico*, la capacité des molécules sélectionnées à inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1 a été évaluée *in vitro* sur le test de déplacement VEGFR1-ECD. Parmi les 206 molécules testées, 27 composés se sont avérés bloquer significativement la fixation du btVEGF sur le récepteur (> 60% d'inhibition à 200µM).

L'observation de ces molécules a permis de mettre en évidence que ces composés présentaient tous un cycle hétéroaromatique à 5 chaînons, une fonction acide carboxylique ainsi qu'un motif urée. Suite à cette analyse structurale, les 27 composés retenus ont alors été classés en trois séries :

- Série (3-carboxy-2-ureido) thiophène (20 molécules)
- Série (2-carboxy-3-ureido) thiophène (6 molécules)
- Série 2-carboxyfurane (1 molécule)

Les composés les plus actifs de ces trois séries ont ensuite été testés en effet-dose sur le test VEGFR1-ECD. Parmi ces molécules, le composé sr 4321 de la série (3-carboxy-2-uréido) thiophène s'est révélé très prometteur avec une Cl_{50} égale à 17,4 µM [IC 95 % de 14,7 à 20,5 µM].

2. Etude du composé sr 4321¹³⁰

En raison de son activité sur le test VEGFR1-ECD ($Cl_{50} = 17,4 \mu M$), l'étude du composé sr 4321 a été plus approfondie. Evalué sur le test VEGFR1-d1-d3, il a été mis en évidence qu'il inhibait également la fixation du btVEGF sur les domaines d1-d3 du VEGFR1 ($Cl_{50} = 9,2 \mu M$ [IC 95 % de 7,8 à 10,8 μM]) (Figure 25).

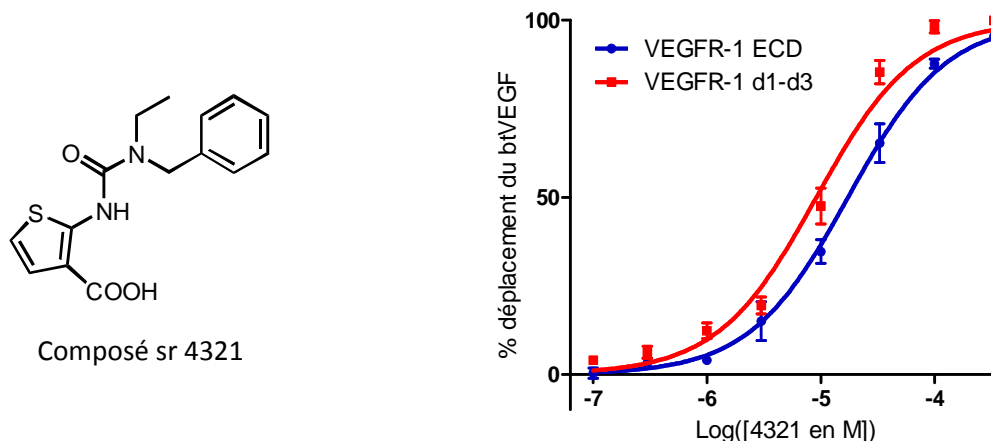


Figure 25: Structure et activité sur les tests de déplacement VEGFR1-ECD et VEGFR1-d1-d3 du composé sr 4321

Ces résultats, en accord avec le criblage *in silico*, suggèrent donc que le composé sr 4321 inhibe l'interaction VEGF/VEGFR1 en se fixant au niveau du site de liaison du VEGF sur le récepteur.

La liaison de ce composé sur le domaine d2 du VEGFR1 a été confirmée par RMN en utilisant une technique dite de Water LOGSY. Le principe de cette technique ainsi que le résultat obtenu est détaillé dans une partie ultérieure (cf. partie III.2.2).

Afin de comprendre son mode d'action, l'activité biologique du composé sr 4321 a été étudiée sur cellules HUVE (Human Umbilical Vascular Endothelial Cells). Ces cellules constituent un modèle couramment utilisé en angiogenèse.

L'étude de l'inhibition de la phosphorylation des VEGFRs induite par le VEGF a mis en évidence l'activité anti-angiogénique du composé sr 4321. De plus, ces résultats ont montré que ce composé agissait spécifiquement sur le VEGFR1. En effet, le composé sr 4321 inhibe la phosphorylation du VEGFR1 de manière dose dépendante tandis qu'il n'a que très peu d'effet sur la phosphorylation du VEGFR2 (Figure 26).

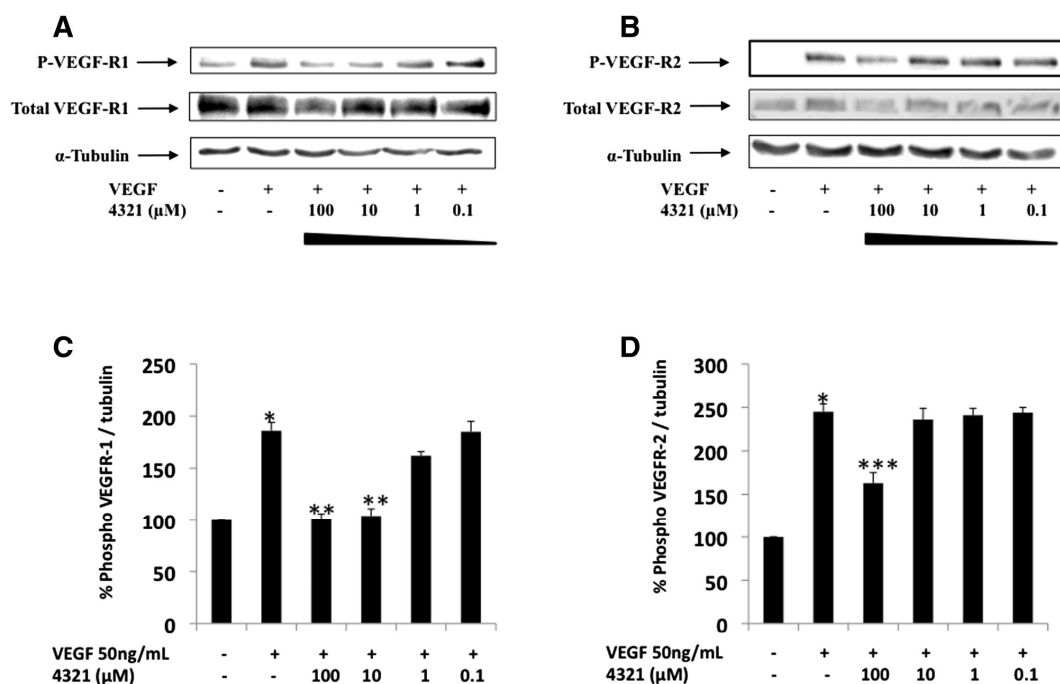


Figure 26: Effet du composé sr4321 sur la phosphorylation du VEGFR1 (à gauche) et VEGFR2 (à droite) induite par le VEGF sur HUVEC. Western blot et représentation de la quantification de la densité optique des bandes. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm SD. *, $p < 0,0001$ par rapport au contrôle sans VEGF ; **, $p < 0,0001$ par rapport au contrôle avec VEGF ; ***, $p < 0,001$ par rapport au contrôle avec VEGF.

L'étude de l'inhibition des voies de transduction intracellulaires (ERK1/2 et Akt) a montré que ce composé n'inhibait pas significativement leur activation. Les voies de transduction étant principalement initiées par le VEGFR2¹³³, cette étude a permis de confirmer la spécificité du composé sr 4321 pour le VEGFR1.

Afin de confirmer l'effet anti-angiogénique du composé sr 4321, des études cellulaires plus approfondies ont été réalisées. Celles-ci ont démontré que ce composé avait un effet significatif sur la migration cellulaire, la différenciation en réseau vasculaire et la réorganisation du réseau d'actine et de tubuline.

Enfin, des études complémentaires ont été réalisées afin de s'assurer que les effets observés sur cellules HUVEC étaient bien liés à l'inhibition de l'interaction VEGF/VEGFR1 et non à une inhibition de l'activité tyrosine kinase ou bien encore à un effet cytotoxique de la molécule.

Au vu de ces différentes expériences, le composé sr 4321 identifié par le criblage *in silico* est donc apparu comme un antagoniste spécifique du VEGFR1.

¹³³ K. Holmes, O. L. Roberts, A. M. Thomas and M. J. Cross, *Cellular Signaling*, **2007**, 19, 2003–2012

3. Conclusion

Les interactions protéine/protéine jouent un rôle fondamental dans la régulation des voies de signalisation et représentent donc des cibles thérapeutiques importantes. Cependant, leurs surfaces d'interactions planes, étendues et parfois flexibles rendent difficile l'identification et le développement de nouveaux inhibiteurs.

Dans le cadre de cette étude, les approches combinées de criblage *in silico* et techniques biochimiques de type ELISA ont permis de mettre en évidence différents composés susceptibles de moduler l'interaction VEGF/VEGFR1-d2.

Parmi ces différentes molécules, le composé sr 4321 de type (3-carboxy-2-uréido) thiophène s'est révélé particulièrement prometteur. Au travers de différentes études structurales et biologiques, il a été démontré que ce composé inhibait de façon spécifique les voies de transductions induites par le VEGFR1 en agissant au niveau du domaine d2 du récepteur.

En conclusion, cette étude menée au laboratoire avant mon arrivée en thèse a permis d'identifier une petite molécule de faible poids moléculaire capable, à priori, d'inhiber spécifiquement l'interaction VEGF/VEGFR1. Du fait de ses propriétés biologiques et de sa structure chimique simple, le composé sr 4321 est donc apparu comme un « scaffold » de choix pour développer et concevoir de nouveaux antagonistes du VEGFR1.

Par conséquent, ce composé a servi de point de départ pour initier au début de ma thèse une étude de relation structure activité.

II. Développement d'une nouvelle voie de synthèse pour le sr 4321 et la synthèse d'analogues.

1. Voie de synthèse développée au CERMN pour les composés de type uréido-thiophènes

La voie de synthèse développée au CERMN (Dr. S. Rault) pour les composés de type (3-carboxy-2-uréido) thiophène repose sur la réaction d'ouverture de l'anhydride 3-thiaisatoïque par différentes amines nucléophiles.

1.1 Synthèse de (3-carboxy-2-uréido) thiophènes

- *Synthèse de 3-anhydride thiaisatoïque*

Contrairement aux anhydrides isatoïques, leurs bio-isostères anhydrides thiaisatoïques ont peu été étudiés.^{134,135} En 1998, S. Rault et son équipe ont développé une voie de synthèse assistée par micro-onde pour accéder à des composés de type anhydride 3-thiaisatoïque.¹³⁶

Cette voie de synthèse débute par l'hydrolyse sous irradiation micro-onde du 2-amino-3 thiophène carboxylate d'éthyle. Cette réaction conduit à la formation de l'acide aminé correspondant qui, pour des raisons d'instabilité (décarboxylation rapide à température ambiante), n'est pas isolé. L'addition de phosgène sur cet intermédiaire permet ensuite d'obtenir, avec un rendement de 67% et sans purification, l'anhydride attendu (*Schéma 1*).

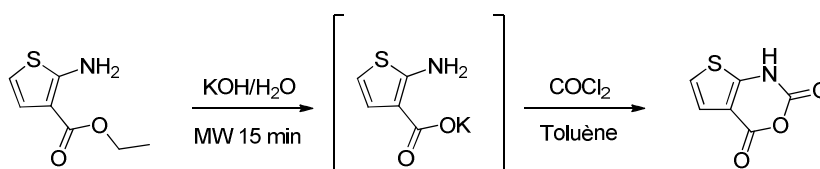


Schéma 1: Synthèse de l'anhydride 3-thiaisatoïque sous irradiation micro-onde

- *Réactivité et ouverture de l'anhydride 3-thiaisatoïque*

En présence de nucléophiles, les anhydrides isatoïques peuvent conduire à deux régioisomères possibles (*Schéma 2*). L'addition d'un nucléophile se fait généralement sur le carbonyle en position 4 (*Schéma 2, voie A*). Cependant, en présence d'un large excès de réactif ou bien encore lorsque la

¹³⁴ B. R. Baker, J. P. Joseph, R. E. Schaub, F. J. Mc Evoy, J. H. Williams, *J. Org. Chem.* **1953**, *18*, 138-152

¹³⁵ J. M. Barker, P. R. Huddleston, D. J. Holmes, *Chem. Research (M)*, **1986**, 1455-1463

¹³⁶ F. Fabis, S. Jolivet-Fouchet, M. Robba, H. Landelle and S. Rault, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 10789-10800

réaction est conduite à température élevée, le deuxième régioisomère peut être formé (*Schéma 2, voie B*).

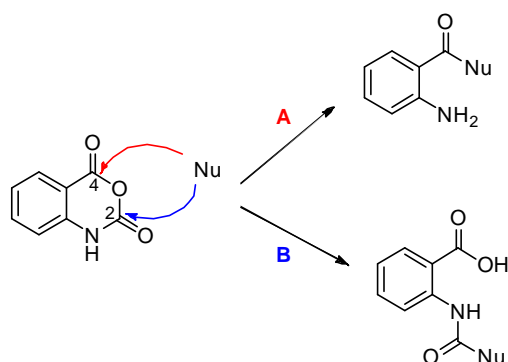


Schéma 2: Réactivité des anhydrides isatoïques

Contrairement aux anhydrides isatoïques, S. Rault et son équipe ont démontré que dans le cas de l'anhydride 3-thiaisatoïque, l'addition de nucléophile ne se faisait que sur le carbonyle en position 2. En effet, indépendamment des conditions réactionnelles et de la nature du nucléophile (amine ou alcool), seul ce régioisomère est formé (*Schéma 3*).¹³⁶

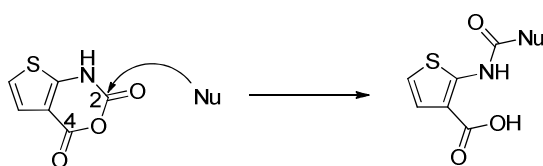


Schéma 3: Réactivité de l'anhydride 3-thiaisatoïque

La régiosélectivité de cette réaction d'addition nucléophile sur le carbamate peut s'expliquer par la diminution de l'électrophilie de l'atome de carbone du carbonyle en position 4 du fait de l'effet mésomère donneur de l'atome de soufre du cycle thiophène (*Schéma 4*).

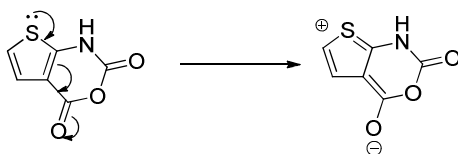


Schéma 4: Justification de la régiosélectivité de l'addition d'un nucléophile sur l'anhydride 3-thiaisatoïque

- *Synthèse de (3-carboxy-2-uréido) thiophènes*

Au vu de ces résultats, les composés de type (3-carboxy-2-uréido) thiophènes peuvent facilement être obtenus en trois étapes à partir de 2-amino-3 thiophène carboxylate de méthyle (commercial ou synthétisé) et du phosgène sous activation micro-onde (*Schéma 5*).

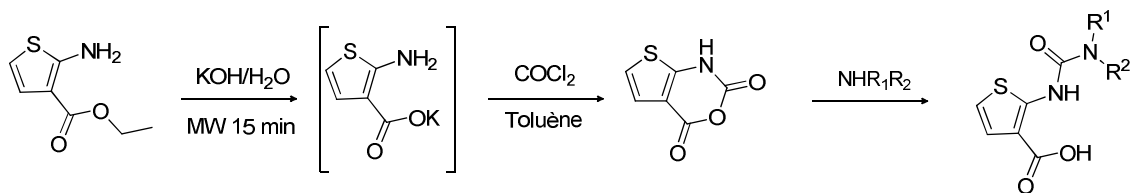


Schéma 5: Synthèse de (3-carboxy-2-uréido) thiophènes

1.2 Généralisation de la voie de synthèse

Cette voie de synthèse peut être adaptée à d'autres cycles thiophène. En effet, la synthèse d'anhydride 2-thioisotique peut être effectuée de la même manière que celle précédemment décrite à partir du 3-amino-2 thiophène carboxylate de méthyle. En raison des réactivités similaires de deux anhydrides thioisotique, l'étape d'ouverture de l'anhydride conduit exclusivement au (2-carboxy-3-uréido) thiophène attendue (*Schéma 6*).

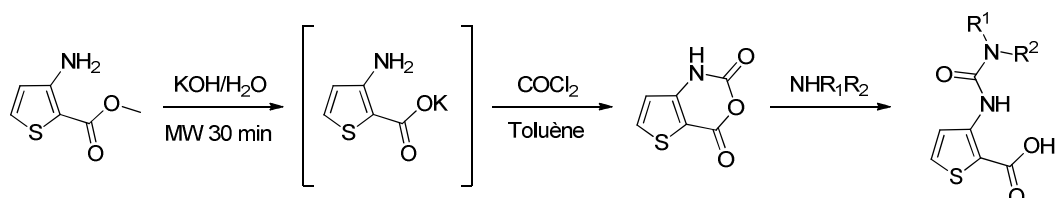


Schéma 6 : Synthèse de (2-carboxy-3-uréido) thiophènes

Par la suite, S. Rault et son équipe ont montré que cette voie de synthèse pouvait également être adaptée à des (2-carboxy-3-amino) thiophènes substitués par des groupements aromatiques en position 4 ou 5 (*Schéma 7*).¹³⁷

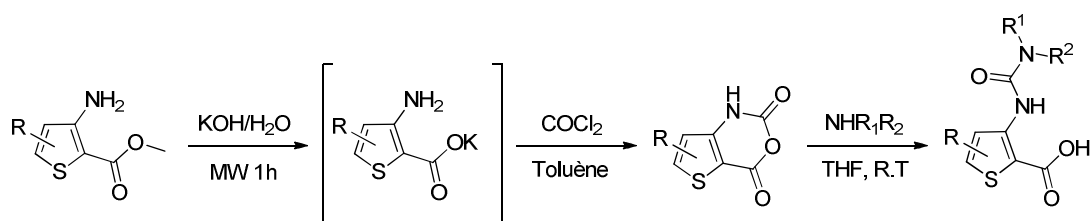


Schéma 7: Synthèse de (2-carboxy-3-uréido) thiophènes substitués en position 4 ou 5 par un groupement aromatique

Bien que cette voie de synthèse soit généralisable à différents cycles thiophènes et différents nucléophiles, une limitation subsiste. Dans le cas particulier d'utilisation d'acides aminés comme nucléophiles, la régiosélectivité de l'ouverture de l'anhydride thioisotique (dérivant de (3-carboxy-2-

¹³⁷ F. X. Le Foulon, E. Braud, F. Fabis, J. C. Lancelot and S. Rault, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 10051–10057

amino) thiophènes ou de (2-carboxy-3-amino) thiophènes) n'est pas aussi exclusive. En effet, il a été montré que la régiosélectivité de l'addition nucléophile de l'acide aminé est dépendante des conditions réactionnelles (solvant, pH, température).¹³⁸

En milieu basique (protique ou aprotique), la réaction d'ouverture se fait préférentiellement sur le carbonyle C2 pour conduire au motif urée. Ce résultat pourrait être expliqué par le passage par un isocyanate. En revanche, à pH neutre, dans un solvant protique, l'addition est favorisée sur le carbonyle C4 pour fournir le produit amide. Ce résultat peut quant à lui être expliqué par l'existence d'une forme tautomère qui modifie l'électrophilie du carbonyle et ainsi dirige l'addition (Schéma 8).

Cette réactivité particulière en présence d'acides aminés a été très étudiée par le Pr. V. Lisowski sur des anhydrides dérivants de (2-carboxy-3-amino) thiophènes.^{139,140}

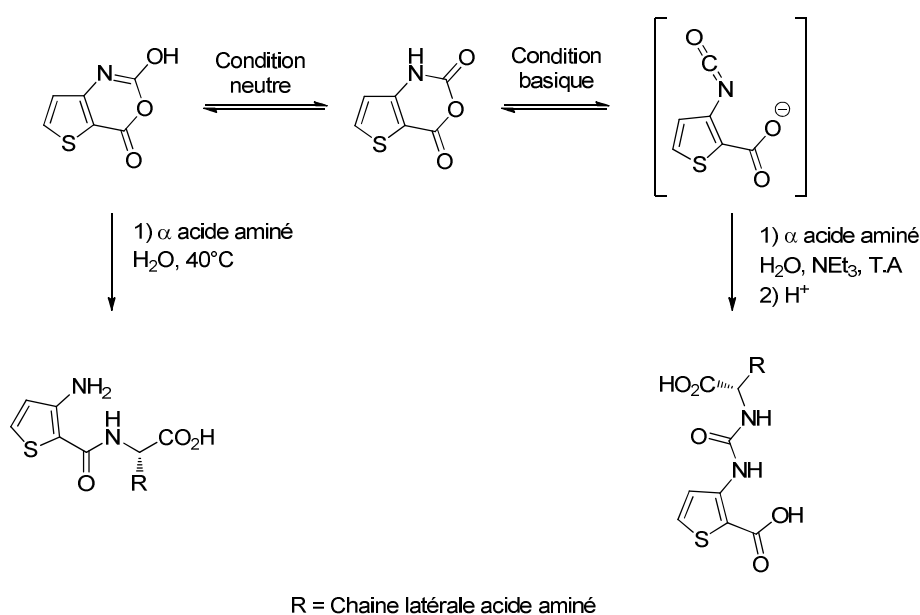


Schéma 8: Réactivité des anhydrides thiaisaitiques en présence d'acides aminés

1.3 Optimisation des conditions réactionnelles et « méthode de parallélisation »

Les étapes de traitement et purification étant un frein à la mise en place d'approche combinatoire en solution, S. Rault et son équipe ont développé une méthode dite « de parallélisation » permettant de simplifier les conditions réactionnelles et ainsi limiter les phases de purification.^{137, 141}

Les deux premières étapes de synthèse ne nécessitant pas d'étapes de purification, les auteurs se sont concentrés sur l'étape d'ouverture de l'anhydride thiaisaitique. La fonctionnalisation des

¹³⁸ Y. Brouillette, J. Martinez and V. Lisowski, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3487–3503

¹³⁹ Y. Brouillette, V. Lisowski, P. Fulcrand and J. Martinez, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 2662-2665

¹⁴⁰ Y. Brouillette, P. Verdié, J. Martinez, V. Lisowski, *Synlett*, **2008**, 15, 2360–2364

¹⁴¹ F. X. Le Foulon, E. Braud, F. Fabis, J. C. Lancelot and S. Rault, *J. Comb. Chem.* **2005**, 7, 253-257

uréido-carboxy-thiophènes ainsi que la réactivité des anhydrides avec les amines leur ont permis d'utiliser une stratégie basée sur la solubilité de leur composés en milieu acide et basique pour obtenir leurs composés sans les purifier par chromatographie.

Dans ces conditions, une suspension dans l'eau d'anhydride thiaisatoïque est mise à réagir avec un excès d'amine (2,2 équivalents) et conduit au composé uréido-carboxy-thiophène sous forme de sel d'ammonium hydrosoluble. Le passage d'une suspension à une solution limpide permet de suivre la réaction et donc d'éviter d'utiliser des techniques de suivi de type CCM ou RMN.

L'acidification du milieu réactionnel permet ensuite d'obtenir le composé uréido-carboxy-thiophène sous forme de précipité. Enfin une dernière étape de lavage à l'eau permet d'éliminer l'excès d'amine et d'obtenir le composé souhaité (*Schéma 9*).

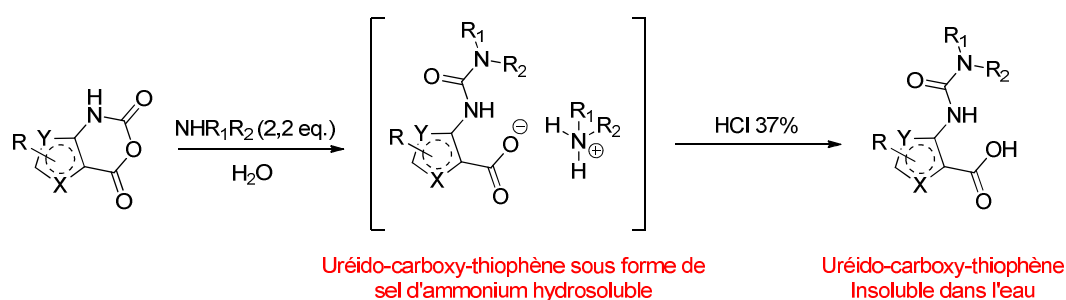


Schéma 9: « Méthode de parallélisation » : optimisation des conditions réactionnelles

Cette technique, adaptable à un procédé d'approche combinatoire en solution, a ainsi permis à S. Rault et son équipe de synthétiser une librairie de composés de type carboxy-uréido-thiophènes avec de bons rendements et des puretés estimées par RMN supérieures à 85%.

2. Développement d'une nouvelle voie de synthèse pour le sr 4321 et la synthèse d'analogues

Bien qu'efficace, la voie de synthèse développée au CERMN regroupe un certain nombre d'inconvénients :

D'un point de vue pratique, cette stratégie est dépendante de l'utilisation du phosgène qui est un gaz toxique et se réalise sous activation micro-onde ce qui implique une installation particulière.

De plus, ce schéma de synthèse est peu modulable et semble se limiter au thiophène puisque un changement de cycle peut conduire à des problèmes de régiochimie lors de l'étape d'ouverture de l'anhydride (exemple du phényle, *cf. schéma 2*).

Enfin, bien que la méthode de parallélisation permette d'accéder rapidement à de nombreux composés, cette technique ne permet pas d'obtenir les produits attendus avec une pureté optimale (pureté de l'ordre de 85%).

Au vu de ces différents constats, cette voie de synthèse ne semblait pas adaptée pour le développement de nouveaux analogues du composé sr 4321 destinés à être testés sur cellules ou dans le meilleur des cas sur animaux.

Une voie de synthèse, alternative à celle développée par le CERMN, a donc été mise au point au laboratoire. Cette stratégie, présentant les qualités requises pour réaliser une étude de Relation Structure Activité, est une méthode modulable de synthèse d'urées dissymétriques qui permet d'introduire rapidement des pharmacomodulations et d'obtenir les produits souhaités avec une pureté satisfaisante (> 98 %).

Cette voie de synthèse se réalise en trois étapes et utilise un carbamate activé ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation du phosgène ou triphosgène (*Schéma 10*). Une première étape consiste donc, à faire réagir de façon équimolaire un aminoester choisi avec du chloroformate de phényle dans le THF à température ambiante. Cette étape est réalisée en absence de base afin d'éviter le départ du groupement phénolate du motif carbamate. Une fois l'atome de chlore substitué par la fonction amine, le carbamate obtenu est mis en présence d'un léger excès d'amine, au reflux du chloroforme, pour former l'urée correspondante. Enfin, une dernière étape de saponification, en présence d'une solution de KOH 1M au reflux du méthanol, permet d'obtenir le composé final. Il est intéressant de noter que, contrairement aux esters méthyliques ou éthyliques classiques, cette réaction d'hydrolyse nécessite d'être réalisée à température élevée. En effet, à température ambiante, le produit attendu n'est pas formé. Ces différentes étapes, incluant celle de formation du carbamate, conduisent généralement à l'obtention des produits souhaités avec de bons à très bons rendements.

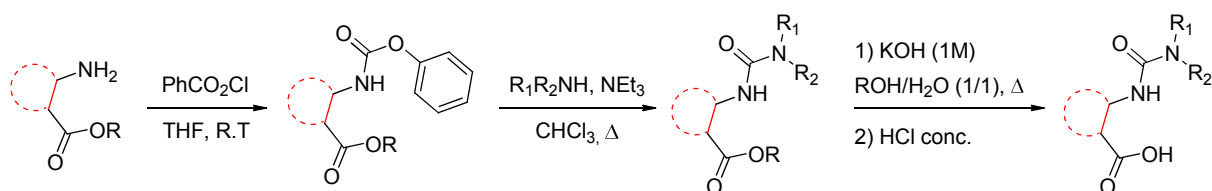


Schéma 10: Nouvelle voie de synthèse développée au laboratoire

Ce schéma réactionnel peut donc être adapté à différents hétérocycles tout en conservant la régiochimie désirée. De plus la stabilité de l'intermédiaire carbamate permet de le synthétiser à l'échelle du gramme et ainsi de pouvoir réaliser de nombreuses pharmacomodulations sans avoir à repartir du réactif aminoester de départ. Enfin, dans cette voie, la réaction de saponification correspond à la dernière étape, ce qui présente comme avantage d'obtenir les intermédiaires sous forme ester, donc plus facilement manipulables (traitement et purification). Ceci permet également de pouvoir obtenir l'ensemble des composés à la fois sous forme d'ester et d'acide sans multiplier le nombre d'étape (cela dans le but de confirmer l'importance de la fonction acide carboxylique pour l'activité biologique).

3. Limitations de la voie de synthèse et étude méthodologique: thienopyrimidinedione vs acide carboxylique

Afin de valider notre stratégie de synthèse, différents composés ont été synthétisés en faisant varier la nature de l'hétérocycle et de l'amine. Les premiers essais ont été effectués en conservant le cycle (3-carboxy-2-amino) thiophène de référence mais en réalisant la réaction de substitution du phénolate par différentes amines primaires et secondaires.

Au cours de ces essais, une limitation à cette voie de synthèse est vite apparue. En effet, lorsque la réaction d'hydrolyse est réalisée sur des composés urée substitués par une amine primaire, nous avons observé dans certains cas la formation de thienopyrimidinedione (*Schéma 11*).

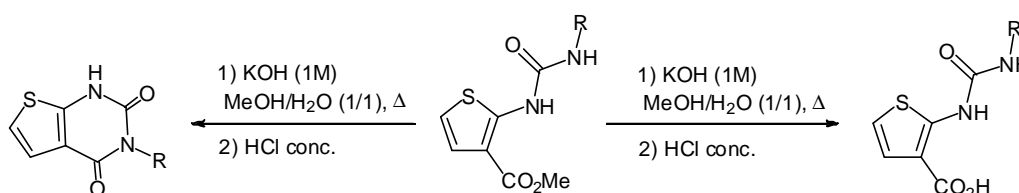


Schéma 11: Formation possible de thienopyrimidinedione lors de la réaction d'hydrolyse de la fonction ester

Il est effectivement décrit dans la littérature que ces composés ou autres analogues peuvent être synthétisés à partir de dérivés (3-carboxy-2-uréido). Suite à cette constatation et en raison de leurs activités biologiques intéressantes, nous nous sommes intéressés aux thienopyrimidinediones.^{142,143,144}

3.1 Mécanisme envisagé

La formation des thienopyrimidinediones résulte d'une réaction de cyclisation non désirée des (3-carboxy-2-uréido) thiophènes en présence d'une base. Dans notre cas, la réaction d'hydrolyse étant réalisée en milieu basique (KOH 1M), il ne paraît donc pas anormal que cette réaction de cyclisation ait lieu.

Le mécanisme envisagé pour cette réaction de cyclisation est présenté dans le schéma 12. Dans un premier temps, l'ion hydroxyle pourrait déprotonner l'azote en α du cycle aromatique. Suite à la délocalisation des électrons du groupe urée, le deuxième azote serait alors déprotoné et chargé négativement. Cet azote pourrait donc ensuite s'additionner sur le carbonyle de la fonction ester, et par réaction d'addition-élimination former le produit pyrimidinedione.

¹⁴² S. D. Guile, J. R. Bantick, M. E. Cooper, D. K. Donald, C. Eyssade, A. H. Ingall, R. J. Lewis, B. P. Martin, R. T. Mohammed, T. J. Potter, R. H. Reynolds, S. A. St-Gallay and A. D. Wright, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 254-263

¹⁴³ K. Miwa, T. Hitaka, T. Imada, S. Sasaki, M. Yoshimatsu, M. Kusaka, A. Tanaka, D. Nakata, S. Furuya, S. Endo, K. Hamamura and T. Kitazaki, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4998-5012

¹⁴⁴ R. Venskutonyte, S. Butini, S. S. Coccone, S. Gemma, M. Brindisi, V. Kumar, E. Guarino, S. Maramai, S. Valenti, A. Amir, E. Anton Valades, K. Frydenvang, J. S. Kastrop, E. Novellino, G. Campiani and D. S. Pickering, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4793-4805

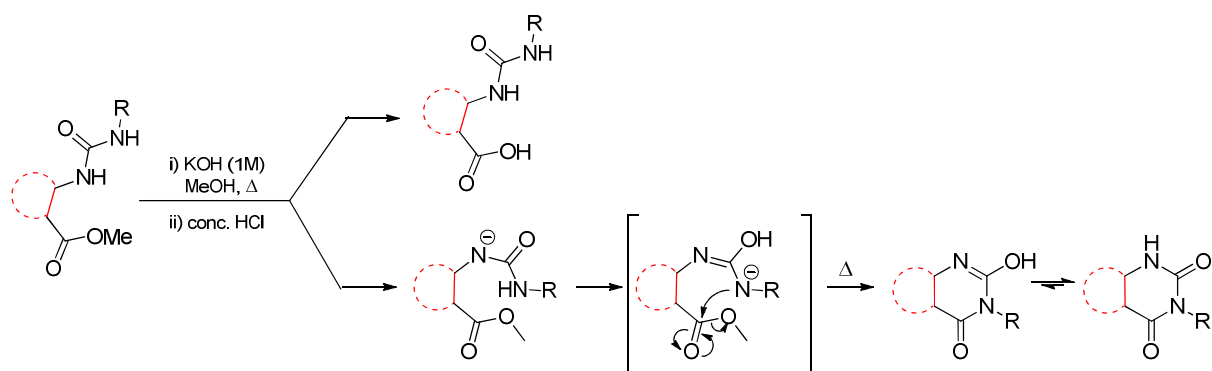


Schéma 12: Mécanisme envisagé de formation de pyrimidinedione

Suite à ces observations et constatations, nous avons réalisé une étude méthodologique afin de déterminer les facteurs qui influencent cette réaction de cyclisation. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la nature des substituants du motif urée (amine primaire ou secondaire) ainsi qu'à la nature du cycle aromatique.

Cette partie de mon travail de thèse ayant fait l'objet d'une publication (*Synthesis* **2013**, 45, 479-490), seuls quelques exemples sont présentés dans ce chapitre afin de résumer cette étude méthodologique. L'ensemble détaillé des résultats de cette étude méthodologique est présenté dans l'article 2.

3.2 Série (3-carboxy-2-uréido) thiophène

Les premières études ont été réalisées en série (3-carboxy-2-uréido) thiophène. Nous avons ainsi observé que l'encombrement du groupement R issu de l'amine influence le ratio acide carboxylique/thienopyrimidinedione (*Schéma 13*).

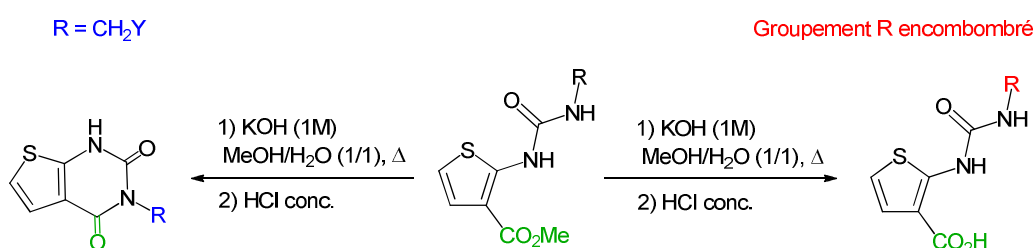
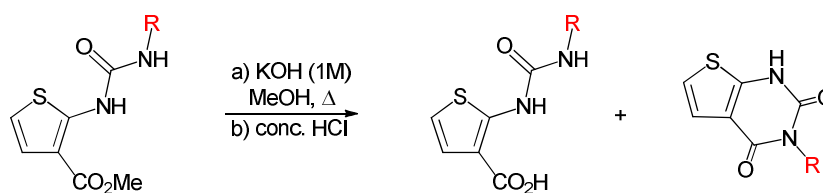


Schéma 13: Influence du groupement R sur le ratio acide carboxylique/thienopyrimidinedione

En effet, des groupements R très volumineux (tels que tBu ou 2-ethylpropyl) conduisent exclusivement à la formation d'acides tandis que des groupements dits « linéaires » (CH₂ lié à l'azote) favorisent la réaction de cyclisation conduisant ainsi à la formation de thienopyrimidinedione. Il est également intéressant de noter que des groupements de taille et volume intermédiaires conduisent à des mélanges de produits.

Un exemple particulièrement explicite de l'influence de l'encombrement du groupement R sur le ratio acide/thienopyrimidinedione a été mis en évidence dans le cas de dérivés cycliques saturés (Tableau 3). En effet, plus la taille du cycle augmente plus on défavorise la réaction de cyclisation.



Groupement R	Rapport acide/thienopyrimidinedione
Cyclohexyle	100/0
Cyclopentyle	85/15
Cyclobutyle	45/55
Cyclopropyle	0/100

Tableau 3: Influence de l'encombrement du groupement R sur le ratio acide/thienopyrimidinedione

Parmi les différents exemples synthétisés pour cette étude, le cas du groupement R de type phényle fait exception. En dépit de son encombrement stérique équivalent à un cyclohexyle, on observe exclusivement la formation de thienopyrimidinedione. Ce résultat peut être expliqué par la stabilisation de la charge négative par le phényle (mésomérie).

3.3 Variation de la nature de l'hétérocycle

Afin de compléter cette étude, différents hétérocycles ont été considérés. Nous avons utilisé trois thiophènes différant par la position de l'atome de soufre dans le cycle ainsi qu'un composé de type benzène.

Etendu à ces différents cycles, l'encombrement stérique ne semble plus être le seul facteur déterminant. En effet, bien que des groupements très volumineux tels que -tBu conduisent exclusivement à la formation d'acides tandis que des groupements dits « linéaires » induisent la formation de thienopyrimidinediones, d'autres effets influent sur la proportion entre acide carboxylique et thienopyrimidinedione.

De façon intéressante, pour les différentes séries de thiophènes, la position relative de l'atome de soufre dans le cycle a une forte influence sur la réaction de cyclisation.

Cet effet est très bien représenté dans le cas du groupement R cyclique de type cyclobutyle. Les proportions des différents produits obtenus avec les trois cycles thiophènes sont indiquées dans le tableau 4.

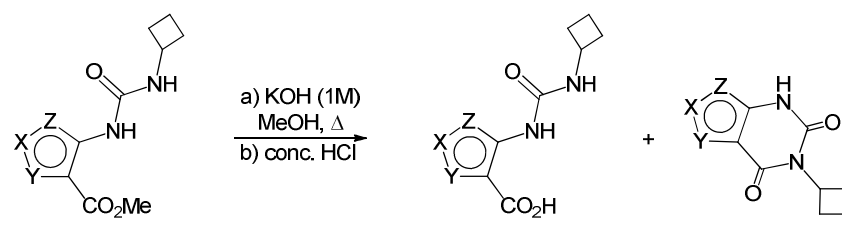
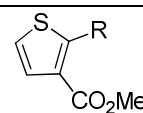
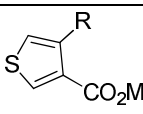
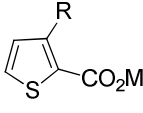
		
Thiophène		Rapport acide/thienopyrimidinedione
	A (3-carboxy-2-uéido) thiophène	45/55
	B (4-carboxy-3-uréido) thiophène	100/0
	C (2-carboxy 3-uréido) thiophène	28/72

Tableau 4: Influence de la position relative de l'atome de soufre dans le cycle sur le ratio acide/thienopyrimidinedione. **A** : Z=S et X=Y=H ; **B** : X=S et Z=Y=H ; **C** : Y=S et X=Z=H

L'effet inductif attracteur de l'atome de soufre ne permet pas d'expliquer complètement la différence de réactivité de ces trois thiophènes. En effet, bien que la différence de réactivité entre le (3-carboxy-2-uréido) thiophène **A** et le (2-carboxy 3-uréido) thiophène **C** puisse être corrélée à l'importance de l'effet attracteur du soufre, cela ne permet pas de justifier le résultat obtenu pour le (4-carboxy-3-uréido) thiophène **B**.

Suite à cette constatation, nous avons alors cherché à comprendre quelle pouvait être la raison de cette différence de réactivité. De nombreuses études et données cristallographiques ont mis en évidence l'existence d'une interaction non liante entre des atomes de soufre et d'oxygène (ou d'azote). En effet, dans ces structures cristallographiques, la distance interatomique de ces atomes S...O (ou S...N) est significativement plus petite que la somme des rayons de Van der Waals (3,32 ou 3,35 Å). Ces interactions sont classées en différentes catégories en fonction de la taille du pseudo cycle formé lors de l'interaction (*Figure 27*).^{145,146}

¹⁴⁵ Y. Nagao, T. Hirata, S. Goto, S. Sano, A. Kakehi, K. Iizuka and M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3104-3110

¹⁴⁶ M. Iwaoka, S. Takemoto and S. Tomoda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10613-10620

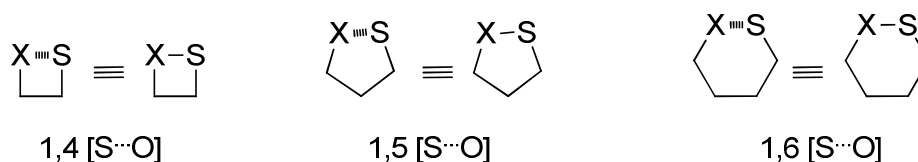


Figure 27: Interaction S...O

Ce type d'interaction non liante est de plus en plus décrit notamment dans les dérivés de type thiophènes et thiazoles.^{147,148,145,149} Dans notre cas, on peut observer deux types d'interactions S...O : Des interactions de type [1,4] et [1,5] S...O.

Au vu de ces constatations, le facteur principal permettant d'expliquer ces résultats semble être la présence d'interactions non liante de type S...O.

Dans le cas du (2-carboxy 3-uréido) thiophène **C**, on peut envisager la présence d'une interaction de type [1,4] S...O entre l'atome de soufre et celui d'oxygène du carbonyle de l'ester (Figure 28-A). Cette interaction pourrait favoriser la réaction de cyclisation en renforçant le caractère électrophile du carbonyle ou bien encore en facilitant la rotation de l'ester permettant ainsi d'atteindre l'angle de Bürgi-Dunitz favorable à l'addition de nucléophiles.

Au contraire, dans le cas du (3-carboxy-2-uréido) thiophène **A**, on peut envisager la présence d'une interaction de type [1,5] S...O entre le soufre et l'atome d'oxygène du carbonyle du motif urée (Figure 28-B). Dans ce cas, la déprotonation de l'azote induirait la présence d'une charge négative sur l'atome d'azote susceptible de détériorer cette interaction [1,5] S...O. Cette déstabilisation pourrait favoriser la rotation du motif urée, permettre l'addition de l'azote sur le carbonyle de l'ester et ainsi induire la formation du composé thienopyrimidinedione.

Enfin, dans le cas du (4-carboxy-3-uréido) thiophène **B**, la position de l'atome de soufre ne permet pas d'envisager d'interaction S...O (Figure 28-C). Il est admis que les urées adoptent préférentiellement une conformation de type *trans-trans*. Par conséquent, on peut envisager qu'en l'absence d'interactions supplémentaires de type S...O, l'énergie de rotation de ce motif soit trop importante et ne permette donc pas l'addition de l'azote de l'urée sur le carbonyle de l'ester pour former le composé bicyclique. Ceci pourrait expliquer la formation exclusive d'acide carboxylique dans le cas du (4-carboxy-3-uréido) thiophène **B**.

¹⁴⁷ H. Huang, Z. Chen, R. P. Ortiz, C. Newman, H. Usta, S. Lou, J. Youn, Y.-Y. Noh, K.-J. Baeg, L. X. Chen, A. Facchetti and T. Marks, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10966–10973

¹⁴⁸ F. T. Burling and B. M. Goldstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2313-2320

¹⁴⁹ R. Tanaka, Y. Oyama, S. Imajo, S. Matsuki and M. Ishiguro, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1389-1399

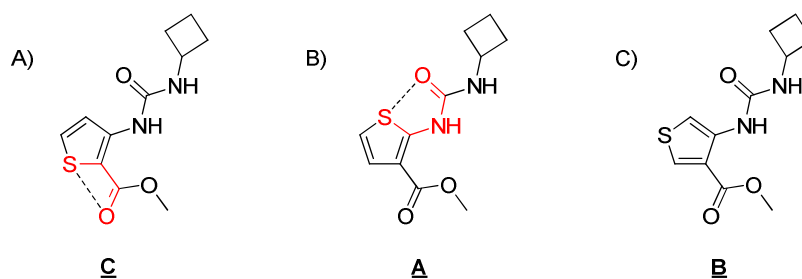


Figure 28: Structure des trois composés thiophènes et représentation de l'interaction S...O

3.4 Réaction d'hydrolyse enzymatique

Suite à cette étude et afin de ne pas être limité dans notre choix de molécules pour développer de nouveaux analogues du composé sr 4321, une réaction d'hydrolyse enzymatique a été mise au point au laboratoire (collaboration Dr. R. Labruère). Il a ainsi été montré que, dans un mélange PBS/DMSO (9/1), l'enzyme Pig Liver Esterase (PLE) était capable d'hydrolyser la fonction ester méthylique de nos composé carboxy uréido thiophènes. Cette réaction semble toutefois limitée à des composés présentant des groupements R simples et pouvant être reconnus par l'enzyme.

3.5 Conclusion de l'étude méthodologique

En conclusion, aux travers des différents exemples présentés dans cette partie ainsi que dans la publication, nous avons pu montrer le contrôle stérique et électronique de cette réaction d'hydrolyse et ainsi déterminer quelques règles nous permettant de prédire l'obtention sélective de l'acide ou du produit bi-cyclique de type pyrimidinedione.

III. Synthèse et étude du composé sr 4321

1. Nouvelle synthèse au laboratoire et évaluation de l'activité du composé sr 4321

Le composé sr 4321 a été synthétisé selon le schéma réactionnel décrit précédemment. La première étape a donc consisté à faire réagir de façon équimolaire le 2-amino-3 thiophène carboxylate de méthyle (commercial) avec du chloroformate de phényle dans le THF à température ambiante. Après 28h de réaction, le thiophène porteur du motif carbamate **1** a été mis en présence d'un léger excès de N-éthyl benzylamine, au reflux du chloroforme, pour former l'uréidothiophène correspondant **2**. L'hydrolyse de la fonction ester en milieu basique (KOH 1M) a ensuite permis d'obtenir le produit sous forme acide **3** (Schéma 14).

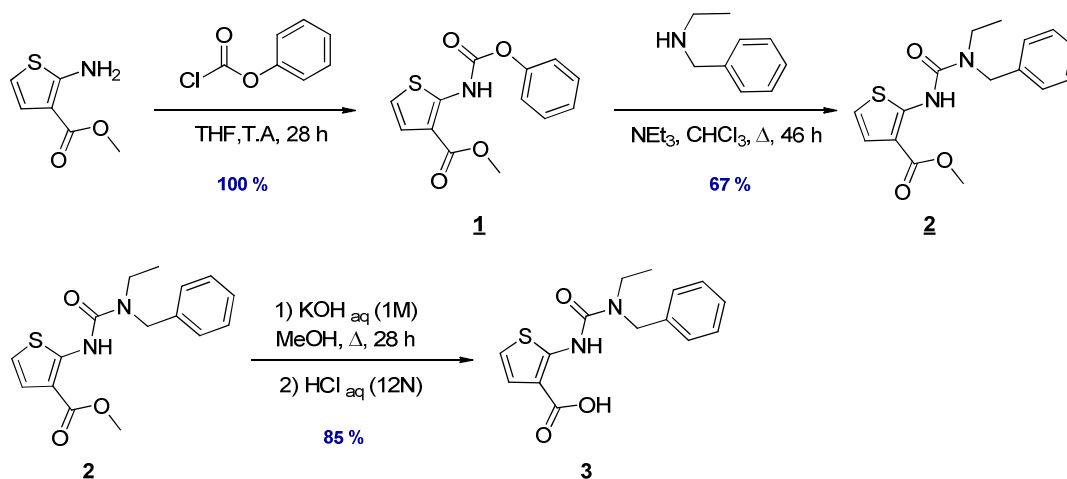


Schéma 14: Synthèse du composé sr 4321

Ce composé sr 4321 (**3**) a ainsi pu être synthétisé, à l'échelle du gramme, avec un rendement de 57 % sur les trois étapes et avec une pureté supérieure à 95%. Une fois synthétisé, l'activité de ce composé **3** a été évaluée sur le test de déplacement VEGFR1-ECD (Figure 29).

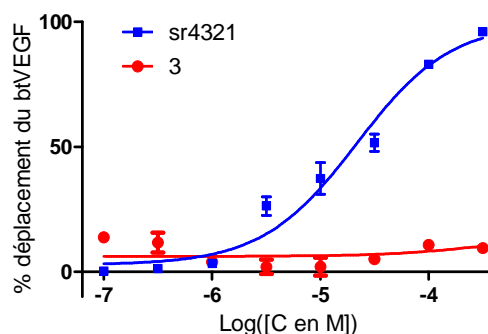


Figure 29: Activité des deux lots de composé sr 4321 sur le test de déplacement VEGFR1-ECD

Cependant, testé dans les mêmes conditions que le composé du CERMN, la molécule **3** synthétisée au laboratoire s'est révélée inactive sur ce test.

2. Analyse comparative des deux lots de composés

Suite aux résultats obtenus sur le test ELISA, une analyse comparative de ces deux lots de composé a été entreprise afin d'essayer d'identifier la cause de cette différence d'activité.

2.1 Caractérisation des deux lots de sr 4321 et observation d'impuretés dans celui du CERMN

De façon préliminaire, l'analyse visuelle de ces deux lots de composé est très différente. En effet, tandis que notre lot de composé apparaît sous forme d'une poudre blanche, la molécule du CERMN est une poudre de couleur foncée (gris-vert).

2.1.1 Analyses des deux lots de composé

- Analyse par RMN

En collaboration avec l'équipe du Dr. S. Bouaziz (UMR 8015, Université Paris Descartes), nous avons analysé ces deux lots de composés par RMN, sur un appareil 600MHz équipé d'une sonde cryogénique, dans l'eau en présence de 5 % de DMSO pour une meilleure solubilité.

La structure chimique du composé sr 4321 étant relativement simple, les protons sont facilement identifiés et attribués (*Figure 30*). La comparaison des spectres ^1H , nous a permis de conclure que le composé **3** synthétisé au laboratoire est plus pur que celui du CERMN. En effet, sur le spectre du composé provenant de la chimiothèque du CERMN, nous avons mis en évidence la présence de plusieurs pics provenant d'impuretés organiques, d'une part dans la zone des protons aliphatiques ($\sim 1,1$ ppm) et d'autre part dans la région des protons aromatiques ($\sim 7,4$ ppm).

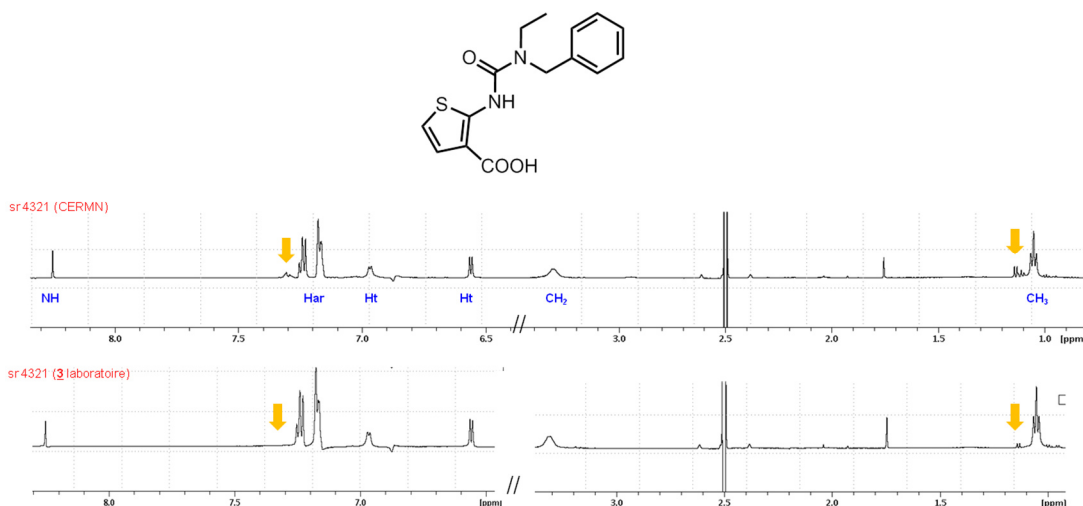


Figure 30: Spectre RMN ^1H des deux lots de composés

Suite à cette constatation et dans le but de déterminer la structure de ces impuretés, l'analyse du composé sr 4321 du CERMN a été approfondie.

L'intégration des pics de la région aliphatique a permis de quantifier le taux d'impureté présent dans cet échantillon. Nous avons ainsi montré que le composé du CERMN était pur à 78 % seulement (Figure 31).

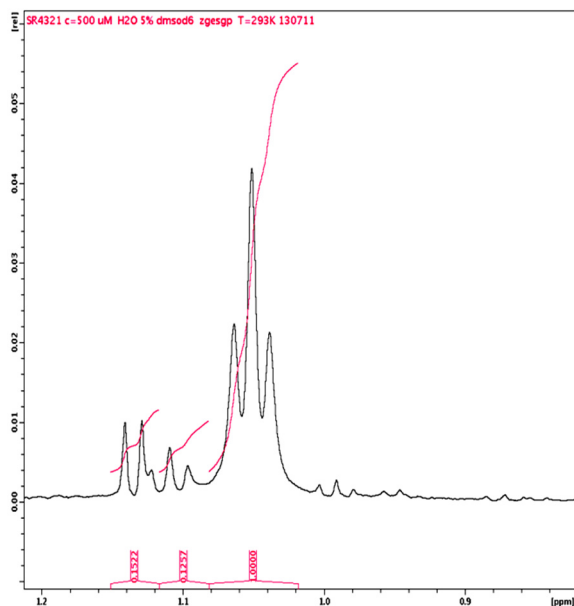


Figure 31: Agrandissement spectre ^1H et intégration

L'analyse TOCSY de ce composé a ensuite permis de mettre en évidence qu'il s'agissait a priori de plusieurs impuretés distinctes. En effet, comme nous pouvons l'observer sur le spectre TOCSY (Figure 32), les deux pics d'impuretés représentés sur la figure 31 ont des systèmes de spin différents.

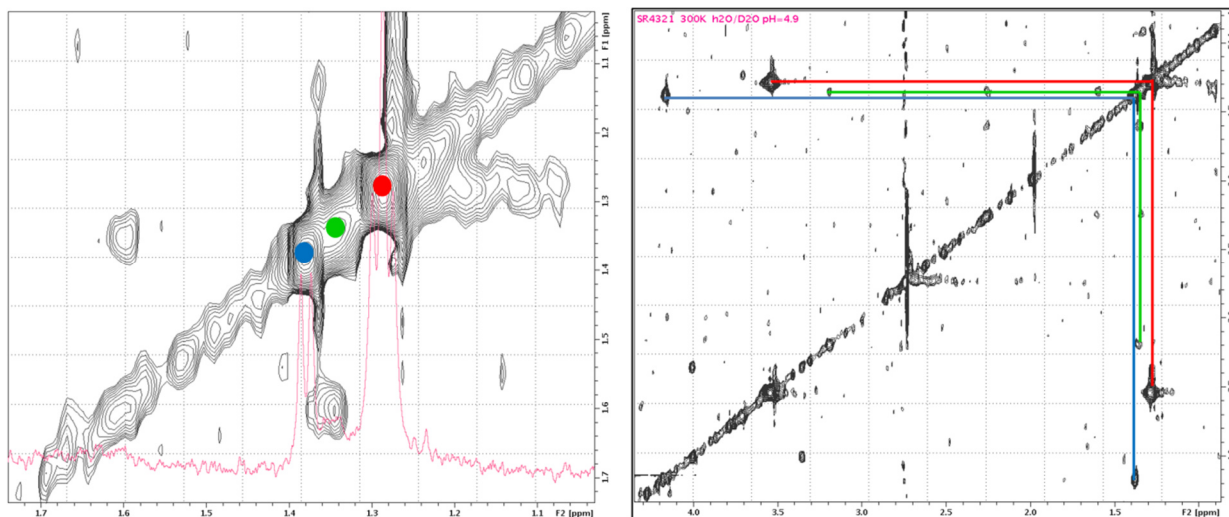


Figure 32: Spectre TOCSY du composé sr 4321 du CERMN

Bien que l'analyse RMN ait mis en évidence des différences significatives de pureté entre ces deux lots de composés, cette étude n'a cependant pas permis de déterminer la nature et la structure des impuretés présentes dans le lot de composé du CERMN.

- Analyse par spectrométrie de masse

Suite à ces résultats et toujours dans le but de comparer les deux lots de composés, ces deux molécules ont été analysées par spectrométrie de masse (ESI +). Cependant, cela n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives. Par conséquent, cette méthode n'a également pas apporté d'informations pour élucider la structure des impuretés présentes dans le lot provenant du CERMN.

- Analyse par HPLC

Dans le but de comparer ces deux lots de composés mais également d'isoler les pics correspondant aux impuretés, les deux échantillons ont ensuite été analysés par HPLC sur un gradient 10-90 % solvant B (70 % MeCN, 30 % H₂O) en 30 minutes. Cependant, les deux chromatogrammes se sont avérés comparables. Analysé à 214 et 254 nm, nous n'avons observé qu'un pic unique à 24,2 minutes pour les deux lots. Une co-injection nous a permis de confirmer que ce pic correspondait au produit synthétisé.

- Analyse par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Toujours dans le but de caractériser les deux lots de sr 4321, l'analyse des formes solides de ces deux échantillons a été initiée en collaboration avec le Dr. Yohann Corvis et le Dr. Philippe Espeau (UTCBS, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques, Université Paris Descartes).

Ces deux lots de composés ont dans un premier temps été analysés par calorimétrie différentielle à balayage. Cette technique permet de déterminer une variation d'énergie et donc un changement d'état (Solide/Liquide) lors d'une variation de température. Cette analyse nous a ainsi permis de mettre en évidence que les deux lots de composés avaient des températures de fusion différentes. En effet, pour le composé du CERMN, nous avons déterminé un point de fusion de 174°C, tandis que pour la molécule **3** (synthétisée au laboratoire), nous avons obtenu 181°C. Au vu des thermogrammes, cet abaissement de la température de fusion pour le composé du CERMN pourrait être expliqué par la présence d'impureté dans l'échantillon ou par un polymorphisme différent plus instable.

- Structure RX sur poudre

Suite aux résultats de DSC, l'analyse des formes solides de ces deux échantillons a été approfondie. La détermination de la structure cristalline sur monocristal n'étant pas possible en raison du peu quantité de composé fournit par le CERMN, l'analyse de la structure des deux lots de composé a été effectuée par diffraction sur poudre toujours en collaboration avec le Dr. Yohann Corvis. Cette méthode, peu consommatrice et non destructive, présente l'avantage d'être utilisée sans préparation préalable de l'échantillon et permet ainsi d'identifier des polymorphismes qui pourraient ne pas être mis en évidence dans le cas de préparation de monocristaux. D'un point de vue général, cette analyse a mis en évidence une meilleure cristallinité du composé **3** synthétisé au laboratoire. De plus, bien que la résolution de la structure de ces composés ne soit pas possible à partir des spectres obtenus (problème de sensibilité de l'appareil), l'analyse du profil et de la position des raies de diffraction nous a permis de mettre en évidence des différences entre les deux lots de composés (Figure 33).

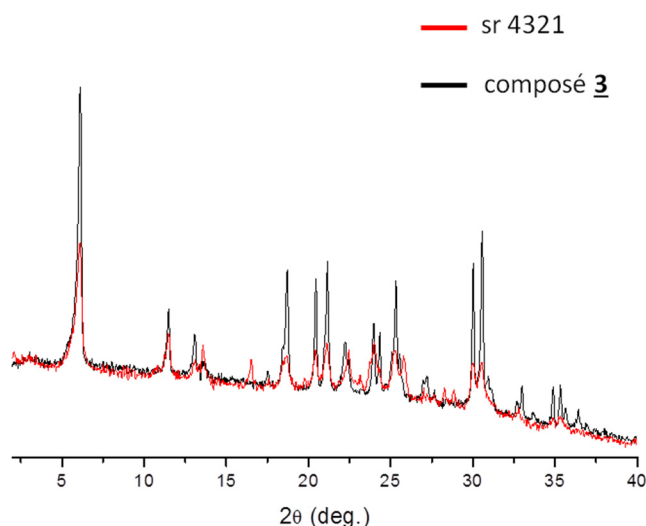


Figure 33 : Superposition des profils des raies de diffraction des composés sr 4321 et **3** obtenus par structure RX sur poudre. Ces deux profils sont normalisés en intensité.

En effet, bien que les différences soient faibles on peut observer un décalage ou dans certains cas une extinction de quelques pics de Bragg. Ces différences peuvent traduire un empilement cristallin différent. Par analogie avec les résultats obtenus par DSC, cette différence de la maille cristalline pourrait être due à la présence d'impureté ou à des différences de conformation de la molécule (induites ou non par la présence d'impureté). Afin de répondre à cette question et de conclure sur ces différences à l'état solide, une perspective envisagée est de résoudre la structure sur poudre de ces deux lots de composé.

En conclusion, bien qu'il s'agisse de données préliminaires et que ces résultats ne puissent pas forcément être transposés en solution, ces dernières analyses ont permis de mettre en évidence des différences entre nos deux lots d'échantillon sous forme solide.

2.1.2 Conclusion sur cette première série d'analyse

La découverte d'impuretés dans le lot de composé sr 4321 provenant du CERMN semble en accord avec les travaux de S. Rault.¹⁴¹ En effet, avec leur méthode dite de « parallélisation », S. Rault et son équipe décrivent obtenir rapidement et sans étapes de purification des composés avec des puretés de l'ordre de 85 %. Dans notre cas, le taux d'impureté mesuré par RMN (~ 22 %) est cependant plus important que celui décrit pour le composé sr 4321.

Suite à cette constatation et n'ayant pu déterminer la structure des impuretés organiques, nous proposons plusieurs hypothèses sur leur nature, en nous basant sur la voie de synthèse du CERMN (Schéma 5 et 9). Bien qu'il soit décrit que l'ouverture des anhydrides thiasoïque se fait de façon régiosélective, on peut envisager qu'une partie de la N-Ethyl benzylamine s'additionne sur le deuxième carbonyle et forme ainsi de façon minoritaire le produit amide et non plus urée. De plus, on peut également envisager qu'une partie de l'ion ammonium dérivant de la N-Ethyl benzylamine soit piégée lors de l'étape de précipitation et se retrouve donc dans l'échantillon (Figure 34).

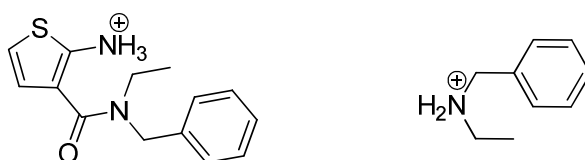


Figure 34: Hypothèses sur la nature des impuretés

2.2 Caractérisation de l'interaction avec le VEGFR1 et mise en évidence de sels dans le composé du CERMN

Suite à cette première série d'analyses et toujours dans le but de comprendre la différence d'activité observée sur le test VEGFR1-ECD, nous nous sommes ensuite intéressés à l'interaction de ces deux lots de composé avec le récepteur.

2.2.1 Caractérisation de l'interaction sr 4321/ VEGFR1-d2 par Water LOGSY

- Généralités sur la méthode WaterLOGSY

Depuis quelques années, différentes méthodes de RMN ont été mises au point pour cribler, identifier de nouveaux ligands ou bien encore caractériser une interaction protéine/ligand. Parmi les méthodes existantes, la technique de WaterLOGSY (« Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy ») est de plus en plus utilisée et apparaît comme une méthode de choix pour identifier une interaction.

Cette approche est basée sur le transfert de magnétisation des molécules d'eau d'un complexe protéine/ligand vers un ligand libre. Cela permet donc d'identifier des molécules capables d'interagir avec une protéine cible via le réseau des molécules d'eau (Figure 35).

Les molécules d'eau jouent un rôle pivot dans les interactions protéine/ligand. Par conséquent, le large nombre de molécules d'eau et de protons échangeables impliqués dans ce type d'interaction permet d'expliquer la sensibilité de cette technique.¹⁵⁰

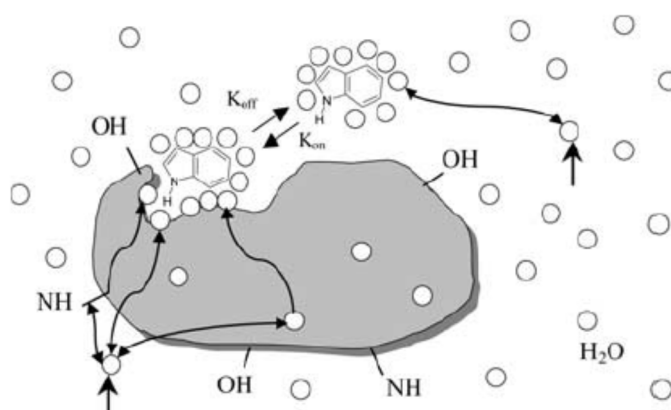


Figure 35 : Principe de la méthode WaterLOGSY¹⁵⁰. Le ligand est représenté à l'état libre et lié à la protéine. L'excitation des molécules d'eau (cercles) est représentée par une flèche simple tandis que le transfert de magnétisation est symbolisé par des doubles flèches.

Bien qu'elle ne donne pas d'informations sur le site de liaison, cette technique présente différents avantages.^{150,151,152} Cette méthode n'est pas limitée par la taille des protéines et ne nécessite ni un marquage par un isotope ni une quantité importante de protéine. De plus, celle-ci permet de discriminer rapidement les molécules libres de celles liées à la cible grâce à leurs signaux RMN. Les résonances des molécules non liées apparaissent sur le spectre RMN avec un signe opposé et généralement plus faible que celles des molécules liées.¹⁵⁰

¹⁵⁰ C. Dalvit, G. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesia and B. Stockman, *Journal of Biomolecular NMR*, **2001**, *21*, 349–359

¹⁵¹ C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tato, M. Veronesi, A. Vulpetti and M. Sundström, *Journal of Biomolecular NMR*, **2000**, *18*, 65-68

¹⁵² C. Dalvit, M. Fasolini, M. Flocco, S. Knapp, P. Pevarello and M. Veronesi, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2610-2614

- Analyse par Water LOGSY des deux lots de composé sr 4321

La méthode de WaterLOGSY permettant de mettre en avant des affinités de l'ordre du micromolaire¹⁵⁰, cette technique avait été utilisée pour vérifier que le composé sr 4321 interagissait avec le domaine d2 du VEGFR1.¹³⁰

Afin de comparer les deux lots de composé sr 4321, le spectre Water LOGSY de la molécule **3** synthétisée au laboratoire a donc été réalisé dans les mêmes conditions (Collaboration équipe du Dr. S. Bouaziz UMR 8015, Université Paris Descartes).

La figure 36 représente les spectres de RMN 1D et WaterLOGSY de ces deux composés en absence du VEGFR1-d2 (A et C) ou en présence de la protéine (B et D). Ces spectres ont été réalisés sur un appareil 600 MHz à 293 K dans un mélange H₂O/ D₂O (90/10) en présence de 5% de DMSO pour solubiliser le composé.

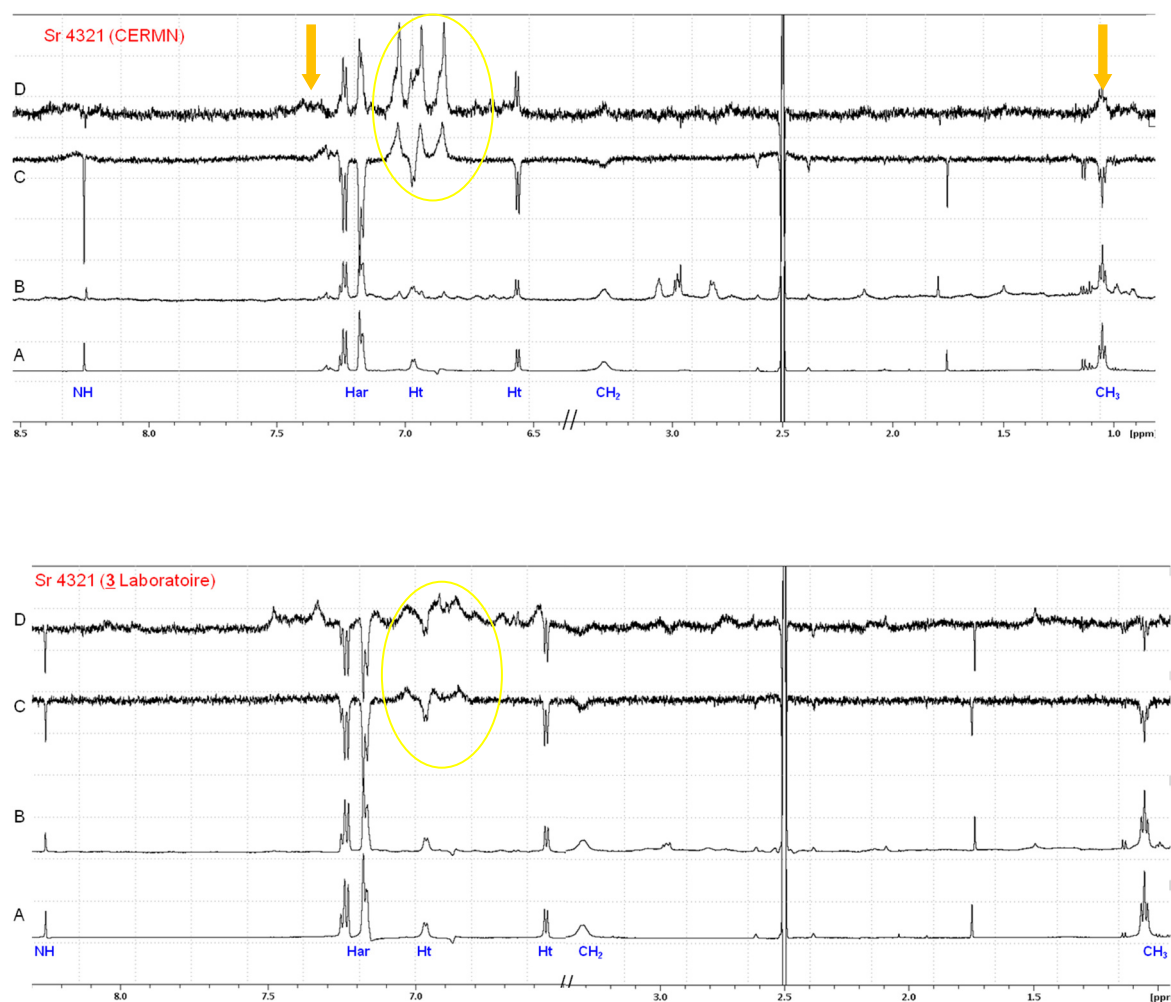


Figure 36 : Comparaison des spectres 1D et Water LOGSY des composés sr 4321 du CERMN (haut) et synthétisé au laboratoire (bas). A : spectre ¹H de la molécule seule, B : spectre ¹H de la molécule en présence du VEGFR1-d2, C : spectre Water LOGSY de la molécule seule, D : spectre Water LOGSY de la molécule en présence du VEGFR1-d2.

D'un point de vue général, la comparaison des spectres Water LOGSY de ces deux lots de composés met en avant de nombreuses différences.

Nous nous sommes tout d'abord intéressé aux signaux correspondant aux protons de la molécule sr 4321. La première constatation que nous avons faite est, qu'en présence de récepteur, les deux lots de composé ne réagissent pas de façon identique.

Sur les spectres Water LOGSY des molécules seules (*Figure 36-C*), ces signaux semblent relativement similaires. Cependant, en présence de récepteur (*Figure 36-D*), l'orientation de ces pics de résonance est différente pour les deux lots de molécules. En effet, contrairement à notre composé, en présence de VEGFR1-d2, on peut noter une inversion du signe des pics du composé sr 4321 du CERMN. L'orientation des signaux étant corrélé au poids moléculaire, cette inversion du signal est généralement caractéristique d'une interaction entre la molécule et le récepteur. Cependant, sans contrôles supplémentaires, on ne peut pas exclure la possibilité que cette inversion soit due à un phénomène d'agrégation.

Cette différence de comportement en présence de VEGFR1-d2 des deux lots de composé peut être corrélée à la différence d'activité observée sur le test de déplacement ELISA. Associé à la mise en évidence d'impureté(s) dans le lot du CERMN, nous pouvons ainsi conclure qu'alors que pur, le composé ne peut se lier au VEGFR1, en présence d'impureté il est capable d'interagir avec celui-ci (ou de s'agréger) et ainsi inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1.

Suite à cette observation, nous avons regardé plus en détail le spectre Water LOGSY du composé sr 4321 du CERMN. Nous nous sommes dans un premier temps concentrés sur les signaux des impuretés identifiés sur le spectre proton (signalés par des flèches orange sur la figure 36). Les pics à 1,1 ppm observés sur le spectre ^1H apparaissent, comme attendu, dans la même phase que les protons de la molécule sur le spectre Water LOGSY de l'échantillon sr 4321 seul. Cette région des pics aliphatiques étant mal définie sur le spectre Water LOGSY de la molécule en présence du récepteur, les pics d'impuretés ne sont pas visibles et il est donc difficile de voir si ces protons entrent en interaction avec le récepteur. De façon inattendue, les signaux des impuretés à 7,3 ppm sont quand à eux opposés aux signaux aromatiques de la molécule sur le spectre Water LOGSY contrôle du composé seul et par conséquent, ne s'inversent pas en présence du récepteur. L'orientation de ces signaux peut être interprétée de plusieurs façons. Par exemple, il pourrait s'agir de protons échangeables et non de protons aromatiques classiques. Cette inversion pourrait également traduire un phénomène d'agrégation. En effet, l'orientation du signal dépend du temps de corrélation qui lui-même est lié au poids moléculaire. Donc un phénomène d'agrégation pourrait conduire à une inversion du signal de l'impureté de façon indépendante à la fixation sur la protéine. Nous nous sommes ensuite intéressés au triplet présent sur le spectre Water LOGSY à 6,95 ppm (cerclé en jaune sur la figure 36). La multiplicité, le déplacement chimique ainsi que l'importante constante de couplage de ces trois larges bandes sont caractéristiques d'un ion ammonium. Au vu des hypothèses faites sur la nature des impuretés organiques, nous nous sommes demandé si ce triplet pourrait correspondre aux impuretés envisagées. Cependant, la structure bien définie de ce triplet ainsi que sa constante de couplage de 52,89 Hz sont caractéristiques d'un ion ammonium symétrique de type NH_4^+ .

La découverte de cet ion ammonium dans le composé du CERMN (ainsi qu'en très faible quantité dans notre échantillon), nous a conduit à envisager que la présence de cet ion pourrait être responsable de l'activité du composé sr 4321 observée sur le test ELISA.

2.2.2 Expérience ELISA

Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons souhaité évaluer l'activité de notre composé en présence d'ion NH_4^+ sur le test VEGFR1-ECD afin de voir si l'activité était ainsi restaurée.

Dans le but de déterminer la quantité d'ion ammonium à ajouter, nous avons regardé par RMN le comportement de la molécule **3** (synthétisée au laboratoire et inactive) en présence d'une quantité croissante de NH_4OH (Figure 37).

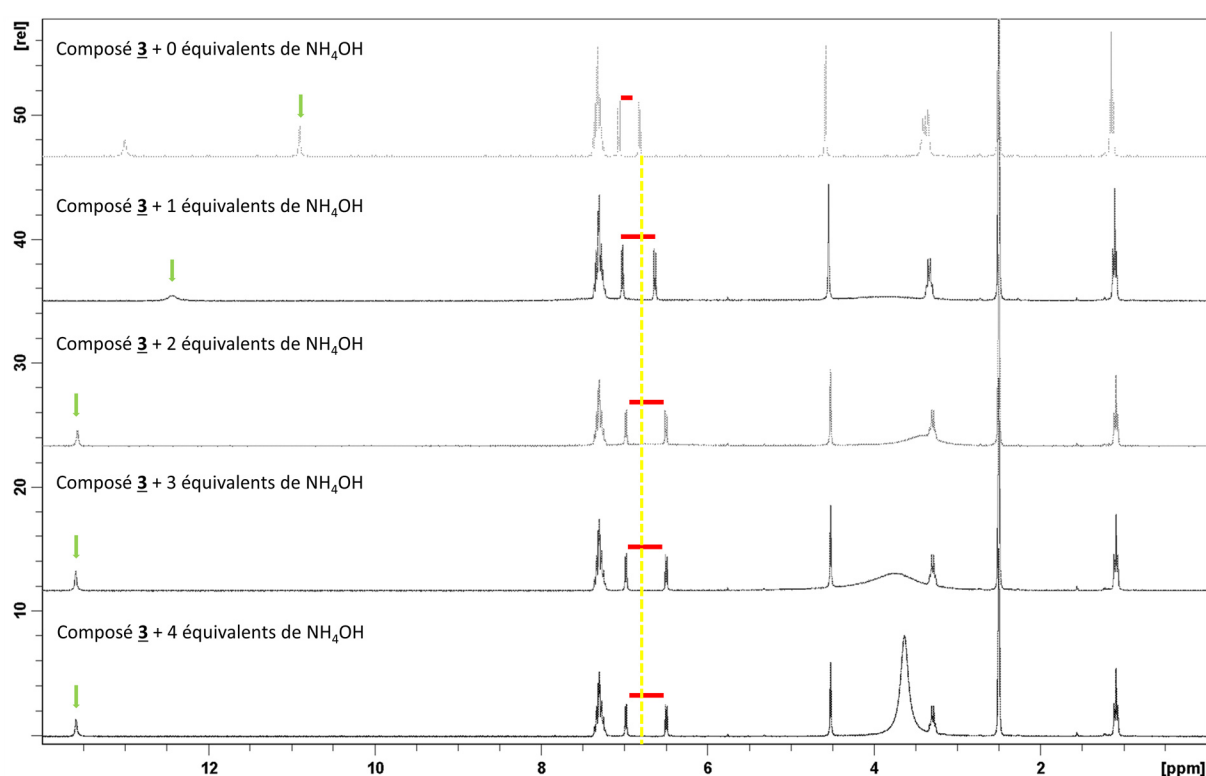


Figure 37 : RMN du composé **3** en présence de quantités croissantes de NH_4OH (le proton porté par l'azote du motif urée est signalé par une flèche verte et l'écart de déplacement chimique entre les deux protons aromatiques du cycle thiophène est représenté par un trait rouge).

Nous avons ainsi montré que l'ajout d'ion ammonium entraînait une variation du déplacement chimique du proton porté par l'azote du motif urée ainsi que des deux protons du cycle thiophène.

L'existence d'une liaison hydrogène entre le carbonyle de la fonction ester et le proton porté par l'azote du motif urée est bien décrite dans la littérature pour les composés de type (2-carboxy 3-uréido) thiophène.¹⁵³ Suite à cette constatation et aux modifications du spectre RMN induites par

¹⁵³ Y. Huang, A. Dömling, *Mol. Divers.* **2011**, *15*, 3–33

des concentrations croissantes en NH_4OH , nous avons alors émis l'hypothèse que le sel formé entre la molécule et l'ion ammonium pourrait perturber cette liaison hydrogène, modifier la structure du composé et donc son activité.

Nous avons donc testé notre composé en présence d'un équivalent d'ammoniac sur le test VEGFR1-ECD. L'activité de ce mélange (**3** + ammoniac) a été comparée d'une part au composé **3** seul et d'autre part au composé sr 4321 provenant du CERMN.

Comme attendu, le composé **3** s'est révélé inactif. Bien que toujours capable de déplacer l'interaction VEGF/VEGFR1, le composé du CERMN s'est avéré légèrement moins actif que précédemment (problème sûrement dû à l'échantillon). Le mélange (**3** + ammoniac) s'est, quant à lui, révélé presque aussi inactif que le composé **3**.

En conclusion, dans ces conditions, cette expérience ne s'est donc pas révélée très concluante et nous n'avons pas observé un réel regain d'activité en présence de sels d'ammoniacque (Figure 38).

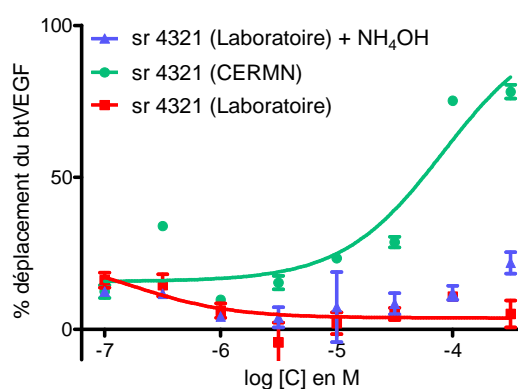


Figure 38 : Evaluation de l'activité de la molécule **3** en présence d'un équivalent de NH_4OH (test VEGFR1-ECD).

2.2.3 Conclusion

Au travers de ces expériences Water LOGSY, nous avons d'une part confirmé que la molécule du CERMN était moins pure que la notre et d'autre part mis en évidence la présence d'ion ammonium dans cet échantillon. De plus, bien que nous n'ayons pu déterminer la cause, nous avons montré que contrairement au produit pur, en présence d'impureté la molécule était capable d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1.

2.3 Recherche d'impuretés métalliques

Afin de compléter notre étude, nous avons ensuite regardé si l'échantillon du CERMN contenait des traces d'ions métalliques. Pour cela, nous avons évalué l'activité du composé sr 4321 sur le test de déplacement VEGFR1-ECD en présence d'un équivalent d'EDTA (chélatant des métaux). Cette expérience a été réalisée à 300 μM , 100 μM et 30 μM (Figure 39).

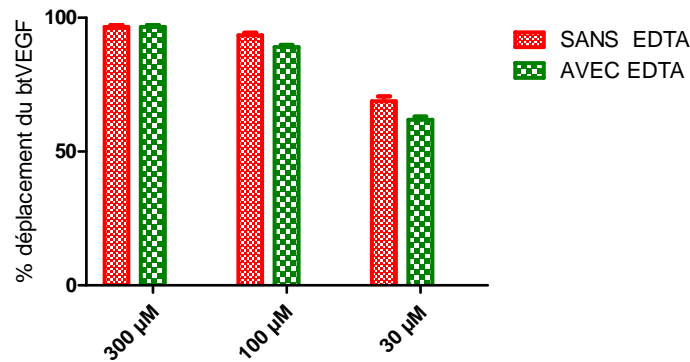


Figure 39 : Recherche d'ion métallique (Test EDTA)

Dans ces conditions nous n'avons pas observé de perte d'activité et avons ainsi conclut que ce composé n'était pas contaminé par des traces de métaux.

2.4 Conclusion de cette étude comparative

Au travers de toutes ces analyses, nous avons mis en évidence des différences significatives entre ces deux lots de composés à la fois sous forme solide et en solution. Bien que nous n'ayons pu déterminer la nature exacte des impuretés, nous avons montré que la molécule du CERMN était moins pure que celle synthétisée au laboratoire.

Cette différence de pureté entre les deux lots de composé a ainsi été corrélée à la différence d'activité sur notre test ELISA. En effet, bien que la cause n'ait pu être déterminée (agrégation, formation de sels, problème de conformation), nous avons mis évidence que ces impuretés ont un effet sur la molécule et sur sa capacité à bloquer l'interaction VEGF/VEGFR1 sur notre test Elisa. Alors que pur, le composé ne peut se lier au récepteur, en présence d'impureté il semble capable de se fixer au VEGFR1 (ou s'agréger) et ainsi inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1.

En conclusion, bien que d'autres analyses soient nécessaires pour expliquer la différence de comportement de ces deux échantillons, en l'état actuel de nos connaissances, cette découverte rend compliqué le développement de nouveaux analogues actifs de ce composé sr 4321.

IV. Synthèse d'analogues du composé sr 4321

En parallèle de l'étude réalisée sur les deux lots de composé sr 4321, et alors que nous n'avions pas encore découvert l'effet des impuretés sur la fixation de la molécule sur le récepteur, nous avons entrepris au début de ma thèse la synthèse de nouveaux analogues de cette molécule. Différentes pharmacomodulations ont donc été réalisées.

1. Modifications du squelette cyclique du composé sr 4321

1.1 Synthèse des analogues

Selon la voie de synthèse décrite précédemment, différentes séries chimiques d'analogues du composé sr 4321 ont été synthétisées en ne faisant varier que le squelette cyclique.

- Hétérocycles de type thiophène

Bien que le composé sr 4321 puisse à première vue sembler flexible, ce composé est en réalité assez contraint.

En effet, la liberté conformationnelle de cette molécule est réduite par la présence d'une liaison hydrogène entre l'atome d'hydrogène porté par l'azote en position 2 et l'atome d'oxygène du carbonyle de la fonction ester. De plus, l'interaction non covalente de type [1,5] S \cdots O présentée précédemment, entre le soufre et l'atome d'oxygène du carbonyle du motif urée, bloque la rotation selon l'axe C-N de l'urée et contraint également la structure du composé sr4321.

Ces deux interactions non covalentes, validées par la structure cristallographique de l'intermédiaire de synthèse ester **2** de notre composé sr 4321 (**3**) contraignent donc la structure du composé qui forme ainsi un pseudo noyau tricyclique (Figure 40).

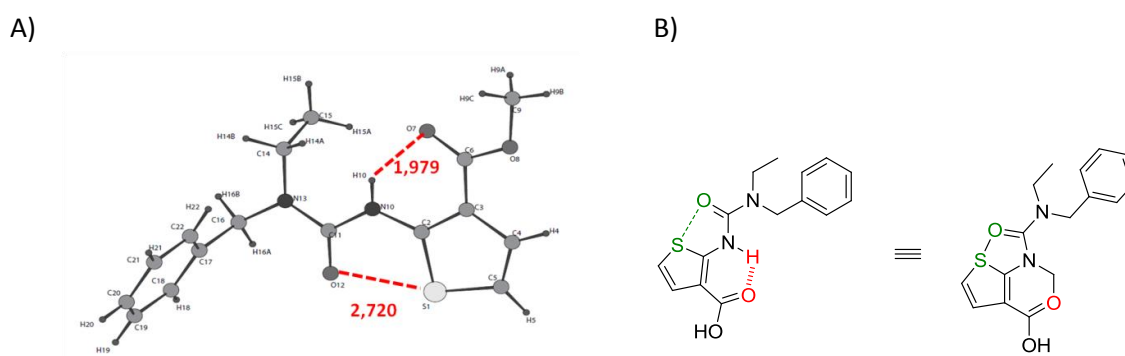


Figure 40 : A) Structure RX de l'ester méthylique **2** du composé sr 4321 (collaboration Dr. P. Lemoine, UMR 8015, Université Paris Descartes) B) Structure du composé sr 4321 contrainte par la liaison hydrogène et l'interaction [1,5] S \cdots O

Suite à cette constatation et afin de moduler la conformation de la molécule, une première étape a été de conserver la série chimique thiophène, mais de synthétiser des régioisomères du composé sr 4321.

En effet, faire varier la position relative du bras urée et de la fonction acide carboxylique par rapport à l'atome de soufre pourrait entraîner un changement conformationnel de la molécule due à la perte ou la modification d'interactions non covalentes de type S...O ou liaison hydrogène. De plus, ces modifications pourraient induire une variation de la répartition électronique pouvant se traduire par une modification du caractère basique du carboxylate.

Par conséquent, ces modifications structurales pourraient se répercuter sur la force de liaison de la molécule avec le domaine d2 du VEGFR-1 et potentiellement modifier son activité.

Dans ce contexte, deux régioisomères du composé sr 4321 ont été synthétisés en partant des composés commerciaux 3-amino-2 thiophène carboxylate de méthyle et 3-amino-4 thiophène carboxylate de méthyle. Ces deux molécules ont été engagées dans la voie de synthèse précédemment décrite et les produits désirés ont ainsi été obtenus en trois étapes avec des rendements respectifs de 81 et 35 % (Schéma 15).

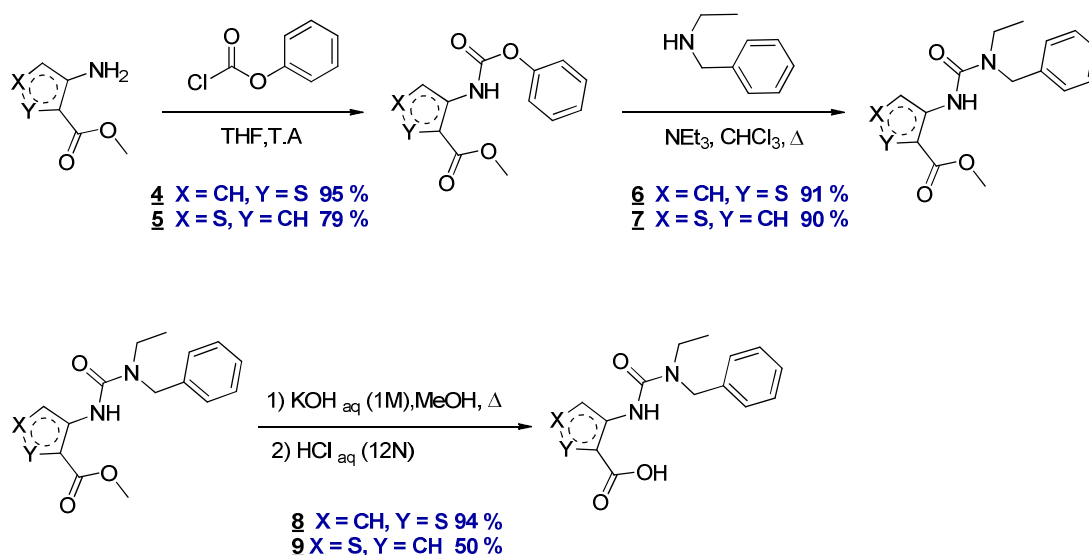


Schéma 15: Synthèse des deux régioisomères du composé sr 4321 : (2-carboxy 3-uréido) thiophène et (3-uréido 4-carboxy) thiophène

- Hétérocycles de type pyrazole

L'approche suivante a été de s'affranchir du thiophène, et de le remplacer par un autre hétérocycle aromatique, le pyrazole. Le schéma de synthèse a donc été adapté au 3-amino-1H-pyrazole-4-carboxylate d'éthyle commercial. Ce composé, proche de la structure du thiophène, présente comme avantage de pouvoir établir des interactions supplémentaires avec le récepteur. En effet, la présence d'un groupement donneur de liaisons hydrogènes et d'un atome accepteur pourraient permettre d'augmenter l'affinité de la molécule pour le récepteur.

Ce composé a donc été engagé dans la même voie de synthèse que les autres analogues. Cependant, la réaction de formation du motif carbamate, réalisée dans le THF en présence d'une quantité équimolaire de pyrazole et de chloroformate de phényle, a conduit à un mélange de deux composés (Schéma 16).

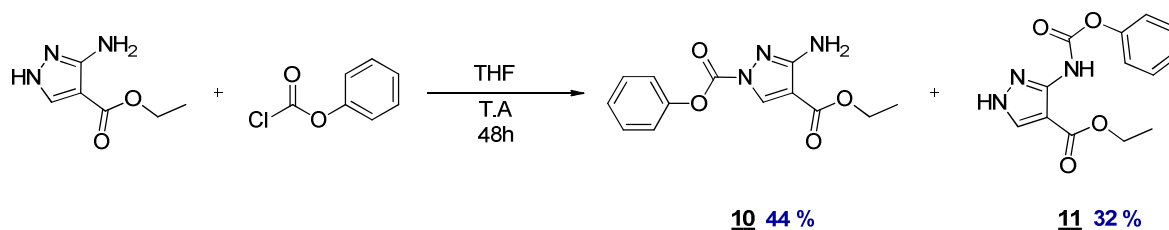


Schéma 16 : Réaction du 3-amino-1H-pyrazole-4-carboxylate d'éthyle avec le chloroformate de phényle

En s'appuyant sur les analyses RMN de ces deux molécules (^1H , ^{13}C , HMBC, HSQC et NOESY) ainsi que sur les données de la littérature nous avons pu déterminer qu'il s'agissait d'un mélange de deux régioisomères. En effet, cette étape a conduit à la formation du composé attendu **11** ainsi que celui portant le motif carbamate sur l'amine du cycle pyrazole **10**.

Ces composés pouvant être intéressants pour notre étude de relation structure-activité, ils ont été engagés dans l'étape de formation du motif urée. Les molécules **12** et **14** ont ainsi été obtenues avec des rendements respectifs de 54 et 49 %. Cependant, en raison des conditions drastiques de saponification (KOH 1M au reflux) et de l'instabilité du composé **14**, seul le composé **12** a été transformé en acide **13** (rendement de 16%) (Schéma 17).

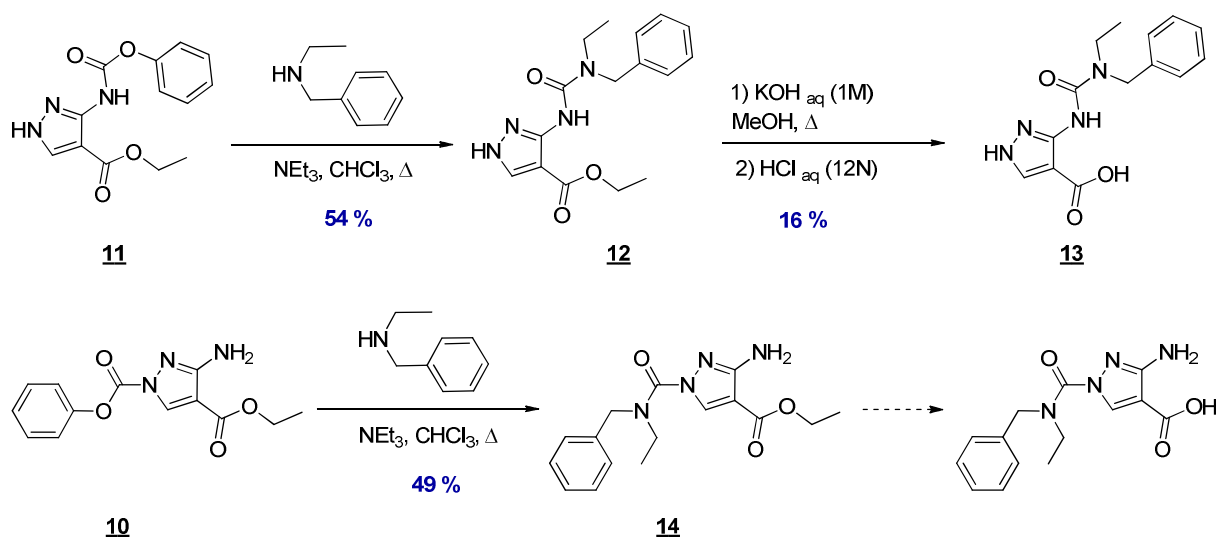


Schéma 17: Réactivité des carbamates de type pyrazole

Pour être sûr de ne pas obtenir les deux régioisomères, une nouvelle expérience a été réalisée à partir du 5-amino-1-méthyle-1H-pyrazole-4-carboxylate d'éthyle commercial (Schéma 18). Ce N-méthyl aminopyrazole a donc été mis en présence de chloroformate de phényle. Cette réaction a

conduit au carbamate correspondant **15** mais avec un rendement de 35 %. Nous avons attribué ce faible rendement au manque de base dans le milieu réactionnel. En effet, deux hypothèses ont été faites pour expliquer ce résultat. Une première hypothèse pourrait être que l'amine extracyclique du pyrazole N-méthylé soit plus basique que celle du thiophène. Dans ce cas, elle pourrait se protoner et ainsi ne plus être assez nucléophile. Une seconde hypothèse pourrait être que l'azote du cycle se protone et diminue ainsi la nucléophilie de l'amine primaire. Nous avons donc ajouté de la triéthylamine. Dans ces conditions, deux produits ont été formés et isolés, le produit attendu **15** et de façon majoritaire le bis carbamate **16**.

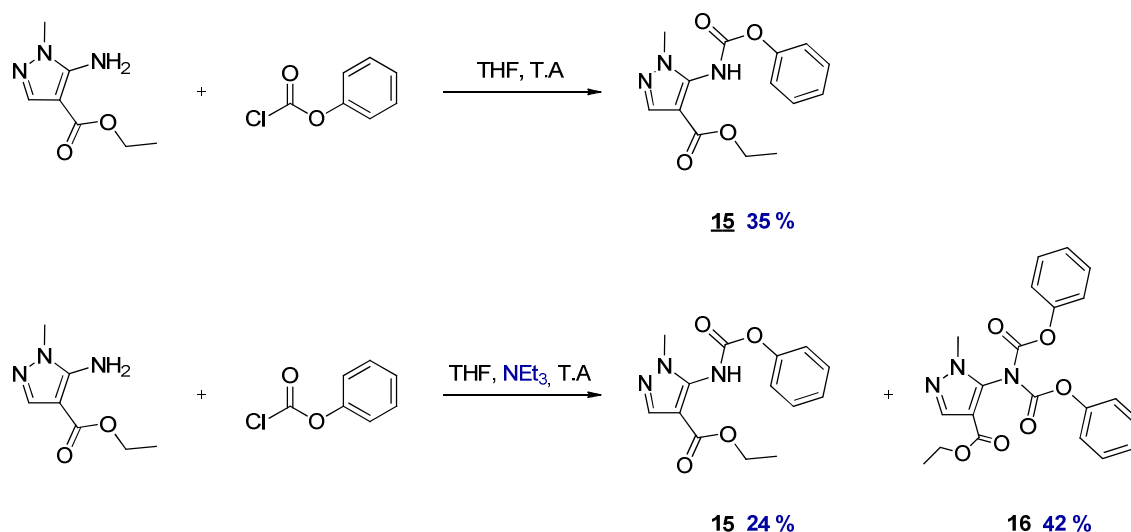


Schéma 18: Réaction entre le pyrazole N-méthylé et le chloroformate de phényle

La structure originale de ce pyrazole porteur de deux motifs carbamate **16** nous a poussé à l'engager dans la suite de la synthèse. Au vu de la structure de ce produit et de ce que nous espérions isoler, les quantités de N-éthyl benzylamine ont été doublées. Cependant, au terme de cette réaction nous avons seulement obtenu le produit porteur d'une seule fonction urée **17**. Cet uréido-pyrazole a néanmoins été isolé avec un bon rendement de 80 % et engagé dans la réaction d'hydrolyse basique. L'acide correspondant **18** a été obtenu avec un rendement de 35% (Schéma 19).

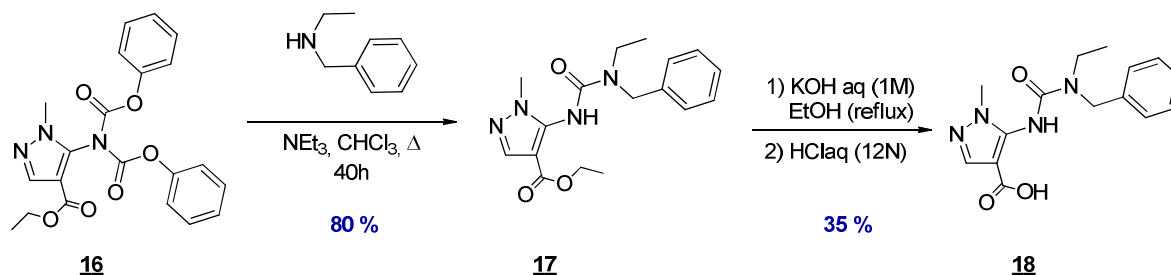


Schéma 19 : Synthèse de l'analogue pyrazole N-méthylé

- Cycle aromatique benzène

Une autre approche a été de remplacer le cycle thiophène par un cycle à six chaînons afin de modifier l'angle entre la fonction acide et le motif urée. Pour cela, l'amino-carboxy-benzène a été engagé dans les trois étapes de synthèse et l'uréido acide correspondant **21** a été obtenu avec un rendement global de 39 % (Schéma 20).

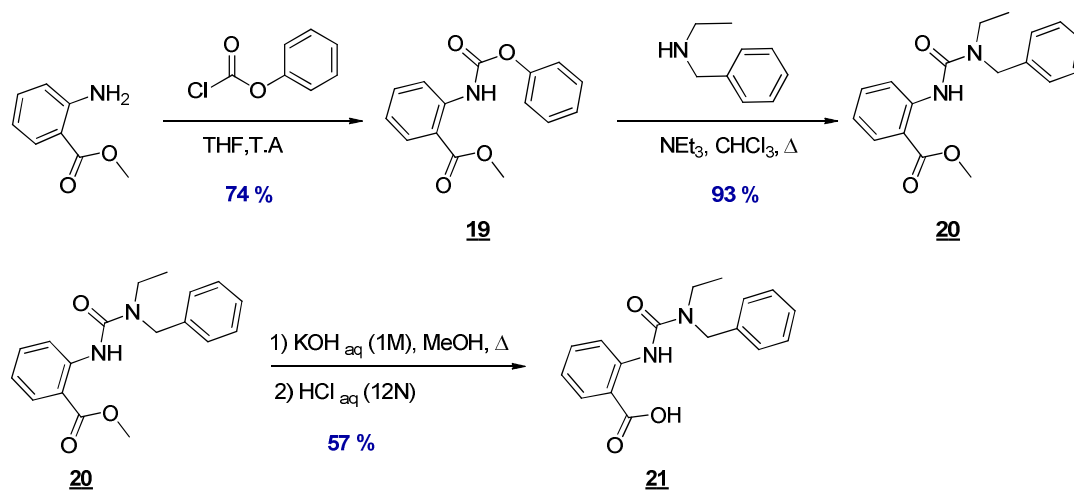


Schéma 20 : Synthèse d'analogues du composé sr 4321 à partir de l'amino-carboxy benzène

- Analogue linéaire du composé sr 4321

Enfin, pour compléter cette étude, un dernier analogue non cyclique présentant de grands degrés de liberté a été synthétisé en partant d'un dérivé de la β glycine. Cette molécule se présentant commercialement sous forme de chlorhydrate, la réaction de formation du carbamate a été conduite en présence de triéthylamine. Le carbamate **22** ainsi formé a été mis à réagir avec la N-Ethyl benzylamine, toujours en présence de triéthylamine, pour former l'urée correspondante **23**. Enfin l'étape de saponification, réalisée dans les conditions classiques, a permis d'obtenir le composé souhaité **24** avec un rendement de 30 % sur les trois étapes (Schéma 21).

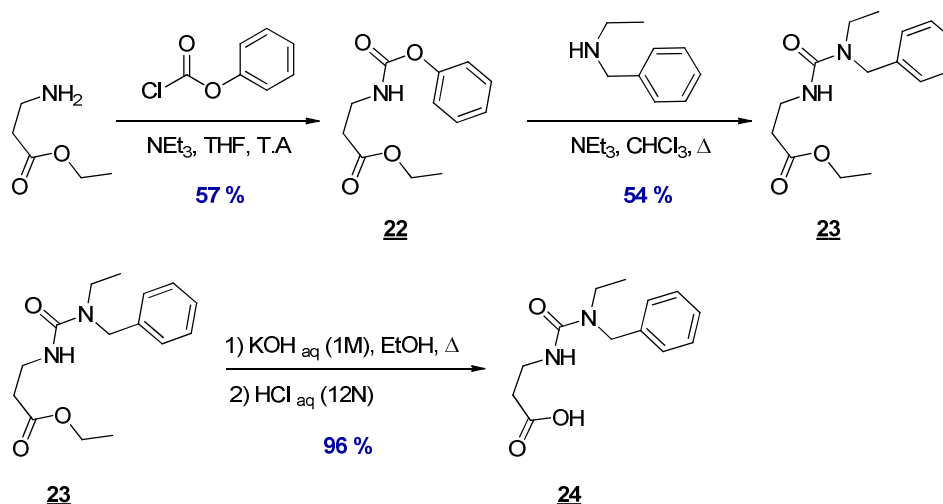


Schéma 21: Synthèse d'un analogue linéaire du composé sr 4321

En conclusion, bien que certains rendements pourraient être optimisés, cette voie de synthèse a permis d'accéder rapidement à une dizaine de nouveaux analogues du composé sr 4321.

1.2 Evaluation de l'activité de ces analogues sur le test VEGFR1-d1-d3

La capacité à inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1 de l'ensemble des analogues sous forme ester et acide a été évaluée sur le test VEGFR1-d1-d3. En dépit de la variabilité au niveau de l'hétérocycle, ces molécules se sont avérées inactives ou très faiblement actives.

De façon similaire au composé sr 4321, tous les dérivés aromatiques (thiophènes, pyrazoles, benzène) sous forme d'acides se sont révélés inactifs. Sous forme d'ester, seul les deux régioisomères thiophènes du composé sr 4321 ont montré une faible capacité à déplacer l'interaction VEGF/VEGFR1 (déplacement à $100\mu\text{M} \leq 20\%$).

Enfin, bien que les différences d'activité soient faibles, le dérivé linéaire s'est révélé être le composé le plus actif. Ce composé s'est avéré capable d'inhiber l'interaction du btVEGF sur le récepteur à la fois sous forme ester et acide (déplacement à $100\mu\text{M} \leq 35\%$).

2. Modification de la chaîne latérale du composé sr 4321 par réaction de chimie click

Suite aux résultats peu concluants obtenus dans la première partie de notre étude, nous avons envisagé la synthèse de nouveaux analogues du composé sr 4321. Afin d'accéder rapidement à une large diversité de fonctions chimiques, des variations sur le bras urée ont été introduites par chimie click, et plus précisément par réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen.

2.1 Chimie click et réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen

La Chimie Click est un concept qui a été introduit en 2001 par Sharpless et son équipe pour définir un ensemble de réactions répondant à différents critères : reproductibilité, sélectivité, modularité, rendements élevés, produits secondaires inoffensifs et facilement éliminable et produit simple à purifier.¹⁵⁴ Cette nouvelle approche de la chimie regroupe de nombreuses réactions telles que des cycloadditions (cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen, réactions de Diels-Alder...), des substitutions nucléophiles (notamment des réactions d'ouverture de cycles : époxydes, aziridines...), des réactions d'addition sur des doubles liaisons (époxydation, dihydroxylation, formation d'aziridine, additions de Michael...) ou encore par exemple la chimie des carbonyles (formation d'urée, de thiourée, hydrazones, amides...). Parmi ces réactions, nous avons utilisé la réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen pour introduire des variations sur le bras urée.

¹⁵⁴ H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004 - 2021

La réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen permet la synthèse d'un motif 1, 2, 3 triazole à partir d'un alcyne terminal et d'un azoture. Cette réaction, réalisée par voie thermique, conduit au mélange des deux régioisomères disubstitués 1,4 et 1,5 (Schéma 22).¹⁵⁵

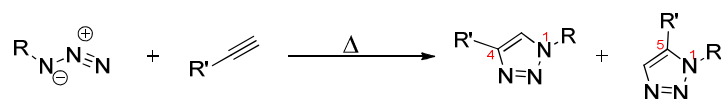


Schéma 22 : Réaction de Huisgen

Il a cependant été démontré que l'utilisation d'un catalyseur métallique permet de conduire sélectivement, en fonction de la nature du métal, à l'un ou l'autre de ces deux isomères. En effet, il a été mis en évidence que l'utilisation de cuivre I permettait d'obtenir spécifiquement le régioisomère 1,4^{156,157}, tandis que l'emploi du ruthénium II conduisait à l'isomère 1,5^{158,159} (Schéma 23).

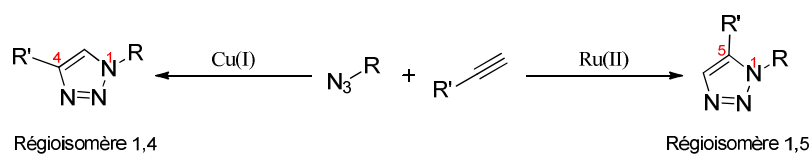


Schéma 23 : Régiosélectivité induite par l'utilisation d'un catalyseur métallique

Par ailleurs, en plus de son effet sur la régiospécificité, il a été montré que l'utilisation de cuivre I permettait d'accélérer la vitesse de la réaction (≈ 100 fois) et donc de travailler dans des conditions plus douces, notamment à des températures plus faibles.^{156,157}

2.2 Synthèse des analogues par chimie click

2.2.1 Synthèse des précurseurs : alcyne et azotures

Pour notre étude, l'introduction de variations sur le bras urée a été effectuée par réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire catalysée par le cuivre I à partir du composé 2-uréido-thiophène porteur d'une fonction alcyne et de divers azotures (Schéma 24).

¹⁵⁵ R. Huisgen, **1984**, Padwa, A., Ed. Wiley: New York

¹⁵⁶ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057 - 3064

¹⁵⁷ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596-2599

¹⁵⁸ L. Zhang, X. G. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. C. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-15999

¹⁵⁹ M. M. Majireck, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8680-8683

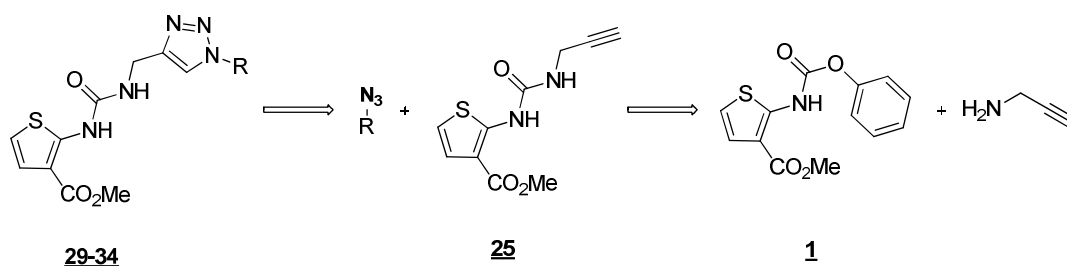


Schéma 24 : Schéma de rétrosynthèse

- Précurseur alcyne

Au regard du schéma rétro-synthétique 24, la première étape a été de synthétiser le composé porteur, sur son bras urée, de la fonction alcyne vrai. Pour cela, le thiophène possédant un motif carbamate **1** décrit précédemment a été mis en présence de propargylamine et de triéthylamine, au reflux du chloroforme, pour former l'uréido-thiophène porteur de la fonction alcyne terminal souhaité **25** avec un rendement de 86 %.

- Précurseurs azotures

La deuxième étape a été de choisir les azotures pour la réaction de chimie click. Le nombre d'azotures commerciaux étant limité, seul deux réactions de cycloaddition ont été réalisées à partir de molécules achetées dans le commerce. Pour palier ce manque, deux solutions ont été trouvées. La première a consisté à préparer nous même les azotures et l'autre a été de réaliser la chimie click en « one pot » à partir de dérivés bromés. Chacun de ces composés a été choisi afin d'obtenir une large diversité de fonctions chimiques : polaires, hydrophobes

Deux azotures ont ainsi été synthétisés par réaction de diazotransfert en partant de deux acides aminés naturels et d'une amine commerciale. Cette réaction, catalysée par le cuivre II, utilise comme agent de transfert un azoture de sulfonyl qui agit comme un donneur de diazo « N₂⁺ ». L'agent de transfert le plus employé à l'heure actuelle est l'azoture de trifluorométhane sulfonyl.¹⁶⁰ Cependant son caractère explosif, sa faible stabilité dans le temps, et le coût élevé de l'anhydride triflique servant de matière première pour la synthèse nous ont conduit à nous reporter sur une méthode décrite en 2007 par E.D. Goddard-Borger et R. V. Stick.¹⁶¹

Ce procédé utilise comme agent de transfert le chlorhydrate d'azoture d'imidazole de sulfonyl qui est obtenu à partir de réactifs peu onéreux et stables tels que l'imidazole, l'azoture de sodium et le chlorure de sulfonyl. Cet agent de transfert **26**, synthétisé sous forme de chlorhydrate, a été obtenu en deux étapes avec un rendement de 77 % (Schéma 25).

¹⁶⁰ P. B. Alper, S. C. Hung, C. H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 6029-6032

¹⁶¹ E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.* **2007**, 9, 3797-3800

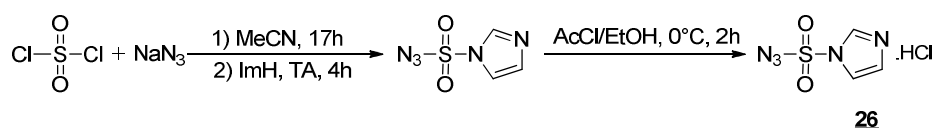
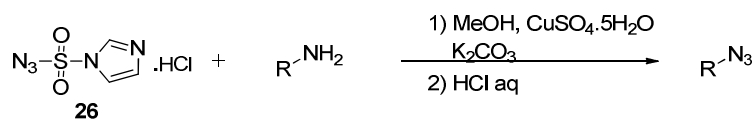


Schéma 25 : Synthèse du réactif de diazotransfert

Une fois synthétisé, ce réactif a été engagé dans une réaction de diazotransfert avec deux acides aminés susceptibles d'établir de nouvelles interactions avec le récepteur (*Tableau 5*).



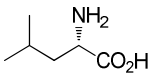
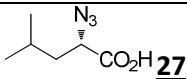
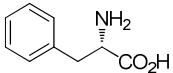
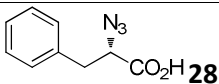
Acides aminés	Azoture	Rendement
		98 %
		86 %

Tableau 5 : Résultats des réactions de diazotransfert

Cette réaction de diazotransfert a été réalisée dans le méthanol en présence de CuSO_4 , et de K_2CO_3 à température ambiante et a été suivi d'un traitement acide pour conduire aux azotures désirés avec des rendements supérieur à 85 %.

2.2.2 Synthèse des analogues : Réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre

- Chimie click à partir d'azotures

Une fois le thiophène porteur de la fonction alcyne et les azotures nécessaires synthétisés, la dernière étape a été la réaction de cycloaddition (*Schéma 27*).

La très faible solubilité du thiophène dans le mélange *tert*-butanol/eau n'a pas permis de réaliser cette réaction dans les conditions classiques. Ces cycloadditions, entre alcyne et azotures, ont donc été conduite dans le DMF en présence d'iodure de cuivre comme catalyseur et d'ascorbate de sodium en tant réducteur. La présence de base dans le milieu réactionnel entrainant des problèmes de cyclisation (*Schéma 26*), nous avons fait le choix de réaliser cette cycloaddition en absence de base.

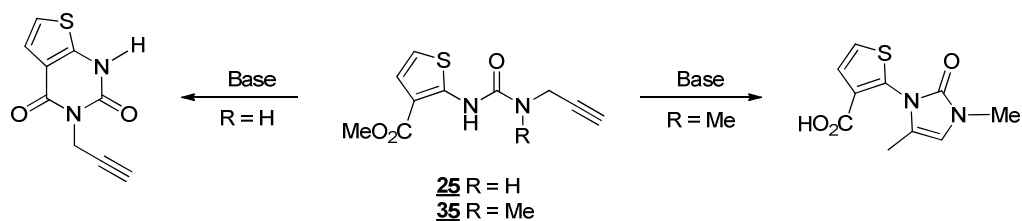


Schéma 26 : Cyclisation en présence de base

Dans ces conditions, quatre analogues ont été synthétisés à partir de deux azotures commerciaux et deux dérivants d'acides aminés. Ces composés ont ainsi été obtenus avec des rendements supérieurs à 75 % (Tableau 6).

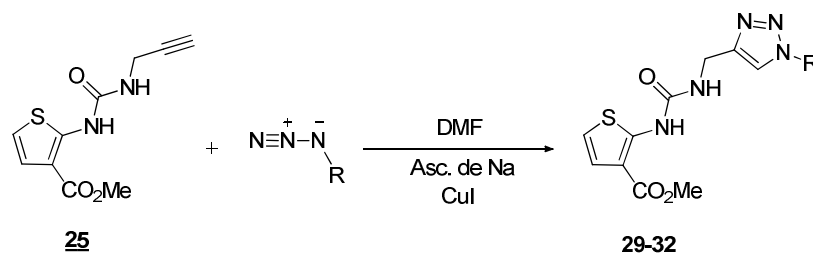


Schéma 27 : Synthèse d'analogues par réaction de cycloaddition

- Chimie click « one pot »

Afin de synthétiser un plus grand nombre d'analogues, nous avons également choisi de réaliser des expériences de chimie click « one pot » (Schéma 28), dans lesquelles les azotures sont obtenus *in situ* par substitution nucléophile de dérivés bromés par l'azoture de sodium. Excepté la température à laquelle elles ont été réalisées (60°C), ces réactions ont été conduites dans les mêmes conditions que celles de chimie click décrites précédemment et ont permis d'obtenir deux nouveaux analogues avec des rendements équivalents de 75 % (Tableau 6).

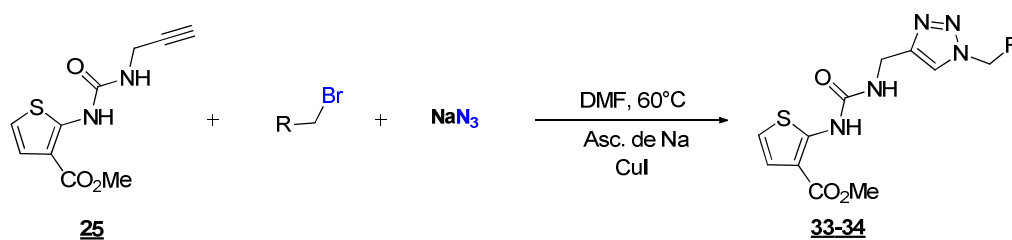


Schéma 28 : Synthèse d'analogues par réaction de cycloaddition « one pot »

- Récapitulatif des analogues synthétisés par chimie click

Ces réactions de chimie click ont donc permis d'introduire sur le bras urée, des groupements et fonctions variés (benzène, acide, ester, nitrobenzène) susceptibles de créer de nouvelles interactions avec le VEGFR1. L'ensemble des analogues synthétisés par chimie click ainsi que les rendements avec lesquels ils ont été obtenus sont décrits dans le tableau 6 ci-dessous.

Azoture	Produit	Rendement
		82 %
		78 %
		77 %
		77 %
		75 %
		75 %

Tableau 6 : Résultats des réactions de cycloaddition

2.3 Evaluation de l'activité de ces analogues sur le test VEGFR1-d1-d3

En accord avec les résultats obtenus sur la série de modification de l'hétérocycle, et sachant que l'hydrolyse en milieu basique de ces composés conduirait à la formation de thienopyrimidinediones, ces analogues obtenus par chimie click ont été testés sous forme d'ester. Evalués sur le test VEGFR1-d1-d3, seul le composé **34** présentant une chaîne latérale ethyl benzyl s'est révélé capable d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1 (~ 40 % de déplacement à 100µM).

3. Elaboration de nouveaux analogues, Relation Structure-Activité finale

Les résultats obtenus lors de la modification du squelette cyclique du composé sr 4321 nous ont permis de mettre en évidence que deux régioisomères de thiophènes ainsi qu'un dérivé linéaire étaient capable, bien que faiblement, de déplacer l'interaction VEGF/VEGFR1.

En s'appuyant sur ces résultats ainsi que sur le fait que parmi les premiers analogues synthétisés par chimie click, seul le composé **34** possédant une chaîne latérale de type éthyl-benzyl est actif, de nouveaux analogues du composé sr 4321 ont été développés. Ces composés ont été synthétisés par chimie click, d'une part en combinant les résultats précédents et d'autre part en modifiant le motif urée.

3.1 Synthèse des différents analogues

- Série (3-carboxy-2-uréido) thiophène

Nous avons tout d'abord conservé le motif (3-carboxy-2-uréido) thiophène et synthétisé différents analogues du composé **34** en modifiant le motif urée. Un premier analogue a été synthétisé en utilisant la N-méthyl propargylamine (mime de la chaîne latérale N-éthyl benzylamine du composé sr 4321). Suivant la voie de synthèse décrite précédemment, la réaction entre le carbamate **1** et la N-méthyl propargylamine a conduit à la formation de l'uréido thiophène correspondant **35** avec un rendement de 73 %. Ce composé a ensuite été engagé dans la réaction de chimie click « one pot » en présence de bromo-éthyl benzène, d'iodure de cuivre et d'ascorbate de sodium. Cette dernière réaction a ainsi permis l'obtention du composé souhaité **36** avec un rendement de 72 % (Schéma 29).

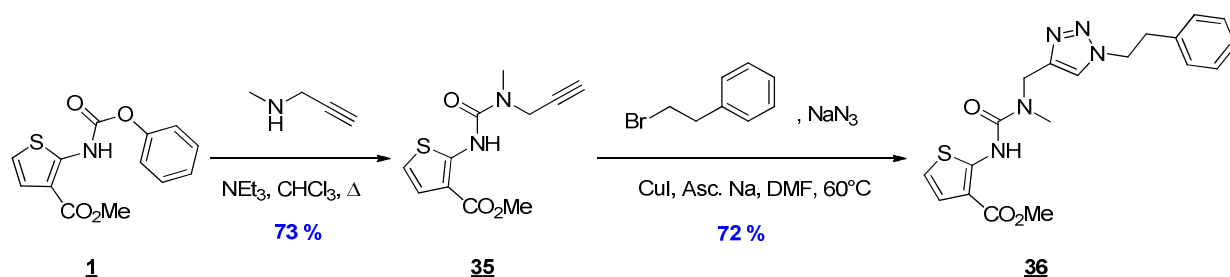


Schéma 29 : Synthèse de l'analogue N-méthylé **36**

Suivant la même voie de synthèse, un deuxième analogue a été synthétisé à partir de la diméthylbutyne amine. Le composé **38** a ainsi été obtenu en deux étapes à partir du carbamate **1** avec un rendement de global de 67 % (Schéma 30).

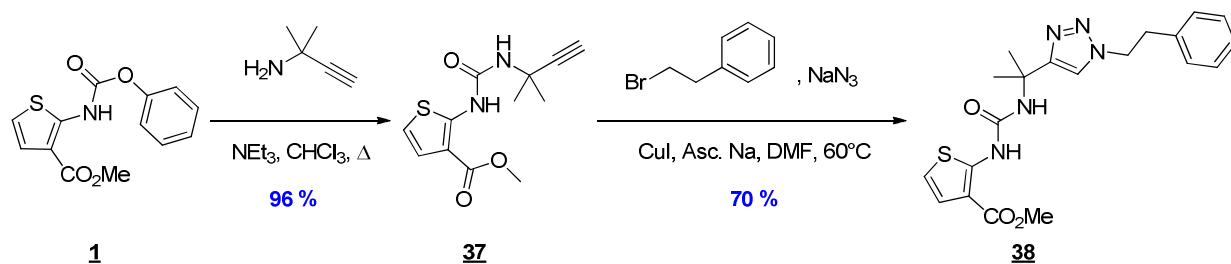


Schéma 30 : Synthèse de l'analogue gem-diméthyle **38**

Afin d'introduire une variation supplémentaire, nous avons choisi de synthétiser l'analogue amide du composé **34**. Le précurseur alcyne de cet analogue amide a été préparé à partir de l'acide 4-pentynoïque et du 2-aminothiophène-3-carboxylate de méthyle selon la voie de synthèse décrite dans le schéma 30. Le composé **39** a ainsi été obtenu en deux étapes avec un rendement de 80 % (Schéma 31).

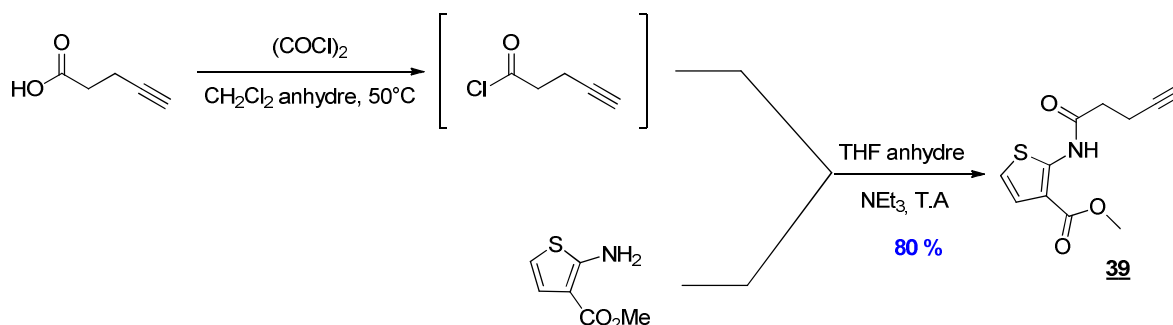


Schéma 31 : Synthèse du précurseur alcyne de l'analogue amide **39**

Une fois synthétisé et purifié, ce composé **39** porteur de la fonction alcyne a été engagé dans la réaction de chimie clic « one pot » pour fournir le composé souhaité **40** avec un rendement de 72 % (Schéma 32).

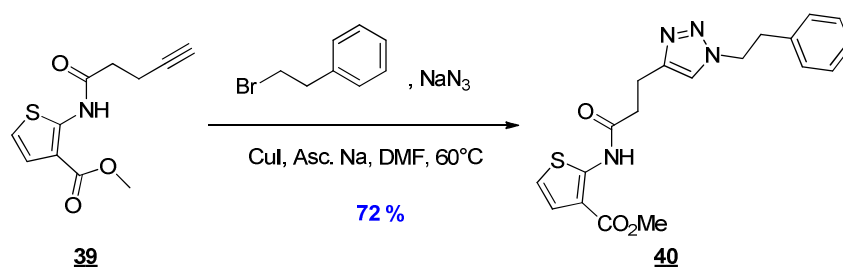


Schéma 32 : Formation de l'analogue amide **40**

- Série (2-carboxy-3-uréido) thiophène

Similairement à ce qui avait été effectué en série (3-carboxy-2-uréido) thiophène, trois nouveaux analogues ont été synthétisés à partir du carbamate **4**. Ces composés ont été préparés selon les voies de synthèses décrites précédemment en utilisant la propargylamine, la N-méthyl propargylamine et la diméthylbutyne amine. Les précurseurs alcyne ainsi que les produits obtenus après réaction de chimie click « one pot » avec le dérivé bromo-éthyl benzène sont présentés dans le tableau 7 ci-dessous.

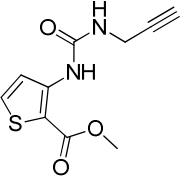
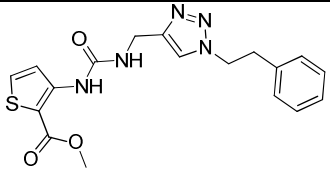
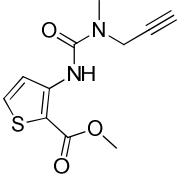
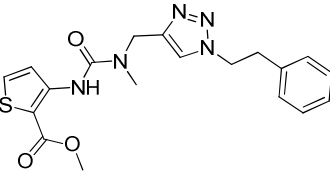
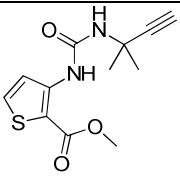
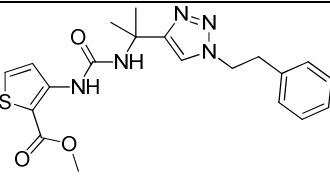
Précurseur alcyne	Produit final	Rendement sur 2 étapes
 <p>41</p>	 <p>44</p>	55 %
 <p>42</p>	 <p>45</p>	60 %
 <p>43</p>	 <p>46</p>	87 %

Tableau 7 : Analogues de la série (2-carboxy-3-uréido) thiophène

- Série (4-carboxy-3-uréido) thiophène

Deux analogues supplémentaires en série (4-carboxy-3-uréido) thiophène ont également été préparés à partir du carbamate **5**. Comme précédemment, ces composés sont présentés ci-dessous (Tableau 8).

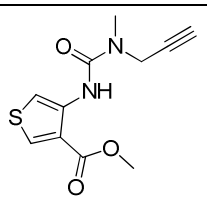
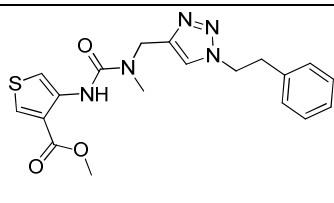
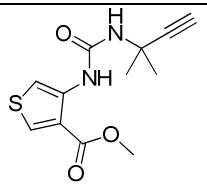
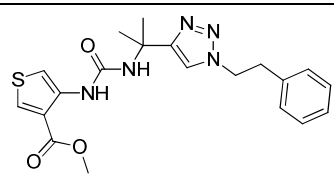
Précurseur alcyne	Produit final	Rendement sur 2 étapes
 47	 49	78 %
 48	 50	71 %

Tableau 8: Analogues de la série (4-carboxy-3-uréido) thiophène

- Série (2-carboxy-5-uréido) thiophène

Afin d'augmenter la diversité au niveau du squelette cyclique, nous avons également souhaité synthétiser de nouveaux composés appartenant à la série (2-carboxy-5-uréido) thiophène. Le 5-amino-2 thiophène carboxylate de méthyle n'étant pas commercial nous l'avons donc dans un premier temps synthétisé.

En s'appuyant sur la voie de synthèse développée par P.B. Dervan¹⁶², le 5-amino-2 thiophène carboxylate de méthyle **53** a été préparé en trois étapes à partir du 5-nitrothiophène-2-carboxaldehyde commercial avec un rendement de 37 % (Schéma 33).

L'oxydation de la fonction aldéhyde du composé de départ par une solution de NaO₂Cl dans un mélange Na₂HPO₄/H₂O a permis d'obtenir l'acide correspondant avec un rendement de 80 %. Après estérification de cette fonction acide par SOCl₂ dans le méthanol, la réduction de groupement NO₂ par le chlorure d'étain a conduit au 5-amino-2 thiophène carboxylate de méthyle souhaité **53**.

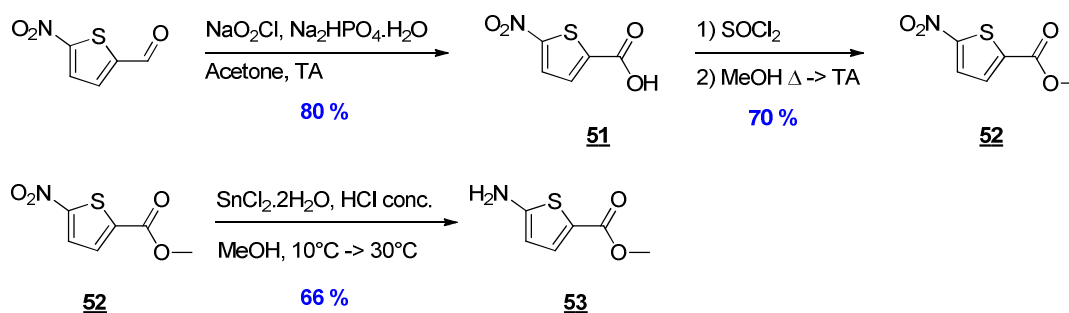


Schéma 33 : Synthèse du 5-amino-2 thiophène carboxylate de méthyle **53**

¹⁶² M. A. Marques, R. M. Doss, A. R. Urbach and P. B. Dervan, Helvetica Chimica Acta, **2002**, 85, 4485-4517

Une fois synthétisé, le composé **53** a été mis en présence de chloroformate de phényle afin d'obtenir le carbamate correspondant. Après 36 heures de réaction le carbamate **54** a ainsi pu être isolé et purifié. Contrairement aux autres carbamates, ce composé n'est pas stable et se dégrade très vite. Cette différence de stabilité pourrait être expliquée par la perte de la liaison hydrogène entre le carbonyle de l'ester et l'hydrogène de la fonction urée.

Bien qu'instable, ce composé a été engagé dans la réaction de formation de l'urée avec la diméthylbutyne amine. Cependant, la rudesse de nos conditions réactionnelles classiques (NEt_3 , chauffage au reflux) n'a pas permis d'obtenir le produit souhaité et a conduit à la dégradation du carbamate. Nous avons alors réalisé cette réaction en absence de base et à température ambiante. Cependant, dans le méthanol ou dans le dichlorométhane, le carbamate n'a pas été converti en urée (Schéma 34).

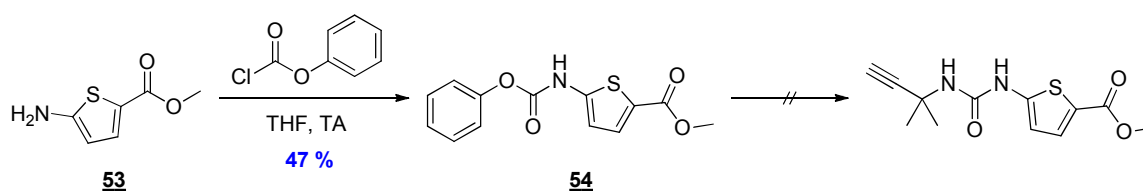


Schéma 34 : Essai de synthèse d'analogues à partir du 5-amino-2 thiophène carboxylate de méthyle **53**

Aux vues de ces résultats et de l'instabilité du carbamate formé, nous n'avons pas continué la synthèse de ce régioisomère.

- Série linéaire

Nous avons ensuite souhaité synthétiser différents analogues en série linéaire. Trois composés urées ont été préparés de façon classique à partir du carbamate **22** dérivant de la β alanine éthyl ester. Les trois précurseurs alcynes ainsi que les produits obtenus après réaction de chimie click « one pot » avec le dérivé bromo-éthyl benzène sont présentés dans le tableau 9 ci-dessous.

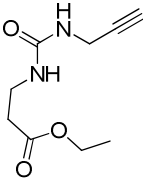
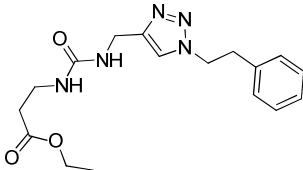
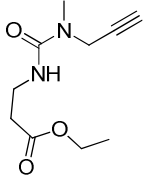
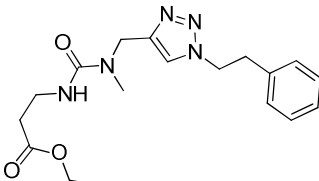
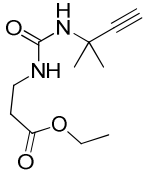
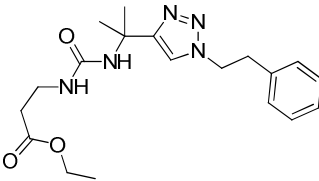
Précurseur alcyne	Produit final	Rendement sur 2 étapes
 55	 58	55 %
 56	 59	60 %
 57	 60	87 %

Tableau 9: Analogues de la série linéaire

Toujours dans le but d'augmenter la diversité moléculaire, un analogue amide a également été préparé. Celui-ci a été synthétisé selon un schéma réactionnel différent du composé amide **40**. Le précurseur alcyne **61** a été préparé en une étape par réaction de couplage entre la β alanine éthyl ester et l'acide 4-pentynoïque en présence de HBTU et de DIEA. Une fois synthétisé et purifié, ce composé a ensuite été engagé dans la réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée au cuivre pour fournir l'analogue amide souhaité **62** avec un rendement de 31 % sur les deux étapes (Schéma 35).

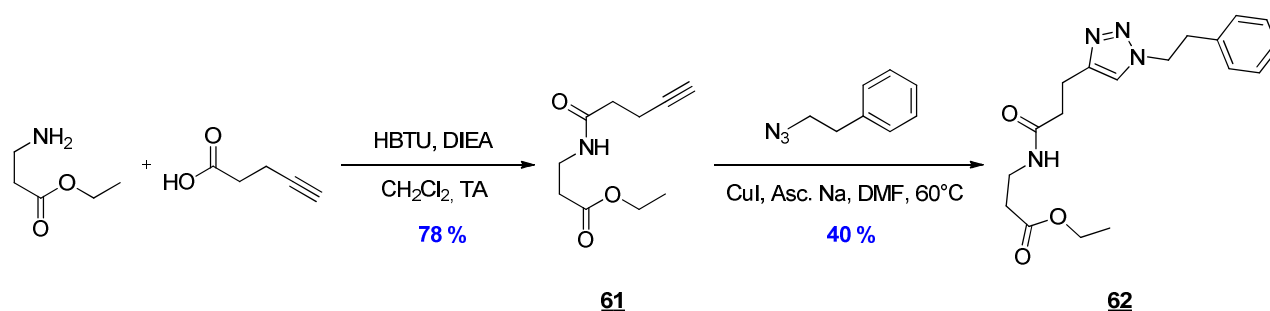


Schéma 35 : Synthèse du composé amide **62**

3.2 Evaluation de l'activité de ces nouveaux analogues sur le test VEGFR1-d1-d3

Une fois synthétisés et purifiés, l'aptitude de ces nouveaux analogues à déplacer l'interaction VEGF/VEGFR1 a été évaluée sur le test VEGFR1-d1-d3. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 10.

Ces nouveaux analogues ont tout d'abord été testé à 100 μM . Lorsque le pourcentage de déplacement de l'interaction à 100 μM était supérieur à 45 %, les composés ont été évalué en effet dose afin de déterminer une valeur de CI_{50} .

D'un point de vue général, nous avons ainsi obtenu une variété de composés couvrant une gamme très large d'activité. Les valeurs de CI_{50} sont comprises entre 12 μM pour le composé le plus actif et des valeurs supérieures à 100 μM pour les moins actifs.

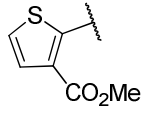
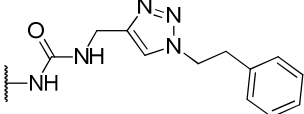
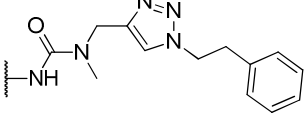
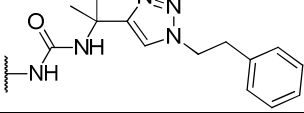
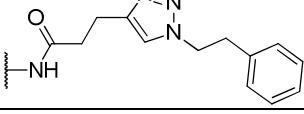
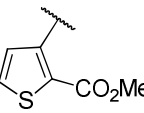
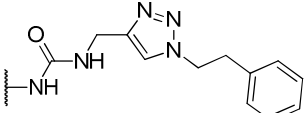
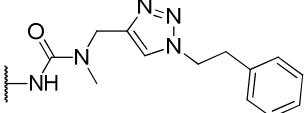
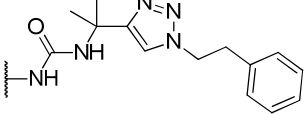
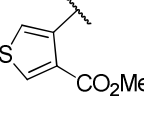
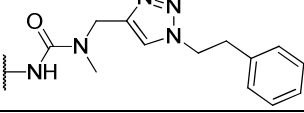
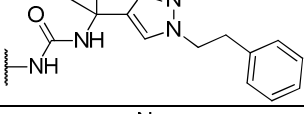
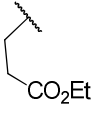
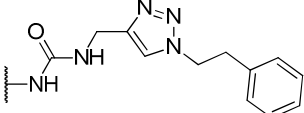
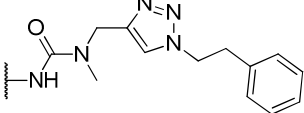
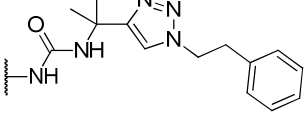
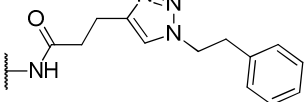
	Structure		% à 100µM ^a	Cl ₅₀ (µM) [IC 95 %]
		34	42 ± 10	ND
		36	50 ± 10	> 100
		38	75 ± 3	50,5 [20,6 - 120]
		40	48 ± 4	88,0 [50,7 - 152]
		44	68 ± 5	42,2 [27,7 - 63,7]
		45	47 ± 8	> 100
		46	70 ± 2	47,2 [29,5 - 75,4]
		49	< 30	ND
		50	44 ± 9	ND
		58	67 ± 3	28,9 [13,0 - 62,3]
		59	65 ± 5	35,4 [24,6 - 50,9]
		60	84 ± 4	12,0 [6,9 - 22,0]
		62	< 30	> 100

Tableau 10 : Aptitude des différents analogues à déplacer l'interaction VEGF/VEGFR1. ND : Non déterminé
^a : % de déplacement à 100µM de l'interaction VEGF/VEGFR

Après analyse du tableau 10, plusieurs constatations peuvent être faites. La substitution du motif urée par une fonction amide semble avoir un effet délétère sur la capacité des molécules à inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1. En effet, les deux dérivés amides **40** et **62** sont très faiblement ou pas actifs.

Les composés de la série linéaire sont largement plus actifs que ceux des trois séries thiophènes. Ce résultat pourrait être interprété par une plus grande flexibilité. Parmi cette série, le composé **60** présentant un motif urée substitué en position α par un groupement gem-diméthyle est le plus actif. Contrairement aux deux autres dérivés urée de cette série qui ont des CI_{50} très proches de l'ordre de 30 μ M, le composé **60** est capable de déplacer l'interaction VEGF/VEGFR1 avec une CI_{50} de 12 μ M.

Parmi les composés de type thiophène, les régioisomères (2-uréido 3-carboxy) thiophène et (3-uréido 2-carboxy) thiophène se sont révélés plus actifs que les composés de la série (3-uréido 4-carboxy) thiophène. Une hypothèse pour rendre compte de cette différence d'activité serait que cette baisse d'activité soit due en partie à la perte de l'interaction S...O. De plus, bien que cela semble moins contraster que pour la série linéaire, les dérivés thiophènes **38**, **46** et **50** possédant un groupement gem-diméthyle en α du motif urée semblent plus actifs que les autres dérivés. Ce résultat pourrait être expliqué par un effet de ce groupement sur la conformation des molécules.

La différence d'activité entre les dérivés thiophènes et linéaires étant très importante et également surprenante, nous avons approfondie l'étude du composé **60**. Evalué sur le test de déplacement VEGFR1-ECD, ce composé a été capable d'inhiber la fixation du VEGF biotynilé sur le récepteur avec une CI_{50} de 13,7 μ M [IC 95 % de 8,7 à 21,7 μ M].

Suite à ces résultats, et avant de poursuivre cette étude de relation structure-activité, nous avons souhaité évaluer l'activité du composé **60** ainsi que celle des dérivés les plus actifs sur cellule HUVE.

V. Etude du composé **60** et découverte de l'activité du cuivre

1. Premiers tests cellulaires, re-synthèse du composé **60** et problèmes de reproductibilité

Ayant montré que le composé **60** inhibe l'interaction VEGF/VEGFR1 sur les tests VEGFR1-ECD et VEGFR1-d1-d3 avec une IC_{50} micromolaire (13,7 μ M et 12,0 μ M respectivement), nous avons souhaité déterminer l'activité de ce composé sur cellules HUVE.

Quelques essais préliminaires ont donc été réalisés. Ce composé a été testé par western blot pour sa capacité à inhiber la phosphorylation du VEGFR1 induite par le VEGF ainsi que les voies de transduction MAPK. Cependant les premiers résultats ne sont pas avérés très concluants et nous nous sommes vite heurtés à des problèmes de reproductibilité.

Pour les besoins de cette étude, ce composé a été re-synthétisé. Il a ainsi été préparé selon la méthode décrite précédemment et obtenu en trois étapes avec un rendement de 14 %. Après purification sur colonne de silice, ce composé a été recristallisé ce qui nous a permis de déterminer sa structure RX (Figure 41).

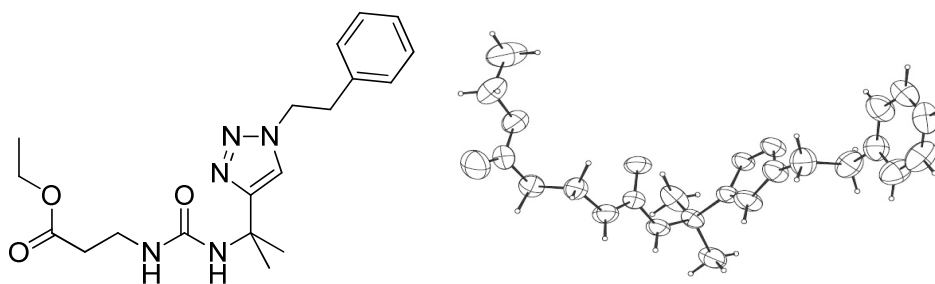


Figure 41: Structure RX du composé **60**

Avant de poursuivre les tests cellulaires, ce composé a été testé en effet dose sur le test VEGFR1-ECD. Contrairement à toute attente, et alors qu'il n'y avait pas de problèmes de solubilité sur cette gamme de concentration, le deuxième lot de composé **60** ne s'est pas révélé actif sur notre test (Figure 42).

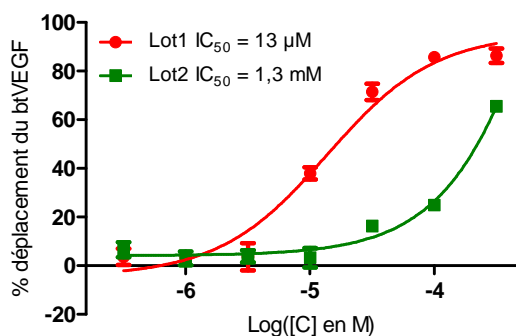


Figure 42: Evaluation de l'activité du deuxième lot de composé **60** sur le test VEGFR-ECD et comparaison avec le premier.

2. Analyse des deux lots de composé 60

Suite à ce résultat et afin de comprendre cette différence d'activité, nous avons entrepris une étude comparative des deux lots de composé 60.

Réalisée dans les mêmes conditions et à la même concentration, l'analyse RMN de ces deux lots de composés n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives. En effet, comme nous pouvons l'observer sur la figure 43, les deux spectres sont superposables.

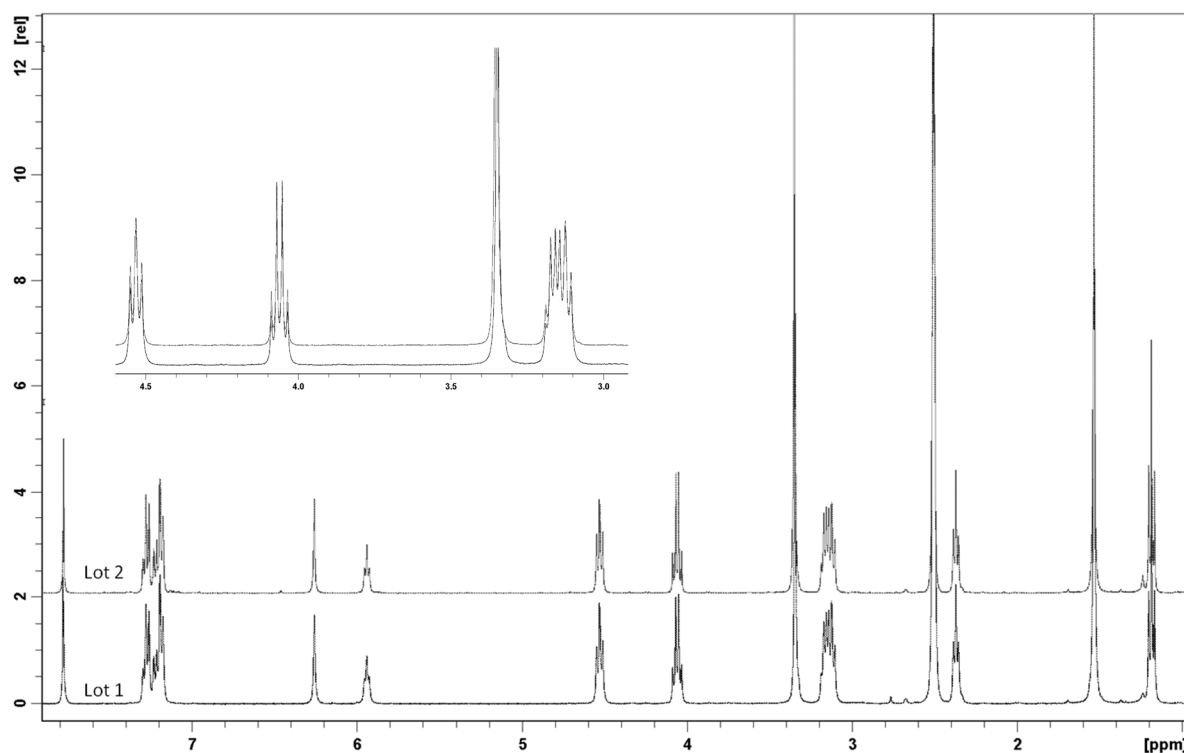


Figure 43 : Superposition des spectres RMN ^1H des deux lots de 60

Suite à cette constatation, les deux lots de composé ont été analysés par HPLC utilisant un gradient 10-100 % solvant B (70 % MeCN, 30 % H₂O, 0,09 % TFA). Cependant de façon similaire à l'analyse RMN, les deux chromatogrammes sont très comparables. En effet, comme nous pouvons le voir sur la figure 44, les deux lots du composé 60 sont purs à plus de 98 % (Figure 44).

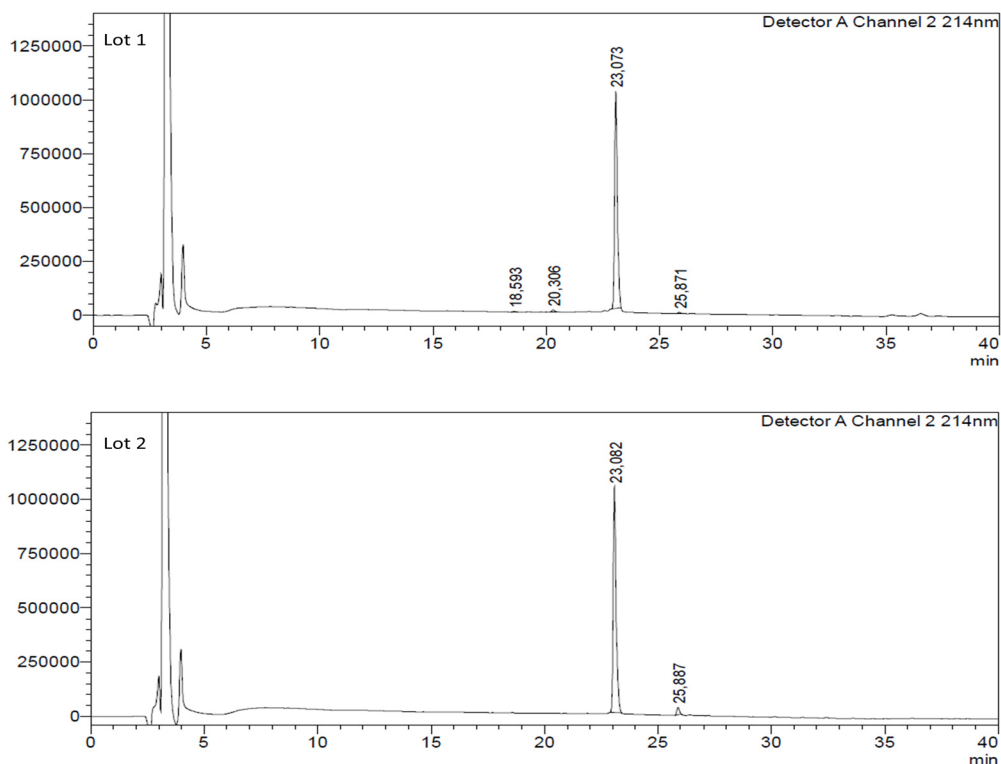


Figure 44: Spectres HPLC des deux lots de composé **60**

De la même façon, l'analyse infrarouge de ces deux composés n'a pas permis de mettre en avant des différences significatives.

Au vu de ces premiers résultats, les deux lots de composés ont alors été analysés par spectrométrie UV sur une gamme de longueurs d'ondes allant de 220 à 300 nm. Après normalisation de la concentration à 100 μ M, nous avons pu noter une différence dans les spectres de ces composés. En effet, sans qu'il s'agisse à première vue d'un problème d'agrégation (retour à la ligne de base similaire à 280 nm), nous pouvons observer un décalage de l'absorbance entre 240 et 270 nm (Figure 45).

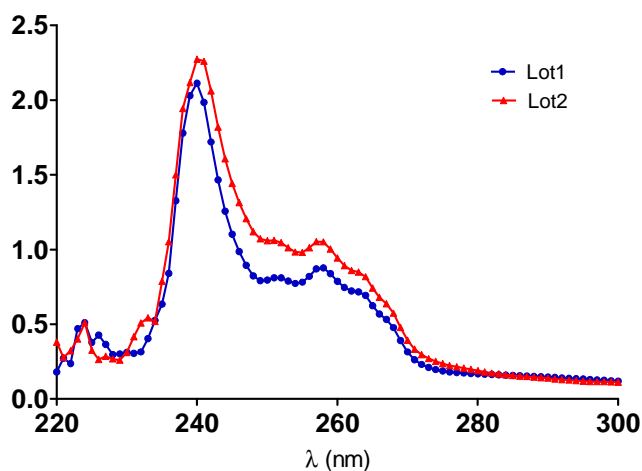


Figure 45 : Spectres UV des deux lots de composé **60**

Bien que cette méthode ne nous permette pas de conclure sur la cause de la différence, ce résultat nous a confortés dans l'idée de poursuivre l'analyse comparative de ces deux lots de composés.

Nous avons alors comparé les points de fusion de ces deux molécules. Mesurés sur un appareil Stuart SMP3, le point de fusion du premier lot de **60** est de 75°C tandis que pour le second nous avons mesuré 86°C. Une baisse de température de fusion étant généralement associée à une diminution de la pureté, ce résultat nous a alors conduit à conclure que le premier lot était moins pur que le second et que donc l'activité observée pourrait être due à la présence de l'impureté.

Nous nous sommes alors repenchés sur notre voie de synthèse et sachant que d'après les différentes analyses il ne s'agissait à priori pas d'impureté organique, nous avons alors émis l'hypothèse que cette impureté pourrait être du cuivre résiduel provenant de l'étape de chimie click.

L'analyse approfondie du spectre de masse (obtenu par electrospray) nous a effectivement permis de mettre en évidence des traces de cuivre dans le premier lot de composé **60**. Bien que peu intense, nous pouvons observer sur ce spectre deux pics correspondants d'une part à l'adduit [1 molécule + Cu] et d'autre part à l'adduit [2 molécules + Cu] (Figure 46).

La comparaison, par exemple dans le cas de l'adduit [1 molécule + Cu], du spectre théorique et de celui obtenu nous permet bien de valider notre hypothèse.

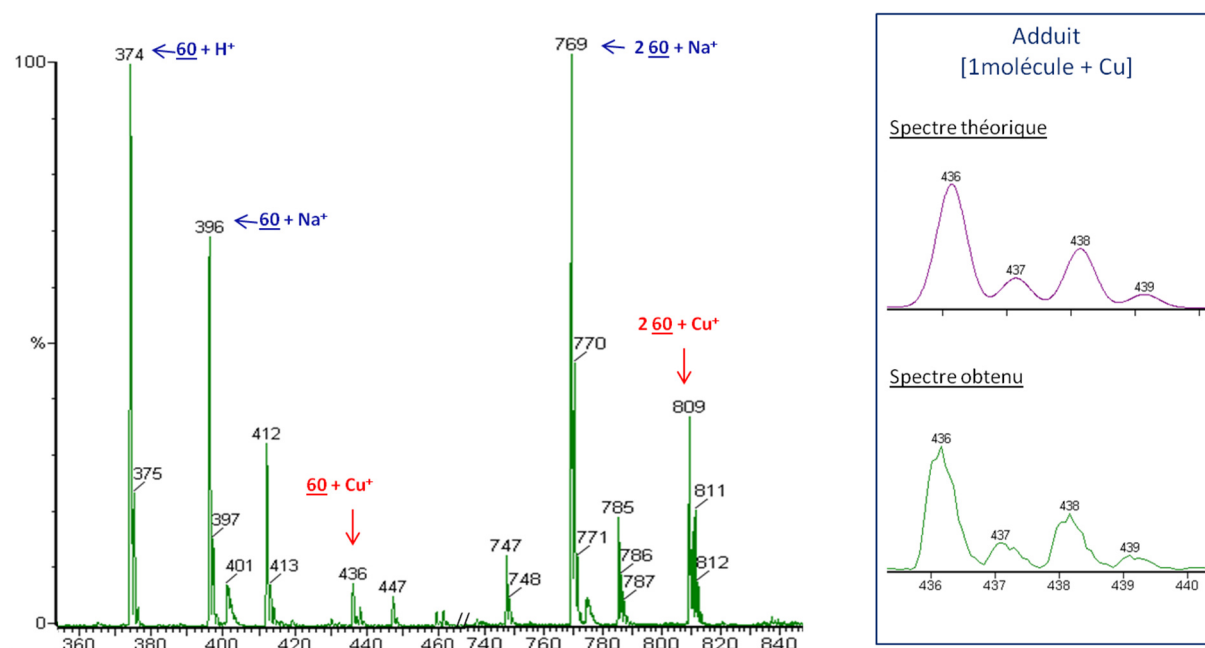


Figure 46 : Spectre de masse du Lot1 (actif) de composé **60** présentant des traces de cuivre

La présence de cuivre dans notre échantillon 1 malgré l'étape de purification sur colonne de silice pourrait s'expliquer par la structure du composé capable de chélater l'ion métallique (Figure 47). En effet, notre molécule est composée de nombreux hétéroatomes pouvant chélater le métal ainsi que d'un cycle benzène pouvant lier le métal via une interaction cation - π par exemple.

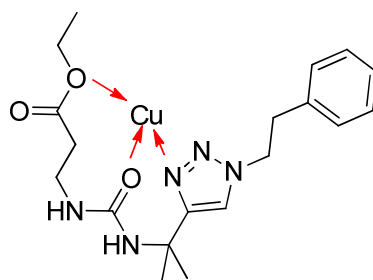


Figure 47 : Exemple de chélation de l'atome de cuivre par le composé **60**

3. Activité du cuivre résiduel

Ayant mis en évidence la présence de cuivre dans le premier lot de composé **60**, nous avons alors souhaité vérifier que ce métal était bien à l'origine de l'activité observée en ELISA. Pour cela, différentes expériences ont été réalisées sur le test de déplacement VEGFR1-ECD.

Dans un premier temps nous nous sommes intéressés au lot actif de composé **60**, à savoir le premier obtenu. Après avoir vérifié que l'EDTA n'avait pas d'effet sur l'interaction VEGF/VEGFR1 dans notre test (Figure 48-A), l'activité de ce premier lot de composé a été évaluée en présence d'EDTA. Le cuivre étant utilisé en quantité catalytique dans notre voie de synthèse, 0,1 équivalent d'EDTA a été additionné. Comme représenté sur la figure 48-B, en présence d'EDTA nous pouvons observer une perte totale de l'activité du composé. L'EDTA étant un ligand hexadente possédant un fort pouvoir chélatant, ce résultat nous a donc confortés dans l'idée que le cuivre résiduel présent dans notre échantillon était à l'origine de l'activité observée.

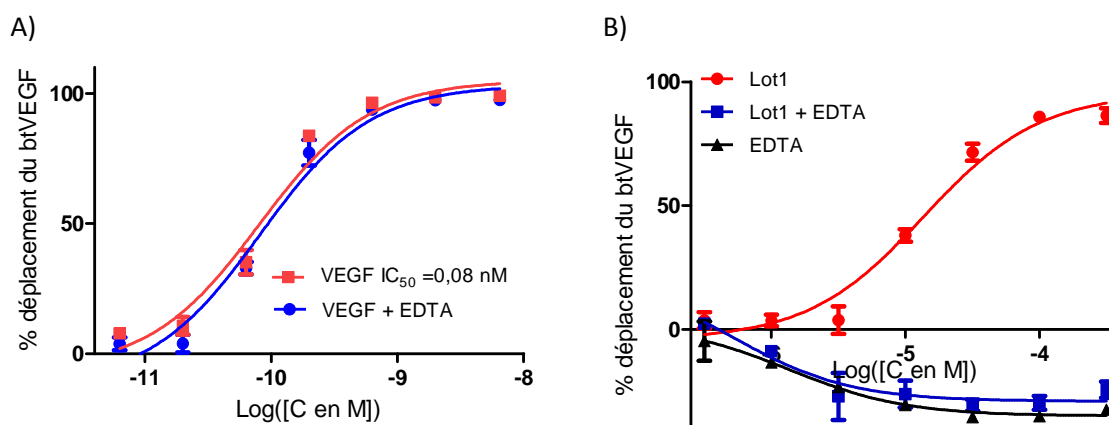


Figure 48 : Evaluation de l'activité de **60** en présence d'EDTA sur le test VEGFR1-ECD

Afin de vérifier notre hypothèse, nous nous sommes ensuite intéressé au deuxième lot de composé **60**. Bien que beaucoup moins actif, nous l'avons testé en présence d'EDTA et avons observé une perte totale d'activité (Figure 49-A). Nous avons ainsi pu conclure que, bien que non visible sur la structure cristallographique, il restait également dans ce lot des traces de cuivre.

Nous avons alors testé le lot 2 en présence de cuivre. Le cuivre utilisé dans notre voie de synthèse est du CuI, donc du cuivre avec un degré d'oxydation +I. Cependant, le test ELISA étant réalisé en milieu aqueux dans un tampon phosphate (PBS), du cuivre +I serait très rapidement oxydé pour fournir du cuivre +II. Pour cette raison, nous avons pré-incubé notre échantillon avec du cuivre +II sous forme CuSO_4 . Au vue de notre voie de synthèse, 0,1 équivalent de cuivre a été ajouté. A partir de cette solution, par dilutions successives, nous avons alors testé le mélange (Lot2 de **60** + 0,1 équivalent de CuSO_4) en effet dose sur le test VEGFR1-ECD. Dans ces conditions, nous avons ainsi observé un regain d'activité et obtenu une Cl_{50} de 2,9 μM [IC 95 % de 1,6 à 5,3 μM] (Figure 49-B).

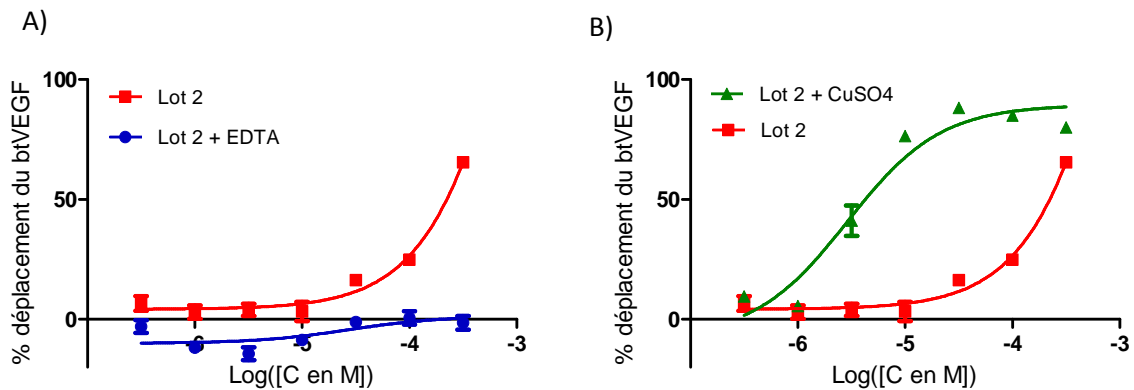


Figure 49 : Etude du deuxième lot de **60** en présence d'EDTA et de cuivre

Ces derniers résultats confirmant notre hypothèse, nous avons alors testé en effet dose le cuivre seul sous forme CuSO_4 sur notre test ELISA. Nous avons ainsi montré que sous cette forme il avait une Cl_{50} de 0,97 μM [IC 95 % de 0,63 à 1,49 μM] (Figure 50). Suite à ce résultat, et afin de confirmer la spécificité du cuivre sur l'interaction VEGF/VEGFR1, le même test ELISA a été réalisé en présence d'EDTA (1 équivalent). Dans ces conditions, CuSO_4 ne perturbe plus l'interaction du VEGF avec le récepteur. De plus, afin de vérifier qu'il n'y avait pas d'effet du contre ion, nous avons également testé en effet dose d'autres sels de cuivre dont CuCl_2 et $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, ainsi que le sel Na_2SO_4 . Contrairement au sel Na_2SO_4 , les deux sels de cuivre CuCl_2 et $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, se sont révélés aussi actifs que CuSO_4 , avec des Cl_{50} respectives de 1,26 μM [IC 95 % de 1,02 à 1,55] et 1,32 μM [IC 95 % de 0,90 à 1,94 μM]. Ces dernières expériences ont permis de montrer que le contre ion n'a pas d'effet et donc que c'est bien l'ion métallique Cu^{2+} qui est actif sur le test ELISA (Figure 50).

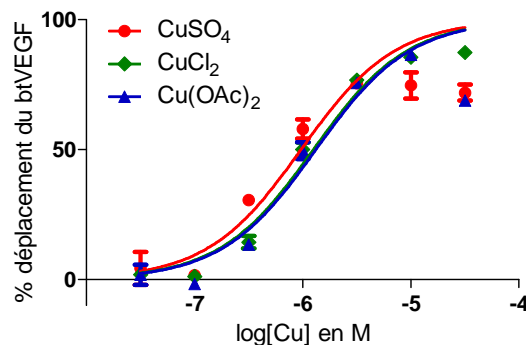


Figure 50 : Effet du cuivre sur le test de déplacement VEGFR1-ECD

De plus, le cuivre est connu pour avoir un effet sur la HRP (peroxidase de Raifort) ¹⁶³ ainsi qu'une activité catalytique sur la dismutation de l'eau oxygénée. Dans ce contexte et afin de s'assurer que l'effet observé était dû à l'inhibition de l'interaction VEGF/VEGFR1, différents contrôles ont été réalisés.

L'activité intrinsèque du cuivre a tout d'abord été contrôlée en solution. Rapportée au signal maximum généralement obtenu dans notre test ELISA, la comparaison du signal obtenu en présence de super signal seul ou de super signal et de cuivre (30 µM) nous a permis de conclure que, bien que faible, le cuivre possède une activité intrinsèque (signal maximum dans conditions classiques de test ELISA : > 500 000 ; signal super signal seul : 8 000 ; super signal + métal : 40 000 à 30 µM).

Suite à cette constatation, nous avons testé l'effet du métal sur le super signal en présence de récepteur. Pour cela, nous avons réalisé l'expérience en fixant, de façon classique, le récepteur (VEGFR1-ECD) dans une plaque 96 puits. Après blocage par de la BSA et incubation pendant 1h avec du cuivre (30 µM), nous avons ajouté le super signal. Dans ces conditions nous avons obtenu le même signal qu'en solution (40 000 à 30 µM) et conclut que la liaison du métal à la protéine n'avait pas d'effet sur son activité. Afin de se rapprocher au mieux des conditions de notre test ELISA, nous avons ensuite réalisé la même expérience mais en effectuant des lavages entre l'étape d'incubation du métal et l'ajout du super signal. Nous avons ainsi pu observer qu'après 4 lavages, l'activité du cuivre diminuait.

En conclusion, dans nos conditions ELISA (7 lavages après ajout du cuivre), l'activité intrinsèque de Cu²⁺ peut être considérée comme négligeable devant celle de la HRP.

Suite à ces expériences, nous avons ensuite évalué l'activité du cuivre sur la HRP. En solution, l'effet du cuivre a été testé en présence de super signal et de HRP. Sur une gamme de 30 µM à 0,03 µM, le cuivre (CuSO₄) n'exerce qu'une faible inhibition de l'activité de la HRP. En effet, à une concentration de 30 µM, le cuivre inhibe à 25 % la HRP et ce pourcentage décroît rapidement lorsque la concentration en cuivre diminue (Figure 51).

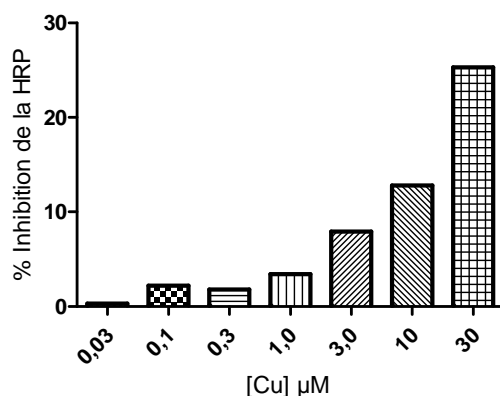


Figure 51 : Effet du cuivre sur la HRP en solution

¹⁶³ A. Mahmoudi, K. Nazari, N. Mohammadian, and A.A. Moosavi-Movahedi, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2003**, *104*, 81-94

Nous avons ainsi montré que le cuivre n'exerce qu'une faible activité catalytique intrinsèque ainsi qu'une inhibition très modérée de la HRP. Dans ces conditions, l'activité observée sur le test de déplacement du VEGFR1-ECD semble spécifique de l'inhibition de l'interaction VEGF/VEGFR1.

En conclusion, au travers de ces différentes expériences nous avons validé notre hypothèse et montré que l'activité observée pour le composé **60** est due à la présence de cuivre dans l'échantillon. De plus, nous avons ainsi découvert et montré que les ions Cu^{2+} ont un fort pouvoir inhibiteur de l'interaction VEGF/VEGFR1, avec une CI_{50} de $0,97 \mu\text{M}$ [IC 95 % de $0,63$ à $1,49 \mu\text{M}$].

VI. Fin du développement de petites molécules

Suite à l'étude du composé **60** et à la découverte de l'activité inhibitrice du cuivre sur l'interaction VEGF/VEGFR1, la plupart des molécules actives en ELISA a été testée en présence d'EDTA sur le test de déplacement VEGFR1-ECD.

Bien que les composés obtenus par chimie click de type thiophène soient peu actifs en ELISA, deux de ces molécules (**34** et **44**) ont été testées à $300 \mu\text{M}$ après pré-incubation avec $0,1$ équivalent d'EDTA. Dans ces conditions, nous avons observé une perte presque totale d'activité. Par conséquent, nous avons conclu que le peu d'activité de ces molécules était également du à la présence de cuivre. Au vu de l'activité des dérivés linéaires, en plus du composé **60**, deux autres dérivés (**58** et **59**) ont également été testés à $300 \mu\text{M}$ en présence de $0,1$ équivalent d'EDTA. Pour ces composés, en présence d'EDTA, nous avons observé une perte importante de l'activité sur notre test ELISA (Figure 52). Cependant, pour certaines molécules, nous n'avons pas observé un retour à 0% d'activité. Pour ces composés, des contrôles additionnels ont donc été effectués afin de voir si cette activité résiduelle était due au cuivre ou à la structure de la molécule. Deux à trois cycles de lavage à l'EDTA/purification sur colonne de silice ont alors été effectués. Après cette étape de re-purification et donc d'élimination de cuivre, ces composés ont été re-testés en ELISA. Dans ces conditions, ces molécules se sont avérées inactives. Nous avons ainsi pu conclure que l'activité résiduelle était due au cuivre et que donc ces dernières molécules avaient potentiellement une meilleure aptitude à chélater les ions cuivre.

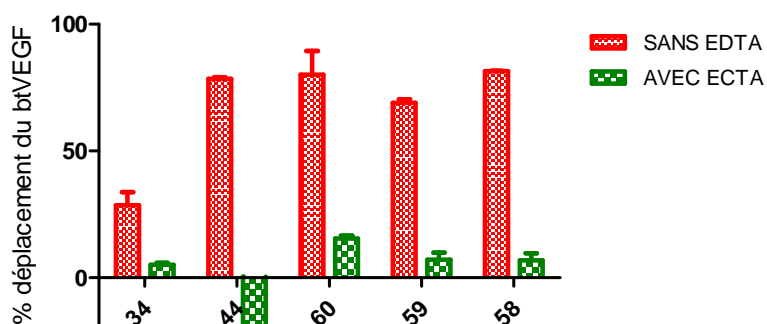


Figure 52 : Evaluation de l'activité en présence d'EDTA

En conclusion, l'activité de l'ensemble des molécules actives sur le test VEGFR1-ECD est en réalité due à la présence de cuivre dans nos échantillons. Ces composés ayant été purifiés de la même façon, la différence d'activité entre ces analogues du composé sr 4321 pourrait donc être expliquée par la différence de pouvoir chélatant des ces composés.

Dans ce contexte, la différence d'activité entre les dérivés thiophènes et linéaires pourrait être due au fait que les composés linéaires sont plus flexibles et donc sûrement plus à même de complexer le métal. De plus, au sein de la série thiophène, la différence d'activité entre les régioisomères pourrait être la conséquence de la présence ou non d'interactions S...O. En effet, les interactions de type 1,4 et 1,5 S...O induisent des différences structurales importantes pouvant peut-être expliquer la différence de capacité à chélater le cuivre.

Suite à ces résultats ainsi qu'à l'avancement de notre étude sur le composé sr 4321, le développement de petites molécules antagonistes du VEGFR1 a donc été suspendu.

VII. Conclusion

Suite à la découverte du composé sr 4321, par criblage *in silico* de la banque de composé du CERMN, nous avons souhaité développer de nouveaux inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR1.

Pour cela une nouvelle voie de synthèse a été mise au point. Bien que présentant de nombreux avantages par rapport à celle développée au CERMN, une limitation de notre voie de synthèse est vite apparue et a fait l'objet d'une étude méthodologique.

Afin d'initier une étude de Relation Structure-Activité, le composé sr 4321 a été re-synthétisé selon notre schéma réactionnel. Cependant, contrairement au composé du CERMN, notre molécule s'est avérée inactive sur le test de déplacement VEGFR1-ECD. Suite à une analyse comparative de ces deux lots de composés, nous avons mis en évidence que la molécule du CERMN était moins pure que la notre. Bien que nous n'ayons pu déterminer la nature exacte des impuretés, nous avons cependant mis en évidence que l'activité observée sur notre test de déplacement n'était pas due à proprement parler aux impuretés. Nous avons montré que ces impuretés n'interagissent à priori pas directement avec le récepteur, mais que par contre elles ont un effet sur la molécule sr 4321. En effet, alors que pur, le composé ne peut se lier au récepteur, en présence d'impureté(s) il est capable de se fixer au VEGFR1 et de perturber l'interaction VEGF/VEGFR1.

En parallèle de cette étude sur le composé sr 4321, le développement de nouveaux analogues de cette molécule a été entrepris. Par réaction de chimie click catalysée au cuivre nous avons obtenu des composés semblant bloquer la fixation du btVEGF sur le récepteur. Cependant, l'analyse approfondie de ces composés nous a conduits à découvrir que la capacité de ces molécules à bloquer *in vitro* l'interaction VEGF/VEGFR1 était en réalité due à la présence de cuivre résiduelle provenant de notre voie de synthèse.

Au cours de cette première approche, les principales limitations rencontrées ont donc été des problèmes de reproductibilité et de faux positifs. Ceci met donc l'accent sur l'importance de bien

connaître les molécules testées ainsi que les voies de synthèses utilisées afin de pouvoir réaliser les contrôles adéquats lors de l'évaluation *in vitro* de l'activité et ainsi distinguer une réelle d'inhibition d'artefacts de liaison.

Suite aux résultats obtenus sur le composé sr 4321 ainsi qu'à la constatation que nous n'avions finalement pas obtenu de composé organique actif, le développement de petites molécules anti-angiogéniques a donc été suspendu. Cependant, bien que ce projet n'ait pas abouti, nous avons découvert que l'ion Cu^{2+} possède un fort pouvoir inhibiteur de l'interaction VEGF/VEGFR1 ($\text{CI}_{50} = 0,97 \mu\text{M}$). Sans que son mécanisme d'action ne soit complètement connu, il est décrit que le cuivre a un effet pro-angiogénique. Notre découverte pouvant présenter un début d'explication, nous avons alors poursuivi notre étude afin d'essayer d'élucider son mécanisme d'action et son implication dans le contrôle de l'angiogenèse. Cette étude est présentée dans le chapitre suivant.

ARTICLE 2

Thienopyrimidinedione Formation Versus Ester Hydrolysis from Ureido Carboxylic Acid Methyl Ester

Marie Reille-Seroussi, Raphaël Labruère, Nicolas Inguibert, Sylvain Broussy, Nathalie Gagey-Eilstein, Wang-Quing Liu, Michel Vidal, Florent Huguenot

Synthesis, **2013**, *45*, 479–490

Thienopyrimidinedione Formation Versus Ester Hydrolysis from Ureido Carboxylic Acid Methyl Ester

Marie Reille-Seroussi,^a Raphaël Labruère,^a Nicolas Inguibert,^b Sylvain Broussy,^a Nathalie Gagey-Eilstein,^a Wang-Qing Liu,^a Michel Vidal,^{*a,c} Florent Huguenot^{*a,d}

^a Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, CNRS UMR 8638, UFR Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 avenue de l'Observatoire, 75270 Paris cedex 06, France
Fax +33(1)43291403; E-mail: florent.huguenot@parisdescartes.fr

^b Université de Perpignan Via Domitia, Laboratoire de Chimie des Biomolécules, 52 avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan, France

^c UF de Pharmacocinétique et Pharmacochimie, AP-HP, Hôpital Cochin, 75014 Paris, France
E-mail: michel.vidal@parisdescartes.fr

^d Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UFR Biomédicale des Saints-Pères, 45 rue des Saints-Pères, 75270 Paris cedex 06, France

Received: 10.10.2012; Accepted after revision: 20.12.2012

Abstract: The basic hydrolysis of ureidothienyl carboxylic esters was found to depend on the substitution pattern of the ureido moiety. While various hindered substituents led to carboxylic acid formation, unhindered substituents preferentially resulted in a cyclization step, yielding thienopyrimidinedione derivatives.

Key words: carboxylic acids, esters, hydrolysis, heterocycles, steric hindrance

Among the broad range of available templates, heterocyclic scaffolds represent the most promising lead structures for the discovery of novel synthetic drugs. Our current work, focused on antitumor and anti-angiogenic therapies, has recently led to the identification of some thiophene derivatives as 'hits' for the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR1) binding interface (VEGFR1 plays a key role in angiogenesis, one of the hallmarks of cancer) through an *in silico* screening process (Figure 1).¹ These candidates could be divided into two chemical families: the (3-carboxy-2-ureido) thiophene family and the (2-carboxy-3-ureido) thiophene family.² We chose to study the ureido thiophene carboxylic acids because of their properties: indeed, these molecules exert various biological effects depending on their substitution pattern.³ As the compounds selected were sufficiently different from previously reported series, we hypothesized that this would preclude binding to targets already described. Furthermore, their selectivity for VEGFR could be adjusted by varying substituents in the ureido moiety.

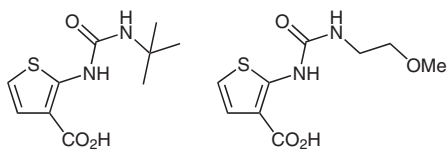


Figure 1 Selected 'hit' molecules

Keeping this in mind, we synthesized 2-ureido-3-carboxylic acid thiophene derivatives, which have also been described in the formation of thienopyrimidines and other analogues.⁴ Thienopyrimidinediones result from an unwanted cyclization process that occurs during the synthesis of 2-ureido-3-carboxylic acid thiophenes in the presence of an organic or inorganic base. However, substituted thienopyrimidinediones and derivatives, present in the core of many physiologically active agents, display interesting therapeutic properties. Such compounds have been shown to inhibit several enzymes as well as to modulate the activity of many receptors, and could be attractive scaffold molecules for anti-angiogenic therapy.⁵ Therefore, ester cleavage under acidic conditions is required to avoid cyclization when starting from *tert*-butyl carboxylic acid ester,⁶ but the thiophene derivative was not commercially available, and the transesterification reaction or *tert*-butyl ester formation starting from the acid is sensitive to decarboxylation reaction.⁷ Here, we describe factors that control the steric and electron withdrawal/donation properties of the thienopyrimidinedione cyclization step. We were interested in exploring this reaction and determining the rules that predict the cyclization, in particular the nature of the R substituent.

We wanted to synthesize the target molecules in large quantities for *in vivo* tests and animal assays, and also to assess the efficacy of the corresponding esters. The solubility of carboxyureido thiophenes being very limited, even in organic solvents such as DMSO or DMF, a small library of ureido carboxylic acid methyl esters were prepared from the corresponding amino esters **1**, available (Scheme 1) using a *phenyl oxy carbonyl* (POC) strategy, instead of using thiaisatoic anhydride ring opening.⁸ In accordance with the synthetic strategy shown in Scheme 2, carbamate **2** was prepared in large amounts by the condensation of phenyl chloroformate with methyl 2-amino-3-thiophenecarboxylic ester without the addition of a base, to avoid the release of the phenolate from the carbamate. Compound **2** was then converted into ureas **3a–n** by the substitution of the phenolate moiety by alkylamines, with moderate to good yields. Next, hydrolysis under

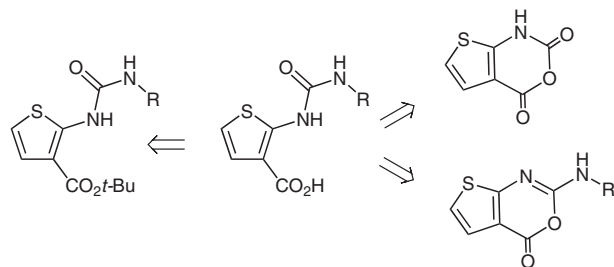
SYNTHESIS 2013, 45, 0479–0490

Advanced online publication: 17.01.2013

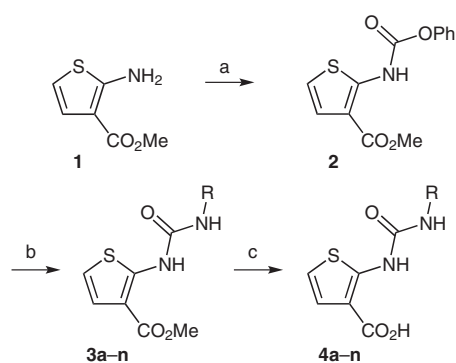
DOI: 10.1055/s-0032-1318100; Art ID: SS-2012-T0791-OP

© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

basic conditions was performed to yield the targeted carboxylic acids.



Scheme 1 Retrosynthetic strategy for 2-ureido-3-carboxylic acid thiophenes



Scheme 2 Strategy for the synthesis of ureido thiophenecarboxylic acids. *Reagents and conditions:* (a) PhCO_2Cl , THF, r.t., 24 h, 82%; (b) RNH_2 , Et_3N , CHCl_3 , reflux, 24 h, 60–91%; (c) (i) KOH (1 M), $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1), Δ , 2 h, (ii) concd HCl, 0–86%.

By using a refluxing solution of KOH in methanol, compound **3a**, in which R is a *tert*-butyl moiety, was entirely converted to the carboxylic acid **4a** in good yield, without a trace of the thienopyrimidinedione (Table 1, entry 1). Notably, refluxing the aqueous KOH (1 M) solution was necessary to hydrolyze the methyl carboxylic ester to the corresponding acid, the use of 1 M LiOH, NaOH, or KOH at room temperature for three days being ineffective.

At the outset, various linear aliphatic chains, branched chains, cyclic substituents, and aromatic rings were used. All compounds were prepared according to the procedure described for **4** and **5** (Table 1). For methyl-2-ureido-3-carboxylic acid esters **3a–n**, the steric size of the R substituent determined the ratio of pyrimidinedione to carboxylic acid: for ‘linear’ groups (e.g., in which CH_2 was bounded to NH), no traces of carboxylic acid was detected (Table 1, entries 9–14). Carboxylic acids were formed with more hindered substituents (Table 1, entries 1–6). A comparison of the cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, and cyclohexyl groups (Table 1, entries 7, 6, 5, and 4, respectively) showed that acid formation was clearly correlated with ring size. Indeed, larger substituents yielded a higher percentage of carboxylic acids. Unexpectedly,

Table 1 Hydrolysis of Methyl 2-Ureido-3-carboxylate Thiophenes

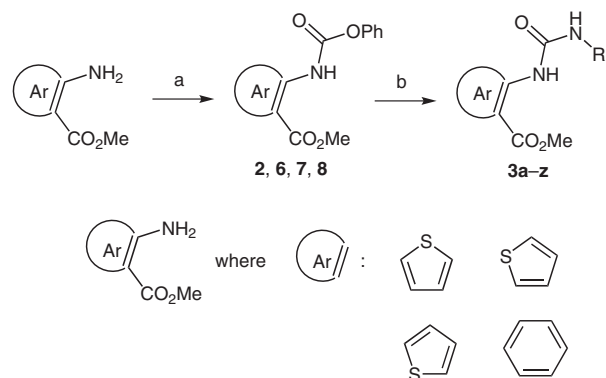
Entry	R	Ratio ^a 4/5	Yield (%) ^b
1	3a <i>t</i> -Bu	100:0	78
2	3b CH_2Et_2	100:0	79
3	3c <i>s</i> -Bu	100:0	82
4	3d <i>c</i> - C_6H_{11}	100:0	86
5	3e <i>c</i> - C_5H_9	85:15	70
6	3f <i>c</i> - C_4H_7	45:55	82
7	3g <i>c</i> - C_3H_5	0:100	72
8	3h Ph	0:100	80
9	3i $\text{CH}_2(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4)$	0:100	67
10	3j $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$	0:100	66
11	3k $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	0:100	71
12	3l $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$	0:100	78
13	3m $\text{CH}_2\text{CH}_2(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4)$	0:100	88
14	3n $\text{CH}_2\text{CH}_2(4\text{-MeOC}_6\text{H}_4)$	0:100	84

^a Determined by ^1H NMR analysis of the crude mixture.

^b Sum of **4** and **5** as isolated product.

when a phenyl substituent was linked to nitrogen, thienopyrimidinedione was the only product obtained in good yield (80%) (Table 1, entry 8), although the size of this substituent is comparable to that of the cyclohexyl group. As the first step of the cyclization process is the formation of an amide anion stabilized by the phenyl ring, this would favor the formation of the pyrimidinedione ring by attacking the ester moiety. Thus, ring formation is favored by unhindered or electron-withdrawing substituents at the ureido site.

Subsequently, the limitations of this steric effect were tested using methyl ureido arylcarboxylic esters containing different substituents (Table 2), in accordance with the strategy for the synthesis shown in Scheme 3. The thienopyrimidinedione/carboxylic acid ratio was affected by the size of the substituent for the all four series tested. In all cases, a *tert*-butyl substituent afforded the carboxylic acid derivative, whereas thienopyrimidinediones were obtained with the 4-nitrobenzyl [$\text{CH}_2(4\text{-O}_2\text{NC}_6\text{H}_4)$] substituent.



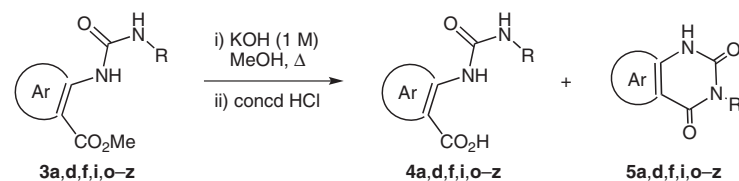
Scheme 3 Strategy for the synthesis of ureido thiophenecarboxylic acids. *Reagents and conditions:* (a) PhCO₂Cl, THF, r.t., 74–100%; (b) RNH₂, Et₃N, CHCl₃, reflux, 24 h, 24–91%.

For each thiophene series, the ratios of the resulting compounds were affected by the steric size of the substituent. The most bulky substituents yielded a high percentage of carboxylic acids. In general, linear alkyl substituents triggered cyclization to thienopyrimidinediones. When a phenyl core was involved, we never observed a mixture of thienopyrimidinediones and carboxylic acids. Except for very bulky groups, thienopyrimidinediones were preferentially formed (Table 2, entries 13–16). Interestingly, the relative position of the sulfur atom in the thiophene moiety of methyl ureidocarboxylate has a strong influence on

the cyclization reaction. For example, three different ratios were obtained with the cyclobutyl substituent. Only carboxylic acid **4q** was obtained when starting from **3q** (Table 2, entry 7), whereas a mixture of thienopyrimidinediones and carboxylic acids were obtained from **3f** and **3u** (Table 2, entries 3 and 11).

In all cases, refluxing was required to obtain the conversion of esters, indicating that the hydroxide anion was not sufficiently nucleophilic to be added directly to the carbonyl of the ester, at room temperature. The reaction medium displayed a yellow color only with the deprotonation of nitrogen of the urea group, this species being stabilized by the conjugation of the electron pair with the aromatic ring and the carbonyl of the urea. Taking into account the addition of the amide carbonyl group of the ester, the first factor affecting carboxylic acid formation is the steric hindrance asserted by the R substituent (Scheme 4). It is possible that the carboxylic acid is formed by the ring opening of the thienoxazinone (benzoxazinone, respectively to the benzene core) by the hydroxide anion. An additional effect that promotes cyclization can be seen with the 3-ureido-2-carboxythiophene core and is due to the electron-withdrawing and inductive effect of sulfur, which increases the electrophilicity of the carbonyl group of the carboxylic ester. In these structures, the propagation of the inductive effect occurs when the sulfur atom is closest to the carbonyl group.

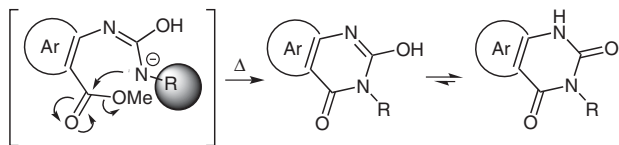
Table 2 Hydrolysis of Methyl Aryl-2-ureido-3-carboxylates



Entry	Ar	R	Ratio ^a 4/5	Yield (%) ^b	
1		<i>t</i> -Bu	4a/5a	100:0	78
2		<i>c</i> -C ₆ H ₁₁	4d/5d	100:0	86
3		<i>c</i> -C ₄ H ₇	4f/5f	45:55	82
4		CH ₂ (4-O ₂ NC ₆ H ₄)	4i/5i	0:100	67
5		<i>t</i> -Bu	4o/5o	100:0	75
6		<i>c</i> -C ₆ H ₁₁	4p/5p	100:0	79
7		<i>c</i> -C ₄ H ₇	4q/5q	100:0	64
8		CH ₂ (4-O ₂ NC ₆ H ₄)	4r/5r	0:100	81
9		<i>t</i> -Bu	4s/5s	100:0	80
10		<i>c</i> -C ₆ H ₁₁	4t/5t	67:33	81
11		<i>c</i> -C ₄ H ₇	4u/5u	28:72	76
12		CH ₂ (4-O ₂ NC ₆ H ₄)	4v/5v	0:100	72
13		<i>t</i> -Bu	4w/5w	100:0	71
14		<i>c</i> -C ₆ H ₁₁	4x/5x	10:90	96
15		<i>c</i> -C ₄ H ₇	4y/5y	0:100	63
16		CH ₂ (4-O ₂ NC ₆ H ₄)	4z/5z	0:100	90

^a Determined by ¹H NMR analysis of the crude mixture.

^b Sum of **4** and **5** as isolated product.



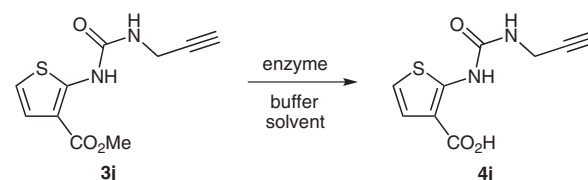
Scheme 4 Plausible mechanism of thienopyrimidinedione **5** formation

An additional factor influencing the process is an intramolecular nonbonded [1,4]-type S \cdots O interaction, pinpointed in several thiophene and thiazole derivatives.⁹ This interaction would promote the addition of nitrogen by increasing the electrophilicity of the carbonyl group and the rotation of the ester group to more easily attain the Bürgi–Dunitz angle. The nonbonded intramolecular [1,5]-type S \cdots O interaction in the 2-ureidothiophene structure could explain the difference in reactivity of **3f** when compared to **3q**. After deprotonation, the excess negative charge would deter nonbonded interaction and promote the rotation of the urea group to allow the cyclization process. In the absence of this nonbonded interaction (for **3o–q**), the energy required for the rotation would favor the hydrolysis of the ester to the corresponding carboxylic acid.

To overcome the cyclization process, the possibility using an enzymatic reaction was checked. For the most chemically sensitive compound **3j**, which is also the most attractive from the point of view of an easy access to structural diversity via click chemistry, a rapid screening of proteolytic enzymes was carried out (Table 3). We used enzymes frequently described for their hydrolytic activity towards esters. Subtilisin, lipase A and *horse pancreatic lipase* are serine proteases/esterases and act via an acylation-deacylation mechanism. Moreover, these enzymes have already permitted the hydrolysis of some methyl esters.¹⁰ Pig liver esterase (PLE) was the most effective enzyme for the full conversion of the ester to the carboxylic acid **4j** (Table 3, entry 7): no trace of thienopyrimidinedione formation was observed by ¹H NMR analysis of the crude reaction mixture. It is also worth noting that the other enzymes were incapable of converting **3j** to **4j**, although this was theoretically feasible based on results with benzoxazinones.¹¹ The first problem that we faced was finding a suitable solvent in which ester **3j** was soluble and that would not undermine the activity of the enzyme. The best compromise was the use of a phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 10% DMSO. At higher concentrations of DMSO, PLE was found to be denatured. When the reaction was performed on a larger scale with the same amount of enzyme, the yield dropped rapidly (Table 3, entry 8); the conversion was complete because of the formation of compound **5j** due to the basicity of the buffer.

In summary, we have studied the basic hydrolysis of aromatic ureido carboxylate derivatives. The nature of the aromatic ring affected the cyclization reaction leading to the production of thienopyrimidinediones. For the same aromatic ring, the nature of the substituted urea moiety deter-

Table 3 Enzymatic Hydrolysis of **3j**



Entry	Enzyme	Conditions	Yield (%)	Conv
1	Subtilisin	cyclohexane–MeOH, PBS (0.1 M)	–	0
2	Subtilisin	PBS–DMSO (9:1)	–	0
3	PLAP ^a	PBS–DMSO (9:1)	–	0
4	PLAP	PBS–DMSO (3:1)	–	0
5	CalA ^b	PBS–DMSO (9:1)	–	0
6	HPL ^c	PBS–DMSO (9:1)	–	0
7	PLE ^d	PBS–DMSO (9:1)	92 ^e	100%
8	PLE	PBS–DMSO (9:1)	52 ^f	100%
8	PLE	PBS–CHCl ₃ (3:2)	–	0
9	PLE	PBS–toluene (2:1)	–	0

^a Pig liver acetone powder.

^b Lipase A from the yeast *Candida antarctica*.

^c Horse pancreatic lipase.

^d Pig liver esterase.

^e Reaction performed with 30 mg of **3j**.

^f Reaction performed with 500 mg of **3j**.

mined the relative proportion of carboxylic acid and thienopyrimidinedione produced. Bulky substituents yielded higher percentages of carboxylic acids, while less hindered substituents or electron-withdrawing substituents promoted thienopyrimidinedione formation. We are continuing our study on the hydrolysis catalyzed by enzymes, in particular regarding the identification of a given compound as a substrate for an enzyme.

Reagent grade solvents (SDS-Carlo Erba), alkyne reagents (Alfa Aesar), NMR solvents (Eurisotop), and all other reagents (Aldrich, Fluka, Acros) were purchased ready to use. Organic solutions were concentrated under vacuum using a Büchi rotary evaporator. Chromatographic purification of products was carried out using 32–64 mesh silica gel. TLC was performed on 0.25 mm silica gel 60-F plates (EM reagents). The developed chromatogram was visualized by fluorescence. IR spectra were recorded on a Nicolet 510FT-IR. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer (250, 300, 400, 500 MHz and 63, 75, 100, 125 MHz, respectively), and were internally referenced to residual protonated solvent signals. Data for ¹H NMR are reported as follows: chemical shift (δ ppm), multiplicity (standard abbreviations were used to indicate the spin multiplicities), coupling constant (Hz), integration. Data for ¹³C NMR are reported in terms of the chemical shift. Assignments shown as C⁴ refer to quaternary carbons. Melting points were determined with a Köfler apparatus or were measured on a Stuart SMP3 melting point apparatus and are uncorrected. Mass spectrometry spectra were recorded on a Waters ZQ 2000 spectrometer. High-

resolution mass spectra were recorded on a Bruker MicrO-Tof-Q 2 spectrometer at the CRMPO (Rennes, France).

Carbamates **2**, **6**, **7**, **8**; General Procedure

To a stirred solution of the appropriate aromatic amine (2.0 mmol) in THF (10 mL) was added phenyl chloroformate (251 μL , 2.0 mmol) in one portion. The reaction mixture was stirred at r.t. until complete consumption of starting materials as monitored by TLC (eluent: cyclohexane–EtOAc 5:1), then diluted with H_2O (20 mL) and EtOAc (10 mL). The combined organic extracts were washed with brine (20 mL), dried (MgSO_4), and evaporated to dryness under reduce pressure. The products were purified by column chromatography on silica gel using cyclohexane–EtOAc (5:1) as eluent.

Methyl 2-[(Phenoxy-carbonyl)amino]thiophene-3-carboxylate (**2**)

Yield: 600 mg (quant); white solid; mp 126–127 °C.

IR (neat): 3286, 2953, 2923, 1740, 1680, 1554, 1491, 1441, 1253, 1208, 1191 cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 3.93 (s, 3 H, CH_3), 6.76 (d, $^3J_{\text{HH}}$ = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.2–7.3 (m, 4 H, CH_{Ar}), 7.43 (m, 2 H, CH_{Ar}), 10.47 (br, 1 H, NH).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ = 51.7 (CH_3), 112.4 (C^4), 115.6 (CH), 121.3 ($2 \times \text{CH}$), 124.3 (CH), 126.1 (CH), 129.5 ($2 \times \text{CH}$), 150.1 (C^4), 150.4 (C^4), 151.4 (C^4), 165.7 (C^4).

MS (ESI+): m/z = 300 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Methyl 4-[(Phenoxy-carbonyl)amino]thiophene-3-carboxylate (**6**)

Yield: 570 mg (95%); white solid; mp 93–94 °C.

IR (neat): 3312, 2953, 1754, 1674, 1578, 1282, 1186 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 3.94 (s, 3 H, CH_3), 7.2–7.3 (m, 3 H, CH_{Ar}), 7.4–7.5 (m, 2 H, CH_{Ar}), 7.68 (d, J = 3.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.08 (d, J = 3.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.70 (s, 1 H, NH).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 51.8 (CH_3), 108.3 (C^4), 121.1 (CH), 121.4 ($2 \times \text{CH}$), 125.5 (CH), 129.2 ($2 \times \text{CH}$), 132.6 (CH), 136.0 (C^4), 150.4 (C^4), 151.6 (C^4), 163.9 (C^4).

MS (ESI+): m/z = 300 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Methyl 3-[(Phenoxy-carbonyl)amino]thiophene-2-carboxylate (**7**)

Yield: 570 mg (95%); white solid; mp 117–118 °C.

IR (neat): 3340, 2953, 1742, 1693, 1529, 1255, 1200 cm^{-1} .

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 3.92 (s, 3 H, CH_3), 7.2–7.3 (m, 3 H, CH_{Ar}), 7.3–7.4 (m, 2 H, CH_{Ar}), 7.48 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.90 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.88 (br, 1 H, NH).

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3): δ = 51.9 (CH_3), 109.5 (C^4), 121.1 (CH_{Ar}), 121.4 (CH_{Ar}), 125.7 (CH_{Ar}), 129.3 (CH_{Ar}), 131.7 (CH_{Ar}), 144.3 (C^4), 150.4 (C^4), 151.2 (C^4), 164.4 (C^4).

MS (ESI+): m/z = 316 [$\text{M} + \text{K}$] $^+$.

Methyl 2-[(Phenoxy-carbonyl)amino]benzoate (**8**)

Yield: 436 mg (74%); white solid; mp 101–102 °C.

IR (neat): 3268, 2953, 1756, 1695, 1588, 1528, 1267, 1190 cm^{-1} .

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 3.96 (s, 3 H, CH_3), 7.08 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.2–7.3 (m, 3 H, CH_{Ar}), 7.3–7.5 (m, 2 H, CH_{Ar}), 7.56 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.06 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.46 (d, J = 8.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.91 (br, 1 H, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 52.4 (CH_3), 114.9 (C^4), 118.9 (CH), 121.7 (CH), 122.1 (CH), 125.6 (CH), 129.3 (CH), 130.9 (CH), 134.7 (CH), 141.3 (C^4), 150.5 (C^4), 151.8 (C^4), 168.6 (C^4).

MS (ESI+): m/z = 294 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Ureas **3a–z**; General Procedure

A mixture of carbamate **2** (277 mg, 1.0 mmol), Et_3N (418 μL , 3.0 mmol), and the selected amine (1.3 mmol) in CHCl_3 (10 mL) was refluxed for 24 h. The cooled reaction mixture was diluted with CHCl_3 (10 mL) and washed with sat. aq. NaHCO_3 (20 mL) and brine (20 mL). The organic phase was dried (MgSO_4) and evaporated to dryness. Purification by flash chromatography (3:1 cyclohexane–EtOAc) gave the respective pure product.

Methyl 2-[(*tert*-Butylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylate (**3a**)

Yield: 218 mg (78%); yellowish solid; mp 178–179 °C.

IR (neat): 3335, 2966, 1660, 1537, 1502, 1245, 1209 cm^{-1} .

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 1.38 (s, 9 H), 3.79 (s, 3 H), 5.30 (br, 1 H), 6.54 (d, J = 5.8 Hz, 1 H), 7.08 (d, J = 5.8 Hz, 1 H), 10.09 (br, 1 H, NH).

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3): δ = 29.2 ($3 \times \text{CH}_3$), 51.4 (C^4), 51.5 (CH_3), 109.7 (C^4), 114.2 (CH), 123.4 (CH), 152.3 (C^4), 152.5 (C^4), 166.3 (C^4).

MS (ESI+): m/z = 279 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Methyl 2-[(Pentan-3-ylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylate (**3b**)

Yield: 231 mg (79%); white solid; mp 137–138 °C.

IR (neat): 3303, 3246, 2965, 1690, 1645, 1537, 1229 cm^{-1} .

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 0.94 (t, J = 7.5 Hz, 6 H, CH_3), 1.44 (m, 2 H, CH_2), 1.64 (m, 2 H, CH_2), 3.63 (m, 1 H, CH), 3.86 (s, 3 H, CH_3), 4.54 (d, J = 10.0 Hz, 1 H, NH), 6.59 (d, J = 6.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.12 (d, J = 6.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.24 (br, 1 H, NH).

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3): δ = 10.2 (CH_3), 27.6 (CH_2), 051.4 (CH_3), 53.9 (CH), 109.7 (C^4), 114.3 (CH), 123.4 (CH), 152.4 (C^4), 153.8 (C^4), 166.3 (C^4).

MS (ESI+): m/z = 293 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Methyl 2-[(Butan-2-ylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylate (**3c**)

Yield: 229 mg (82%); white solid; mp 157–158 °C.

IR (neat): 3310, 3249, 2965, 1689, 1647, 1546, 1233 cm^{-1} .

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 0.95 (t, J = 7.5 Hz, 3 H, CH_3), 1.20 (d, J = 6.5 Hz, 3 H, CH_3), 1.53 (quint, J = 7.5 Hz, 2 H, CH_2), 3.80 (m, 1 H, CH), 3.86 (s, 3 H, CH_3), 4.64 (br, 1 H, NH), 6.59 (d, J = 6.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.12 (d, J = 6.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.22 (br, 1 H, NH).

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3): δ = 10.3 (CH_3), 20.6 (CH_3), 29.8 (CH_2), 48.1 (CH), 51.3 (CH_3), 109.6 (C^4), 114.2 (CH), 123.4 (CH), 152.2 (C^4), 153.2 (C^4), 166.1 (C^4).

MS (ESI+): m/z = 279 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Methyl 2-[(Cyclohexylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylate (**3d**)

Yield: 262 mg (86%); yellowish solid; mp 165–166 °C.

IR (neat): 3294, 2930, 2853, 1652, 1538, 1233 cm^{-1} .

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ = 1.2–1.4 (m, 4 H), 1.5–1.8 (m, 4 H), 2.05 (m, 2 H), 3.58 (m, 1 H), 3.87 (s, 3 H, CH_3), 4.80 (d, J = 6.9 Hz, 1 H, NH), 6.60 (d, J = 5.81 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.13 (d, J = 5.8 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 11.0 (br, 1 H).

^{13}C NMR (63 MHz, CDCl_3): δ = 24.7 ($2 \times \text{CH}_2$), 25.4 (CH_2), 33.4 ($2 \times \text{CH}_2$), 49.7 (CH), 51.4 (CH_3), 109.7 (C^4), 114.4 (CH), 123.4 (CH), 152.3 (C^4), 152.8 (C^4), 166.3 (C^4).

MS (ESI+): m/z = 305 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

Methyl 2-[(Cyclopentylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylate (**3e**)

Yield: 204 mg (70%); white solid; mp 171–172 °C.

IR (neat): 3303, 2952, 2870, 1677, 1651, 1538, 1236 cm^{-1} .

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.4–1.8 (m, 6 H, CH₂), 2.04 (m, 2 H, CH₂), 3.86 (s, 3 H, CH₃), 4.13 (m, 1 H, CH), 4.81 (br, 1 H, NH), 6.59 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.12 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.26 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 23.6 (CH₂), 33.3 (CH₂), 51.4 (CH₃), 52.5 (CH), 109.8 (C⁴), 114.4 (CH), 123.4 (CH), 152.2 (C⁴), 153.4 (C⁴), 166.2 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 291 [M + Na]⁺.

Methyl 2-[(Cyclobutylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylate (3f)

Yield: 207 mg (82%); white solid; mp 173–174 °C.

IR (neat): 3303, 2950, 1682, 1649, 1542, 1235 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.7–1.9 (m, 2 H, CH₂), 1.9–2.0 (m, 2 H, CH₂), 2.43 (m, 2 H, CH₂), 3.85 (s, 3 H, CH₃), 4.26 (m, 1 H, CH), 5.24 (br, 1 H, NH), 6.59 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.12 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.22 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 14.9 (CH₂), 31.2 (CH₂), 46.0 (CH), 51.5 (CH₃), 110.1 (C⁴), 114.6 (CH), 123.5 (CH), 152.1 (C⁴), 152.6 (C⁴), 166.4 (C⁴).

MS (ESI-): *m/z* = 253 [M – H]⁻.

Methyl 2-[(Cyclopropylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylate (3g)

Yield: 190 mg (72%); white solid; mp 158–159 °C.

IR (neat): 3338, 3284, 2952, 2921, 1673, 1547, 1440, 1239 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.7–1.9 (m, 2 H, CH₂), 1.9–2.0 (m, 2 H, CH₂), 2.43 (m, 1 H, CH₂), 3.85 (s, 3 H, CH₃), 4.26 (m, 1 H, CH), 5.24 (br, 1 H, NH), 6.59 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.12 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.22 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 7.7 (CH₂), 22.5 (CH), 51.5 (CH₃), 110.8 (C⁴), 114.8 (CH), 123.6 (CH), 151.6 (C⁴), 155.0 (C⁴), 166.2 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 263 [M + Na]⁺.

Methyl 2-[(Phenylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylate (3h)

Yield: 240 mg (80%); yellowish solid; mp 130–131 °C.

IR (neat): 3291, 2952, 1668, 1600, 1542, 1498, 1228 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.85 (s, 3 H), 6.67 (d, ³*J*_{H,H} = 5.8 Hz, 1 H, CH), 6.97 (br, 1 H, NH), 7.17 (m, 2 H), 7.3–7.5 (m, 4 H), 10.51 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 51.5 (CH₃), 110.7 (C⁴), 114.9 (CH), 121.1 (2 × CH), 123.7 (CH), 124.5 (CH), 129.1 (2 × CH), 137.3 (C⁴), 151.2 (C⁴), 151.8 (C⁴), 166.0 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 299 [M + Na]⁺.

Methyl 2-[(4-Nitrobenzyl)carbamoyl]amino}thiophene-3-carboxylate (3i)

Yield: 224 mg (67%); yellow solid; mp 175–176 °C.

IR (neat): 3318, 2977, 2921, 1669, 1545, 1522, 1240 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.84 (s, 3 H, CH₃), 4.62 (d, *J* = 5.7 Hz, 2 H, CH₂), 5.54 (t, *J* = 5.7 Hz, 1 H, NH), 6.63 (d, *J* = 6.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.13 (d, *J* = 6.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.50 (d, *J* = 10.0 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 8.20 (d, *J* = 10.0 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 10.39 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 43.8 (CH₂), 51.5 (CH₃), 110.4 (C⁴), 114.7 (CH_{Ar}), 123.6 (CH_{Ar}), 123.9 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 145.8 (C⁴), 147.3 (C⁴), 151.6 (C⁴), 153.5 (C⁴), 166.3 (C⁴).

MS (ESI-): *m/z* = 334 [M – H]⁻.

Methyl 2-[(Prop-2-yn-1-ylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylate (3j)

Yield: 172 mg (66%); white solid; mp 128–129 °C.

IR (neat): 3293, 2952, 2921, 1661, 1543, 1240 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 2.25 (t, *J* = 2.5 Hz, 1 H, ≡CH), 3.83 (s, 3 H, CH₃), 4.12 (dd, *J* = 6.0, 2.5 Hz, 2 H, CH₂), 5.82 (t, *J* = 6.0 Hz, 1 H, NH), 6.60 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.10 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.32 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 30.3 (CH₂), 51.5 (CH₃), 71.9 (≡CH), 79.4 (C⁴), 110.4 (C⁴), 114.7 (CH_{Ar}), 123.5 (CH_{Ar}), 151.7 (C⁴), 163.8 (C⁴), 165.6 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 261 [M + Na]⁺.

Methyl 2-[(2-Hydroxyethyl)carbamoyl]amino}thiophene-3-carboxylate (3k)

Yield: 190 mg (71%); white solid; mp 164–165 °C.

IR (neat): 2972, 2906, 1667, 1545, 1240 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.17 (q, *J* = 5.5 Hz, 2 H, CH₂), 3.45 (q, *J* = 5.5 Hz, 2 H, CH₂), 3.80 (s, 3 H, CH₃), 4.73 (t, *J* = 5.5 Hz, 1 H, OH), 6.77 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.05 (d, ³*J*_{H,H} = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.99 (t, *J* = 5.5 Hz, 1 H, NH), 10.75 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CD₃OD): δ = 43.6 (CH₂), 51.8 (CH₃), 61.9 (CH₂), 111.3 (C⁴), 115.4 (CH_{Ar}), 124.8 (CH_{Ar}), 152.8 (C⁴), 156.2 (C⁴), 166.9 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 267 [M + Na]⁺.

Methyl 2-[(2-Cyanoethyl)carbamoyl]amino}thiophene-3-carboxylate (3l)

Yield: 215 mg (78%); white solid; mp 155 °C.

IR (neat): 3335, 2952, 1673, 1543, 1240 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.72 (t, ³*J*_{H,H} = 6.0 Hz, 2 H, CH₂), 3.59 (q, *J* = 6.0 Hz, 2 H, CH₂), 3.82 (s, 3 H, CH₃), 6.29 (t, *J* = 6.0 Hz, 1 H, NH), 6.60 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.10 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.29 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 19.0 (CH₂), 36.6 (CH₂), 51.5 (CH₃), 110.5 (C⁴), 114.6 (CH), 118.5 (CN), 123.7 (CH), 151.3 (C⁴), 153.5 (C⁴), 166.2 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 276 [M + Na]⁺.

Methyl 2-([2-(4-Nitrophenyl)ethyl]carbamoyl)amino}thiophene-3-carboxylate (3m)

Yield: 327 mg (88%); yellow solid; mp 165–166 °C.

IR (neat): 3319, 2950, 1666, 1540, 1517, 1344, 1239 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.99 (t, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, 2 H, CH₂), 3.59 (m, 2 H, CH₂), 3.78 (s, 3 H, CH₃), 5.87 (br, 1 H, NH), 6.58 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.09 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.34 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 8.07 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 10.25 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 36.0 (CH₂), 41.4 (CH₂), 51.4 (CH₃), 110.1 (C⁴), 114.5 (CH_{Ar}), 123.5 (CH_{Ar}), 123.6 (CH_{Ar}), 129.6 (CH_{Ar}), 146.5 (C⁴), 146.6 (C⁴), 151.7 (C⁴), 153.6 (C⁴), 166.2 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 372 [M + Na]⁺.

Methyl 2-([2-(4-Methoxyphenyl)ethyl]carbamoyl)amino}thiophene-3-carboxylate (3n)

Yield: 300 mg (84%); yellowish solid; mp 92 °C.

IR (neat): 3321, 2952, 1663, 1539, 1511, 1442, 1239 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.80 (t, ³*J*_{H,H} = 7.0 Hz, 2 H, CH₂), 3.51 (td, *J* = 7.0, 5.5 Hz, 2 H, CH₂), 3.74 (s, 3 H, CH₃), 3.77 (s, 3 H, CH₃), 5.91 (t, *J* = 5.5 Hz, 1 H, NH), 6.57 (d, *J* = 6.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 6.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.10 (m, 3 H, CH_{Ar}), 10.25 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 35.0 (CH₂), 42.1 (CH₂), 51.3 (CH₃), 55.1 (CH₃), 109.8 (C⁴), 113.9 (CH_{Ar}), 114.3 (CH_{Ar}), 123.4 (CH_{Ar}), 129.5 (CH_{Ar}), 130.4 (C⁴), 152.0 (C⁴), 153.7 (C⁴), 158.1 (C⁴), 166.2 (C⁴).

MS (ESI+): $m/z = 357$ [M + Na]⁺.

Methyl 4-[3-(*tert*-Butylureido)thiophene-3-carboxylate (3o)

Yield: 340 mg (82%); white solid; mp 132 °C.

IR (neat): 3331, 2962, 2926, 2926, 1697, 1662, 1518, 1447.9, 1274, 1246 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.38 (s, 9 H), 3.86 (s, 3 H), 4.57 (br, 1 H, NH), 7.66 (d, $J = 5.8$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.98 (d, $J = 5.8$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.95 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 28.7 (3 × CH₃), 50.2 (C⁴), 51.3 (CH₃), 106.0 (CH), 120.2 (C⁴), 131.6 (CH), 137.3 (C⁴), 153.4 (C⁴), 164.2 (C⁴).

MS (ESI+): $m/z = 279$ [M + Na]⁺.

Methyl 4-(3-Cyclohexylureido)thiophene-3-carboxylate (3p)

Yield: 224 mg (79%); white solid; mp 137–138 °C.

IR (neat): 3340, 3273, 2922, 2851, 1704, 1682, 1644, 1561, 1545, 1529, 1511, 1443, 1273, 1246, 1228 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.2–1.5 (m, 4 H), 1.7–2.0 (m, 6 H, CH₂), 3.63 (m, 1 H, CH), 3.87 (s, 3 H, CH₃), 5.04 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, NH), 7.77 (d, $J = 5.8$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.02 (d, $J = 5.8$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.17 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 24.9 (2 × CH₂), 25.5 (CH₂), 33.6 (2 × CH₂), 49.4 (CH), 51.8 (CH₃), 106.9 (CH), 121.1 (C⁴), 131.2 (CH), 137.9 (C⁴), 154.5 (C⁴), 164.4 (C⁴).

MS (ESI+): $m/z = 283$ [M + H]⁺.

Methyl 4-(3-Cyclobutylureido)thiophene-3-carboxylate (3q)

Yield: 207 mg (82%); white solid; mp 144–145 °C.

IR (neat): 3329, 2951, 1693, 1658, 1557, 1524, 1246 cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.7–1.8 (m, 4 H, CH₂), 2.43 (m, 2 H, CH₂), 3.85 (s, 3 H, CH₃), 4.20 (m, 1 H, CH), 5.41 (br, 1 H, NH), 7.72 (d, $J = 5.5$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.98 (d, $J = 5.5$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.14 (s, 1 H, NH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.8 (CH₂), 31.1 (2 × CH₂), 45.6 (CH), 51.7 (CH₃), 107.1 (CH), 120.9 (C⁴), 132.1 (CH), 137.5 (C⁴), 154.2 (C⁴), 164.5 (C⁴).

MS (ESI–): $m/z = 253$ [M – H][–].

Methyl 4-[3-(4-Nitrobenzyl)ureido]thiophene-3-carboxylate (3r)

Yield: 436 mg (81%); yellow solid; mp 146–147 °C.

IR (neat): 3327, 2946, 2923, 2855, 1693, 1665, 1557, 1518, 1448, 1344, 1264 cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.81 (s, 3 H, CH₃), 4.53 (d, $J = 6.0$ Hz, 2 H, CH₂), 5.44 (br, 1 H, NH), 7.45 (d, $J = 9.0$ Hz, 2 H, CH_{Ar}), 7.64 (d, $J = 3.0$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.98 (d, $J = 3.0$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.12 (d, $J = 9.0$ Hz, 2 H, CH_{Ar}), 9.27 (s, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 43.8 (CH₂), 51.5 (CH₃), 110.4 (C⁴), 114.7 (CH_{Ar}), 120.9 (CH_{Ar}), 123.9 (CH_{Ar}), 128.0 (CH_{Ar}), 137.4 (C⁴), 146.7 (C⁴), 147.3 (C⁴), 154.7 (C⁴), 164.8 (C⁴).

MS (ESI–): $m/z = 334$ [M – H][–].

Methyl 3-[(*tert*-Butylcarbamoyl)amino]thiophene-2-carboxylate (3s)

Yield: 198 mg (71%); yellowish solid; mp 126 °C.

IR (neat): 3324, 2964, 1666, 1551, 1444, 1417, 1285, 1249, 1223 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.36 (s, 9 H), 3.82 (s, 3 H), 5.09 (br, 1 H), 7.33 (d, $J = 5.7$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.87 (d, $J = 5.7$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.29 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 29.3 (3 × CH₃), 51.5 (C⁴), 51.6 (CH₃), 106.7 (C⁴), 121.2 (CH), 130.4 (CH), 146.3 (C⁴), 153.5 (C⁴), 165.3 (C⁴).

MS (ESI+): $m/z = 279$ [M + Na]⁺.

Methyl-3-[(Cyclohexylcarbamoyl)amino]thiophene-2-carboxylate (3t)

Yield: 233 mg (83%); yellowish solid; mp 153–154 °C.

IR (neat): 3313, 2928, 2855, 1660, 1557, 1445, 1244 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.1–1.5 (m, 4 H, CH₂), 1.5–1.9 (m, 4 H, CH₂), 1.98 (m, 2 H, CH₂), 3.62 (m, 1 H, CH), 3.87 (s, 3 H, CH₃), 4.66 (br s, 1 H, NH), 7.42 (d, $J = 5.5$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.99 (d, $J = 5.5$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.41 (s, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 24.8 (CH₂), 25.5 (CH₂), 33.5 (CH₂), 49.5 (CH), 51.7 (CH₃), 106.6 (C⁴), 121.8 (CH), 131.6 (CH), 147.0 (C⁴), 153.1 (C⁴), 165.2 (C⁴).

MS (ESI–): $m/z = 281$ [M – H][–].

Methyl 3-[(Cyclobutylcarbamoyl)amino]thiophene-2-carboxylate (3u)

Yield: 176 mg (76%); white solid; mp 124–125 °C.

IR (neat): 3308, 2950, 1657, 1548, 1443, 1417, 1407, 1281, 1237 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.7–2.0 (m, 4 H, CH₂), 2.42 (m, 2 H, CH₂), 3.87 (s, 3 H, CH₃), 4.21 (m, 1 H, CH), 5.01 (br, 1 H, NH), 7.42 (d, $J = 5.7$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.00 (d, $J = 5.7$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.43 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 14.9 (CH₂), 31.1 (CH₂), 45.7 (CH), 51.7 (CH₃), 107.0 (C⁴), 121.8 (CH), 131.4 (CH), 146.7 (C⁴), 153.2 (C⁴), 165.0 (C⁴).

MS (ESI+): $m/z = 231$ [M + Na]⁺.

Methyl 3-[(4-Nitrobenzyl)carbamoyl]amino]thiophene-2-carboxylate (3v)

Yield: 274 mg (82%); yellow solid; mp 174–175 °C.

IR (neat): 3313, 2957, 2924, 1685, 1641, 1541, 1445, 1254 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.84 (s, 3 H, CH₃), 4.57 (s, 2 H, CH₂), 5.58 (br s, 1 H, NH), 7.42 (d, $J = 5.2$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.48 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, CH_{Ar}), 7.96 (d, $J = 5.2$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, CH_{Ar}), 9.58 (s, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 43.7 (CH₂), 51.8 (CH₃), 107.4 (C⁴), 121.6 (CH_{Ar}), 123.9 (CH_{Ar}), 127.9 (CH_{Ar}), 131.8 (CH_{Ar}), 146.2 (C⁴), 146.3 (C⁴), 147.2 (C⁴), 153.7 (C⁴), 165.2 (C⁴).

MS (ESI–): $m/z = 334$ [M – H][–].

Methyl 2-[(*tert*-Butylcarbamoyl)amino]benzoate (3w)

Yield: 246 mg (90%); white solid; mp 158–159 °C.

IR (neat): 3323, 2966, 2924, 1672, 1525, 1454, 1259 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.36 (s, 9 H, CH₃), 3.83 (s, 3 H, CH₃), 4.70 (br, 1 H, NH), 6.87 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.42 (t, $J = 8.0$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.89 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.44 (d, $J = 8.0$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.07 (s, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 29.1 (CH₃), 50.7 (C⁴), 51.9 (CH₃), 113.4 (C⁴), 119.3 (CH), 120.1 (CH), 130.5 (CH), 134.3 (CH), 143.4 (C⁴), 153.8 (C⁴), 169.0 (C⁴).

MS (ESI+): $m/z = 273$ [M + Na]⁺.

Methyl 2-[(Cyclohexylcarbamoyl)amino]benzoate (3x)

Yield: 153 mg (51%); yellowish solid; mp 164–165 °C.

IR (neat): 3309, 2921, 2852, 1709, 1649, 1550, 1251 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.0–1.4 (m, 4 H, CH₂), 1.5–1.8 (m, 4 H, CH₂), 1.95 (m, 2 H, CH₂), 3.58 (m, 1 H, CH), 3.87 (s, 3 H, CH₃), 4.80 (m, 1 H, NH), 6.92 (t, $J = 8.5$ Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.47 (t, $J =$

8.5 Hz, CH_{Ar}), 7.95 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.52 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.27 (s, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 24.8 (CH₂), 25.4 (CH₂), 33.6 (CH₂), 49.3 (CH), 52.0 (CH₃), 113.4 (C⁴), 119.3 (CH), 120.3 (CH), 130.6 (CH), 134.5 (CH), 143.4 (C⁴), 154.2 (C⁴), 169.1 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 299 [M + Na]⁺.

Methyl 2-[(Cyclobutylcarbamoyl)amino]benzoate(3y)

Yield: 211 mg (78%); white solid; mp 133–134 °C.

IR (neat): 3289, 2976, 2943, 2866, 1708, 1646, 1588, 1548, 1524, 1447, 1435, 1253 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 1.65 (m, 2 H, CH₂), 1.86 (m, 2 H, CH₂), 2.33 (m, 2 H, CH₂), 3.81 (s, 3 H, CH₃), 4.21 (m, 1 H, CH), 5.55 (br, 1 H, NH), 6.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.40 (t, *J* = 8.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.89 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.49 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.18 (s, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 14.7 (CH₂), 31.1 (CH₂), 45.5 (CH), 51.9 (CH₃), 113.6 (C⁴), 119.5 (CH), 120.3 (CH), 130.4 (CH), 134.2 (CH), 143.0 (C⁴), 154.1 (C⁴), 168.8 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 271 [M + Na]⁺.

Methyl 2-[(4-Nitrobenzyl)carbamoyl]amino]benzoate (3z)

Yield: 164 mg (50%); yellow solid; mp 194–195 °C.

IR (neat): 3308, 2962, 2921, 1680, 1519, 1334, 1254 cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.91 (s, 3 H, CH₃), 4.59 (d, *J* = 6.0 Hz, 2 H, CH₂), 5.39 (t, *J* = 6.0 Hz, 1 H, NH), 7.00 (td, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.4–7.6 (m, 3 H, CH_{Ar}), 7.99 (dd, *J* = 8.5, 1.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.18 (dd, *J* = 6.7, 1.7 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 8.50 (dd, *J* = 8.5, 1.1 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.52 (s, 1 H, NH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 43 (CH₂), 52.2 (CH₃), 113.7 (C⁴), 119.4 (CH), 121.0 (CH), 123.8 (2 × CH), 128.0 (2 × CH), 130.7 (CH), 134.7 (CH), 142.8 (C⁴), 146.5 (C⁴), 147.2 (C⁴), 154.7 (C⁴), 169.2 (C⁴).

MS (ESI–): *m/z* = 328 [M – H][–].

Enzymatic Hydrolysis; 2-[3-(Prop-2-yn-1-yl)ureido]thiophene-3-carboxylic Acid (4j)

Typical Procedure

To a solution of thiophene **3j** (30 mg, 126 μmol) in a PBS–DMSO mixture (9:1, 30 mL) at r.t. was added Pig Liver Esterase (150 mg). The reaction mixture was stirred at 37 °C until complete consumption of the starting materials (about 2 d) as monitored by TLC (eluent: 100% EtOAc). The mixture was acidified with aq 1 M HCl to pH 1 and poured into H₂O (40 mL). EtOAc (30 mL) was added and the resulting mixture was vigorously stirred until precipitation of solid, which was filtered off. The combined organic extracts were evaporated to dryness under reduce pressure. The crude product was thoroughly washed with CH₂Cl₂ to afford pure **4j**; yield: 25 mg (92%); white solid; mp 211–212 °C.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.16 (s, 1 H, CH), 3.94 (s, 2 H, CH₂), 6.76 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.07 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.31 (s, 1 H, NH), 10.73 (br, 1 H, NH).

¹³C NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 29.5 (CH₂), 73.6 (CH), 81.7 (C⁴), 111.7 (C⁴), 115.0 (CH), 124.8 (CH), 150.9 (C⁴), 154.1 (C⁴), 166.8 (C⁴).

MS (ESI–): *m/z* = 223 [M – H][–].

Hydrolysis of Methyl 2-Ureido-3-carboxylate Thiophenes; General Procedure

To a solution of thiophene or phenyl derivative **3** (0.5 mmol) in MeOH (5 mL) at r.t. was added an aq solution of 1 M KOH (0.6 mmol). The reaction mixture was refluxed until complete consumption of the starting materials as monitored by TLC (eluent: ???). The aqueous layer was washed with CH₂Cl₂ (30 mL), then acidified with concd HCl to pH 2 to obtain a solid precipitate, which was col-

lected by filtration. The precipitate was thoroughly washed with H₂O to afford the desired compound.

2-[(*tert*-Butylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylic Acid (4a)

Yield: 94 mg (78%); white solid; mp 220–221 °C.

IR (neat): 3333, 2962, 2921, 1662, 1650, 1537, 1524, 1210 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.29 (s, 9 H), 6.70 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.01 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.72 (s, 1 H, NH), 10.05 (s, 1 H, NH), 12.54 (br, 1 H, OH).

¹³C NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 29.2 (CH₃), 50.4 (C⁴), 110.2 (C⁴), 114.4 (CH), 124.4 (CH), 151.6 (C⁴), 153.1 (C⁴), 166.4 (C⁴).

MS (ESI–): *m/z* = 241 [M – H][–].

HRMS-ESI+: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₁₀H₁₄N₂O₃S + Na]⁺: 265.06228; found: 265.0622.

2-[(Pentan-3-ylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylic Acid (4b)

Yield: 110 mg (79%); white solid; mp 245–246 °C.

IR (neat): 3312, 2962, 2923, 2855, 1685, 1644, 1537, 1524, 1224 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.84 (t, *J* = 7.5 Hz, 6 H, CH₃), 1.3–1.6 (m, 4 H, CH₂), 3.44 (m, 1 H, CH), 6.71 (d, *J* = 6.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.02 (d, *J* = 6.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, NH), 10.13 (s, 1 H, NH), 12.65 (s, 1 H, CO₂H).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.7 (CH₃), 27.3 (CH₂), 52.8 (CH), 110.2 (C⁴), 114.4 (CH), 124.4 (CH), 151.8 (C⁴), 153.9 (C⁴), 166.4 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 279 [M + Na]⁺.

HRMS-ESI+: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₁₁H₁₆N₂O₃S + Na]⁺: 279.07793; found: 279.0781.

2-[(Butan-2-ylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylic Acid (4c)

Yield: 99 mg (82%); white solid; mp 219–220 °C.

IR (neat): 2972, 2916, 1690, 1652, 1535, 1522, 1227 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 3 H, CH₃), 1.07 (d, *J* = 6.5 Hz, 3 H, CH₃), 1.42 (quint, *J* = 7.5 Hz, 2 H, CH₂), 3.59 (qq, *J* = 7.5, 6.5 Hz, 1 H, CH), 6.71 (d, *J* = 6.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.02 (d, *J* = 6.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.72 (br, 1 H, NH), 10.09 (br, 1 H, NH), 12.61 (br, 1 H, CO₂H).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 10.9 (CH₃), 20.9 (CH₃), 29.6 (CH₂), 47.3 (CH), 110.3 (C⁴), 114.6 (CH), 124.4 (CH), 151.8 (C⁴), 153.5 (C⁴), 166.5 (C⁴).

MS (ESI–): *m/z* = 241 [M – H][–].

HRMS-ESI+: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₁₀H₁₄N₂O₃S + Na]⁺: 265.06228; found: 265.0622.

2-[(Cyclohexylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylic Acid (4d)

Yield: 115 mg (86%); white solid; mp 221–222 °C.

IR (neat): 3338, 3303, 2930, 1645, 1552, 1535, 1523, 1446, 1218 cm⁻¹.

¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.1–1.9 (m, 10 H), 3.47 (m, 1 H), 6.71 (m, 1 H), 7.01 (m, 1 H), 7.83 (br, 1 H, NH), 10.11 (br, 1 H, NH), 12.65 (br, 1 H, CO₂H).

¹³C NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 24.9 (2 × CH₂), 25.7 (CH₂), 33.2 (2 × CH₂), 48.9 (CH), 110.34 (C⁴), 114.6 (CH), 124.5 (CH), 151.9 (C⁴), 153.3 (C⁴), 166.5 (C⁴).

MS (ESI–): *m/z* = 267 [M – H][–].

HRMS-ESI+: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₁₂H₁₆N₂O₃S + Na]⁺: 291.07793; found: 291.0781.

2-[(Cyclopentylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylic Acid (4e)

Yield: 74 mg (59%); white solid; mp 211–212 °C.

IR (neat): 3354, 3293, 2936, 2857, 1646, 1565, 1542, 1449, 1412, 1295, 1259, 1248, 1228 cm⁻¹.¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.3–1.9 (m, 8 H, CH₂), 3.96 (m, 1 H, CH), 6.71 (d, *J* = 6.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.01 (d, *J* = 6.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.89 (d, *J* = 6.7 Hz, 1 H, NH), 10.09 (br, 1 H, NH), 12.65 (br, 1 H, CO₂H).¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 23.6 (CH₂), 33.0 (CH₂), 51.8 (CH), 110.2 (C⁴), 114.5 (CH), 124.4 (CH), 151.7 (C⁴), 153.5 (C⁴), 166.4 (C⁴).MS (ESI⁻): *m/z* = 253 [M – H]⁻.HRMS-ESI⁺: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₁₁H₁₄N₂O₃S + Na]⁺: 277.06228; found: 277.0624.**3-Cyclopentylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5e)**

Yield: 13 mg (11%); white solid; mp 251–252 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.3–2.2 (m, 8 H, CH₂), 5.25 (m, 1 H, CH), 7.07 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.13 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 12.10 (br, 1 H, NH).MS (ESI⁻): *m/z* = 235 [M – H]⁻.HRMS-ESI⁺: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₁₁H₁₂N₂O₂S + Na]⁺: 259.05172; found: 259.0524.**2-[(Cyclobutylcarbamoyl)amino]thiophene-3-carboxylic Acid (4f)**¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.6–2.0 (m, 4 H, CH₂), 2.1–2.4 (m, 2 H, CH₂), 2.1–2.2 (m, 2 H, CH₂), 4.10 (hex, *J* = 7.5 Hz, 1 H, CH), 6.72 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.02 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.13 (br, 1 H, NH), 10.09 (br, 1 H, NH), 12.66 (br, 1 H, CO₂H).¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 15.0 (CH₂), 27.3 (CH₂), 46.7 (CH), 110.5 (C⁴), 114.6 (CH), 122.7 (CH), 151.6 (C⁴), 152.8 (C⁴), 166.5 (C⁴).MS (ESI⁻): *m/z* = 239 [M – H]⁻.HRMS-ESI⁺: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₁₀H₁₂N₂O₃S + Na]⁺: 263.04663; found: 263.0468.**3-Cyclobutylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5f)**

Yield: 50 mg (45%); yellowish solid; mp 237–238 °C.

IR (neat): 3135, 2953, 1709, 1634, 1565, 1533, 1434, 1339, 1252 cm⁻¹.¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.6–2.0 (m, 4 H, CH₂), 2.1 (m, 2 H, CH₂), 2.89 (m, 2 H, CH₂), 5.23 (quint, *J* = 9.0 Hz, 1 H, CH), 7.07 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.13 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 12.05 (br, 1 H, NH).¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 14.9 (CH₂), 30.9 (CH₂), 45.3 (CH), 115.4 (C⁴), 117.4 (CH), 124.4 (CH), 150.8 (C⁴), 151.0 (C⁴), 159.5 (C⁴).MS (ESI⁻): *m/z* = 221 [M – H]⁻.**3-Cyclopropylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5g)**

Yield: 83 mg (72%); white solid; mp 261–262 °C.

IR (neat): 3200, 2952, 2926, 1713, 1659, 1552, 1540, 1428, 1349 cm⁻¹.¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.70 (m, 2 H, CH₂), 0.99 (m, 2 H, CH₂), 2.58 (m, 1 H, CH), 7.05 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.12 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 11.97 (br, 1 H, NH).¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.8 (CH₂), 24.5 (CH), 115.5 (C⁴), 117.2 (CH), 122.7 (CH), 150.9 (C⁴), 151.6 (C⁴), 160.0 (C⁴).MS (ESI⁺): *m/z* = 231 [M + Na]⁺.HRMS-ESI⁺: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₉H₈N₂O₂S + Na]⁺: 231.02042; found: 231.0206.**3-Phenylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5h)**

Yield: 107 mg (80%); white solid; mp 297–299 °C.

IR (neat): 2972, 2931, 1718, 1657, 1430, 1346 cm⁻¹.¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.2–7.8 (m, 7 H), 12.34 (br, 1 H).¹³C NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.6 (C⁴), 117.8 (CH), 122.9 (CH), 128.6 (CH), 129.3 (2 × CH), 129.3 (2 × CH), 136.3 (C⁴), 150.9 (C⁴), 151.7 (C⁴), 159.2 (C⁴).MS (ESI⁺): *m/z* = 267 [M + Na]⁺.HRMS-ESI⁺: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₁₂H₈N₂O₂S + Na]⁺: 267.02042; found: 267.0206.**3-(4-Nitrobenzyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5i)**

Yield: 102 mg (67%); yellow solid; mp 289–290 °C.

IR (neat): 2952, 2923, 2845, 1725, 1624, 1512, 1339 cm⁻¹.¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 5.15 (s, 2 H, CH₂), 7.13 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.19 (d, *J* = 5.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 8.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 12.41 (br, 1 H, NH).¹³C NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 43.3 (CH₂), 115.0 (C⁴), 118.1 (CH_{Ar}), 122.7 (CH_{Ar}), 124.0 (CH_{Ar}), 128.8 (CH_{Ar}), 145.8 (C⁴), 147.0 (C⁴), 150.8 (C⁴), 151.6 (C⁴), 158.9 (C⁴).MS (ESI⁺): *m/z* = 304 [M + H]⁺.HRMS-ESI⁺: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₁₃H₉N₃O₄S + Na]⁺: 326.02115; found: 326.0215.**3-(Prop-2-yn-1-yl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5j)**

Yield: 77 mg (67%); white solid; mp 251–253 °C.

IR (neat): 3277, 3109, 2957, 2922, 1737, 1621, 1552, 1440, 1339, 1258 cm⁻¹.¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.11 (s, 1 H, ≡CH), 4.58 (s, 2 H, CH₂), 7.14 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.18 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 12.37 (br, 1 H, NH).¹³C NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 29.8 (CH₂), 73.3 (CH_{sp}), 79.8 (C⁴), 114.8 (C⁴), 118.1 (CH_{Ar}), 122.5 (CH_{Ar}), 150.1 (C⁴), 151.4 (C⁴), 158.0 (C⁴).MS (ESI⁺): *m/z* = 229 [M + Na]⁺.HRMS-ESI⁺: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₉H₆N₂O₂S + Na]⁺: 229.00477; found: 229.0048.**3-(2-Hydroxyethyl)thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5k)**

Yield: 75 mg (71%); white solid; mp 267–269 °C.

IR (neat): 2962, 2926, 2860, 1461, 1400, 1377, 1219, 1077.3 cm⁻¹.¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.52 (t, *J* = 6.6 Hz, 2 H, CH₂), 3.93 (q, *J* = 6.6 Hz, 2 H, CH₂), 4.74 (br, 1 H, OH), 7.09 (d, *J* = 5.6 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.15 (d, *J* = 5.6 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 12.13 (s, 1 H, NH).¹³C NMR (63 MHz, CD₃OD): δ = 42.3 (CH₂), 58.0 (CH₂), 115.0 (C⁴), 117.4 (CH_{Ar}), 122.6 (CH_{Ar}), 150.9 (2 × C⁴), 159.0 (C⁴).MS (ESI⁻): *m/z* = 211 [M – H]⁻.HRMS-ESI⁺: *m/z* [M + Na]⁺ calcd for [C₈H₈N₂O₃S + Na]⁺: 235.01533; found: 235.0151.**3-(2,4-Dioxo-1,4-dihydrothieno[2,3-*d*]pyrimidin-3(2*H*)-yl)propanenitrile (5l)**

Yield: 95 mg (78%); white solid; mp 261–263 °C.

IR (neat): 3191, 3150, 2957, 2922, 2850, 1713, 1633, 1558, 1542, 1463, 1336 cm⁻¹.¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.86 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H, CH₂), 4.09 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H, CH₂), 7.14 (d, *J* = 5.3 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.19 (d, ³*J*_{H,H} = 5.3 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 12.35 (s, 1 H, NH).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ = 16.1 (CH₂), 35.9 (CH₂), 114.9 (C⁴), 117.9 (CH_{Ar}), 118.9 (CN), 122.6 (CH_{Ar}), 150.5 (C⁴), 151.3 (C⁴), 158.6 (C⁴).

MS (ESI+): m/z = 244 [M + Na]⁺.

HRMS-ESI+: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₉H₇N₃O₂S + Na]⁺: 244.01567; found: 244.0157.

3-[2-(4-Nitrophenyl)ethyl]thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5m)

Yield: 139 mg (88%); yellowish solid; mp 316–320 °C.

IR (neat): 3191, 3123, 2955, 1708, 1631, 1515, 1337, 1258 cm⁻¹.

^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.03 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, CH₂), 4.13 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, CH₂), 7.11 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.16 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.51 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 8.16 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 12.25 (br, 1 H, NH).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO- d_6): δ = 33.6 (CH₂), overlapped with DMSO- d_6 peak (CH₂), 115.0 (CH_{Ar}), 117.8 (C⁴), 122.6 (CH_{Ar}), 123.9 (CH_{Ar}), 130.5 (CH_{Ar}), 146.6 (C⁴), 147.6 (C⁴), 150.7 (C⁴), 151.1 (C⁴), 158.7 (C⁴).

MS (ESI-): m/z = 316 [M - H]⁻.

HRMS: m/z calcd for C₁₄H₁₂N₃O₄S⁺: 318.05485; found: 318.0543.

3-[2-(4-Methoxyphenyl)ethyl]thieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5n)

Yield: 126 mg (84%); white solid; mp 257–259 °C.

IR (neat): 2962, 2916, 1705, 1628, 1540, 1512, 1240 cm⁻¹.

^1H NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.77 (t, J = 7.7 Hz, 2 H, CH₂), 3.73 (s, 3 H, CH₃), 4.01 (t, J = 7.7 Hz, 2 H, CH₂), 6.86 (m, 2 H, CH_{Ar}), 7.10–7.18 (m, 4 H, CH_{Ar}), 12.20 (br, 1 H, NH).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO- d_6): δ = 32.8 (CH₂), 41.7 (CH₂), 55.3 (CH₃), 114.2 (CH_{Ar}), 115.0 (C⁴), 117.5 (C⁴), 122.5 (CH_{Ar}), 130.0 (CH_{Ar}), 130.8 (C⁴), 150.6 (C⁴), 150.9 (C⁴), 158.1 (C⁴), 158.6 (C⁴).

MS (ESI-): m/z = 301 [M - H]⁻.

HRMS-ESI+: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₅H₁₄N₂O₃S + Na]⁺: 325.06228; found: 325.0622.

4-[3-(*tert*-Butyl)ureido]thiophene-3-carboxylic Acid (4o)

Yield: 90 mg (75%); white solid; mp 200–201 °C.

IR (neat): 3375, 2970, 1667, 1642, 1557, 1518, 1448, 1282.84, 1213, 1192 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.27 (s, 9 H, CH₃), 7.20 (s, 1 H, NH), 7.61 (d, J = 3.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.19 (d, J = 3.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.94 (s, 1 H, NH), 13.01 (br, 1 H, OH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 29.5 (3 × CH₃), 49.9 (C⁴), 106.2 (CH), 122.6 (C⁴), 133.2 (CH), 138.5 (CH), 154.5 (C⁴), 165.2 (C⁴).

HRMS-ESI+: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₀H₁₄N₂O₃S + Na]⁺: 265.06228; found: 265.0621.

4-(3-Cyclohexylureido)thiophene-3-carboxylic Acid (4p)

Yield: 106 mg (79%); white solid; mp 199–200 °C.

IR (neat): 3344, 3306, 3120, 2922, 2851, 2594, 1643, 1550, 1519, 1499, 1445, 1272, 1249, 1259, 1194 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.11–1.33 (m, 5 H), 1.50–1.80 (m, 5 H), 3.42 (m, 1 H, CH), 7.31 (br, 1 H, NH), 7.60 (d, J = 3.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.20 (d, J = 3.7 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.01 (br, 1 H, NH), 13.06 (br, 1 H, CO₂H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 25.0 (2 × CH₂), 25.8 (CH₂), 33.4 (2 × CH₂), 48.6 (CH), 106.2 (CH), 122.5 (C⁴), 133.3 (CH), 138.5 (C⁴), 155.4 (C⁴), 165.3 (C⁴).

HRMS-ESI+: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₂H₁₆N₂O₃S + Na]⁺: 291.07793; found: 291.0776.

4-(3-Cyclobutylureido)thiophene-3-carboxylic Acid (4q)

Yield: 76 mg (64%); white solid; mp 211–212 °C.

IR (neat): 3323, 2972, 2931, 1680, 1456, 1380, 1085, 1047 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.52–1.70 (m, 2 H, CH₂), 1.8–2.0 (m, 2 H, CH₂), 2.1–2.3 (m, 2 H, CH₂), 4.09 (hex, J = 7.5 Hz, 1 H, CH), 7.58 (d, J = 4.8 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.66 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, NH), 8.20 (d, J = 4.8 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.03 (br, 1 H, NH), 13.14 (br, 1 H, CO₂H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 14.9 (CH₂), 31.1 (2 × CH₂), 45.2 (CH), 106.4 (CH), 122.5 (C⁴), 133.4 (CH), 138.3 (C⁴), 154.1 (C⁴), 165.4 (C⁴).

MS (ESI-): m/z = 239 [M - H]⁻.

HRMS-ESI+: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₀H₁₂N₂O₃S + Na]⁺: 263.04663; found: 263.0463.

3-(4-Nitrobenzyl)thieno[3,4-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5r)

Yield: 122 mg (81%); yellowish solid; mp 282–285 °C.

IR (neat): 3107, 2936, 2858, 1718, 1645, 1600, 1510, 1338 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 5.14 (s, 2 H, CH₂), 6.89 (d, J = 2.6 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.53 (d, J = 8.3 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 8.17 (d, J = 8.3 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 8.43 (d, J = 2.6 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 11.23 (br, 1 H, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 43.2 (CH₂), 103.6 (CH), 121.6 (C⁴), 124.0 (2 × CH), 128.7 (2 × CH), 131.4 (CH), 136.9 (C⁴), 146.0 (C⁴), 147.0 (C⁴), 150.9 (C⁴), 158.5 (C⁴).

MS (ESI-): m/z = 302 [M - H]⁻.

HRMS-ESI+: m/z [M + H]⁺ calcd for C₁₃H₁₀N₃O₄S⁺: 304.0392; found: 304.0389.

3-[3-(*tert*-Butyl)ureido]thiophene-2-carboxylic Acid (4s)

Yield: 97 mg (80%); white solid; mp 196–197 °C.

IR (neat): 3340, 2986, 2964.32, 2526, 1676, 1634, 1564, 1533, 1452, 1413, 1286, 1250, 1206 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.28 (s, 9 H, CH₃), 7.44 (s, 1 H, NH), 7.68 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.90 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.18 (br, 1 H, NH), 12.91 (br, 1 H, CO₂H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 29.3 (CH₃), 50.1 (C⁴), 107.3 (C⁴), 122.4 (CH), 131.8 (CH), 146.6 (C⁴), 153.4 (C⁴), 165.3 (C⁴).

HRMS-ESI+: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₀H₁₄N₂O₃S + Na]⁺: 265.06228; found: 265.0624.

3-[(Cyclohexylcarbamoyl)amino]thiophene-2-carboxylic Acid (4t)

Yield: 76 mg (54%); white solid; mp 211–212 °C.

IR (neat): 3293, 2936, 2857, 2532, 1646, 1542, 1505, 1449.04, 1412, 1295, 1248, 1228 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.10–1.80 (m, 10 H), 3.43 (m, 1 H), 7.54 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, NH), 7.69 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.91 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.23 (s, 1 H, NH), 12.90 (br, 1 H, CO₂H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 24.9 (CH₂), 25.7 (CH₂), 33.3 (2 × CH₂), 48.7 (CH), 107.5 (C⁴), 122.3 (CH), 131.8 (CH), 146.5 (C⁴), 153.5 (C⁴), 165.4 (C⁴).

MS (ESI-): m/z = 267 [M - H]⁻.

HRMS-ESI+: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₂H₁₆N₂O₃S + Na]⁺: 291.07793; found: 291.0777.

3-Cyclohexylthieno[3,2-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5t)

Yield: 30 mg (27%); white solid; mp 270–272 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.10–1.80 (m, 10 H, CH₂), 4.69 (tt, J = 12.0, 3.5 Hz, 1 H, CH), 6.87 (d, J = 5.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.03 (d, $^3J_{\text{H,H}}$ = 5.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 11.75 (br, 1 H, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 14.9 (CH₂), 30.9 (CH₂), 45.3 (CH), 115.4 (C⁴), 117.4 (CH), 124.4 (CH), 145.1 (C⁴), 151.7 (C⁴), 159.2 (C⁴).

MS (ESI⁻): m/z = 221 [M - H]⁻.

HRMS-ESI⁺: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₂H₁₄N₂O₂S + Na]⁺: 273.06737; found: 273.0681.

3-[(Cyclobutylcarbamoyl)amino]thiophene-2-carboxylic Acid (4u)

Yield: 26 mg (21%); white solid; mp 195–196 °C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.6–2.0 (m, 4 H, CH₂), 2.12 (m, 2 H, CH₂), 4.09 (m, 1 H, CH), 7.71 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.89 (m, 2 H, NH, CH_{Ar}), 9.25 (s, 1 H, NH), 13.02 (br, 1 H, CO₂H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 15.1 (CH₂), 31.1 (CH₂), 45.2 (CH), 107.7 (C⁴), 122.2 (CH), 131.9 (CH), 146.4 (C⁴), 153.2 (C⁴), 165.5 (C⁴).

MS (ESI⁻): m/z = 239 [M - H]⁻.

HRMS-ESI⁺: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₀H₁₂N₂O₃S + Na]⁺: 263.04663; found: 263.0469.

3-Cyclobutylthieno[2,3-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5u)

Yield: 61 mg (55%); white solid; mp 277–279 °C.

IR (neat): 3302, 3193, 3080, 2943, 1625, 1570, 1548, 1414, 1301, 1262, 1252 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.6–2.0 (m, 2 H, CH₂), 2.1 (m, 2 H, CH₂), 2.92 (m, 2 H, CH₂), 5.26 (quint, J = 9.0 Hz, 1 H, CH), 6.88 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.04 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 11.76 (br, 1 H, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 14.9 (CH₂), 27.3 (CH₂), 46.9 (CH), 111.8 (C⁴), 117.5 (CH), 136.6 (CH), 145.2 (C⁴), 151.8 (C⁴), 159.4 (C⁴).

MS (ESI⁻): m/z = 221 [M - H]⁻.

HRMS-ESI⁺: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₀H₁₀N₂O₂S + Na]⁺: 245.03607; found: 245.0363.

3-(4-Nitrobenzyl)thieno[3,2-*d*]pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5v)

Yield: 109 mg (72%); yellowish solid; mp 282–285 °C.

IR (neat): 2957, 2924, 2860, 1669, 1524, 1453, 1210 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 5.16 (s, 2 H, CH₂), 6.96 (d, J = 5.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.56 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 8.11 (d, J = 5.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.16 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, CH_{Ar}), 12.06 (s, 1 H, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 43.4 (CH₂), 111.2 (C⁴), 117.7 (CH_{Ar}), 124.0 (CH_{Ar}), 128.9 (CH_{Ar}), 137.2 (CH_{Ar}), 145.5 (C⁴), 145.7 (C⁴), 147.0 (C⁴), 151.6 (C⁴), 158.7 (C⁴).

MS (ESI⁻): m/z = 302 [M - H]⁻.

HRMS-ESI⁺: m/z [M + H]⁺ calcd for C₁₃H₁₀N₃O₄S⁺: 304.0392; found: 304.0388.

2-[(*tert*-Butylcarbamoyl)amino]benzoic Acid (4w)

Yield: 83 mg (71%); white solid; mp 200–201 °C.

IR (neat): 3169, 3047, 1698, 1630, 1521, 1439, 1345 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.29 (s, 9 H, CH₃), 6.92 (td, J = 8.1 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.21 (s, 1 H, NH), 7.44 (td, J = 8.6 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.88 (dd, J = 8.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.31 (dd, J = 8.6 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.83 (s, 1 H, NH), 13.16 (s, 1 H, CO₂H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 29.4 (CH₃), 50.1 (C⁴), 115.0 (C⁴), 119.9 (CH), 120.2 (CH), 131.3 (CH), 133.9 (CH), 143.7 (C⁴), 154.4 (C⁴), 169.7 (C⁴).

MS (ESI⁻): m/z = 235 [M - H]⁻.

HRMS-ESI⁺: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₂H₁₆N₂O₃ + Na]⁺: 259.10586; found: 259.1060.

2-[(Cyclohexylcarbamoyl)amino]benzoic Acid (4x)

Yield: 13 mg (10%); white solid; mp 184–185 °C.

IR (neat): 3303, 2932, 2852, 1655, 1584, 1534, 1408, 1266, 1089, 1039 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.10–1.82 (m, 10 H, CH₂), 3.33 (overlapped with H₂O peak, 1 H, CH), 6.93 (t, J = 8.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.35 (d, J = 5.7 Hz, 1 H, NH), 7.46 (td, J = 8.4, 1.4 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.89 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.37 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 10.01 (s, 1 H, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 25.2 (2 × CH₂), 25.7 (CH₂), 33.4 (2 × CH₂), 48.7 (CH), 114.8 (C⁴), 119.6 (CH), 120.3 (CH), 131.4 (CH), 134.1 (CH), 143.7 (C⁴), 154.4 (C⁴), 169.9 (C⁴).

HRMS-ESI⁺: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₄H₁₈N₂O₃ + Na]⁺: 285.12151; found: 285.1215.

3-Cyclohexylquinazoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5x)

Yield: 105 mg (86%); white solid; mp 266–268 °C.

IR (neat): 3282, 2930, 2861, 1709, 1633, 1622, 1398, 1376, 1260 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.12–1.36 (m, 3 H, CH₂), 1.56–1.66 (m, 3 H, CH₂), 1.77–1.82 (m, 2 H, CH₂), 2.32–2.44 (m, 2 H, CH₂), 4.74 (tt, J = 12.1, 3.5 Hz, 1 H, CH), 7.10–7.17 (m, 2 H, CH_{Ar}), 7.60 (t, J = 7.1 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.89 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 11.35 (s, 1 H, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 25.6 (CH₂), 26.4 (2 × CH₂), 28.8 (2 × CH₂), 53.1 (CH), 114.6 (C⁴), 115.5 (CH), 122.6 (CH), 127.9 (CH), 135.2 (CH), 140.3 (C⁴), 150.9 (C⁴), 162.8 (C⁴).

MS (ESI⁻): m/z = 243 [M - H]⁻.

HRMS-ESI⁺: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₄H₁₆N₂O₂ + Na]⁺: 267.11095; found: 267.1110.

3-Cyclobutylquinazoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5y)

Yield: 68 mg (63%); white solid; mp 265–267 °C.

IR (neat): 2924, 1714, 1660, 1448 cm⁻¹.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.6–1.9 (m, 2 H, CH₂), 2.1–2.3 (m, 2 H, CH₂), 2.8–3.0 (m, 2 H, CH₂), 5.24 (quint, J = 8.7 Hz, 1 H, CH), 7.1–7.3 (m, 2 H, CH_{Ar}), 7.63 (t, J = 8.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.91 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 11.31 (br s, 1 H, NH).

^{13}C NMR (63 MHz, DMSO- d_6): δ = 15.1 (CH₂), 27.5 (CH₂), 47.1 (CH), 114.6 (C⁴), 115.3 (CH), 122.8 (CH), 127.8 (CH), 135.3 (CH), 139.8 (C⁴), 150.7 (C⁴), 162.9 (C⁴).

MS (ESI⁻): m/z = 215 [M - H]⁻.

HRMS-ESI⁺: m/z [M + Na]⁺ calcd for [C₁₂H₁₂N₂O₂ + Na]⁺: 239.07965; found: 239.0797.

3-(4-Nitrobenzyl)quinazoline-2,4(1*H*,3*H*)-dione (5z)

Yield: 133 mg (90%); yellowish solid; mp 284–287 °C.

IR (neat): 3192, 3076, 3006, 2907, 2921, 1716, 1514, 1340 cm⁻¹.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 5.20 (s, 2 H, CH₂), 7.24 (m, 2 H, CH_{Ar}), 7.57 [d, J = 8.7 Hz, 2 H, CH(ArNO₂)], 7.69 (t, J = 7.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.94 (d, J = 7.0 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.17 [d, J = 8.7 Hz, 2 H, CH(ArNO₂)], 11.62 (s, 1 H, NH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 43.4 (CH₂), 114.1 (C⁴), 115.8 (CH), 123.2 (CH), 124.0 (2 × CH), 127.9 (CH), 128.9 (2 × CH), 135.8 (CH), 140.0 (C⁴), 145.7 (C⁴), 147.0 (C⁴), 150.6 (C⁴), 162.5 (C⁴).

MS (ESI⁻): m/z = 296 [M - H]⁻.

HRMS-ESI⁺: m/z [M + H]⁺ calcd for C₁₅H₁₂N₃O₄⁺: 298.08278; found: 298.0828.

Acknowledgment

This work was supported by ANR (SALSA project). We would like to thank Perpignan University for BQR support.

References

- (1) (a) Gautier, B.; Goncalves, V.; Diana, D.; Di Stasi, R.; Teillet, F.; Lenoir, C.; Huguenot, F.; Garbay, C.; Fattorusso, R.; D'Andrea, L. D.; Vidal, M.; Inguibert, N. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4428. (b) Goncalves, V.; Gautier, B.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 767. (c) Goncalves, V.; Gautier, B.; Coric, P.; Bouaziz, S.; Lenoir, C.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5135. (d) Goncalves, V.; Gautier, B.; Regazzetti, A.; Coric, P.; Bouaziz, S.; Garbay, C.; Vidal, M.; Inguibert, N. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5590.
- (2) Gautier, B.; Miteva, M. A.; Goncalves, V.; Huguenot, F.; Coric, P.; Bouaziz, S.; Seijo, B.; Gaucher, J.-F.; Broutin, I.; Garbay, C.; Lesnard, A.; Rault, S.; Inguibert, N.; Villoutreix, B.; Vidal, M. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1631.
- (3) (a) Häcker, H.-G.; Leyers, S.; Wiendlocha, J.; Gütschow, M.; Wiese, M. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4586. (b) Arhin, F.; Bélanger, O.; Ciblat, S.; Dehbi, M.; Delorme, D.; Dietrich, E.; Dixit, D.; Lafontaine, Y.; Lehoux, D.; Liu, J.; McKay, J. A.; Moeck, G.; Reddy, R.; Rose, Y.; Srikumar, R.; Tanaka, K.; Williams, D. M.; Gros, P.; Pelletier, J.; Parr, T. R. Jr.; Rafai Fara, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5812. (c) Rheault, T.; Donaldson, K.; Badiang-Alberti, J.; Davis-Ward, R.; Webb Andrews, C.; Bambal, R.; Jackson, J.; Cheung, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4587. (d) Laine, E.; Goncalves, C.; Karst, J. C.; Lesnard, A.; Rault, S.; Tang, W.-J.; Malliavin, T. E.; Ladant, D.; Blondel, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 11277. (e) Pietsch, M.; Gütschow, M. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24006. (f) Chan, L.; Das, S. K.; Jagadeeswar, Reddy, T.; Poisson, C.; Proulx, M.; Pereira, O.; Courchesne, M.; Roy, C.; Wang, W.; Siddiqui, A.; Yannopoulos, C. G.; Nguyen-Ba, N.; Labrecque, D.; Bethell, R.; Hamel, M.; Courtemanche-Asselin, P.; L'Heureux, L.; David, M.; Nicolas, O.; Brunette, S.; Bilimoria, D.; Bédard, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 793.
- (4) (a) Venskutonyte, R.; Butini, S.; Sanna, Coccone, S.; Gemma, S.; Brindisi, M.; Kumar, V.; Guarino, E.; Maramai, S.; Valenti, S.; Amir, A.; Anton, Valades, E.; Frydenvang, K.; Kastrup, J. S.; Novellino, E.; Campiani, G.; Pickering, D. S. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4793. (b) Miwa, K.; Hitaka, T.; Imada, T.; Sasaki, S.; Yoshimatsu, M.; Kusaka, M.; Tanaka, A.; Nakata, D.; Furuya, S.; Endo, S.; Hamamura, K.; Kitazaki, K. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4998. (c) Guile, S. D.; Bantick, J. R.; Cooper, M. E.; Donald, D. K.; Eyssade, C.; Ingall, A. H.; Lewis, R. J.; Martin, B. P.; Mohammed, R. T.; Potter, T. J.; Reynolds, R. H.; St-Gallay, S. A.; Wright, A. D. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 254. (d) Tor, Y.; Del Valle, S.; Jaramillo, D.; Srivatsan, S. G.; Rios, A.; Weizman, H. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3608. (e) Betz, S. F.; Lio, F. M.; Gao, Y.; Reinhart, G. J.; Guo, Z.; Mesleh, M. F.; Zhu, Y.-F.; Struthers, R. S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6170.
- (5) (a) Munchhof, M. J.; Beebe, J. S.; Casavant, J. M.; Cooper, B. A.; Doty, J. L.; Higdon, R. C.; Hillerman, S. M.; Soderstrom, C. I.; Knauth, E. A.; Marx, M. A.; Rossi, A. M. K.; Sobolov, S. B.; Sun, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 21. (b) Wamhoff, H.; Ertas, M. *Synthesis* **1985**, 190. (c) Romeo, G.; Materia, L.; Manetti, F.; Cagnotto, A.; Mennini, T.; Nicoletti, F.; Botta, M.; Russo, F.; Minneman, K. P. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2877. (d) Meyer, M.; Altenbach, R.; Bai, H.; Basha, F.; Carroll, W.; Kerwin, J. Jr.; Lebold, S.; Lee, E.; Pratt, J.; Sippy, K.; Tietje, K.; Wendt, M.; Brune, M.; Buckner, S.; Hancock, D. I. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1971. (e) Russell, R.; Press, J.; Rampulla, R.; McNally, J.; Falotico, R.; Keiser, J.; Bright, D.; Tobia, A. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1789. (f) Sasaki, S.; Cho, N.; Nara, Y.; Harada, M.; Endo, S.; Suzuki, N.; Furuya, S.; Fujino, M. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 113. (g) Sugiyama, M.; Sakamoto, T.; Tabata, K.; Endo, K.; Ito, K.; Kobayashi, M.; Fukumi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2091.
- (6) Pietsch, M.; Gütschow, M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 8270.
- (7) (a) Florence, X.; Seville, S.; De Tullio, P.; Lebrun, P.; Pirotte, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7723. (b) Lichitsky, B.; Belyi, R.; Komogortsev, A.; Dudinov, A.; Krayushkin, M. *Russ. Chem. Bull.* **2009**, *58*, 387. (c) Brouillette, Y.; Lisowski, V.; Guillon, J.; Massip, S.; Martinez, J. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7538.
- (8) (a) Le Foulon, F.-X.; Braud, E.; Fabis, F.; Lancelot, J.-C.; Rault, S. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 10051. (b) Le Foulon, F.-X.; Braud, E.; Fabis, F.; Lancelot, J.-C.; Rault, S. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 253. (c) Fabis, F.; Jolivet-Fouchet, S.; Robba, M.; Landelle, H.; Rault, S. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 10789.
- (9) (a) Temple Burling, M.; Goldstein, B. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2313. (b) Tanaka, R.; Oyama, Y.; Imajo, S.; Matsuki, S.; Ishiguro, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1389. (c) Nagao, Y.; Hirata, T.; Goto, S.; Sano, S.; Kakehi, A.; Iizuka, K.; Shiro, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3104. (d) Huang, H.; Chen, Z.; Ponce Ortiz, R.; Newman, C.; Usta, H.; Lou, S.; Youn, J.; Noh, Y.-Y.; Baeg, K.-J.; Chen, L. X.; Facchetti, A.; Marks, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10966. (e) Ohkata, K.; Ohsugi, M.; Yamamoto, K.; Ohsawa, M.; Akiba, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6355.
- (10) (a) Domínguez de María, P.; García-Burgos, C. A.; Bargeman, G.; van Gemert, R. W. *Synthesis* **2007**, 1439. (b) Felluga, F.; Fermeglia, M.; Ferrone, M.; Pitacco, G.; Pricl, S.; Valentin, E. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 4046. (c) Tanyeli, C.; Turkut, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2057. (d) Kingery-Wood, J.; Johnson, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3975. (e) Lou, W.; Zong, M.; Wu, H. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2005**, *41*, 151. (f) Das, A. K.; Collins, R.; Ulijn, R. V. *Small* **2008**, *4*, 279.
- (11) Neumann, U.; Gütschow, M. *Bioorg. Chem.* **1995**, *23*, 72.

Chapitre 3 :

Implication de la dimérisation du VEGFR1-d2 induite par les ions métalliques dans le contrôle de l'angiogenèse

I. Données bibliographiques : ions métalliques et Angiogenèse

Suite à la découverte du fort pouvoir inhibiteur du cuivre (Cu^{2+}) sur l'interaction VEGF/VEGFR1, nous sommes intéressés à l'implication et au rôle des ions métalliques, et plus précisément du cuivre, dans l'angiogenèse.

1. Ions métalliques et angiogenèse

Les ions métalliques sont impliqués dans de nombreux processus biologiques ainsi que dans différentes pathologies. Leurs rôles dans l'angiogenèse sont de plus en plus décrits. En effet, suite à la découverte dans les années 1980 de l'effet pro-angiogénique du cuivre, le rôle et l'effet de différents métaux ont été étudiés. De nombreuses études suggèrent que des métaux exogènes dérivant de l'environnement (Cd, Ni, V ou encore As) ainsi que le cuivre et d'autres métaux endogènes (Zn, Fe, Co) régulent l'angiogenèse et réduisent l'apoptose dans de nombreux modèles humains ou encore murins.¹⁶⁴

Bien que les mécanismes d'actions de ces ions métalliques ne soient, à l'heure actuelle, pas entièrement élucidés, différentes cibles ont été identifiées. De plus, différents liens entre concentration en métal et facteurs de croissance ou autres protéines ont été établis.

Suite à notre découverte de l'effet inhibiteur du cuivre (Cu^{2+}) sur l'interaction VEGF/VEGFR1, et sachant que l'implication de ce métal dans l'angiogenèse a été très étudiée, nous nous sommes concentrés sur cet ion métallique. Cependant, à titre d'exemple, quelques effets d'autres ions métalliques endogènes et exogènes sont décrits de façon succincte.

Le zinc est un élément naturel présent à l'état d'oxydation +II. Cet ion métallique semble avoir un effet sur de nombreuses protéines cibles. Sur des cellules de la moelle osseuse de rat, il a été montré que ce métal inhibe l'apoptose induite par H_2O_2 . Dans des conditions d'ischémie, l'ajout de zinc favorise la survie cellulaire en agissant sur la voie de signalisation Akt. De plus, ce métal induit la sécrétion de VEGF favorisant ainsi l'angiogenèse.¹⁶⁵

¹⁶⁴ L. D. D'Andrea, A. Romanelli, R. Di Stasia and C. Pedone, *Dalton Trans.* **2010**, 39, 7625–7636

¹⁶⁵ D. Zhang, Y. Li, T. Zhu, F. Hang, Z. Yang and D. Miao, *Cytotherapy*, **2011**, 13, 156–164

Le fer, quant à lui, est un nutriment essentiel dont le métabolisme est fortement lié à celui du cuivre. Ce métal, pouvant exister à différents degrés d'oxydation, joue un rôle dans la régulation de l'angiogenèse et agit sur de nombreuses protéines et enzymes. Ses propriétés ne sont, cependant, pas encore complètement connues. L'action d'agents chélateurs du fer semble controversée. En effet, alors que certaines études montrent que la chélation du fer induit l'expression du VEGF et favorise l'angiogenèse via la stabilisation du facteur de transcription HIF, d'autres études montrent qu'au contraire cette chélation conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et donc à l'apoptose.¹⁶⁴

Le nickel, à fortes concentrations, est connu pour induire différents troubles de la santé dont des cancers. Il est décrit dans la littérature, que ce métal induit l'expression du VEGF. La kinase 3-phosphoinositide (PI3K) ainsi que la voie de signalisation de ERK semblent jouer un rôle essentiel dans l'induction de l'expression du VEGF par le nickel. De plus, ce métal semble également induire l'expression du gène Cap43 qui est associé à l'angiogenèse et corrélé à la différenciation des tumeurs et de la survie cellulaire.^{166,164}

Le cadmium est un polluant industriel et environnemental jouant un rôle dans la régulation de l'angiogenèse. En raison de sa capacité à perturber les jonctions intercellulaires, il est envisagé que ce métal agisse sur la cadhérine de l'endothélium vasculaire (VE-cadherin). Cette protéine transmembranaire est exprimée au niveau des jonctions entre les cellules endothéliales. Elle régule la perméabilité vasculaire ainsi que l'intégrité de l'endothélium vasculaire. Par conséquent elle joue un rôle crucial dans l'angiogenèse. Le cadmium semble avoir un double effet en fonction de la concentration. A faible concentration, ce métal induit la formation de tubes sur HUVEC, la sécrétion de VEGF ainsi que l'activation du VEGFR2 et différentes voies de signalisation. Au contraire, à forte dose, le cadmium devient toxique et inhibe l'expression du VEGF ainsi que l'activation du VEGFR2.^{167,164}

2. Cuivre, angiogenèse et transduction du signal

Dans le cadre de notre étude nous nous sommes particulièrement intéressés à l'effet du cuivre sur l'angiogenèse. Sa concentration dans le plasma peut varier en fonction des individus (âge, sexe...). Cependant elle est restée relativement plus élevée que celle de la plupart des autres métaux¹⁶⁸ et augmente lors de certaines pathologies. Le cuivre plasmatique (15-30 µM) est essentiellement lié à la céruloplasmine (~95 %). D'autres ligands moins affins et échangeables tels que l'albumine, la transcupréine ou encore des ligands de faible masse molaire (< 10 kDa) peuvent également lier le cuivre.¹⁶⁹ Ce métal est impliqué dans de nombreux phénomènes biologiques, tels que le métabolisme

¹⁶⁶ W. Ouyang, J. Li, X. Shi, M. Costa and C. Huang, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2005**, 279, 35–43

¹⁶⁷ J. Kim, W. Lim, Y. Ko, H. Kwon, S. Kim, O. Kim, G. Park, H. Choia and O. Kima, *J. Appl. Toxicol.* **2012**, 32, 342-349

¹⁶⁸ A. Cesbron, E. Sausseureau, L. Mahieu, I. Couland, M. Guerbet and J.-P. Gouille, *Journal of Analytical Toxicology*, **2013**, 37, 401–405

¹⁶⁹ W.T. Buckley and R.A. Vanderpool, *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, **2008**, 21, 601-612

énergétique ou encore la production d'hémoglobine. Il joue également un rôle essentiel dans l'angiogenèse physiologique et tumorale.

2.1 Découverte de l'effet du cuivre sur l'angiogenèse

L'angiogenèse est depuis longtemps associée à une augmentation du taux en cuivre. Une des premières expériences mettant en évidence l'effet du cuivre sur la croissance tumorale a été réalisé sur des xénogreffe de tumeurs sur lapins. Cette étude montrait que le taux de ceruloplasmine, protéine transporteuse de cuivre dans le sérum, augmentait nettement lors de la progression tumorale alors qu'il retombait à un niveau basal lors de la phase de régression.¹⁷⁰

Cette constatation a été fortement renforcée lorsqu'en 1980, McAuslan et Reilly ont mis en évidence, pour la première fois, que des sels de cuivre stimulaient l'angiogenèse et induisaient, *in vitro*, la migration des cellules endothéliales en stimulant la production de fibronectine (glycoprotéine présente dans la matrice extracellulaire et jouant un rôle clé dans la migration cellulaire).¹⁷¹

A la même période, des études réalisées sur la cornée de lapins ont également montré que le cuivre induisait une néovascularisation via la prostaglandine E1 qui est un puissant stimulant angiogénique.¹⁷² De plus, sur ce même modèle, il a été montré que l'addition de sels de cuivre seuls était suffisante pour induire une vascularisation de manière dose dépendante. Chez ces lapins, une déficience en cuivre inhibe l'induction de cette néovascularisation.

Ces résultats ont par la suite été validés sur d'autres modèles cellulaires (cellules endothéliales aortiques bovines)¹⁷³ ainsi que *in vivo*¹⁷⁴.

Différentes biomolécules transporteuses de cuivre telles que la ceruloplasmine, l'héparine ou le tripeptide glycyl-histidyl-lysine (GHK) se sont révélées capable d'induire la formation de capillaires lorsqu'elles étaient liées au cuivre.¹⁷⁵ En effet, alors qu'initialement ces molécules sont non-angiogéniques, elles deviennent angiogéniques lorsqu'elles sont liées au cuivre.¹⁷⁶

Il a été montré qu'en plus de stimuler la migration cellulaire, le cuivre induit également *in vitro* la prolifération des cellules endothéliales.¹⁷⁶ Par des expériences réalisées dans des conditions de non toxicité du métal, en présence ou absence de sérum, Hu a montré que cet effet prolifératif n'impliquait à priori pas des protéines de liaison du cuivre (type ceruloplasmine, transferrine ou albumine).¹⁷⁶

¹⁷⁰ H. Ungar-Waron, A. Gluckman, E. Spira, M. Waron, Z. Trainin, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 1296–1299

¹⁷¹ B. R. McAuslan, W. Reilly, *Exp. Cell Res.* **1980**, *130*, 147-157

¹⁷² M. Ziche, J. Jones, P. M. Gullino, *J. Natl Cancer Inst.* **1982**, *69*, 475–482

¹⁷³ B. R. McAuslan, W. G. Reilly, G. N. Hannan, G. A. Gole, *Microvasc. Res.* **1983**, *26*, 323-338

¹⁷⁴ G. Alessandri, K. Raju, P. M. Gullino, *Microcirc. Endothelium Lymphatics*, **1984**, *1*, 329-346

¹⁷⁵ P. M. Gullino, *Anticancer Res.* **1986**, *6*, 153-158

¹⁷⁶ G.-F. Hu, *Journal of Cellular Biochemistry*, **1998**, *69*, 326-335

Au travers de ces différentes expériences et données, l'effet du cuivre sur l'angiogenèse a bien été validé. En effet, il semble bien établi que le cuivre induit la migration, la prolifération cellulaire ainsi que la néovascularisation.

2.2 Développement d'agents chélateurs du cuivre pour inhiber l'angiogenèse tumorale

Le métabolisme du cuivre est altéré lors de cancer.¹⁷⁷ Une augmentation de la concentration en cuivre a été observée dans différents type de tumeurs.¹⁷⁸ Dans le cadre d'une étude portant sur le cancer du sein, il a été mis en évidence que l'augmentation du taux de cuivre était relié à l'évolution de la gravité de la maladie.¹⁷⁹ Partant de ces constatations, et sachant que le cuivre a un effet pro-angiogénique, des expériences de déplétion en cuivre ont donc été réalisées *in vivo* et corrélées à la réduction de la formation du réseau vasculaire et donc la croissance tumorale.

De nombreux agents chélateurs du cuivre permettant la déplétion en cuivre existent. La plupart résultent du développement de traitement du trouble de stockage du cuivre telles que les maladies de Wilson et Menke. Parmi les agents approuvés en clinique, on retrouve par exemple le tétrathiomolybdate (TM), la pénicillamine ou bien encore la trientine (sel de triéthylènetetramine) (Figure 53).

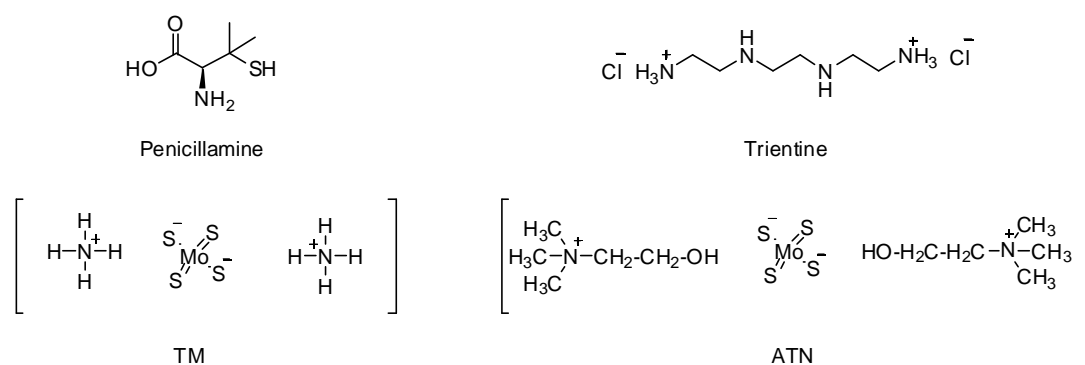


Figure 53 : Exemple d'agents chélatants du cuivre

Sur cellules HUVE, des études ont montré que l'ajout de chélatant du cuivre inhibait *in vitro* la migration des cellules endothéliales.¹⁸⁰ En effet, comme présenté dans la figure 54, la migration de ces cellules est ralentie en présence de chélateur (ATN-224).

¹⁷⁷ S. Apelgot, J. Coppey, A. Fromentin, E. Guille, M.F. Poupon and A. Roussel, *Anticancer Res.* **1986**, 6, 159-164

¹⁷⁸ E.J. Margalioth, J.G. Schenker and M. Chevion, *Cancer*, **1883**, 52, 868-872

¹⁷⁹ S.K. Gupta, V.K. Shukla, M.P. Vaidya, S.K. Roy and S. Gupta, *J. Surg. Oncol.* **1991**, 46, 178-181

¹⁸⁰ S. A. Lowndes and A. L. Harris, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **2005**, 10, 299-310

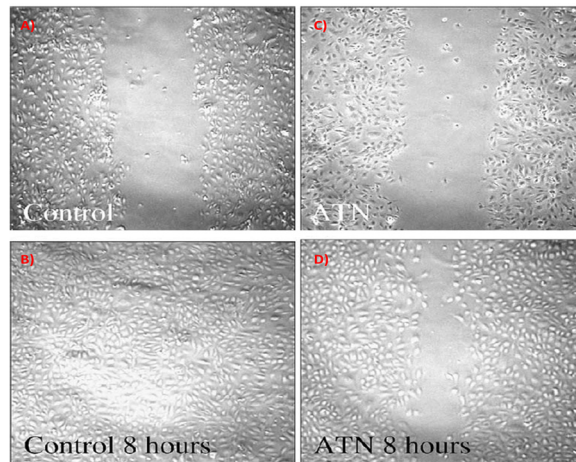


Figure 54 : Migration des cellules endothéliales (HUVEC) en présence ou absence d'agent chélateur du cuivre (ATN). A) T0h, formation de la blessure en absence d'ATN B) Contrôle T8h en absence d'ATN C) T0h, formation de la blessure en présence d'ATN D) Contrôle T8h en présence d'ATN. D'après S.A. Lowndes and A.L. Harris, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **2005**.¹⁸⁰

Sur le modèle de cornée de lapin, il a également été mis en évidence qu'alors que le cuivre induisait la néovascularisation, l'administration par voie parentérale de pénicillamine inhibait la prolifération de vaisseaux sanguins de la cornée.¹⁸¹

Relativement tôt, des études montrant une diminution de l'angiogenèse par chélation du cuivre ont été réalisées sur xélogreffes de glioblastomes de rat.¹⁸² Sur ce modèle, la pénicillamine limite la croissance des tumeurs. Ces résultats ont par la suite été validés sur de nombreux exemples de xélogreffes et de modèles tumoraux. Ces avancées sont très documentées et présentées dans de nombreuses publications et revues.^{180,183,164} L'effet de la chélation du cuivre sur la suppression de l'angiogenèse ne semblant pas dépendant du type cellulaire, l'utilisation d'agents chélatant comme traitement anti-angiogénique a été envisagée. Les premiers résultats positifs de traitement de cancer par déplétion en cuivre ont été obtenus avec le tétrathiomolybdate chez des patients souffrant de cancers métastatiques.¹⁸⁴ Cet agent chélatant a également été employé en phase II d'essai clinique sur des patients atteints de cancers du rein avancés et a conduit à une stabilisation de la maladie.¹⁸⁵ Récemment, le tétrathiomolybdate ainsi que des chélateurs de seconde génération ont été testés en essai clinique (phase I ou II) sur différents types de cancers.^{183,164}

Bien que ces traitements ne conduisent pas à une suppression de la maladie mais à une stabilisation, ces résultats restent encourageants et laissent envisager la possibilité d'utiliser ces chélatant du cuivre en association avec d'autres chimiothérapies.

¹⁸¹ T. Matsubara, R. Saura, K. Hirohata, M. Ziff, *J Clin Invest*, **1989**, *83*, (1), 158-167

¹⁸² S. Brem, A. M. Tsanaclis, D. Zagzag, *Neurosurgery*, **1990**, *26*, 391–396

¹⁸³ L. Finney, S. Vogt, T. Fukai and D. Glesne, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **2009**, *36*, 88-94

¹⁸⁴ G. J. Brewer, R. D. Dick, D. K. Grover, V. LeClaire, M. Tseng, M. Wicha, K. Pienta, B. G. Redman, T. Jahan, V. K. Sondak, M. Strawderman, G. LeCarpentier and S. D. Merajver, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1-10.

¹⁸⁵ B. G. Redman, P. Esper, Q. Pan, R. L. Dunn, H. K. Hussain, T. Chenevert, G. J. Brewer and S. D. Merajver, *Clin. Cancer Res.*, **2003**, *9*, 1666–1672

2.3 Cibles et mécanisme d'action du cuivre sur l'angiogenèse

Bien que l'effet du cuivre sur l'angiogenèse (prolifération, migration cellulaire, vascularisation) soit connu et étudié depuis de nombreuses années son mécanisme d'action précis n'est pas encore complètement élucidé et fait encore aujourd'hui débat.

2.3.1 Effets et cibles possibles du cuivre

Le cuivre semble jouer un rôle central et réguler, de façon directe ou indirecte, de nombreux éléments nécessaires au processus de l'angiogenèse.^{180,164} Quelques uns des effets et cibles possibles de ce métal sont présentées succinctement ci-dessous ainsi que sur la figure 55.

- Induction de l'expression, la libération et l'activité de nombreux facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF, eNOS ou encore par exemple des interleukines)
- Production et élévation du taux de protéines de liaisons du cuivre (céruleoplasmine, héparine)
- Effet de cofacteur favorisant les interactions entre les protéines (angiogenine, FGF, interleukines)
- Effet sur les enzymes dépendantes du cuivre (céruleoplasmine, SOD, lysyl oxydase, cytochrome C oxydase, amine oxydase SSAOs)
- Effet sur la réponse des facteurs de transcription
- Effet sur les protéines chaperonnes (Atox1, ATP7, COX, CCS)
- Effet sur les voies de signalisations des tumeurs (HIF-1, NFκB, MAPK)
- Effet sur les ATPases dépendantes du cuivre (ATP7B : protéine transmembranaire de type ATPase intervenant dans le transport du cuivre)

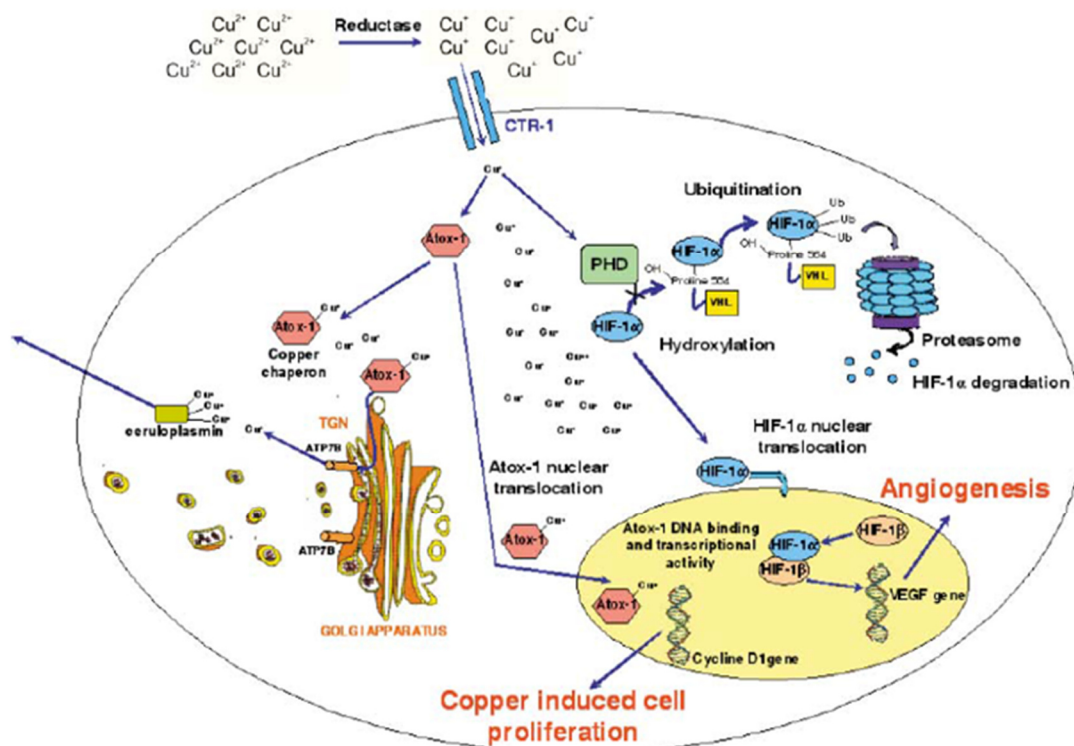


Figure 55 : Cibles potentielles du cuivre. D'après D'Andrea et al. *Dalton Trans.*, 2010.¹⁶⁴

2.3.2 Mécanismes possibles de l'effet du cuivre

Le mécanisme d'action du cuivre n'étant pas complètement élucidé, différentes hypothèses sont proposées dans la littérature pour expliquer l'effet pro-angiogénique de ce métal. Dans le cadre de notre étude et au vu de nos résultats préliminaires, nous nous sommes particulièrement intéressés aux voies dépendantes du VEGF. Les données présentées dans cette partie ne sont pas exhaustives mais visent à étayer notre hypothèse selon laquelle le cuivre pourrait avoir un effet sur la voie du VEGF et plus précisément sur l'interaction VEGF/VEGFR1.

- Voie VEGF-dépendante : effet du cuivre sur l'activité de HIF-1 (« Hypoxia Inducible Factor ») et donc sur l'expression du VEGF

Sur certains types cellulaires et dans certaines conditions de concentration en cuivre, il a été mis en évidence que l'ion métallique Cu^{2+} induit l'expression de VEGF.

Des études sur cellules ainsi que sur souris ont montré que l'ajout de cuivre induit une augmentation du taux en VEGF associée à un effet pro-angiogénique dans les cellules du myocarde.¹⁸⁶ De plus, il a été mis en évidence qu'une restriction en cuivre conduit à une diminution ou suppression du VEGF.¹⁸⁷ L'effet du cuivre sur l'expression du VEGF semble dépendre de sa concentration. Ces résultats ont également été validés sur d'autres modèles cellulaires tels que des kératinocytes où l'addition de cuivre stimule l'expression de VEGF conduisant ainsi à une augmentation de l'angiogenèse et donc au processus de cicatrisation.¹⁸⁸ Le cuivre apparaît donc comme requis pour l'expression du VEGF¹⁸⁹ ainsi que pour sa surproduction¹⁹⁰. Cette régulation du taux de VEGF semble liée à l'activation et à la stabilisation de HIF-1, qui est un facteur de transcription composé de deux sous unités (1α et 1β) connu pour induire l'expression de différents facteurs pro-angiogéniques. En effet, il a été montré que, dans des conditions d'hypoxie, la chélation du cuivre physiologique inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1 et donc l'expression du VEGF.^{186,189}

La régulation de l'activité de HIF-1 par le cuivre s'effectue à différents niveaux. Ce métal semble avoir un effet sur la synthèse et la stabilisation de HIF-1 α , sur la translocation de HIF-1 du cytosol vers le noyau, ainsi que sur la formation de complexes multi-protéiques transcriptionnels et la liaison sur la séquence HRE (« Hypoxia Response Element ») des gènes cibles.¹⁸⁹

L'activation de HIF-1 est fortement régulée par sa stabilisation et son accumulation intracellulaire.¹⁹⁰ En conditions de normoxie, le taux de HIF-1 α est négligeable. Dans ces conditions, cette sous-unité est hydroxylée par la PHD (« Prolyl Hydroxylase Domain-containing protein») et rapidement dégradée. Au contraire dans des conditions d'hypoxie, Wenger a montré que le cuivre ainsi que

¹⁸⁶ Y. Jiang, C. Reynolds, C. Xiao, W. Feng, Z. Zhou, W. Rodriguez, S. C. Tyagi, J. W. Eaton, J. T. Saari and Y. J. Kang, *J Exp Med*, **2007**, 204, 657-666

¹⁸⁷ L. Elsherif, Y. Jiang, J. T. Saari and Y. J. Kang, *Exp Biol Med (Maywood)*, **2004**, 229, 616-622

¹⁸⁸ C. K. Sen, S. Khanna, M. Venojarvi, P. Trikha, E. C. Ellison, T. K. Hunt and S. Roy, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2002**, 282, 1821-1827

¹⁸⁹ W. Feng, F. Ye, W. Xue, Z. Zhou and Y. J. Kang, *Mol Pharmacol*, **2009**, 75, 174-182

¹⁹⁰ F. Martin, T. Linden, D. M. Katschinski, F. Oehme, I. Flamme, C. K. Mukhopadhyay, K. Eckhardt, J. Tröger, S. Barth, G. Camenisch and R. H. Wenger, *Blood*, **2005**, 105, 4613-4619

d'autres métaux (Co ou Ni) inhibent la PHD et induisent ainsi l'accumulation de HIF-1 α dans la cellule et la surproduction de VEGF.¹⁹⁰ Cet effet paraît cependant très dépendant de la concentration en cuivre utilisée. En effet cela semble se vérifier seulement pour des concentrations en cuivre supérieure à 25 μ M.^{189,190}

L'activité transcriptionnelle de HIF-1 et sa fixation sur la séquence HRE des gènes cibles requiert également la présence de cuivre.¹⁸⁹ En conditions d'hypoxie, il a été mis en évidence qu'une restriction en cuivre inhibait la liaison de HIF-1 sur HRE. Afin de se lier à la séquence HRE, le facteur de transcription HIF-1 forme un complexe transcriptionnel avec d'autres cofacteurs, dont la protéine p300. La formation de ce complexe est régulée par la protéine FIH-1 (« factor inhibiting hypoxia-inducible factor ») qui en hydroxylant HIF-1 inhibe le recrutement des cofacteurs. Or il est décrit que la chélation du cuivre induit une diminution de la liaison de HIF-1 sur la protéine p300. Ce résultat suggère donc que soit le cuivre est requis pour la liaison entre HIF-1 et p300 soit que le cuivre inhibe l'action de FIH-1 et induit ainsi la formation du complexe.

De plus, la liaison du complexe sur la séquence HRE semble également dépendante de la protéine chaperonne du cuivre CCS (« copper chaperone for superoxide dismutase 1 »). En effet, cette protéine de transport du cuivre paraît nécessaire pour l'interaction puisque l'extinction du gène de cette protéine conduit au même effet que la chélation du cuivre. A savoir, l'absence de la protéine CCS entraîne l'inhibition de l'activité de HIF-1 et donc de l'expression du VEGF.

Ces différentes données, mettant en avant le rôle central et complexe du cuivre dans l'activité de HIF-1, sont résumées dans la figure 56.

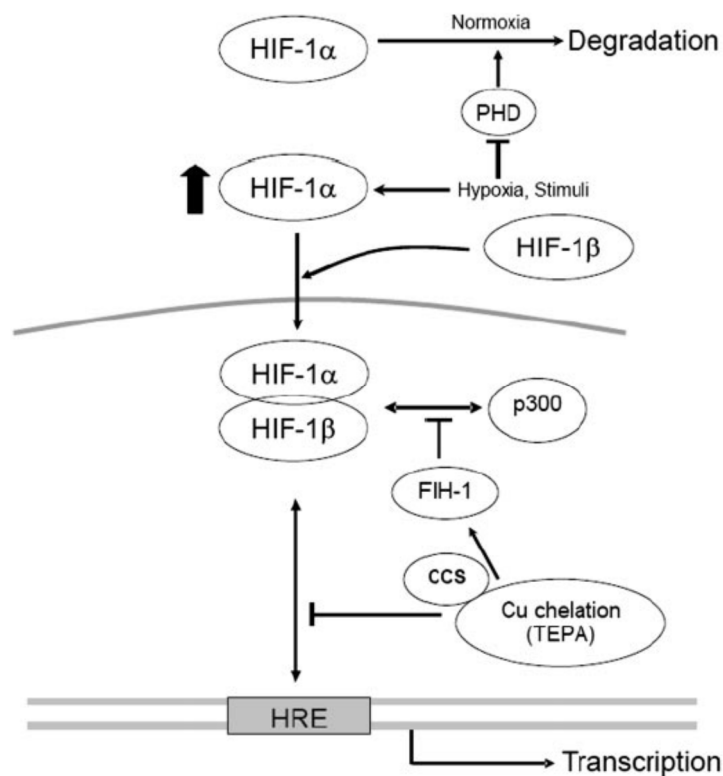


Figure 56: Régulation de l'activité de HIF-1 par le cuivre, conduisant à la transcription du VEGF. D'après Jiang et al. *J. Exp. Med.* **2007**.¹⁸⁹

Finalement, la régulation de l'expression du VEGF induite par le cuivre semble également dépendante de différentes kinases. Les kinases MAPK (« Mitogen-activated protein kinases »), cSrc et PI3K (« phosphatidylinositide 3-kinases ») sont connues pour être responsables de l'activité de HIF-1. Dans ce contexte, il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs de ces kinases induisait une inhibition de l'activité de HIF-1 induite par le cuivre.¹⁸⁸

En conclusion, au travers de ces différentes expériences, le cuivre semble bien impliqué dans l'expression du VEGF et, à haute concentration, dans sa surproduction.

- Voie VEGF-indépendante

Cette hypothèse de stimulation de la prolifération et de l'effet angiogénique par une voie dépendante du VEGF a cependant été nuancée récemment par Kang et son équipe.^{191,192}

Dans une première étude réalisée sur cellules HUVE¹⁹¹, ils ont montré que la stimulation de la croissance cellulaire par des concentrations physiologiques en cuivre n'est pas VEGF-dépendante mais à priori eNOS (« Nitric Oxide Synthase endothelial ») dépendante. L'eNOS, forme endothéliale de l'oxyde nitrique synthase, joue un rôle prédominant dans l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire. L'oxyde nitrique (NO) produit par cette enzyme est un médiateur important de l'angiogenèse. Il est impliqué dans la régulation de nombreux processus, tels que la réduction de l'apoptose ou bien encore l'augmentation de la prolifération et la migration cellulaire. En effet, dans cette étude, les auteurs ont confirmé qu'à des concentrations physiologiques, le cuivre stimule la croissance des cellules HUVE. Ainsi, l'ajout de 5 µM de cuivre augmente la prolifération cellulaire. De plus, ils ont montré que l'ajout de 25 µM de TEPA (agent chélateur du cuivre) inhibe la prolifération. Cet effet est cependant réversible puisque l'addition d'une quantité équimolaire de cuivre restaure cet effet prolifératif (*Figure 57-A*).

Cependant, les mêmes auteurs ont observé que dans ces conditions et concentrations en cuivre, cette stimulation n'est pas accompagnée d'une augmentation de la production de VEGF (*Figure 57-B*). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-VEGF n'inhibe pas la stimulation de la croissance. Par conséquent, ils ont conclu qu'à des concentrations en cuivre physiologiques, la stimulation de la croissance cellulaire induite par le cuivre était indépendante du VEGF. Au contraire, dans les mêmes conditions, ils ont observé que la production de eNOS était augmentée (*Figure 57-B*). Suite à ce résultat, l'utilisation d'un siARN spécifique de la eNOS leur a permis de conclure que la stimulation était bien eNOS dépendante.

Il est intéressant de noter que HIF-1 régule également l'expression de la eNOS. Cependant, leurs résultats les ont conduit à envisager que l'augmentation de la production de eNOS induite par le cuivre serait régulée par un mécanisme autre que celui passant par HIF-1.

¹⁹¹ S. Li, H. Xie, S. Li and Y. J. Kang, *Experimental Biology and Medicine*, **2012**, 237, 77–82

¹⁹² Q.-F. Li, X.-Q. Ding, Y. J. Kang, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2014**, 25, 44–49

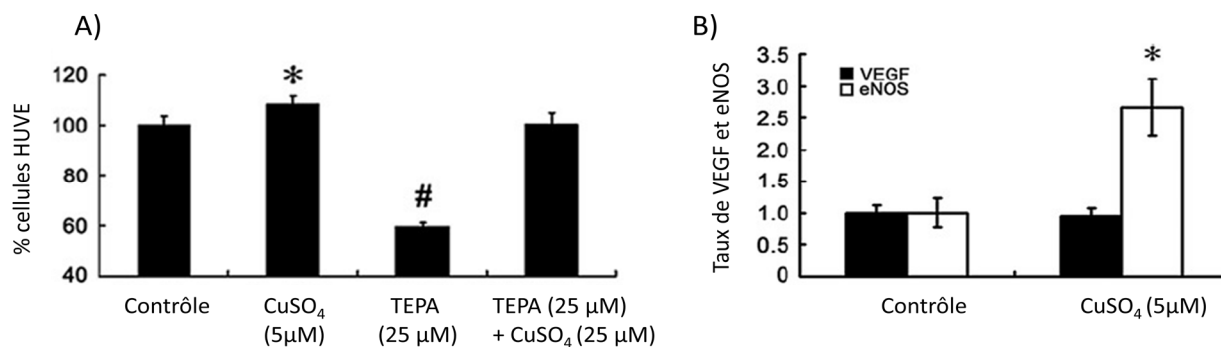


Figure 57 : A) Effet du cuivre et de TEPA sur la prolifération des cellules HUVE mesuré sur un test MTT B) Effet du cuivre sur la production de VEGF et de eNOS. D'après Li et al. *Experimental Biology and Medicine*, **2012**.¹⁹¹

Cette première étude montre donc que, bien que le cuivre soit nécessaire à l'expression du VEGF et donc au maintien d'une croissance normale des cellules, la stimulation de la prolifération des HUVEC dans les conditions de cette étude n'est pas VEGF dépendante mais eNOS dépendante.

Plus récemment, dans une seconde publication¹⁹², Kang et son équipe ont complété cette étude, cette fois-ci en analysant les effets du cuivre sur des anneaux aortiques de rat (tissu vasculaire isolé). Les résultats obtenus corrélaient avec ceux décrits ci-dessus sur HUVEC. Sur ce modèle, l'ajout de 5 µM de cuivre induit fortement l'angiogenèse sans augmenter pour autant la production de VEGF. Au contraire, l'addition de 50 µM de métal inhibe le processus d'angiogenèse mais induit cette fois-ci une augmentation du taux de VEGF. La surproduction de VEGF seul ne semble donc pas suffisante pour induire la formation de vaisseaux (Figure 58).

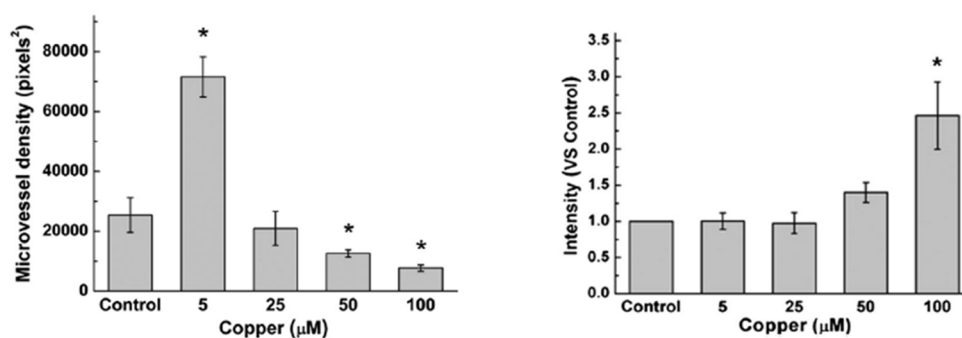


Figure 58 : A gauche : Effet du cuivre sur l'angiogenèse et la formation de micro-vaisseaux. A droite : Effet du cuivre sur la production de VEGF. D'après Li et al. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2014**.¹⁹²

De plus, à 5 µM en cuivre, l'ajout de TEPA diminue le niveau basal de VEGF et inhibe le phénomène d'angiogenèse (Figure 59). Les auteurs ont ainsi confirmé que le cuivre est nécessaire à l'expression du VEGF ainsi qu'au mécanisme d'angiogenèse.

Enfin, ils ont également observé que la neutralisation du VEGF par un anticorps anti-VEGF bloque l'effet pro-angiogénique induit par le cuivre.

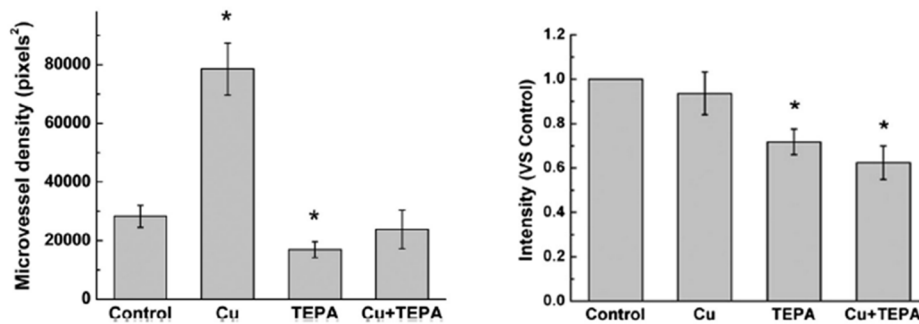


Figure 59 : A gauche : Effet du cuivre et du TEPA sur l'angiogenèse et la formation de micro-vaisseaux. A droite : Effet du cuivre et du TEPA sur la production de VEGF. D'après Li et al. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2014**.¹⁹²

En conclusion, les résultats de ces études semblent donc cohérents et mettent en évidence que, bien que l'expression d'un niveau basal de VEGF soit nécessaire, la surproduction de ce facteur de croissance et l'effet pro-angiogénique induit par le cuivre sont deux phénomènes parallèles. L'effet observé pourrait donc être associé à la production de eNOS ainsi qu'à d'autres cibles potentielles.

- Voie VEGFR1 dépendante

Des études récentes portant sur l'hypertrophie cardiaque ont suggéré que l'activité angiogénique du cuivre pourrait être associée à la voie de signalisation des récepteurs au VEGF et plus particulièrement au VEGFR1.

L'hypertrophie cardiaque est étroitement corrélée au processus de l'angiogenèse. La perturbation de ce lien peut conduire à un dysfonctionnement ou à une insuffisance cardiaque. Le VEGF semble avoir deux fonctions distinctes dans les cardiomyocytes. En conditions physiologiques, il stimule la croissance des cardiomyocytes. Au contraire, en condition d'hypertrophie, il induit une diminution de la taille des cardiomyocytes. Donc la régression de l'hypertrophie cardiaque est un mécanisme dit angiogenèse-dépendant. Il a été montré que, sur des cultures primaires de cardiomyocytes de rats, l'ajout de concentrations physiologiques en cuivre (5 μ M) induisait la régression de l'hypertrophie cardiaque (induite par la phényléphrine PE). De plus, il a été mis en évidence que la régression de l'hypertrophie cardiaque induite par le cuivre était VEGF-dépendante.¹⁹³ Cependant, sur ce modèle, cette régression ne s'accompagne pas d'une augmentation de la production en VEGF.¹⁹⁴

Cette action VEGF-dépendante du cuivre sans surexpression de VEGF suggère donc que le métal agit sur une cible dépendante de la voie du VEGF autre que le facteur de croissance lui-même. Cette étude a mis en évidence que le cuivre altère la distribution des récepteurs au VEGF, induisant une augmentation du ratio VEGFR1/VEGFR2. L'analyse par microscopie de fluorescence de la répartition des récepteurs a montré qu'en présence de 5 μ M de cuivre, la densité du VEGFR1 n'était pas altérée

¹⁹³ Y. Zhou, Y. Jiang, Y. J. Kang, *J Mol Cell Cardiol*, **2008**, 45, 106-117

¹⁹⁴ Y. Zhou, K. Bourcy and Y. J. Kang, *Cardiovascular Research*, **2009**, 84, 54-63

tandis que celle du VEGFR2 était réduite (Figure 60). Cet effet est associé à une inhibition de la croissance des cardiomyocytes et à une régression de l'hypertrophie.

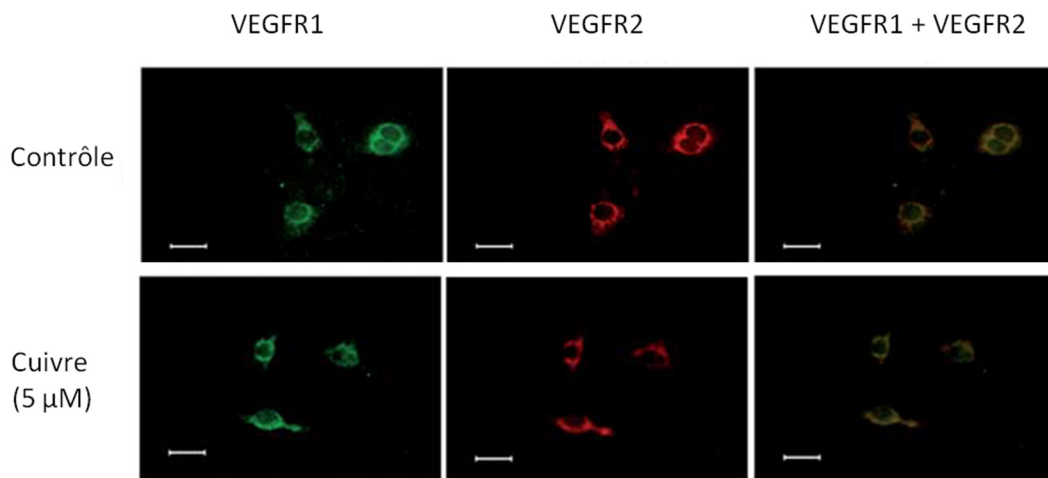


Figure 60 : Images de microscopie de fluorescence de cellules traitées par des anticorps anti-VEGFR1 (vert), ou anti-VEGFR2 (rouge), ou avec les deux après exposition ou non à une concentration en cuivre de 5 µM. D'après Y. Zhou et al. *Cardiovascular Research*, **2009**.¹⁹⁴

Afin de mettre en évidence un lien de cause à effet entre l'augmentation du ratio VEGFR1/VEGFR2 et la régression de l'hypertrophie cardiaque, les auteurs ont réalisé une série de contrôles et d'expériences supplémentaires. Dans un premier temps, l'utilisation de siARN spécifiques du VEGFR2 les a conduits à montrer que l'extinction du gène du VEGFR2 ne modifie pas l'effet du cuivre. Sur ces cellules traitées par siARN spécifiques du VEGFR2, l'utilisation d'anticorps anti-VEGF inhibe cependant la régression de l'hypertrophie cardiaque induite par le cuivre. Ces effets suggérant l'importance du VEGFR1 dans le mécanisme d'action du cuivre, l'expérience a été reproduite en éteignant cette fois-ci le gène du VEGFR1. Dans ces conditions, la régression induite par le cuivre est en effet également bloquée.

Les auteurs ont ainsi mis en évidence l'importance du VEGFR1 dans la régression induite par le cuivre. En conclusion, la voie du VEGFR1 représente donc une cible potentielle du cuivre.

- Cibles extracellulaires

Des cibles extracellulaires ont également été envisagées. Une étude réalisée sur des cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMVEC) a mis en évidence par microscopie électronique que lors d'un stimulus pro-angiogénique (par exemple du au VEGF), le niveau de cuivre cellulaire diminue.¹⁹⁵

¹⁹⁵ L. Finney, S. Mandava, L. Ursos, W. Zhang, D. Rodi, S. Vogt, D. Legnini, J. Maser, F. Ikpatt, O. I. Olopade and D. Glesne, *PNAS*, **2007**, 104, 2247–2252

En effet, 30 à 60 minutes après le stimulus, la majorité du cuivre normalement centralisé au niveau du noyau est relocalisé à la périphérie de la cellule et transloqué dans l'espace extracellulaire où il est séquestré au niveau de la membrane (Figure 61).

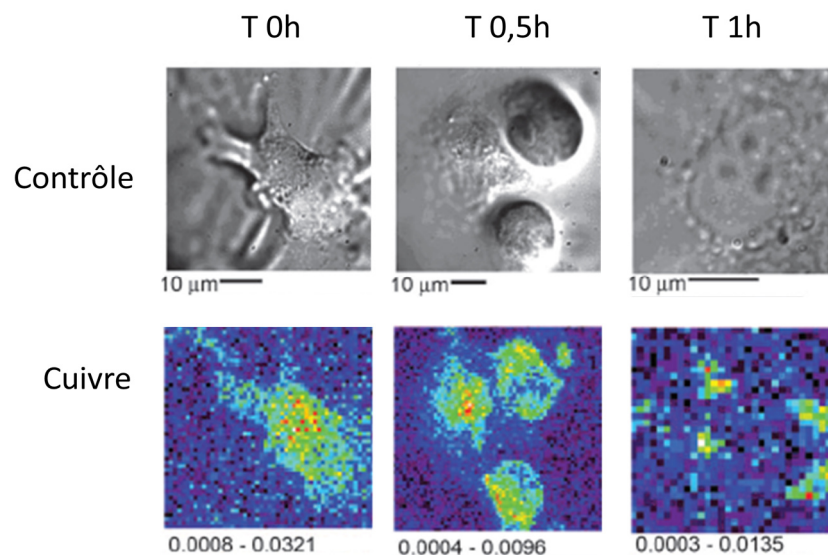


Figure 61 : Relocalisation du cuivre du noyau de la cellule vers l'espace extracellulaire. D'après L. Finney et al. *PNAS*, 2007.¹⁹⁵

La spécificité, *in vivo*, des agents chélateurs du cuivre dans l'inhibition de l'angiogenèse suggère que cette relocalisation du cuivre serait spécifique de l'angiogenèse. De plus, cette hypothèse pourrait ainsi expliquer l'effet des agents chélateurs du cuivre qui ne peuvent pas passer les membranes cellulaires.

Bien que la cible n'ait pas été mise en évidence, il est envisagé que le cuivre pourrait être séquestré au niveau extracellulaire par une protéine ou macromolécule potentiellement transmembranaire.

3. Conclusion

En conclusion, l'angiogenèse semble fortement régulée par le cuivre ainsi que par différents métaux endogènes et exogènes. Bien que l'effet pro-angiogénique de certains de ces métaux ait été très étudié, leur mécanisme d'action exact n'est pas encore élucidé. D'après la littérature et les différentes données présentées dans cette introduction, de nombreuses cibles ont été identifiées et des connections entre concentration en métal et facteurs de croissances ou autres protéines ont été établies. Dans ce contexte, les efforts actuels portent sur l'identification de nouvelles cibles et sur la compréhension des mécanismes d'actions de ces métaux. Cela, en partie, dans le but de développer de nouvelles molécules capables de moduler la réponse angiogénique en agissant sur les mécanismes dépendant des métaux.

II. Résultats : dimérisation du domaine d2 du VEGFR1 induite par les métaux et régulation de l'angiogénèse

Notre découverte de l'effet inhibiteur du cuivre sur l'interaction VEGF/VEGFR1 *in vitro* pouvant s'inscrire dans une démarche de compréhension du mécanisme de régulation de l'angiogénèse par les métaux, nous avons poursuivi cette étude.

En s'appuyant sur les données de la littérature présentées précédemment et plus particulièrement sur les travaux de Finney sur la relocalisation extracellulaire du cuivre¹⁹⁵, nous avons envisagé que le VEGFR1 pourrait être une cible potentielle du cuivre et d'autres métaux divalents dans la régulation de l'angiogénèse.

Dans ce contexte, en collaboration avec une équipe de biologie structurale (équipe du Dr. I. Broutin, UMR 8015, Université Paris Descartes) et une équipe de RMN (équipe du Dr. S. Bouaziz, UMR 8015, Université Paris Descartes), nous avons étudié l'effet des métaux sur le VEGFR1 et donc sur l'angiogénèse. Cette étude faisant l'objet d'une publication en cours de soumission seul un résumé est présenté. L'article complet (article 3) contenant le détail des résultats est inséré dans le manuscrit.

1. Déplacement de l'interaction VEGF/VEGFR1 par des métaux divalents : test ELISA

Suite à la découverte du pouvoir inhibiteur du cuivre sur l'interaction VEGF/VEGFR1 et sachant que de nombreux ions métalliques ont un effet sur le contrôle de l'angiogénèse¹⁶⁴, l'activité de différents métaux divalents a été évaluée sur notre test ELISA VEGFR1-ECD (domaine extracellulaire).

Sept ions métalliques endogènes ou dérivant de l'environnement ont été choisis (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} et Ni^{2+}). De plus, un métal exogène supplémentaire, le Pd^{2+} , a été sélectionné en raison de son utilisation fréquente et importante en synthèse organique et peptidique. Nous avons ainsi mis en évidence que différents métaux pouvaient déstabiliser l'interaction VEGF/VEGFR1. Comme indiqué dans la figure 62, le cuivre et le palladium sont les plus actifs des ions métalliques testés avec des CI_{50} respectives de 0,97 μM et 0,36 μM . D'autres métaux tels que le zinc et le nickel sont également très actifs avec des CI_{50} de l'ordre du micromolaire. De plus, nous avons également montré que d'autres métaux divalents ont peu d'effet (cobalt et cadmium) ou pas d'effet sur cette interaction (fer et manganèse).

Métaux	CI ₅₀ [95% CI] (μM)
CuSO ₄	0.97 [0.63-1.49]
Pd(OAc) ₂	0,36 [0.27-0.48]
NiSO ₄	3.54 [2.67 – 4.70]
ZnSO ₄	5.94 [4.80-7.37]
CoCl ₂	47,11 [35.33 – 62.81]
CdCl ₂	47,97 [32.55 – 70.69]
FeSO ₄	N/A
MnSO ₄	N/A

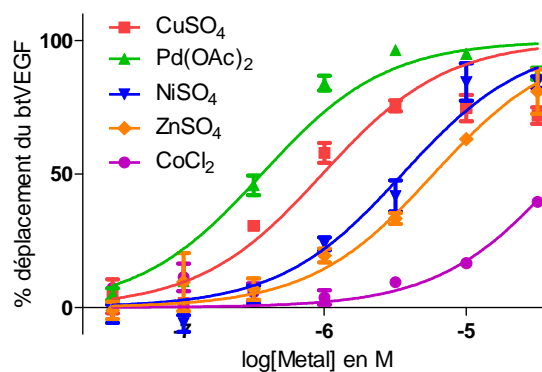


Figure 62 : Capacité des métaux sélectionnés à déplacer l'interaction VEGF/VEGFR1. (N/A : inférieur à 10 % de déplacement à 30 μM)

Au vu de ces résultats, différents contrôles ont été effectués pour confirmer la spécificité d'action des métaux les plus actifs. Sachant qu'il est décrit que les métaux ont un effet sur la HRP¹⁶³, nous avons souhaité étudier l'activité de certains de ces métaux dans nos conditions ELISA. De la même manière que pour le cuivre (*cf. chapitre 2*), l'effet du palladium sur l'activité de la HRP a été évalué. En solution, l'effet de Pd(OAc)₂ a été testé en présence d'eau oxygénée, de « super signal » et de HRP. Sur une gamme de 30 μM à 0,03 μM, le palladium n'exerce qu'une faible inhibition de l'activité de la HRP. De façon similaire au cuivre, le palladium inhibe à 23 % l'activité de la HRP à 30 μM et cet effet décroît rapidement lorsque la concentration en métal diminue. A très faible concentration, le palladium semble au contraire activer légèrement l'enzyme (*Figure 63*).

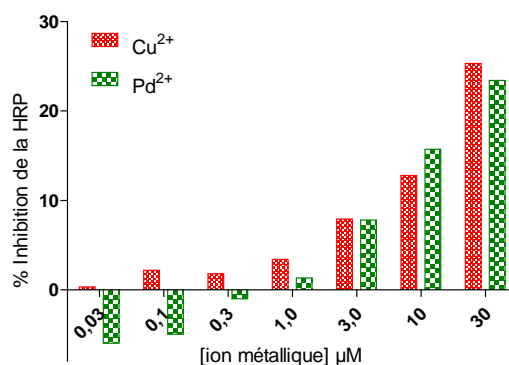


Figure 63 : Effet du palladium et du cuivre sur l'activité de la HRP en solution

Nous avons également étudié l'effet intrinsèque de certains métaux sur la dismutation de l'eau oxygénée. Bien que le fer ne soit pas actif sur notre test ELISA, nous l'avons inclus afin d'avoir un contrôle négatif. Dans un premier temps, nous avons comparé le signal obtenu, en solution, en présence de super signal seul ou en présence de 30 μM de métal. Comme attendu, nous avons pu constater que le fer n'a pas d'effet. Contrairement au palladium qui, comme le cuivre, n'a qu'une faible activité, le cobalt s'est avéré avoir un effet très important sur le super signal et donc *a priori* sur la dismutation de l'eau oxygénée (*Figure 64*).

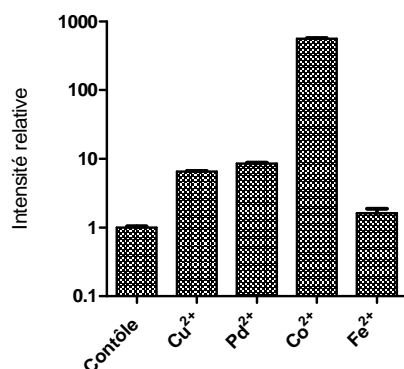


Figure 64 : Effet des métaux divalents sur le super signal en solution. Le contrôle représente l'intensité lumineuse obtenue avec le super signal seul. Celui-ci a été arbitrairement fixé à 1.

Afin de s'assurer que l'activité observée pour le cobalt sur le test ELISA n'était pas due à un effet de l'ion métallique sur le super signal, différents contrôles complémentaires ont été effectués. Comme nous l'avons fait pour le cuivre, nous avons testé l'effet du cobalt ainsi que celui du palladium et du fer sur le super signal en présence de récepteur. Pour cela, nous avons réalisé l'expérience en fixant le récepteur (VEGFR1-ECD) dans une plaque 96 puits. Après blocage par de la BSA et incubation pendant 1h avec l'ion métallique souhaité (30 μ M), nous avons ajouté le super signal. Après révélation de la plaque par chimioluminescence, nous n'avons pas vu de différence par rapport aux résultats précédents et avons conclu que la liaison de l'ion métallique sur la protéine n'avait pas d'effet sur son activité intrinsèque (Figure 65).

Suite à ce résultat, et afin de se rapprocher au mieux des conditions du test ELISA, nous avons réalisé la même expérience mais en effectuant des lavages entre l'étape d'incubation de l'ion métallique et l'ajout du super signal. Nous avons ainsi pu observer qu'après 4 lavages, l'activité de tous les métaux divalents diminuait fortement. En effet, après 4 lavages, l'activité du cobalt revient à un niveau basal. En conclusion, dans nos conditions ELISA (7 lavages après ajout des métaux), l'activité intrinsèque de tous les métaux peut être considérée comme négligeable (Figure 65).

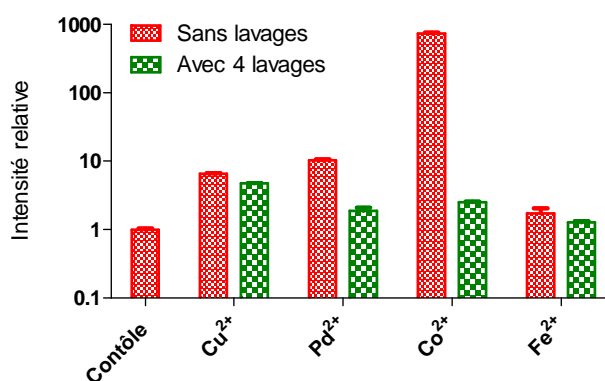


Figure 65 : Effet des métaux divalents sur le super signal dans les conditions de test ELISA. Le contrôle représente le signal obtenu en absence de métaux. Celui-ci a été arbitrairement fixé à 1.

Au travers de ces différents contrôles, nous avons donc mis en évidence que l'activité de ces métaux divalents sur notre test de déplacement VEGFR1-ECD est bien significative et spécifique de l'interaction VEGF/VEGFR1.

2. Dimérisation du VEGFR1-d2 en présence de métaux

2.1 Cristallisation du VEGFR1-d2 en présence de métaux divalents

Suite aux résultats obtenus en ELISA, une étude cristallographique a été initiée en collaboration avec le Dr. J.-F. Gaucher et B. Seijo (équipe du Dr. I. Broutin).

De façon antérieure à notre découverte, cette équipe avait obtenu, au cours d'essais de cristallisation du récepteur en présence de ligands potentiels, une structure du domaine d2 du VEGFR1 dans laquelle se trouvait de façon inattendue un atome de zinc. Ce résultat avait alors été considéré comme un artefact de cristallisation.

Cependant, associée à l'effet inhibiteur de l'interaction VEGF/VEGFR1 de différents ions métalliques, cette structure ne semblait plus être un artefact mais un élément fondamental pour l'analyse et la compréhension de l'effet des métaux sur l'interaction VEGF/VEGFR.

Dans ce contexte, différents essais de cristallisation du domaine d2 du VEGFR1 en présence de métaux divalents (Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} et Ni^{2+}) ont été réalisés. Deux structures cristallines ont ainsi été obtenues en présence d'ions Zn^{2+} et Co^{2+} . Ces deux structures, relativement similaires, ont permis de mettre en évidence une dimérisation du domaine d2 du récepteur induite par le métal (*Figure 66*).

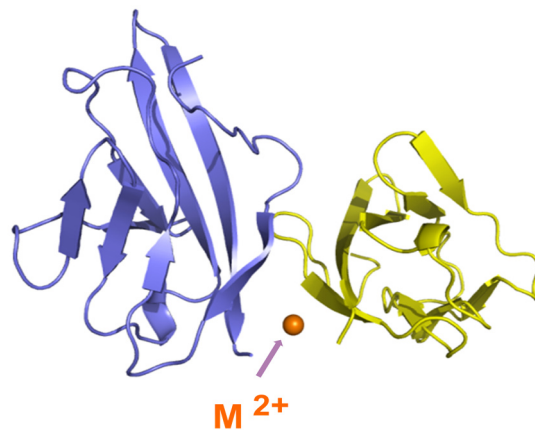


Figure 66 : Dimérisation du domaine d2 du VEGFR1 induite par les métaux

La structure de l'homodimère de récepteur est stabilisée par une large surface hydrophobe et complémentaire ainsi que par la chélation de l'ion métallique par deux histidines présentes sur chaque monomère (His 147 et 223). Bien que les structures soient très similaires, le mode de coordination semble varier en fonction des ions métalliques. En effet, alors que l'ion Zn^{2+} adopte une géométrie de coordination de type tétraédrique, l'ion métallique Co^{2+} est coordonné d'une part par les

quatre histidines mais également par deux molécules d'eau et adopte donc une géométrie octaédrique (Figure 67).

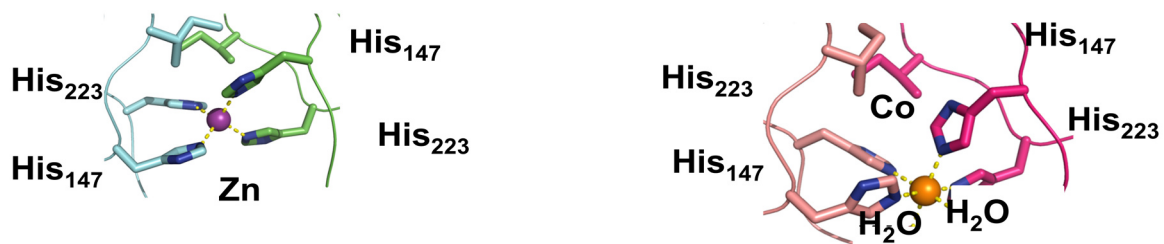


Figure 67 : Mode de coordination tétraédrique pour le zinc et octaédrique pour le cobalt

La différence de géométrie, associée à des distances de coordination plus longue que celles classiques, laisse envisager une adaptabilité du site métallique et donc une chélation possible de métaux possédant un rayon atomique plus large. Ce résultat semble donc en accord avec les résultats obtenus par ELISA.

2.2 Dimérisation du récepteur induite par les métaux en solution

Afin de vérifier que la dimérisation du récepteur induite par les métaux observée par cristallographie pouvait avoir lieu en solution et donc dans des conditions physiologiques, différentes expériences complémentaires ont été réalisées : chromatographie d'exclusion, SAXS et RMN.

2.2.1 Expérience de SAXS (Small-angle X-ray scattering)

Le SAXS ou diffraction aux petits angles est une méthode permettant de détecter un signal émis par un faisceau de rayons X à des angles faibles et qui émerge de l'échantillon en solution (macromolécule) pratiquement dans l'axe du faisceau incident (Figure 68). Cette méthode ne permet pas de déterminer la structure de la molécule mais permet de reconstruire son enveloppe et donc d'accéder à sa forme et sa taille.

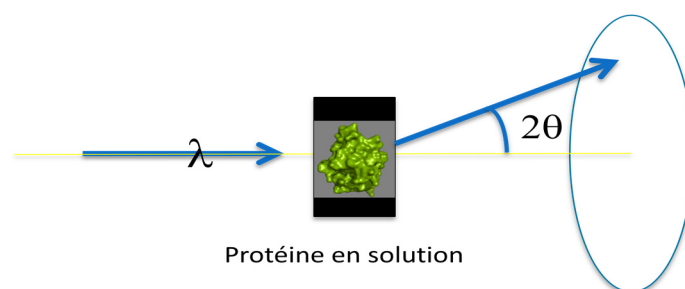


Figure 68 : Principe du SAXS

Toujours en collaboration avec le Dr. Jean-François Gaucher, l'analyse de diffraction aux petits angles du domaine d2 du VEGFR1 a été réalisée en présence de cobalt et a permis de confirmer que cette

dimérisation du récepteur était possible en solution. En effet, en accord avec les structures cristallographique, l'ajout de ce métal induit le passage d'une forme monomérique à dimérique (Figure 69).

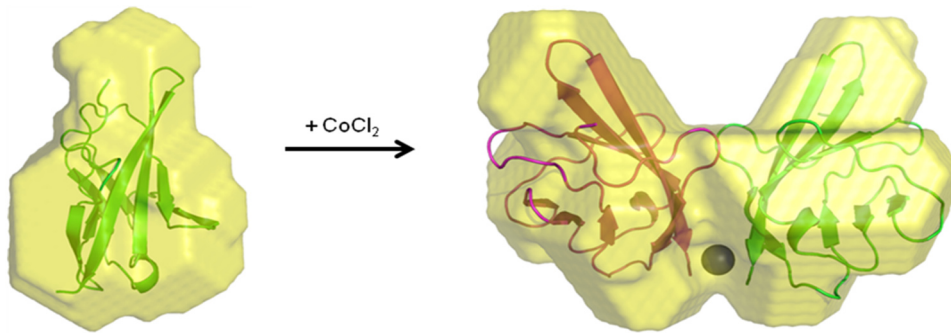


Figure 69 : SAXS : Dimérisation induite par du cobalt en solution

2.2.2 Analyse RMN

En collaboration avec le Dr. S. Bouaziz et P. Coric, des expériences de RMN ont également été réalisées et ont permis de valider cette dimérisation du domaine d2 du VEGFR1 en présence de cadmium. De plus, l'analyse du spectre ^1H - ^{15}N TROSY du VEGFR1 en présence de Cd^{2+} a permis de confirmer le mode de liaison de ce dimère. Comme observé dans le cristal, l'ion métallique est chélaté par les quatre histidines dans le complexe (Figure 70). Cette méthode a également permis de mettre en évidence, à l'aide d'une quantité équimolaire d'EDTA, que ce phénomène de dimérisation est réversible.

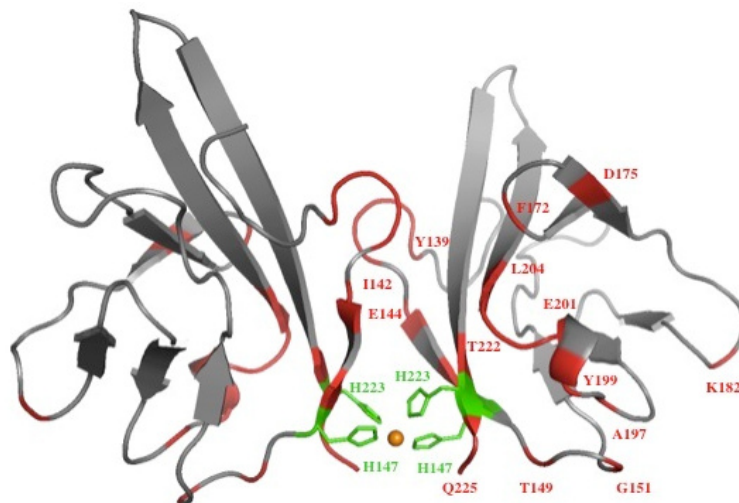


Figure 70 : RMN : Dimérisation induite par du cadmium en solution

2.3 Surface d'interaction : Complexe VEGFR1/VEGFR1 vs VEGFR1/VEGF

Au travers de ces deux techniques (RMN et SAXS) ainsi que d'une expérience de chromatographie d'exclusion en présence de cuivre, l'existence d'un équilibre de dimérisation du domaine d2 du récepteur induit par des métaux divalents a donc été confirmée en solution.

De plus, les approches complémentaires de cristallographie et RMN ont permis de caractériser le mode de formation du dimère de VEGFR1-d2 et d'identifier les résidus impliqués d'une part dans la chélation du métal et d'autre part dans la surface d'interaction hydrophobe de ces deux monomères de récepteur. Nous avons ainsi mis en évidence que cette surface d'interaction est similaire à celle impliquée dans la reconnaissance du VEGF par le récepteur. (Figure 71).

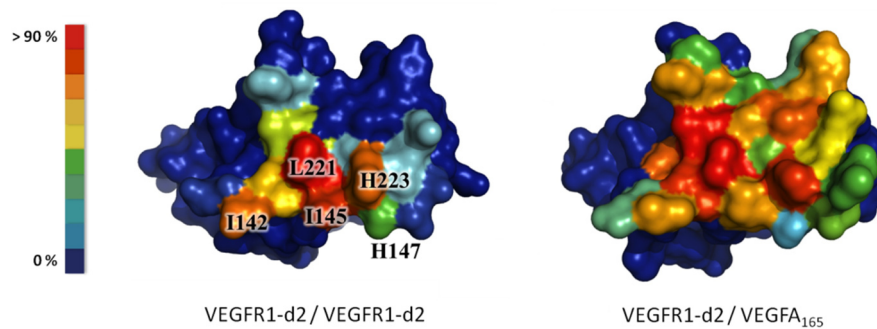


Figure 71 : Résidus du VEGFR1-d2 impliqués d'une part dans la formation de l'homodimère (gauche) et d'autre part dans l'interaction avec le VEGF (droite). Le code couleur représente le degré d'enfouissement des résidus lors de l'interaction.

La surface de dimérisation, similaire à celle impliquée dans la reconnaissance du VEGF par le récepteur, laisse envisager que cette dimérisation du VEGFR1-d2 est incompatible avec la fixation du ligand naturel. Associé aux résultats obtenus par ELISA, ceci suggère que des métaux divalents tels que Cu, Pd, Ni, Zn, Co, ou encore Cd pourrait entrer en compétition avec la fixation du VEGF et réguler ainsi le mécanisme de l'angiogénèse.

3. Effets des métaux divalents sur la prolifération des cellules HUVE

Afin de compléter cette étude, nous avons évalué l'effet de ces ions métalliques sur la prolifération des cellules HUVE. La stimulation de la croissance cellulaire des HUVEC par différents métaux divalents a été étudiée sur un test de survie cellulaire de type MTT (« Methyl Thiazol Tetrazolium »). Nous avons ainsi montré que la prolifération cellulaire était induite par les ions Pd²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺. De plus, nous avons montré que Co²⁺ et Fe²⁺ n'induisent respectivement que peu ou pas de stimulation de la croissance cellulaire (Figure 72). Ces résultats corréleront avec ceux obtenus sur notre test de déplacement de l'interaction VEGF/VEGFR1.

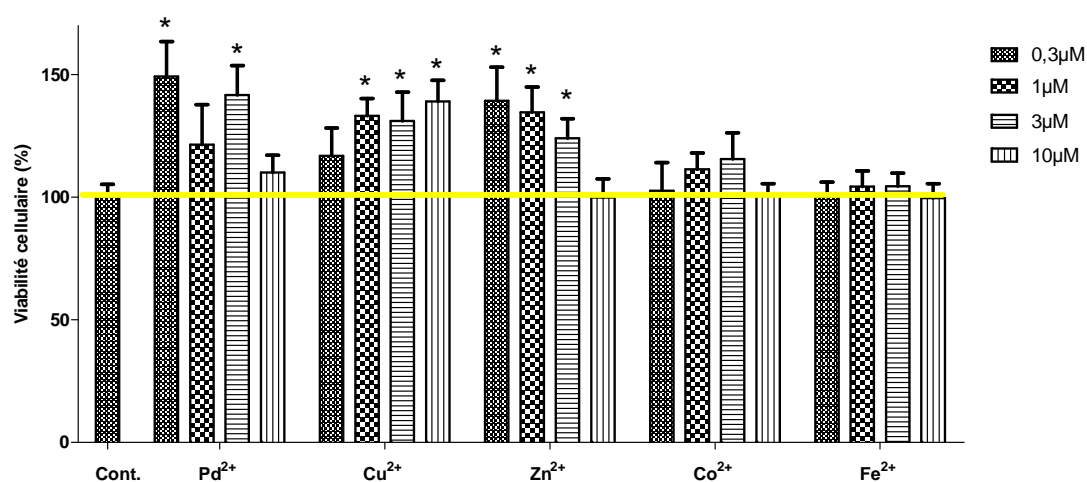


Figure 72 : Effets des métaux sur la prolifération cellulaire des HUVEC

Dans nos conditions expérimentales, nous avons montré que 30 % de stimulation cellulaire étaient atteints à 0,3 μM, 1,0 μM et 0,3 μM respectivement pour le palladium, le cuivre et le zinc. De plus, alors que le cuivre semble stimuler la prolifération de manière dose dépendante, un retour au niveau basal est observé pour le zinc et le cobalt à des concentrations élevées. Cette différence de comportement suggère un effet cytotoxique du zinc et du cobalt.

Des résultats similaires au palladium et au zinc ont également été obtenus avec du cadmium par J. Kim.¹⁶⁷ En effet, Kim et son équipe ont montré que le cadmium induit une augmentation de la prolifération des cellules HUVE (20 %) jusqu'à 10 μM puis diminue la viabilité cellulaire de manière dose dépendante. L'absence de cytotoxicité pour le cuivre à cette gamme de concentration est accord avec les travaux de G-F. Hu¹⁷⁶ et de S. Li¹⁹¹.

En conclusion, nos résultats sur cellules HUVE semblent corréler avec les résultats obtenus en ELISA. De plus, bien que cette stimulation de la prolifération des cellules par des métaux soit en accord avec les données de la littérature, nos résultats mettent en évidence que le cuivre, le zinc et le palladium ont un effet prolifératif à faible concentration (micromolaire).

III. Discussion : implication de la dimérisation du VEGFR1 induite par les métaux dans le contrôle de l'angiogenèse

Les histidines du VEGFR1-d2 impliquées dans la chélation du métal (H₁₄₇ et H₂₂₃) sont substituées par des résidus hydrophobes dans le VEGFR2-d2. Par conséquent et bien que nous n'ayons pu évaluer l'effet des métaux sur le VEGFR2-d2, la dimérisation du récepteur induite par les métaux semble spécifique du VEGFR1. Dans ce contexte et suite aux résultats obtenus dans cette étude, différentes hypothèses ont été envisagées pour comprendre l'implication de cette dimérisation du VEGFR1 induite par les métaux dans le contrôle de l'angiogenèse.

Hypothèse 1 : Activation des domaines à activité tyrosine kinase du VEGFR1 en absence de VEGF ?

Une première hypothèse a été d'envisager que suite à la dimérisation du VEGFR1 induite par les métaux, les domaines à activité tyrosine kinase de ce récepteur soient activés et conduisent alors à la transduction du signal nécessaire à l'effet prolifératif et angiogénique.

En s'appuyant sur la structure du VEGFR2-d2-d3 ainsi que sur la structure du dimère de d2, un modèle des domaines d2-d3 du VEGFR1 a été construit (collaboration avec le Dr. J.-F. Gaucher). Celui-ci a mis en évidence qu'en présence de métaux l'orientation des domaines d3 du récepteur diffère de celle observée dans le complexe VEGFR2-d2-d3/VEGF¹⁹⁶ (Figure 73). Par conséquent cette observation laisse envisager que les positions relatives des domaines d3-d7 varient par rapport à celles induites par la fixation du VEGF.

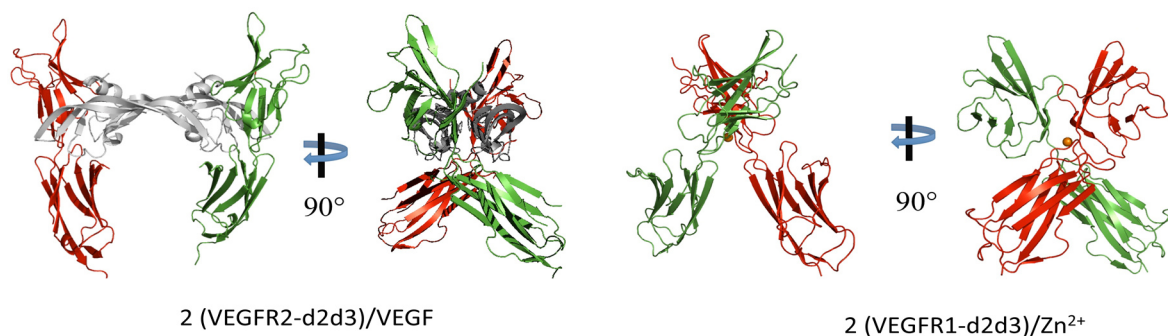


Figure 73 : Structure du complexe (VEGFR2-d2d3/VEGF)₂ et du modèle (VEGFR1-d2d3)₂ en présence de Zn²⁺

Ce résultat de la modélisation suggère donc que, bien que la dimérisation des domaines d2 du VEGFR1 soit envisageable sur le récepteur entier, celle-ci ne semble pas compatible avec une activation du récepteur et donc des voies de transduction.

¹⁹⁶ V.-M. Leppänen, A. E. Prota, M. Jeltsch, A. Anisimov, N. Kalkkinen, T. Strandin, H. Lankinen, A. Goldman, K. Ballmer-Hofer and K. Alitalo, *PNAS*, **2010**, *107*, 2425–2430

Hypothèse 2 : Modification de l'équilibre entre homodimères de VEGFR1, de VEGFR2 et hétérodimères VEGFR1/2?

Suite à cette constatation, une autre hypothèse pourrait être que le cuivre ou plus généralement d'autres métaux divalents régulent l'angiogenèse en modulant la formation d'homo et hétérodimères de VEGFRs. Les récepteurs au VEGF étant des récepteurs à activité tyrosine kinase, ils nécessitent d'être sous forme de dimère pour être actifs. Ces récepteurs peuvent former des homodimères VEGFR1, VEGFR2 ou des hétérodimères VEGFR1/2. Le mécanisme de dimérisation du récepteur n'est cependant pas clair et différentes hypothèses sont envisagées. Cette dimérisation des récepteur pourrait soit être induite par la fixation du ligand sur un premier monomère de récepteur soit résulter d'un phénomène de pré-association des deux monomères de récepteurs avant fixation du ligand. A l'aide de modèle informatiques, Mac Gabhann et Popel ont étudié ce phénomène de pré-association des récepteurs et ont avancé que la formation d'hétérodimères était statistiquement inévitable lorsque les cellules expriment plusieurs types de récepteurs. De plus, cette étude suggère que le VEGFR1 étant présent en plus faible quantité que le VEGFR2, la majorité de VEGFR1 dans les cellules endothéliales existe sous forme d'hétérodimère VEGFR1/2.⁴⁸

Ces récepteurs sous forme d'homo ou hétéro dimères activent des voies de signalisations différentes.^{64,65} L'effet prolifératif des cellules endothéliales est principalement assuré par le VEGFR2. En effet, contrairement à l'homodimère VEGFR2, l'activation de l'hétérodimère VEGFR1/2 n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire. En s'appuyant sur le modèle de pré-association des récepteurs, il a également été proposé que le VEGFR1 régule négativement le VEGFR2 en formant des hétérodimères VEGFR1/2, afin de maintenir l'homéostasie des cellules endothéliales.⁶⁶

Très récemment, une étude de FRET a appuyé ces différents résultats en montrant que, sur des cellules d'insectes transfectées par des récepteurs 1 et 2 au VEGF, le VEGFR1 serait prédimérisé sous forme d'hétérodimères VEGFR1/2 en absence de ligand. La formation d'homodimères VEGFR1 serait induite par des concentrations croissantes en VEGF. Cette étude renforce également l'idée que les voies de signalisation dépendantes du VEGF sont régulées par l'état de dimérisation des récepteurs.¹⁹⁷

Dans ce contexte, et au vu de nos résultats, les métaux pourraient potentiellement moduler le ratio homo/hétérodimère et ainsi être impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse.

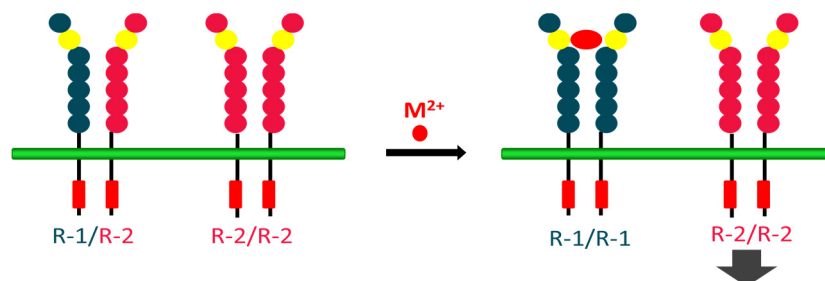


Figure 74 : Hypothèse 2 : modulation du ratio homo/hétérodimère en présence de métaux divalents

¹⁹⁷ Z. Ahmadova, V. Yagublu, T. Forg, Y. Hajiyeva, R. Jesenofsky, M. Hafner and M. Keese, *Anticancer Research*, 2014, 34, 2123-2134

Selon cette hypothèse, de façon similaire à ce qui a été montré en présence de VEGF, les métaux favoriseraient la formation et l'activation des homodimères VEGFR1 et VEGFR2 au détriment des hétérodimères VEGFR1/2 et conduiraient ainsi à un effet pro-angiogénique passant plutôt par VEGFR2 (Figure 74).

Hypothèse 3 : Transfert du VEGF du VEGFR1 au VEGFR2 en présence de métaux divalents

Une dernière hypothèse, et certainement la plus probable, serait qu'en présence de métaux divalents tels que le cuivre, le VEGF se fixe non plus sur le VEGFR1 mais sur le VEGFR2 et induise ainsi un effet pro-angiogénique. Bien qu'induisant une faible signalisation, le VEGF se fixe préférentiellement sur le VEGFR1 sous forme d'homo ou d'hétérodimère. Cependant, au vu de nos résultats et de la spécificité d'action supposée des ions métalliques pour le VEGFR1, la présence de métaux divalents tels que le cuivre pourrait rétablir une compétition de fixation du VEGF sur les différents récepteurs. En effet, en raison de l'affinité apparemment importante du cuivre pour le VEGFR1 et de l'incompatibilité de fixation du métal et du VEGF sur ce récepteur, la présence de métaux pourrait induire un déplacement du facteur de croissance du VEGFR1 vers le VEGFR2 (Figure 75).

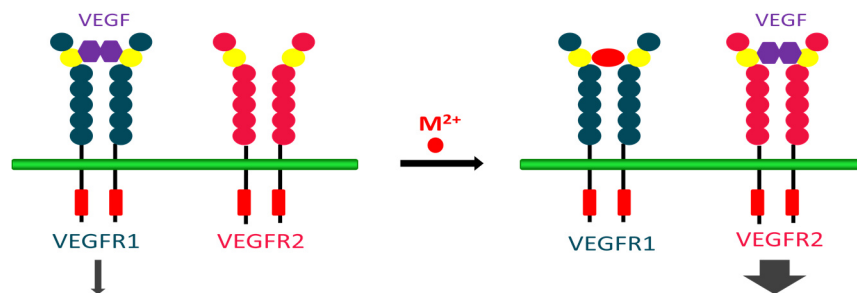


Figure 75 : Hypothèse 3 : transfert du VEGF du VEGFR1 au VEGFR2 en présence de métaux divalents

Comme mentionné précédemment, le VEGFR2 semble être responsable de la majorité des effets cellulaires du VEGF, tels que la prolifération par exemple. Par conséquent, l'activation spécifique de ce récepteur pourrait expliquer l'effet pro-angiogénique observé pour des métaux divalents tels que le cuivre. De plus, il est important de noter que cette dernière hypothèse n'est pas incompatible avec la seconde.

IV. Conclusion

Le rôle des métaux dans l'angiogenèse est connu et décrit depuis les années 1980. Cependant, bien que de nombreuses cibles aient été mises en évidence, leur mécanisme d'action n'est, à l'heure actuelle, toujours pas élucidé. Notre étude s'inscrit donc dans une démarche de compréhension du mécanisme de régulation de l'angiogenèse par des métaux divalents tels que le cuivre.

Au travers de différentes méthodes et expériences nous avons prouvé que ces métaux divalents sont capables d'induire, sous forme solide comme en solution, une dimérisation du VEGFR1. Cette dimérisation paraissant incompatible avec la fixation du ligand naturel, nous avons évalué *in vitro* la capacité de ces métaux à inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1. Bien que nous ne puissions affirmer que les résultats observés en ELISA soit dus à un phénomène de dimérisation du récepteur, nous avons montré que ces mêmes métaux sont capables de déstabiliser *in vitro* l'interaction du VEGF sur son récepteur. Enfin, en accord avec les données de la littérature, l'analyse de l'effet de ces ions sur des cellules HUVE nous a permis de confirmer que ces métaux ont un effet sur la prolifération et la survie cellulaire. Ces différentes données mettent donc en avant que le VEGFR1 pourrait être une cible potentielle du cuivre et d'autres métaux divalents dans la régulation de l'angiogenèse.

Dans ce contexte et bien que nous n'ayons encore pu toutes les tester, différentes hypothèses ont été envisagées pour comprendre l'implication de cette dimérisation induite par les métaux dans le contrôle de l'angiogenèse. Cette découverte peut constituer un élément fondamental dans la compréhension du mécanisme de régulation de l'angiogenèse. Elle doit être explorée *in vivo*, en caractérisant le mode de dimérisation des récepteurs aux VEGF en présence de métaux, ainsi que les voies de signalisation activées. Elle ouvre de nouvelles perspectives pour développer des inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR et donc de nouveaux composés anti-angiogéniques potentiels.

De plus, à travers cet exemple, ces données apportent de nouveaux éléments de compréhension du mécanisme de la régulation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs).

De façon additionnelle, la découverte du pouvoir inhibiteur *in vitro* ainsi que la confirmation de l'effet prolifératif sur HUVEC de certains métaux très utilisés en chimie organique et synthèse peptidique tels que le cuivre ou le palladium met en garde contre l'obtention de faux positifs due à la présence de métaux dans les échantillons.

ARTICLE 3

Metal-induced Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 dimerization competes with VEGF-A binding

Jean-François GAUCHER, Marie REILLE-SEROUSSI, Nathalie GAGEY-EILSTEIN, Sylvain BROUSSY, Pascale CORIC, Bili SEIJO, Marie-Bernard LASCOMBE, Benoit GAUTIER, Wang-Quing LIU, Florent HUGUENOT, Nicolas INGUIMBERT, Serge BOUAZIZ, Michel VIDAL, Isabelle BROUTIN

Soumis: The Journal of Biological Chemistry

Metal-induced Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 dimerization competes with VEGF-A binding*

Jean-François GAUCHER¹, Marie REILLE-SEROUSSE², Nathalie GAGEY-EILSTEIN², Sylvain BROUSSY², Pascale CORIC¹, Bili SEIJO¹, Marie-Bernard LASCOMBE¹, Benoit GAUTIER², Wang-Quing LIU², Florent HUGUENOT², Nicolas INGUIMBERT³, Serge BOUAZIZ¹, Michel VIDAL^{2,4}, Isabelle BROUTIN¹

¹ UMR 8015 and ² UMR 8638 CNRS - Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Sorbonne Paris Cité, 4 av. de l'Observatoire, Paris 75006 France

³ Université de Perpignan Via Domitia, Centre de Recherche Insulaire et Observatoire de l'Environnement (CRIOBE) USR CNRS 3278 CRIOBE, Centre de phytopharmacie, Bat T, 58 av. Paul Alduy, Perpignan 66860, France

⁴ UF Pharmacocinétique et Pharmacochimie, hôpital Cochin, AP-HP, 27 rue du Faubourg Saint-Jacques, Paris 75014, France

*Running Title: *Metal-induced VEGFR1d2 dimerization*

To whom correspondence should be addressed: Jean-François Gaucher, and Isabelle Broutin, UMR 8015 CNRS - Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, 4 avenue de l'Observatoire, Paris 75006 France, Tel.: (33) 170649407; Fax.: (33) 153739925 E-mail: jean-francois.gaucher@parisdescartes.fr, Isabelle.broutin@parisdescartes.fr

Keywords: Angiogenesis, crystal structure, NMR, metal-ion protein interaction, VEGF receptor, VEGFR1 dimerization, transition metal cations

Background: Divalent transition metal ions activate angiogenesis on endothelial cells.

Results: Crystal structures, NMR, SAXS, modelization and biochemical data decipher the binding of metals on VEGF receptor 1.

Conclusions: Some metals compete with VEGF for VEGF receptor 1 domain 2 binding, and induce dimerization *in vitro*.

Significance: VEGF receptor 1 homodimerization is a potential mechanism for angiogenesis regulation by metals.

ABSTRACT

Angiogenesis is tightly regulated through the binding of vascular endothelial growth factors (VEGFs) to their receptors (VEGFRs). This process may be up-regulated by divalent transition metals. In this context, we showed that VEGFR1 domain 2 crystallizes in the presence of metals as a dimer that forms *via* metal-ion interactions and interlocked hydrophobic surfaces. SAXS, NMR and size exclusion chromatography analyses confirm the formation of this dimer in solution in presence of Co^{2+} , Cd^{2+} , or Cu^{2+} . Because the dimerization masks the VEGFs binding surface, we investigated the ability of metal ions to compete with VEGF-A for binding to the full-length extracellular domain of VEGFR1. Using ELISA, we evidenced that the metals that are able to modulate endothelial cell proliferation at micromolar level, also compete with VEGF-A for VEGFR1 extracellular domain binding at the same level range. In conclusion, we propose that divalent metal ions such as copper, could modulate the VEGF-A signaling through differential VEGFR1 and VEGFR2 homo- and heterodimerisation.

Angiogenesis is a physiological process characterized by the remodeling of the vascular tissue and the growth of new blood vessels from preexisting ones. It is an important biological process during embryonic development and tissue growth, which is limited to particular physiological phenomena in adults, such as wound healing and menstruation. Tightly controlled by pro- and antiangiogenic factors, the shift in the equilibrium under pathological conditions is associated with several human diseases, and represents a fundamental step in the angiogenic switch of malignant tumors (1).

Among the major proangiogenic cytokines, vascular endothelial growth factors (VEGFs) are essential. The

five human VEGFs, VEGF-A, B, C, D, and placenta growth factor (PlGF), form homodimers, although naturally occurring heterodimers of VEGF-A and PlGF have been described (2). VEGFs are secreted proteins that bind to transmembrane tyrosine kinase receptors (VEGFRs) primarily expressed on the surface of endothelial cells (ECs) and that induce receptor dimerization, activation through transphosphorylation, and assembly of the membrane-proximal signaling complex. Three receptor types have been highlighted: VEGFR3 (also called Flt-4) regulates lymphangiogenesis, VEGFR2 (KDR/Flk-1) is the primary proangiogenic receptor, whereas VEGFR1 (Flt-1) has been proposed as a regulator of VEGFR2 (for review, see (3)). Furthermore, alternative splicing or proteolytic activity of membrane VEGFR1 generates a soluble form (sFlt-1) of the extracellular domain (ECD), which sequesters VEGF-A (4).

Nevertheless angiogenesis is also associated to an increased plasmatic copper concentration: An excess of copper appears to be an essential co-factor for angiogenesis, and elevated levels of copper are found in many types of human cancers, including prostate, breast, colon, lung, and brain. Copper salts themselves are sufficient to induce vascularization, and depletion of copper minimizes vascular formation in several tumor model systems. Recent studies suggest a role for other transition metal cations, by up-regulating angiogenesis and attenuating cell apoptosis in several human and murine EC models (for a review, see (5)). Among these metal ions, Cu^{2+} is active at physiological concentrations (6) and its activity appears strongly correlated with VEGFR1 signaling. Nevertheless, the specific target of Cu^{2+} , and of all the metal ions in general, and their molecular mechanism of action remain matters of debate. Depending on the cell type and metal ion concentration, it is proposed that Cu^{2+} stimulates cell proliferation through the enhancement of VEGF expression, implicating hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 α) transcriptional activity (7) or mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways (8). But other studies demonstrate that 5 μM Cu^{2+} upregulate angiogenesis without affecting VEGF-A expression level (6,9,10). Moreover, in a model of cardiomyocyte hypertrophy, it alters the distribution of VEGFRs, increasing the apparent VEGFR1 to VEGFR2 ratio, and gene silencing of VEGFR1 leads to the suppression of both Cu^{2+} - and VEGF-A-induced regression of hypertrophy (6).

In this study, we focused on the presence of a metal at the dimer interface of X-ray structures of VEGFR1

domain 2 (VEGFR1d2) solved in the presence of several divalent metal ions. The dimer interface is included in the VEGF-A recognition site that suggests a possible dimerization mechanism via the metal, competitive to VEGF-A binding.

Consequently, we hypothesize that the observed dimerization of VEGFR1d2 may be a physiological process implied in angiogenesis regulation.

To address this question, we first investigated the behavior of domain 2 in solution in presence of several metals, by SAXS, NMR and analytical size exclusion chromatography. The structural reliability of our hypothesis was verified by the building of a dimer model of the full VEGFR1 binding site, encompassing domains 2 and 3 (VEGFR1d2d3), able to accommodate a metal ion without structural steric hindrance.

Afterwards, the ability of metals to compete with VEGF-A for the full ECD of VEGFR1 was tested, and we correlated the competition effect of several metals to their ability to induce HUVEC proliferation. All together, these structural and biological features, in accordance with previous findings, shed light on the possible regulation mechanism of angiogenesis by VEGFR1 *via* the binding of divalent metal cations such as Cu²⁺.

Experimental procedures

Protein expression, purification and refolding

The human VEGFR1d2 protein (residues 132-226) was obtained as previously described (11). For SAXS analysis, all divalent metal ions were thoroughly removed, with 0.25 mM EDTA, followed by three dialysis against 250 volumes of 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.0, containing 160 mg/l of divalent cation-chelating resin Chelex®100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

For ¹⁵N labeling, VEGFR1d2 was expressed in *E. Coli* Rosetta-gami(DE3)pLysS bacterial strain (Novagen, Darmstadt, Germany), cultured in ¹⁵N-isotope-enriched medium (CortecNet, Voisin-le-Bretonneux, France) and purified as previously described.

Biochemical assays

The activity of the refolded human VEGFR1d2 domain was evaluated using a chemiluminescent assay based on competitive binding to biotinylated VEGF-A between the VEGFR1d2 domain and a Fab-dimerized VEGFR1-ECD (12).

Based on this assay, the ability of metal ions to prevent the VEGF-A/VEGFR1 interaction was evaluated. For this study, the divalent metal salts

described in Table III were used, and Na₂SO₄ was used as the control. Briefly, metal ions were preincubated for 1 hour in a 96-well microplate (96-well, high-binding white plates, Corning, New-York, USA) coated with a human VEGFR1-ECD/Fc chimera (20 ng/well, R&D Systems, Abingdon, UK). Subsequently, a fixed amount of biotinylated human VEGF-A (131 pM, R&D Systems, Abingdon, UK) was incubated with the evaluated metal ions for 2 hours. After PBS washing, the remaining biotinylated VEGF-A was detected by chemiluminescence using HRP-conjugated streptavidin (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). The divalent metal ions were evaluated from 30 to 0.03 μM in the presence of 1% DMSO.

Measurement of cell viability using an MTT assay

HUVECs were purchased from Lonza (Lonza, Bazel, Switzerland) and maintained in endothelial growth media (EGM-2, Lonza, Bazel, Switzerland) containing 2% FBS, hydrocortisone, human EGF, gentamicin/amphotericin B, human VEGF, human FGF-B, R³-IGF-1, ascorbic acid and heparin from the SingleQuot Kit (CC-4176, Lonza, Bazel, Switzerland)). Cells were routinely cultured at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator and were used between passages 2 and 4.

For 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT), HUVECs were seeded onto 96-well plates at 7000 cells/well in 200 μL of EGM-2 complete media. After 18 hours at 37°C under 5% CO₂, freshly prepared metal ion solutions were added to the wells at different concentrations in EGM-2 with 1% DMSO. After 48 hours, cell viability was detected using a colorimetric MTT assay by measuring the absorbance at 405 nm using a microplate reader. Data were normalized to the MTT activity of the 1% DMSO control cells, which were arbitrarily fixed at 100%.

The data were expressed as the means ± standard deviation (SD). The significance of the difference between the control and metal ion-treated cell populations was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's test. A *P*-value < 0.05 was considered significant.

Crystallization, structure determination and analysis

VEGFR1d2 was crystallized using the vapor diffusion technique at 18°C and equal volumes of reservoir and protein solution. Initial crystals were obtained in the presence of putative VEGFR ligands (11,13) and in the presence of several divalent metal cations.

Diffraction-quality crystals were optimized for two crystal forms: The first crystallized in the space group $C222_1$, from a drop containing 1 mM VEGFR1d2, 0.1% (w/v) n-Dodecyl β -D-maltoside and 4 mM Laxaphycin B (13) in 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, and a reservoir solution containing 18% (w/v) PEG 8000 and 100 mM HEPES-NaOH, pH 7.5. The second crystal form crystallized in the $P1$ space group with 1 mM VEGFR1d2 in 5 mM HEPES-NaOH, pH 7.0, 10 mM $CoCl_2$, and a reservoir containing 100 mM Bis-Tris-HCl, pH 6.5, and 15% (w/v) PEG 3350. Diffraction data were collected at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) at the ID23-EH2 microfocuss (14) and ID29 beamlines (15) and processed with the XDS X-Ray detector Software package (Kabsch, 1993). The first structure for the $P1$ crystal form was solved by molecular replacement using Phaser (16,17) and the VEGFR1d2 structure (PDB ID 1FLT) (18) as the search model and was further optimized using PHENIX (19) for refinement and Coot (20) for interactive model building. After initial rounds of refinement, two major peaks remained for each molecule in the $2F_o - F_c$ and $F_o - F_c$ difference maps. The first peak corresponded to the cobalt ion, and the second peak corresponded to a distortion of the main chain between residues 135 and 142. An iterative omit map was calculated (19) to rebuilt this segment in the four molecules of the asymmetric unit. The second crystal structure was solved in the $C222_1$ space group, with one molecule per asymmetric unit. An identical procedure was performed using the previously refined model as the search model. The $F_o - F_c$ map revealed a 15σ peak localized at a special crystallographic position on the 2-fold axis that reconstitutes the dimer. Because the nature of this atom was unknown, an X-ray fluorescence spectrum was performed on the PROXIMA 1 beamline of the SOLEIL synchrotron (Saint-Aubin, France) (21) revealing an unique anomalous signal corresponding to zinc. The final refinement statistics for the two refined structures are summarized in Table I. Structural analysis of each dimer surface and interface was performed using the PISA server (European Bioinformatics Institute) (22). Molecular graphics were rendered using PyMOL (Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC).

Small-angle X-ray scattering

We measured SAXS data of VEGFR1d2 solutions in the absence or presence of $CoCl_2$, at the BM29 BioSAXS beamline at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France). Frames

were integrated, checked for radiation damage, and averaged using the PRIMUS 3.1 software (23). After background subtraction, data were analyzed using the ATSAS Version 2.4.3 program package (24) and SAXS MoW software (25). The absence of a concentration dependence of the scattering data was verified using three concentrations ranging from 1.5 to 5.0 mg/mL in the presence or absence of 10 mM $CoCl_2$. The distance pair-distribution functions were calculated from the scattering curve using GNOM (26), and *ab initio* shapes were determined using DAMMIF (27). Fifty independent shapes were aligned and filtered using DAMAVER (28). The most representative shapes, as determined by DAMSEL, were aligned with crystal models using SUPCOMB to produce the structural representations without Co^{2+} ($\langle NSD_{best\ shape/other\ shapes} \rangle = 0.651$; $NSD_{best\ shape/VEGFR1d2\ monomer} = 0.925$) and with Co^{2+} ($\langle NSD_{best\ shape/other\ shapes} \rangle = 0.819$; $NSD_{best\ shape/VEGFR1d2\ dimer} = 0.989$). X-ray solution scattering of the monomeric and dimeric crystal structures were evaluated using CRY SOL (29) and were compared with the experimentally determined values. Mean SAXS data-collection and scattering-derived parameters are summarized in Table II and Figure 3.

NMR data acquisition

All spectra were acquired at 300 K using a Bruker AVANCE 600 MHz spectrometer equipped with a 5-mm triple resonance probe and triple axis pulsed field gradients. Typical NMR samples used for the 1H - ^{15}N TROSY dimerization assays *via* metal ion binding consisted of 150 μ L of uniformly ^{15}N -labeled VEGFR1d2 in 300 μ L of a 20 mM phosphate buffer at pH 5.7 containing 50 μ L EDTA and 10% (v/v) 2H_2O . The metal chelator was solubilized in 100 μ L of H_2O to yield a concentration of 15 mM, and 1 μ L of this solution was added to the NMR sample for titration experiments until a 2-molar equivalent was reached. Chemical shift referencing of the 1H and ^{15}N assignments was performed using previously published assignments (30). Spectral processing and analysis were performed using TopSpin 1.3 and CcpNmr 2.1.5 (31). Backbone spectral 1H - ^{15}N assignment was performed as previously reported, and volumes were normalized against the highest peak volume in the TROSY experiment.

Size-exclusion chromatography

The Cu^{2+} -induced dimerization of VEGFR1d2 was confirmed using a precalibrated analytical gel-filtration column (SuperdexTM75 HR 10/300 Amersham GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Prior

to loading, samples were prepared by incubating 160 μM VEGFR1d2 in a buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 8.1, 250 mM NaCl, and either 1 mM EDTA or 1mM CuSO_4 for 30 min at 18°C. Subsequently, 50 μL of this mixture was loaded at 0.5 mL/min on the column that was preequilibrated with the identical respective buffers. Elution peaks were integrated, and the corresponding fractions were analyzed on SDS-PAGE.

VEGFR1d2d3 modelization

VEGFR1 domain 3 modelization was performed using I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (32). To crosscheck its validity, other models were performed by using the structure of VEGFR2d3 as template (PDB ID 3S37), on two other servers, CPHmodels3.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) (33), and Geno3D (<http://geno3d-pbil.ibcp.fr/>) (34). A fourth model was obtained from pGenThreader (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (35) using the structure of VEGFR2d2d3 (PDB ID 2X1W). Accuracy of models was evaluated using the Structural Analysis and VERification Server (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES/>).

After validation, the best model of domain 3 was connected to the domain 2 issued from the P1 crystal structure, previously oriented as in the VEGFR2d2d3/VEGF-C structure (PDB ID 2X1X).

Molecular dynamics (MD) simulations were then performed by using the Gromacs 4.5.5 package (36), and united atom GROMOS96 53a6 force field at 300 K, in explicit water and NaCl: The model of VEGFR1d2d3 was energy minimized using the steepest descent, until the maximum force on the atoms was smaller than 1 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ and convergence was obtained. Then the modelization box was fulfilled with 31700 water molecules and 250 mM Na^+ and Cl^- ions, and the solvent was equilibrated by energy minimization, followed by restrained MD (5 ps). Two steps of MD were performed with initial velocity drawn from Maxwell distribution at 300K, followed by simulation of pressure by the Berendsen procedure. Then final productive MD of unrestrained system was performed for 1 ns at 300K, with an integration time step of 1 fs, and Parrinello-Rahan Pressure coupling.

After validation of the MD results with SAVES, we re-used model to perform MD on dimerized VEGFR1d2d3 in presence or in absence of a Zn^{2+} ion in the metal site. The initial orientations and interactions of dimerized d2d3 were those determined

in the here solved crystal structure of VEGFR1d2 in presence of Zn. We tested several initial orientations of d3 in regard to d2. The MD procedure was identical to the previous one, but the MD was continued during a total of 2ns.

Results

Crystallization of the VEGFR1d2 in the presence of divalent transition metal cations

Crystallization trials of VEGFR1d2 were first performed in the presence of previously developed potential ligands. Although the presence of a ligand was not observed in the crystal structure, we observed the unexpected presence of one metal ion characterized as Zn^{2+} using X-ray fluorescence spectrometry. Therefore, suspecting a biological role for metal ions in the regulation of angiogenesis, we crystallized VEGFR1d2 in the presence of several other divalent transition metal cations (Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , or Ni^{2+}). Diffraction-quality crystals were obtained for two crystal forms: 1) VEGFR1d2 containing Zn^{2+} that crystallized in the orthorhombic $C222_1$ space group and 2) VEGFR1d2 that crystallized in the primitive $P1$ space group in the presence of CoCl_2 .

Overall crystal structure

We determined the crystal structures using molecular replacement and as search model, the VEGFR1d2 structure issued from the complex formed between VEGFR1d2 and the truncated VEGF- A_{13-109} (later called tVEGF-A) (PDB ID: 1FLT) (18). The crystallographic parameters of the refined structures are summarized in table I. The structures of the $P1$ and $C222_1$ crystal forms were determined with four molecules and one molecule in the asymmetric unit respectively. Thus, we obtained five independent structures very similar to each other, exhibiting a rmsd comprised between 0.27 and 0.72 \AA over C α atoms depending on the superposed pairwise. The structures exhibited an immunoglobulin-like β -sandwich fold that was typical of I-set domains, with the exception of the loop consisting of residues 137-142. This loop formed a bulge away from the core domain structure and was involved in important hydrophobic interactions with the ligands. In our structures, its backbone adopted a conformation similar to the one found in the structures of VEGFR1d2 in complex with tVEGF-A (1QTY) (18), and with PlGF-1 (1RV6) (37), but significantly

different from the alternative conformation observed in tVEGF-A/VEGFR1d2 (1FLT) and VEGF-B/VEGFR1d2 (2XAC) (38)) complexes or in the apo form (1QSZ) (30). This supported the hypothesis of an induced fit adaptation of this loop proposed by Starovasnik et al. (30).

A metal ion site at the interface of the VEGFR1d2 dimer

The asymmetric unit of the *P1* crystal form contained four molecules that were organized in two sets of two molecules coordinated by a cobalt ion and were related by a nearly pure 2-fold rotational non-crystallographic axis passing through the metal. The Co^{2+} ion was coordinated through the N ϵ atoms of the imidazole groups of His₁₄₇ and His₂₂₃ on each domain and by two water molecules to form a square-based bipyramidal regular octahedron (Figure 1d). Three additional Co^{2+} ions, which exhibited higher *B* factors, were present in the asymmetric unit and were also coordinated by a histidine residue (His₂₁₄). In the C222₁ crystal form, a Zn^{2+} ion lied on a 2-fold axis and coordinated two symmetrically related molecules similarly to the *P1* asymmetric unit geometry. In this form, the Zn^{2+} ion adopted a regular tetrahedral coordination geometry and was coordinated through the N ϵ atoms of the imidazole groups of His₁₄₇ and His₂₂₃ (Figure 1c).

The octahedral and tetrahedral coordinations of the Co^{2+} and Zn^{2+} dimer correspond to the most representative geometries observed in metalloprotein structures deposited in the PDB (39). Nevertheless the bond lengths for N ϵ His-Co and N ϵ His-Zn belonged to [2.20 Å; 2.49 Å] and [2.19 Å; 2.34 Å], respectively, which was slightly higher than expected from a statistical analysis of these PDB structures (40), and the χ_2 side chain angles of His₂₂₃ were not in the lowest energy conformation, suggesting the adaptability of the site to metal ions with a larger coordination sphere.

The homodimerization buried $1045 \pm 15 \text{ \AA}^2$ of accessible surface area (ASA) at the protein-protein interface. With the exception of His₁₄₇ and His₂₂₃, the residues involved were primarily hydrophobic including Ile₁₄₂, Pro₁₄₃, Ile₁₄₅, Phe₁₇₂, Leu₂₀₄, and Leu₂₂₁ (Figures 1a and 1b). Superposition of one VEGFR1d2 molecule of the Co^{2+} -bound and Zn^{2+} -bound dimers resulted in an apparent rotation for the second molecule by 7° and a translation of 1.0 Å. The previously mentioned 137-142 loop adjusted its conformation to the surface of the adjacent molecule, and the interactions at the interface qualitatively

remained similar in the two structures.

The two crystal structures were analyzed using PISA, which is designed to identify stable complexes in crystal packing and their likelihood of representing biological units (Figure 2a). Both complexes were analyzed as stable. The mean estimation for dimer ΔG dissociation was 53 kJ.mol⁻¹ and 243 kJ.mol⁻¹ for (VEGFR1d2)₂- Co^{2+} and - Zn^{2+} , respectively, and $\Delta G = 44.6 \pm 2.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$ not accounting the metal. This estimation indicated that the interfaces between each pair of monomers were surprisingly hydrophobic and interlocked, without unmatched electron donor or acceptor, suggesting that stable macromolecular complexes existed in solution and were reinforced by metal chelation. When compared to the VEGFR1d2/VEGFs structures, all of the buried residues at the dimer interface belonged to the core of the VEGF-interacting surfaces (Figure 2b, c, d). Consequently, the dimerization that occurred in the presence of a divalent cation can be competitive with the binding of VEGFs to VEGFR1.

Small angle X-ray scattering (SAXS) analysis indicates metal-induced dimerization in solution

To verify that the homodimer observed in the crystal forms existed in solution, we performed SAXS analysis of VEGFR1d2 in the presence of 10 mM CoCl_2 or after thorough removal of all traces of divalent cations. In both cases low-resolution SAXS data and Guinier analysis indicated the absence of aggregation, however the high-resolution data dispersion was higher in the absence than in the presence of Co^{2+} (Figures 3a and 3c). Molecular mass were estimated using Guinier analysis, pair function analysis, BSA calibration and the method of Fisher (25) (Table II). The SAXS results unambiguously indicated that 10 mM Co^{2+} induced a doubling of the molecular weight and a significant increase of the radius of gyration, confirming the Co^{2+} -induced dimerization of the VEGFR1d2 domain in solution. Theoretical data calculated by CRYSOLO fitted well with data measured in the presence of Co^{2+} (VEGFR1d2 dimer crystal structure) or in the absence of Co^{2+} (VEGFR1d2 monomer structure). In the presence of 10 mM Co^{2+} , shapes obtained from DAMMIF were approximately symmetrical. Consequently, we imposed a *P2* symmetry in the calculation of additional *ab initio* shapes. The 50 independent shapes calculated from DAMMIF, after filtration and superimposition by DAMAVER, exhibited a normalized spatial discrepancy (<NSD>) of 0.884 ± 0.088 . This relatively low NSD indicated

that the shapes converged toward similar results. Subsequently, the most representative shape was superimposed with the dimer structure of the *P1* crystal form, which is considered in the following as the structure of reference, with a low spatial discrepancy (Figure 3d). In absence of Co^{2+} , an identical method was used to calculate 50 *ab initio* shapes in a *P1* symmetry. The shapes converged to similar models, with $\langle \text{NSD} \rangle = 0.704 \pm 0.091$. However, some of these shapes were composed of a globular shape with a thin extension, for which the spatial orientation differs from one shape to the other (Figure 3b). All together, these results may correspond to a mixture of monomers with a minority of dimers and suggested that, even in the absence of divalent metals, a minor fraction of VEGFR1d2 exhibited a weak propensity to dimerize in solution. In conclusion, the SAXS results were consistent with the determined homodimer crystal structures.

Metal ion binding and reversible dimer formation probed by NMR

Zinc and cobalt are transparent to NMR spectroscopy. Thus, zinc-to-cadmium (^{113}Cd) replacement (41) may provide detailed information on the binding of the metal ion to the protein and the resulting dimerization, by ^{113}Cd chemical shift perturbation mapping (42). The ^{113}Cd chemical shifts depend on the nature and on the space organization of the metal ligands (1,43). However, attempts to observe a ^{113}Cd signal were unsuccessful due to the intermediate exchange between the free form of the metal and its bound state in the protein.

Two-dimensional ^1H - ^{15}N transverse relaxation optimized spectroscopy (TROSY) (44,45) experiments were performed using the uniformly ^{15}N -labeled VEGFR1d2 at a concentration of 150 μM for which 100% of the assignment was known. The TROSY spectra in the absence and in the presence of Cd^{2+} (50 to 300 μM) were compared and the chemical shift perturbations were analyzed (Figure 4a). In the absence of significant conformational modifications, this method allows the detection of variations in the electronic environment of the protein backbone amides that occur upon binding of the metal ion and upon dimerization. Chemical shift perturbations were directly observed in the ^1H - ^{15}N TROSY NMR spectra, and several residues of the protein exhibited line-width broadening upon the addition of cadmium (Figure 4a) due to an intermediate exchange phenomenon on the NMR timescale. Peak resonances disappeared upon cadmium binding and VEGFR1d2

dimerization due to this intermediate exchange (46). In our case, the broadening of the signal was so extreme that several resonances cannot be detected in the spectrum.

To determine whether dimerization is reversible, EDTA (300 μM), a metal ion chelator, was added to the NMR sample containing 150 μM VEGFR1d2 and 300 μM CdCl_2 . The obtained spectra (Figure 4b) indicated that the divalent metal cation was neutralized upon the addition of EDTA, and the spectra recovered the original resonances that were present in the absence of cadmium.

The residues involved in the dimer formation in solution were identified by following the volume of observable peaks at different concentrations of cadmium from 0 to 1.8 equivalents (Figure 5). Three principal regions were highlighted. The first one in the N-terminal region contains residues Tyr₁₃₉-Ile₁₄₂, Glu₁₄₄, Ile₁₄₆, His₁₄₇, Thr₁₄₉, and Gly₁₅₁, a second region included residues Glu₂₀₁-Leu₂₀₄, and a third one in the C-terminal region encompassed residues Thr₂₂₂-Thr₂₂₆. Additional isolated residues Phe₁₇₂, Asp₁₇₅, and Lys₁₈₂ appeared to be perturbed (Figures 5 and S1). The peak volumes in the ^1H - ^{15}N TROSY spectra undergoing the higher perturbations upon addition of cadmium were mapped onto the crystal structure of the dimeric VEGFR1d2 determined in this study. Among the different identified regions, Tyr₁₃₉-Gly₁₅₁ and Thr₂₂₂-Thr₂₂₆ contain His₁₄₇ and His₂₂₃ respectively, which were involved in both metal ion recognition and dimerization. Due to dimerization, these residues, located at the dimer interface, were the most perturbed by the interaction with the cadmium ion; the resonances for these residues were very broad or disappear from the TROSY spectra. Moreover, a global line broadening due to dimerization upon cadmium ion binding by histidines His₁₄₇ and His₂₂₃ within each monomer was observed in the ^1H - ^{15}N TROSY NMR analysis and nearly 30% of the peak volumes were lost upon the addition of 0.3 equivalents of Cd^{2+} (Figures 4a and 5). Consequently, the dimer interface in solution was identical to that in the crystal structure, and dimerization was clearly due to coordination of the metal ion by these two histidines from both monomers.

VEGFR1-d2d3 modelization

After demonstrating the metal induced dimerization of domain d2 in solution, the question occurring was the capacity of the full VEGF binding site, i.e. the d2d3 domains of VEGFR1, to dimerize in solution in the presence of a metal. Consequently an atomic model of domain d3 was built, then connected to the

d2 structure, and the behavior of the metal-bound d2d3 dimer in solution was simulated by MD.

The high degree of residues conservation between VEGFR1d3 and VEGFR2d3 (36%) resulted in a set of very similar models, at the exception of the 270-282 segment that displayed several alternative arrangements because of a lower degree of homology. The resulting model of domain d3 was then connected to our reference crystal structure of VEGFR1d2 issued from the P1 crystal structure, previously oriented as in the VEGFR2d2d3/VEGF-C structure (PDB ID 2X1X).

MD simulation was performed on the resulting monomer using the Gromacs 4.5.5 package, in explicit water and NaCl, for a time period of 1 ns at 300 K. During the MD, the total energy fluctuated weakly ($-1223570 \pm 700 \text{ kJ.mol}^{-1}$), which indicated a good stability of the system. Calculation of the RMS displacements on all atoms showed that the main fluctuations were equally distributed in the loops of both domains, and that the cores of each domain were stable. The resulting model conserved a good stereochemical quality (SAVES). The only negative was the low backbone Z-score ($Z=-6.4$), despite a good geometry. The regions presenting a slightly poorer geometrical quality were the 174-176 and 208-212 segment of d2, and the C-terminus (311-321) of d3 oriented toward the fourth domain in the full receptor context. During the MD, a large hinge movement around residues 223-226 was observed with a relative orientation between the two domains fluctuating up to 40° without significant energy variation (Figure 6a) (DynDom) (47). To simulate the Zn^{2+} -dimerized VEGFR1d2d3, two molecules of the built VEGFR1d2d3 model were then superimposed on the crystallographic dimer of VEGFR1d2. Two MD simulations were performed on this resulting dimer model, with and without the presence of Zn^{2+} . The MD procedures were identical to the previous one, but continued during a total of 2 ns. All along MD simulations, the d2 domains remained bounded via the hydrophobic interface previously described in the crystal structures. However, the Zn^{2+} stabilized the crystallographic d2 interface, while in the absence of metal, one of the two d2 domains slightly rotated relative to the other one. Moreover, we noticed that the Gln₂₂₅ side chains of both molecules moved in the vicinity of Zn^{2+} , adding two bonds to the metal, and forming a square based bi-pyramid octahedral coordination. Despite this supplementary constraint on Gln₂₂₅, residues 224-226 still form a hinge between the two domains, as in the MD simulation performed on the monomeric d2d3 model.

The first striking point is that the d2d3 model in the same relative orientation than that observed in the VEGFR2d2d3/VEGFs crystal structures, can be dimerized in presence of metal without steric hindrance. The second point is that, after MD simulation, the relative orientation of the two d3 in the dimer model differ from what was observed in VEGFR2d2d3/VEGF-A, -E, and -C crystal structures (pdb ID: 3V2A, 3V6B, 2X1W) ((48) (49)) (Figure 6b), as they face by the opposite surfaces. Nevertheless, the d3 main axis is roughly perpendicular to the membrane surface, and similar to the direction observed in VEGFR2d2d3/VEGF complexes (Figure 6b). It suggests, on a structural point of view, that a metal-induced dimer of the full-length receptor can be anchored in the membrane, but that the relative positions of domains 3-7 are completely different than in the dimer induced by VEGF binding, probably precluding activation.

Displacement of VEGF-A binding to the VEGFR1-ECD by divalent cations in ELISA

The effect of several divalent cations to disrupt the VEGF-A/VEGFR1 interaction were evaluated using a previously described chemiluminescent competition assay that utilized biotinylated VEGF-A and recombinant human VEGFR1-ECD. Initial screening at $30 \mu\text{M}$ revealed the ability of some divalent cations, including Cu^{2+} , Pd^{2+} , Ni^{2+} , and Zn^{2+} , to destabilize the VEGF-A/VEGFR1 interaction. As indicated in Table III, copper (CuSO_4) and palladium ($\text{Pd}(\text{OAc})_2$) demonstrated the highest IC_{50} values below $1 \mu\text{M}$ ($0.97 \mu\text{M}$ and $0.36 \mu\text{M}$, respectively). Zn^{2+} and Ni^{2+} exhibited IC_{50} values within the micromolar range. Other divalent cations exhibited little (Co^{2+} and Cd^{2+}) or no effect on the competition assay (Fe^{2+} and Mn^{2+}). These various effects suggested that the binding site was flexible and able to adapt to different cation size and coordination, which was consistent with the structural results. For cations of similar size, the observed differences may be due to different preferred coordination geometry (39) and ligands. The effect of counter ions was also evaluated by examining CuSO_4 , CuCl_2 , $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, and PdCl_2 . The specific role of the metal ion was confirmed by the observation of very similar activity for copper (II) or palladium (II) complexes. To confirm the specific interaction of Cu^{2+} with VEGFR1, the ELISA test was performed in the presence of a metal chelator (EDTA, 1 eq.). Under these conditions, Cu^{2+} was unable to disrupt the VEGF-A/VEGFR1-ECD interaction. These results, together with the determined crystal structures,

suggested that metal ions, particularly Cu^{2+} and Pd^{2+} , competed with biotinylated VEGF-A in our ELISA.

VEGFR1d2 dimerization using analytical size exclusion chromatography

Because the ELISA results indicated a higher effect for Cu^{2+} ions than for Zn^{2+} or Co^{2+} , which were present in the determined crystal structures, the Cu^{2+} -induced dimerization of VEGFR1d2 was verified using analytical gel-filtration chromatography. In the presence of 1 mM EDTA a single VEGFR1d2 peak was observed, which represents the monomer (apparent MW = 14.9 kDa). In the presence of 1 μM CuSO_4 , two peaks were eluted corresponding respectively to the VEGFR1d2 dimer (78% of absorption, apparent MW = 27.9 kDa) and monomer (apparent MW = 15.8 kDa). SDS-PAGE analysis confirmed that both peaks consist of VEGFR1d2 (Figure 7).

Effect of metal ions on human umbilical vein EC (HUVEC) growth in culture

To assess the role of low metal ions levels *in vivo*, the effect of four endogenous transition metal cations (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , and Fe^{2+}) on EC proliferation were evaluated (Figure 8). An exogenous cation, Pd^{2+} , was also chosen due to its presence in commonly used catalysts in chemical synthesis, which may produce artifacts in the *in vitro* assay if present in solution of chemically synthesized ligands. The growth-stimulating activity of metal ions toward HUVECs, in which the VEGFR1 and VEGFR2 homologues were present, was determined using a cell proliferation MTT assay. HUVECs were treated with a range of different divalent cation concentrations (0.3-10 μM). Results indicated that cell proliferation was induced by Pd^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} , whereas moderate or no cell proliferation was observed for Co^{2+} or Fe^{2+} . These results correlated with the ability or inability of the metal ions to displace VEGF-A from VEGFR1 in the ELISA trials: Under our experimental conditions, Cu^{2+} appeared to stimulate cell proliferation in a dose-dependent manner (from 15% to 40% proliferation for 0.3 μM and 10 μM , respectively). Pd^{2+} and Zn^{2+} induced a proliferative effect at lower concentrations (0.3 μM) but return to a basal level at higher concentrations, which suggested a cytotoxic effect. The absence of cytotoxicity in this range of Cu^{2+} concentrations was consistent with the results of Hu (50) and Li *et al* (10), who also observed only cell

proliferation at these concentrations. Therefore, these results were consistent with other studies indicating that copper and other divalent cations significantly affect HUVEC proliferation and viability.

Discussion

We have determined two crystal structures of VEGFR1d2 in the presence of Co^{2+} or Zn^{2+} . Both structures are similar and reveal a homodimer with interlocked hydrophobic surfaces buried at the interface and a divalent cation chelated by four histidine residues (two from each monomer). The metal ion coordination is octahedral for Co^{2+} and tetrahedral for Zn^{2+} , indicating an adaptability of the metal ion site. The coordination distances are slightly longer than those classically observed for Co^{2+} and Zn^{2+} , which is compatible with the putative chelation of other metal ions with larger atomic radii. Both dimers are analyzed as stable in solution by PISA. SAXS analysis, NMR, and analytical size-exclusion chromatography verify respectively the Co^{2+} -, Cd^{2+} -, and Cu^{2+} -induced dimerization of VEGFR1d2 in solution. The SAXS shapes are consistent with the determined crystal structures for both monomer and homodimer. NMR analysis shows that VEGFR1d2 dimerization is reversible using EDTA as a chelating agent. Importantly, the dimer interface involves residues that lie in the core of the VEGFR1d2 surface that interacts with VEGF-A, VEGF-B or PlGF.

Thus, we hypothesize that some metal ions may induce the homodimerization of the full-length VEGFR1-ECD.

To evaluate this hypothesis, a model of VEGFR1d2d3 is constructed, oriented as in the VEGFR2d2d3 template and positioned as observed in the Zn^{2+} VEGFR1d2 dimer structure, followed by a GROMOS molecular dynamics simulation performed in the presence of water and NaCl (36). The homodimeric model retains the d2 dimer interface and the bound Zn^{2+} ion after a 2-ns molecular dynamics simulation. We observe a movement of d3 relative to d2 that suggests that a metal-induced dimer of the full-length receptor can be anchored in the membrane, but with a modified relative position of domains 3-7, probably precluding the tyrosine kinase domains activation (Figure 6b).

Because the dimerization is incompatible with VEGF binding, we investigated the ability of metal ions to compete with VEGF-A. *In vitro* competition for the whole VEGFR1-ECD, predimerized *via* Fab targeting the d7 domain, indicates that several divalent cations displace VEGF-A from its target with micromolar IC_{50} values. Cu^{2+} and Pd^{2+} are the most efficient

divalent cations, but Ni^{2+} , Zn^{2+} , and Co^{2+} also exhibit an effect to a lesser extent. Remarkably, we observe that the capacity of these metals to induce HUVEC proliferation at micromolar range correlates with their ability to displace VEGF-A from VEGFR1 ECD.

Although we cannot evaluate the effect of metal ions on VEGFR2 dimerization, we notice that the two histidines that chelate the metal in VEGFR1 are substituted by hydrophobic residues at the corresponding positions in VEGFR2 (Tyr or Phe for His₁₄₇, and Val, Ala or Leu for His₂₂₃ depending on the species). Consequently, the metal-induced dimerization of domain d2 would be specific to VEGFR1. Although we cannot yet confirm whether the metal-induced dimerization is biologically relevant, several converging findings together with our results in HUVECs suggest that it may participate in the regulation of angiogenesis.

Numerous studies focus on the role of metal ions in angiogenesis, both on exogenous (Cd, Ni, V, and As), and endogenous metal ions (Cu, Zn, and Co), which regulate the activity of essential proteins (5). In several VEGFR1 and -R2 expressing human or murine cell models (human embryonic kidney cells 29, mesenchymal stroma cells, HUVECs and cardiomyocytes), Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , and Ni^{2+} attenuate cell apoptosis and enhance proliferation. Kim *et al* (51) demonstrate that 10 μM Cd^{2+} increase HUVEC proliferation by 20% and decrease cell viability in a dose-dependent manner at higher concentrations. Notably, this reports that Cd^{2+} HUVECs growth response is similar to our Pd^{2+} and Zn^{2+} responses even if the considered concentrations are shifted to lower values in our case. Therefore, our results highlight the potential effects of micromolar-range metal ion concentrations on HUVEC proliferation.

We focused on Cu^{2+} , as it exhibits one of the greatest ability to displace VEGF-A binding to VEGFR1d2 in the ELISA trials. Moreover, its concentration in plasma is relatively higher (22 μM) than that of other metal ions (52) and increases significantly in most malignancies (53). Although the major part of plasmatic Cu^{2+} is tightly bound to ceruloplasmin, another fraction is exchangeable (0.52 μM) (54). Its proangiogenic activity in normal or pathological conditions is widely documented: Cu^{2+} has been shown to be a physiological regulator of angiogenesis, but the molecular basis for the sensitivity of angiogenesis to copper remains elusive, and studies are ongoing to determine its possible molecular targets. A known target is hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 α), which binds HIF-1 β

under hypoxic conditions, and promotes VEGFs and other genes transcription. On normoxic conditions, several divalent metals have been reported to stabilize HIF-1 α and to favor its accumulation in the cell, but the copper effect is controverted (55) (7) (56). Cytosolic copper is also specifically required for HIF-1 α transcriptional activity (7) (56), leading to the regulation of VEGF expression. Therefore, a direct link between copper and VEGF signaling in this context is demonstrated.

However, Li *et al.* (9,10) demonstrate that low Cu^{2+} level (5 μM) increases cell proliferation without increasing of VEGF expression in HUVEC and aortic cells. Additional Cu^{2+} targets are suspected, as it was reported that under proangiogenic stimuli, EC cellular copper levels significantly decrease, and 80-90% of it translocate from the nucleus toward the periphery space of the cell where it is tightly sequestered at the leading edge of the membrane (57).

Several studies also established that Cu^{2+} activity is mediated through the VEGFR1 pathway: In a model of cardiomyocyte hypertrophy, it has been demonstrated that 5 μM Cu^{2+} level alters the distribution of VEGF receptors, and increases by twofold the VEGFR1 to VEGFR2 ratio, by lowering VEGFR2 density after 24 h incubation, without changing the VEGF-A level. This effect is associated with cardiomyocyte hypertrophy regression, which is blocked by VEGFR-1 gene silencing, or when an anti-VEGF-A antibody is applied to the cells (6). Consequently, in light of the presented results, VEGFR1 appears to be one of the potential targets of Cu^{2+} and other divalent cations, in physiological angiogenesis regulation.

It has been shown that ligand-induced VEGFR1 and VEGFR2 homodimers and VEGFR1/VEGFR2 heterodimers each activate specific signaling pathways (58,59). VEGFR1 negatively regulates VEGFR2 homodimer activity, predominantly by forming heterodimer receptors with VEGFR2 subunits (60) (61).

In this context and with respect to our results, we propose that some transition metal cations, as Cu^{2+} , may bind to VEGFR1 and favors its homodimerization, releasing VEGF-A to specifically activate homodimerized VEGFR2 (Figure 9), which is known to induce proliferation of EC (61) (60).

Such VEGFR1 and R2 homo- and heterodimerization have been recently confirmed by fluorescent resonance energy transfer experiments (FRET) (62). A computational study of VEGFR dimerization (63), suggests that the expression levels of VEGFR1 and VEGFR2 modulate the heterodimerization ratio:

Because VEGFR1 is typically present at lower level than VEGFR2, it is predicted that homodimerization of the less abundant receptor is scarce, and indeed FRET experiments confirm that VEGFR1 homodimers are suppressed in absence of VEGF-A.

Moreover, because of the 200-fold higher affinity of VEGF-A for VEGFR1 in comparison to VEGFR2 (18) (49), it was proposed that VEGFR1, either as a homo- or heterodimer, acts to sequester VEGF-A in the absence of other angiogenesis activation. However, the affinity of copper for VEGFR1 should be sufficient to restore the competition between VEGFR1 and VEGFR2 for VEGF-A. Consequently, increasing the Cu^{2+} level in the medium may reduce the level of the VEGF-A/VEGFR1 complex, releasing VEGF-A to specifically activate homodimeric VEGFR2.

In conclusion, our hypothesis of direct Cu^{2+} VEGFR1 targeting may constitute an unexplored regulatory mechanism to control angiogenesis and paves the way for the development of new therapeutic compounds that modulate the interaction between VEGFs and VEGFR1.

In addition to potential trials to further investigate the role of metal ions in angiogenesis and their mechanism of action, the results presented here may

aid in the prevention of false positives during screenings of compound libraries. Indeed, numerous compound libraries are built using transition metal reagents or catalysts containing copper or palladium.

Accession numbers

The PDB ID for the structures of VEGFR1d2 in complex with Cobalt and Zinc are 4CL7 and 4CKV, respectively.

Acknowledgements

We thank Dr Virgine Lasserre (Paris Descartes University) for her help in statistical studies.

We acknowledge ESRF and SOLEIL for the use of their synchrotron radiation facilities and thank the staff at the BM29 BioSAXS, ID23EH2, ID29, and PROXIMA I beamline for their assistance.

This research was supported by CNRS, Université Paris-Descartes, ANR (ANR-2010-BLAN-1533) and ARC (grant DOC2013 0606849 to Marie Reille-Seroussi).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70
2. DiSalvo, J., Bayne, M. L., Conn, G., Kwok, P. W., Trivedi, P. G., Soderman, D. D., Palisi, T. M., Sullivan, K. A., and Thomas, K. A. (1995) Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor.placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem* **270**, 7717-7723
3. Koch, S., and Claesson-Welsh, L. (2012) Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006502
4. Kendall, R. L., and Thomas, K. A. (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10705-10709
5. D'Andrea, L. D., Romanelli, A., Di Stasi, R., and Pedone, C. (2010) Bioinorganic aspects of angiogenesis. *Dalton Trans* **39**, 7625-7636
6. Zhou, Y., Bourcy, K., and Kang, Y. J. (2009) Copper-induced regression of cardiomyocyte hypertrophy is associated with enhanced vascular endothelial growth factor receptor-1 signalling pathway. *Cardiovascular research* **84**, 54-63
7. Feng, W., Ye, F., Xue, W., Zhou, Z., and Kang, Y. J. (2009) Copper regulation of hypoxia-inducible factor-1 activity. *Molecular pharmacology* **75**, 174-182
8. Sen, C. K., Khanna, S., Venojarvi, M., Trikha, P., Ellison, E. C., Hunt, T. K., and Roy, S. (2002) Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **282**, H1821-1827
9. Li, Q. F., Ding, X. Q., and Kang, Y. J. (2014) Copper promotion of angiogenesis in isolated rat aortic ring: role of vascular endothelial growth factor. *The Journal of nutritional biochemistry* **25**, 44-49
10. Li, S., Xie, H., Li, S., and Kang, Y. J. (2012) Copper stimulates growth of human umbilical vein endothelial cells in a vascular endothelial growth factor-independent pathway. *Exp Biol Med (Maywood)* **237**, 77-82
11. Gautier, B., Miteva, M. A., Goncalves, V., Huguenot, F., Coric, P., Bouaziz, S., Seijo, B., Gaucher, J. F., Broutin, I., Garbay, C., Lesnard, A., Rault, S., Inguibert, N., Villoutreix, B. O., and Vidal, M. (2011) Targeting the proangiogenic VEGF-VEGFR protein-protein interface with drug-like compounds by in silico and in vitro screening. *Chem Biol* **18**, 1631-1639
12. Goncalves, V., Gautier, B., Garbay, C., Vidal, M., and Inguibert, N. (2007) Development of a chemiluminescent screening assay for detection of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligands. *Anal Biochem* **366**, 108-110
13. Boyaud, F., Mahiout, Z., Lenoir, C., Tang, S., Wdzieczak-Bakala, J., Witczak, A., Bonnard, I., Banaigs, B., Ye, T., and Inguibert, N. (2013) First total synthesis and stereochemical revision of laxaphycin B and its extension to lynbyacyclamide A. *Organic letters* **15**, 3898-3901
14. Flot, D., Mairs, T., Giraud, T., Guijarro, M., Lesourd, M., Rey, V., van Brussel, D., Morawe, C., Borel, C., Hignette, O., Chavanne, J., Nurizzo, D., McSweeney, S., and Mitchell, E. (2010) The ID23-2 structural biology microfocus beamline at the ESRF. *J Synchrotron Radiat* **17**, 107-118
15. de Sanctis, D., Beteva, A., Caserotto, H., Dobias, F., Gabadinho, J., Giraud, T., Gobbo, A., Guijarro, M., Lentini, M., Lavault, B., Mairs, T., McSweeney, S., Petidmange, S., Rey-Bakaikoa, V., Surr, J., Theveneau, P., Leonard, G. A., and Mueller-Dieckmann, C. (2012) ID29: a high-intensity highly automated ESRF beamline for macromolecular crystallography experiments exploiting anomalous scattering. *J Synchrotron Radiat* **19**, 455-461
16. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* **40**, 658-674

17. Read, R. J. (2001) Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 1373-1382
18. Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H. W., Eigenbrot, C., Wells, J. A., and de Vos, A. M. (1997) Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* **91**, 695-704
19. Terwilliger, T. C., Grosse-Kunstleve, R. W., Afonine, P. V., Moriarty, N. W., Adams, P. D., Read, R. J., Zwart, P. H., and Hung, L. W. (2008) Iterative-build OMIT maps: map improvement by iterative model building and refinement without model bias. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**, 515-524
20. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132
21. Ascone, I., Girard, E., Gourhant, P., Legrand, P., Roudenko, O., Roussier, L., and Thompson, A. W. (2006) Proxima 1, a New Beamline on the Third Generation SR Source SOLEIL Combining PX and Single-Crystal BioXAS. *Proceedings of the 13th International Conference On X-Ray Absorption Fine Structure (XAFS13), Stanford, 2006, edited by Britt Hedman and Piero Pianetta, eConf C060709 (2006)*
22. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**, 774-797
23. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of applied crystallography* **36**, 1277-1282
24. Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H. D. T., Konarev, P. V. & Svergun, D. I. (2012) New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Cryst.* **45**, 342-350
25. Fischer, H., de Oliveira Neto, M., Napolitano, H. B., Polikarpov, I., and Craievich, A. F. (2010) Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. *Journal of applied crystallography* **43**, 101-109
26. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of applied crystallography* **25**, 495-503
27. Franke, D., and Svergun, D. I. (2009) DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of applied crystallography* **42**, 342-346
28. Volkov, V. V., and Svergun, D. I. (2003) Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Cryst.* **36**, 860-864
29. Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995) CRY SOL— a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *Journal of applied crystallography* **28**, 768-773
30. Starovasnik, M. A., Christinger, H. W., Wiesmann, C., Champe, M. A., de Vos, A. M., and Skelton, N. J. (1999) Solution structure of the VEGF-binding domain of Flt-1: comparison of its free and bound states. *J Mol Biol* **293**, 531-544
31. Vranken, W. F., Boucher, W., Stevens, T. J., Fogh, R. H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E. L., Markley, J. L., Ionides, J., and Laue, E. D. (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* **59**, 687-696
32. Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* **5**, 725-738
33. Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O., and Petersen, T. N. (2010) CPHmodels-3.0--remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. *Nucleic acids research* **38**, W576-581
34. Combet, C., Jambon, M., Deleage, G., and Geourjon, C. (2002) Geno3D: automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics* **18**, 213-214

35. Lobley, A., Sadowski, M. I., and Jones, D. T. (2009) pGenTHREADER and pDomTHREADER: new methods for improved protein fold recognition and superfamily discrimination. *Bioinformatics* **25**, 1761-1767
36. Pronk, S., Pall, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B., and Lindahl, E. (2013) GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **29**, 845-854
37. Christinger, H. W., Fuh, G., de Vos, A. M., and Wiesmann, C. (2004) The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1. *J Biol Chem* **279**, 10382-10388
38. Iyer, S., Darley, P. I., and Acharya, K. R. (2010) Structural insights into the binding of VEGF-B by VEGFR-1D2: Recognition and specificity. *J Biol Chem*
39. Rulisek, L., and Vondrasek, J. (1998) Coordination geometries of selected transition metal ions (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺) in metalloproteins. *J Inorg Biochem* **71**, 115-127
40. Dokmanic, I., Sikic, M., and Tomic, S. (2008) Metals in proteins: correlation between the metal-ion type, coordination number and the amino-acid residues involved in the coordination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **64**, 257-263
41. Malgieri, G., Zaccaro, L., Leone, M., Bucci, E., Esposito, S., Baglivo, I., Del Gatto, A., Russo, L., Scandurra, R., Pedone, P. V., Fattorusso, R., and Isernia, C. (2011) Zinc to cadmium replacement in the A. thaliana SUPERMAN Cys(2) His(2) zinc finger induces structural rearrangements of typical DNA base determinant positions. *Biopolymers* **95**, 801-810
42. Williamson, M. P. (2013) Using chemical shift perturbation to characterise ligand binding. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **73**, 1-16
43. Hemmingsen, L., Olsen, L., Antony, J., and Sauer, S. P. (2004) First principle calculations of (113)Cd chemical shifts for proteins and model systems. *J Biol Inorg Chem* **9**, 591-599
44. Pervushin, K. V., Wider, G., and Wuthrich, K. (1998) Single Transition-to-single Transition Polarization Transfer (ST2-PT) in [15N,1H]-TROSY. *J Biomol NMR* **12**, 345-348
45. Czisch, M., and Boelens, R. (1998) Sensitivity enhancement in the TROSY experiment. *J Magn Reson* **134**, 158-160
46. Kleckner, I. R., and Foster, M. P. (2011) An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochimica et biophysica acta* **1814**, 942-968
47. Hayward, S., and Berendsen, H. J. (1998) Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: new results on citrate synthase and T4 lysozyme. *Proteins* **30**, 144-154
48. Brozzo, M. S., Bjelic, S., Kisko, K., Schleier, T., Leppanen, V. M., Alitalo, K., Winkler, F. K., and Ballmer-Hofer, K. (2012) Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2 dimerization. *Blood* **119**, 1781-1788
49. Leppanen, V. M., Prota, A. E., Jeltsch, M., Anisimov, A., Kalkkinen, N., Strandin, T., Lankinen, H., Goldman, A., Ballmer-Hofer, K., and Alitalo, K. (2010) Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2425-2430
50. Hu, G. F. (1998) Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *Journal of cellular biochemistry* **69**, 326-335
51. Kim, J., Lim, W., Ko, Y., Kwon, H., Kim, S., Kim, O., Park, G., Choi, H., and Kim, O. (2012) The effects of cadmium on VEGF-mediated angiogenesis in HUVECs. *Journal of applied toxicology : JAT* **32**, 342-349
52. Cesbron, A., Saussereau, E., Mahieu, L., Couland, I., Guerbet, M., and Gouille, J. P. (2013) Metallic profile of whole blood and plasma in a series of 106 healthy volunteers. *J Anal Toxicol* **37**, 401-405

53. Margalioth, E. J., Schenker, J. G., and Chevion, M. (1983) Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer* **52**, 868-872
54. Buckley, W. T., and Vanderpool, R. A. (2008) Analytical variables affecting exchangeable copper determination in blood plasma. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **21**, 601-612
55. Martin, F., Linden, T., Katschinski, D. M., Oehme, F., Flamme, I., Mukhopadhyay, C. K., Eckhardt, K., Troger, J., Barth, S., Camenisch, G., and Wenger, R. H. (2005) Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood* **105**, 4613-4619
56. Qiu, L., Ding, X., Zhang, Z., and Kang, Y. J. (2012) Copper is required for cobalt-induced transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **342**, 561-567
57. Finney, L., Mandava, S., Ursos, L., Zhang, W., Rodi, D., Vogt, S., Legnini, D., Maser, J., Ikpatt, F., Olopade, O. I., and Glesne, D. (2007) X-ray fluorescence microscopy reveals large-scale relocalization and extracellular translocation of cellular copper during angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2247-2252
58. Huang, K., Andersson, C., Roomans, G. M., Ito, N., and Claesson-Welsh, L. (2001) Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 315-324
59. Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., Kroll, J., Plaisance, S., De Mol, M., Bono, F., Kliche, S., Fellbrich, G., Ballmer-Hofer, K., Maglione, D., Mayr-Beyrle, U., Dewerchin, M., Dombrowski, S., Stanimirovic, D., Van Hummelen, P., Dehio, C., Hicklin, D. J., Persico, G., Herbert, J. M., Communi, D., Shibuya, M., Collen, D., Conway, E. M., and Carmeliet, P. (2003) Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature medicine* **9**, 936-943
60. Cudmore, M. J., Hewett, P. W., Ahmad, S., Wang, K. Q., Cai, M., Al-Ani, B., Fujisawa, T., Ma, B., Sissaoui, S., Ramma, W., Miller, M. R., Newby, D. E., Gu, Y., Barleon, B., Weich, H., and Ahmed, A. (2012) The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nat Commun* **3**, 972
61. Rahimi, N., Dayanir, V., and Lashkari, K. (2000) Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem* **275**, 16986-16992
62. Ahmadova, Z., Yagublu, V., Forg, T., Hajiyeva, Y., Jesenofsky, R., Hafner, M., and Keese, M. (2014) Fluorescent Resonance Energy Transfer Imaging of VEGFR Dimerization. *Anticancer research* **34**, 2123-2133
63. Mac Gabhann, F., and Popel, A. S. (2007) Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: a computational study. *Biophys Chem* **128**, 125-139

Figure Legends

Figure 1: Crystal structure of VEGFR1d2 homodimers

- a) Interface of the Zn^{2+} -induced dimer. The VEGFR1d2 buried side chains from one monomer are represented as ball-and-stick surrounded by a dot surface. The second monomer is represented by its surface conventionally colored according to the electrostatic potential.
- b) The crystal Co^{2+} -dimer (salmon and magenta) and the Zn^{2+} -dimer (light blue and green) were superposed on one of the two molecules (left in the figure). The second molecule is rotated by 7° relative to the indicated axis and translated by 0.97 \AA along a direction perpendicular to the axis.
- c) and d) Metal coordination for Zn^{2+} and Co^{2+} , respectively.

Figure 2: VEGFR1d2 surface colored as a function of the PISA-determined accessible surface area buried at the interface

- a) VEGFR1d2/VEGFR1d2 ($C222_1$ space group), b) VEGFR1d2/tVEGF-A (1FLT), c) VEGFR1d2/VEGF-B (2XAC), d) VEGFR1d2/PIGF (1RV6), and e) ribbon representation of the VEGFR1d2 in the identical orientation. The homodimer interaction surface (a) mimics an important part of the VEGFR1-ligand interaction surface, with a major contribution of Leu₂₂₁ (in red).

Figure 3: SAXS analysis of VEGFR1d2 in the absence (a, b) and presence (c, d) of $CoCl_2$

- a) and c): Scattering intensities with the CRY SOL and DAMMIF fit, and pair-distribution function ($P(r)$); b) and d): Corresponding SAXS *ab initio* DAMMIF shapes. The cobalt ion is shown as a black sphere.

Figure 4: 1H - ^{15}N -TROSY NMR spectra of the VEGFR1d2 domain

- a) Overlay of the TROSY spectra of the VEGFR1d2 in the absence (red) and presence (black) of cadmium (1.8 eq). The full spectra are shown except for residues F135 and W186, with resonances at 5.6 ppm and 10.5 ppm, respectively. A general line broadening effect is observed following the addition of the divalent cation due to a conformational exchange on an intermediate NMR timescale. b) EDTA has been added (1.8 eq) to the precedent mixture. EDTA chelates cadmium ions, leading to the disruption of the dimer and the reemergence of the previously missing resonances.

Figure 5: Peak volume evolution of the 1H - ^{15}N TROSY with increasing concentrations of $CdCl_2$

The cadmium concentration was increased from 0 to 1.8 equivalents. The peak volumes are normalized against the highest peak volume in the TROSY experiment without cadmium.

Extremely perturbed volumes following cadmium addition identify three principal regions potentially involved in dimerization: Tyr₁₃₉-Gly₁₅₁, Ala₁₉₇-Leu₂₀₄ and Leu₂₂₁-Gln₂₂₅. A fourth region involving residues Phe₁₇₂, Asp₁₇₅ and Lys₁₈₂ appears to be involved in the interaction.

Figure 6: VEGFR1-d2d3 structural modelization

- a) VEGFR1d2d3 model after MD simulation: two extreme conformers observed during the MD simulation are superposed on domain 2 to illustrate the 40° hinge motion.
- b) Top: crystal structure of the VEGFR2-d2d3/VEGF-E complex (3V6B). Bottom: Zn^{2+} -dimerized VEGFR1d2d3 model after MD simulation. The Zn^{2+} ion is shown as an orange sphere. Equivalent orientations of domain 3 are shown in identical colors (red or green).

Figure 7: Size-exclusion chromatography reveals the Cu^{2+} induced VEGFR1d2 dimerization

a) VEGFR1d2 eluted either in presence of 1 mM EDTA (Violet curve) or 1mM $CuSO_4$ (Green curve). The chromatogram revealed a single peak in the presence of 1mM EDTA (d), and two major peaks corresponding to the monomer (b) and the dimer (a) in the presence of Cu^{2+} . A third peak consisting in Cu^{2+} ions is eluted near the total volume.

b) SDS page of loaded samples and eluted peaks. VEGFR1-d2 + $CuCl_2$ (Green): Loaded sample (ls), $V_e = 11.3 \text{ ml}$ (a), $V_e = 14.1 \text{ ml}$ (b) ; VEGFR1-d2 + EDTA (Violet): Loaded sample (ls), $V_e = 17.3 \text{ ml}$ (c), $V_e = 14.0 \text{ ml}$ (d)

Figure 8: Dose dependence of metal ions on HUVEC viability

The cells were treated with various concentrations of divalent metal cations (0.3-10 μM). The data are reported as the means \pm SD, and the asterisk indicates a significant difference in comparison to the control ($P < 0.05$).

Figure 9: Hypothesis for Cu^{2+} -mediated regulation of the VEGF-A pathway

a) VEGFR1 is less abundant than VEGFR2. Consequently homodimeric VEGFR1 is scarce, and most VEGFR1 heterodimerize with VEGFR2. The affinity of VEGF-A is higher for heterodimeric VEGFR1-R2 than for homodimeric VEGFR2. b) Copper may favor homodimeric VEGFR1 and preclude heterodimerization. c) Copper binding to VEGFR1 competes with VEGF-A and favors the binding of VEGF-A to homodimeric VEGFR2 leading to cellular proliferation.

Table I: Crystal data collection and refinement statistics.

Space group	P 1	C 222 ₁
Beam line	id23-eh2	id29
Unit cell (Å, °)	27.75 41.71 94.69 87.05 82.25 73.03	95.73 102.39 27.47 90 90 90
Wavelength (Å)	0.8726	0.9787
Resolution range (Å)	19.47 – 2.00 (2.07 – 2.00)	47.87 - 2.05 (2.13 - 2.05)
Unique reflections	26362 (2596)	8564 (737)
Multiplicity	1.8 (1.8)	3.9 (2.3)
Completeness (%)	97.07 (96.58)	96.88 (83.85)
Mean I/sigma(I)	10.74 (3.01)	15.46 (3.97)
Wilson B-factor (Å ²)	17.58	27.29
R-sym (%)	6.9 (33.0)	5.3 (16.5)
Number of molecules in AU	4	1
Matthews coeff. (Å ³ /Da) †	2.36	3.06
Solvent (%)	47.9	59.8
R-factor (%)	16.75 (19.98)	16.28 (19.20)
R-free (%)	23.32 (26.44)	20.53 (28.76)
Asymmetric unit composition		
Protein residues	372	94
Alternate positions	0	5
Metal ions	5 Co	0.5 Zn
Ethylene glycol	5	4
Water	279	61
RMS (bonds, Å)	0.006	0.007
RMS (angles, °)	0.98	1.06
Ramachandran favored (%)	95	95
Ramachandran outliers (%)	0	0
Clash score	10.38	6.61
Average B-factor (Å ²)	24.40	29.70
Macromolecule	23.40	28.30
Solvent	33.40	42.30

Statistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses

A single crystal was used for each data set

Table II: SAXS data recording and analysis

[CoCl ₂] (mM)	0	10
Data-collection parameters		
beam line	BM29 ESRF	BM29 ESRF
detector	Pilatus 1M	Pilatus 1M
Wavelength (Å)	1.008	1.008
q range (Å ⁻¹)	0.0039-0.4624	0.0039-0.4624
Exposure time / frame (s) (protein / buffer solution)	2.0 / 2.0	2.0 / 2.0
Number of averaged frames (protein / buffer solution)	10 / 20	10 / 20
Concentration range (mg.mL ⁻¹)	0.5-5	0.5-5
Temperature (K)	277	277
Structural parameters †		
I(0) (cm ⁻¹) [from Guinier] § #	11.32 ± 0.02	18.37 ± 0.02
I(0) (cm ⁻¹) [from P(r)] § ¥	11.31	18.53
R _g (Å) [from Guinier] #	15.08 ± 0.16	18.44 ± 0.14
R _g (Å) [from P(r)] ◇	15.10 ± 0.05	18.77 ± 0.02
D _{max} (Å) ¥	51.7	57.6
Porod volume estimate (Å ³) ◇	14635	25938
Dry volume estimated from sequence (Å ³) ∂	13080	26050
Molecular-mass determination		
Partial specific volume (cm ³ .g ⁻¹) ‡	0.749	0.749
Contrast (Δρ × 10 ¹⁰ cm ⁻²) ‡	2.70138	2.6889
Molecular Mass M _r from I(0) (Da) ◇	12100	21500
Calculated monomeric M _r from sequence (Da)	11006	22012
Software employed		
Data reduction and processing	PRIMUS	PRIMUS
Ab initio analysis	DAMMIF	DAMMIF
Validation and averaging	DAMAVR	DAMAVR
Computation of models intensities	CRYSOL	CRYSOL
Superposition of models	SUPCOMB	SUPCOMB
Three-dimensional graphic representations	PyMOL	PyMOL

† Reported for 5mg.mL⁻¹ measurements § intensity on relative scale

‡ calculated from VolSpec software (Javier Perez and Jean-Noël Lesdema, unpublished)

◇ calculated from (25)

calculated from (23),

¥ calculated from (26),

∂ calculated from (29)

Table III: IC₅₀s and % inhibition of assayed metal complexes.

Metals	% displacement at 30 μ M ^a	IC ₅₀ [95% CI] (μ M) ^b
CuSO ₄	83 \pm 8	0.97 [0.63-1.49]
Cu(OAc) ₂	69 \pm 2	1.32 [0.90 – 1.94]
CuCl ₂	87 \pm 2	1.26 [1.02 – 1.55]
Pd(OAc) ₂	97 \pm 3	0.36 [0.27-0.48]
PdCl ₂	93 \pm 1	0.25 [0.19 – 0.31]
NiSO ₄	75 \pm 1	3.54 [2.67 – 4.70]
ZnSO ₄	61 \pm 2	5.94 [4.80-7.37]
CoSO ₄	44 \pm 1	N/A ^c
CoCl ₂	40 \pm 2	47.11 [35.33 – 62.81]
CdCl ₂	38 \pm 4	47.97 [32.55 – 70.69]
FeSO ₄	13 \pm 5	N/A
MnSO ₄	0	N/A
Na ₂ SO ₄	0	N/A

^a Activity corresponds to the percentage of biotinylated VEGF-A₁₆₅ displaced by 30 μ M of metal on the whole extracellular domain (ECD: d1-d7) of VEGFR1.

^b Inhibitory concentration able to displace 50% of the biotinylated VEGF-A₁₆₅ binding on VEGFR1 (ECD).

^c Problem of insolubility

Figure 1

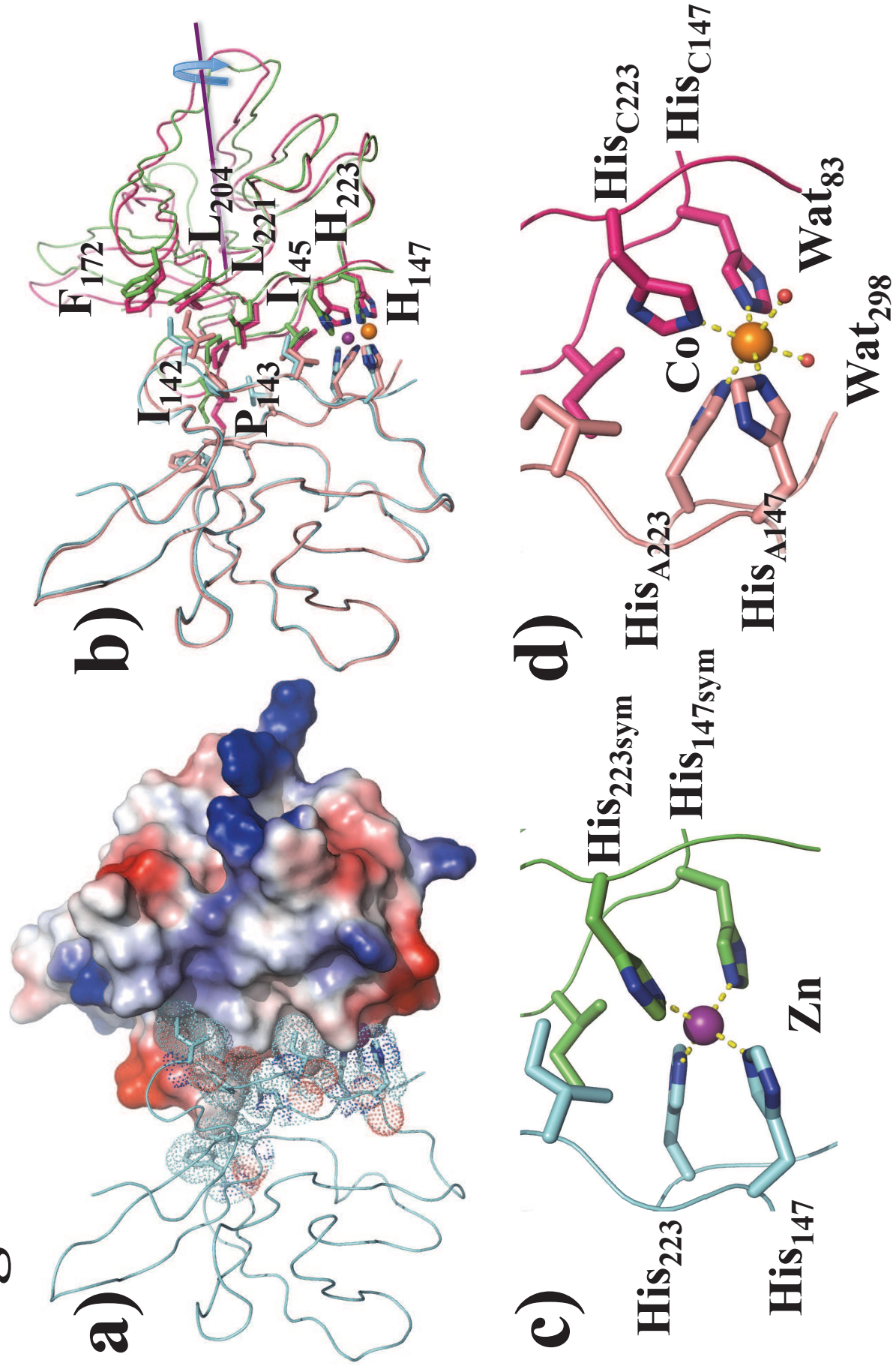


Figure 2

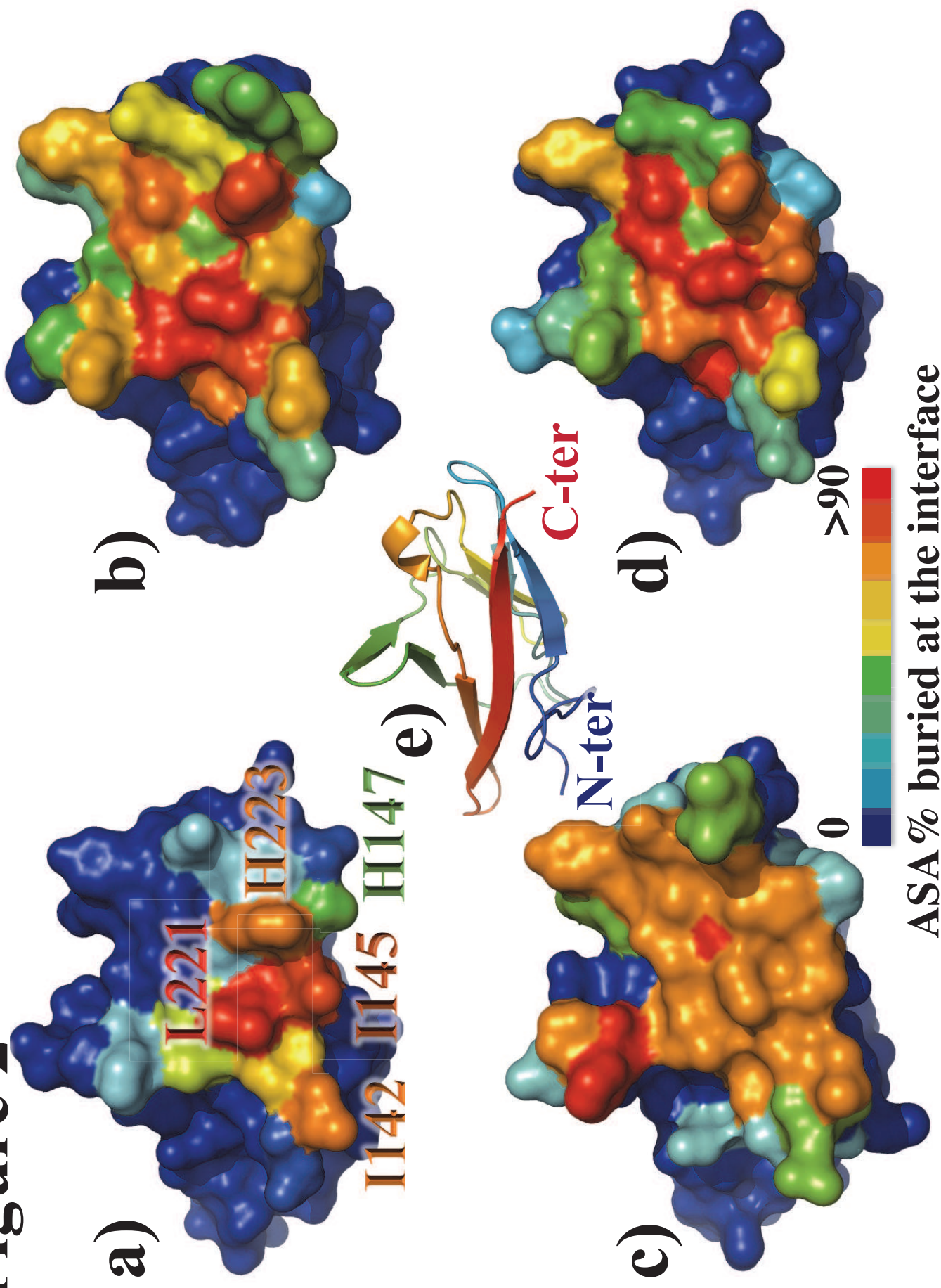
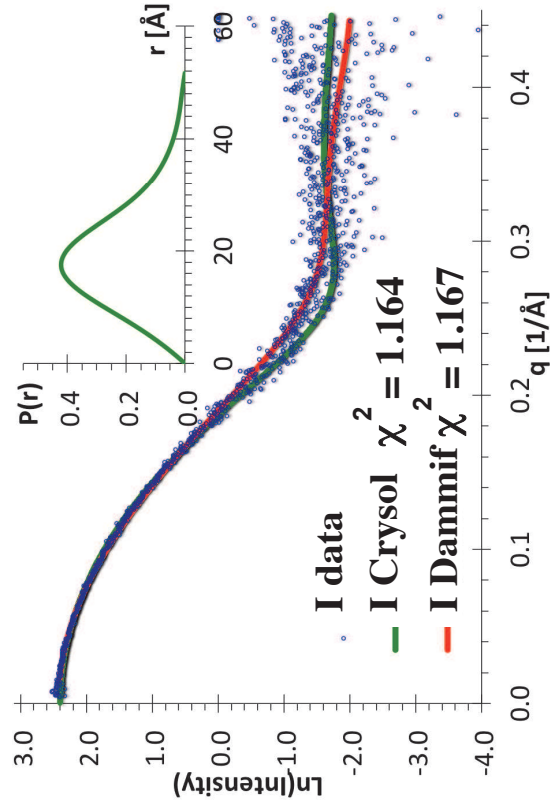
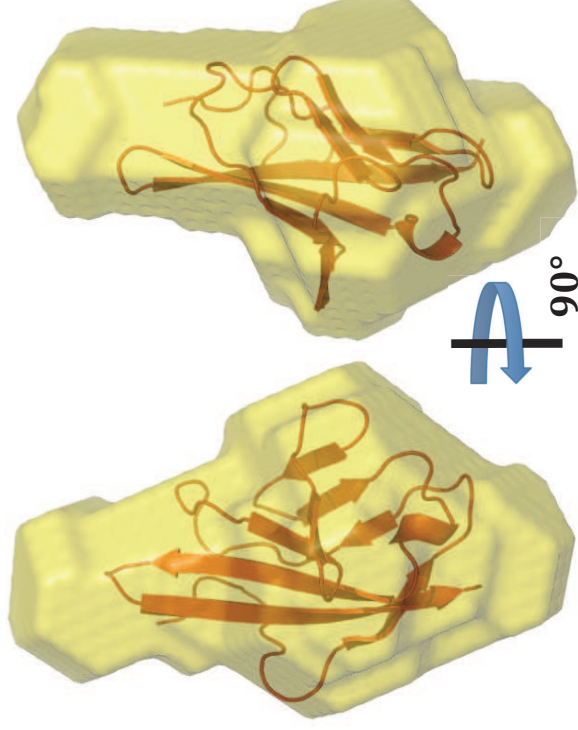


Figure 3

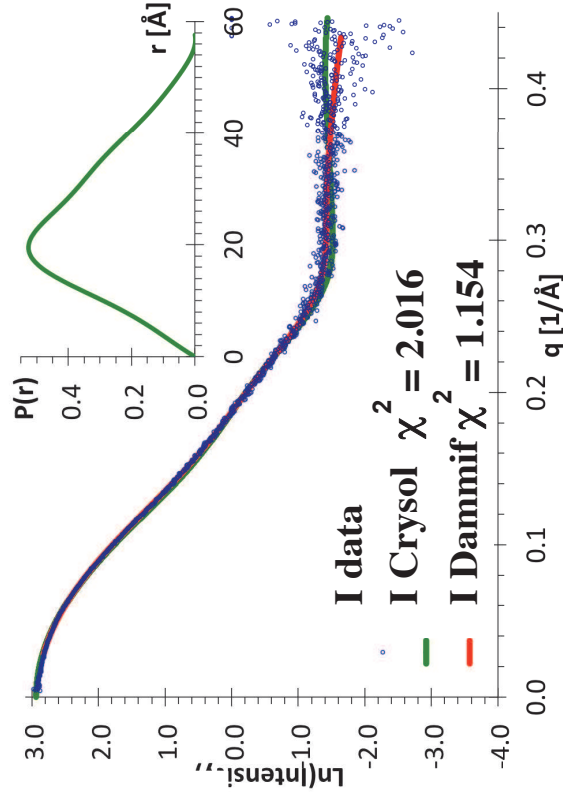
a) SAXS data without Co^{2+}



b) corresponding shapes



c) SAXS data with Co^{2+}



d) corresponding shapes

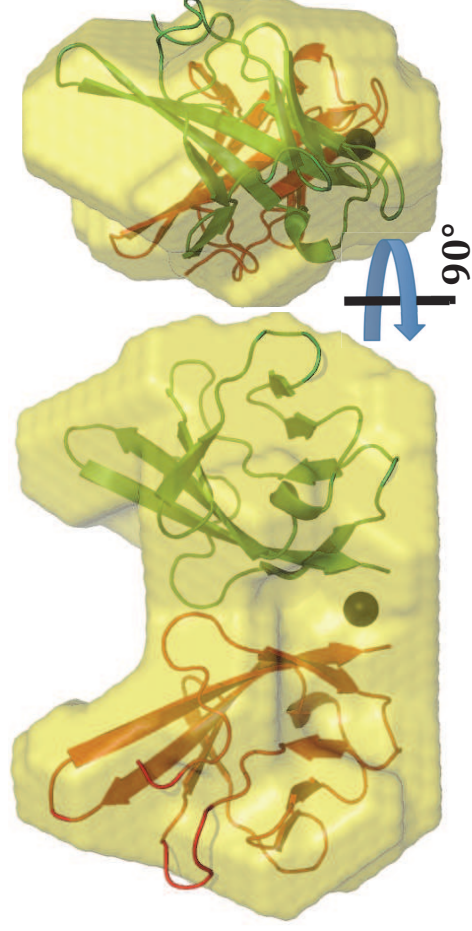


Figure 4

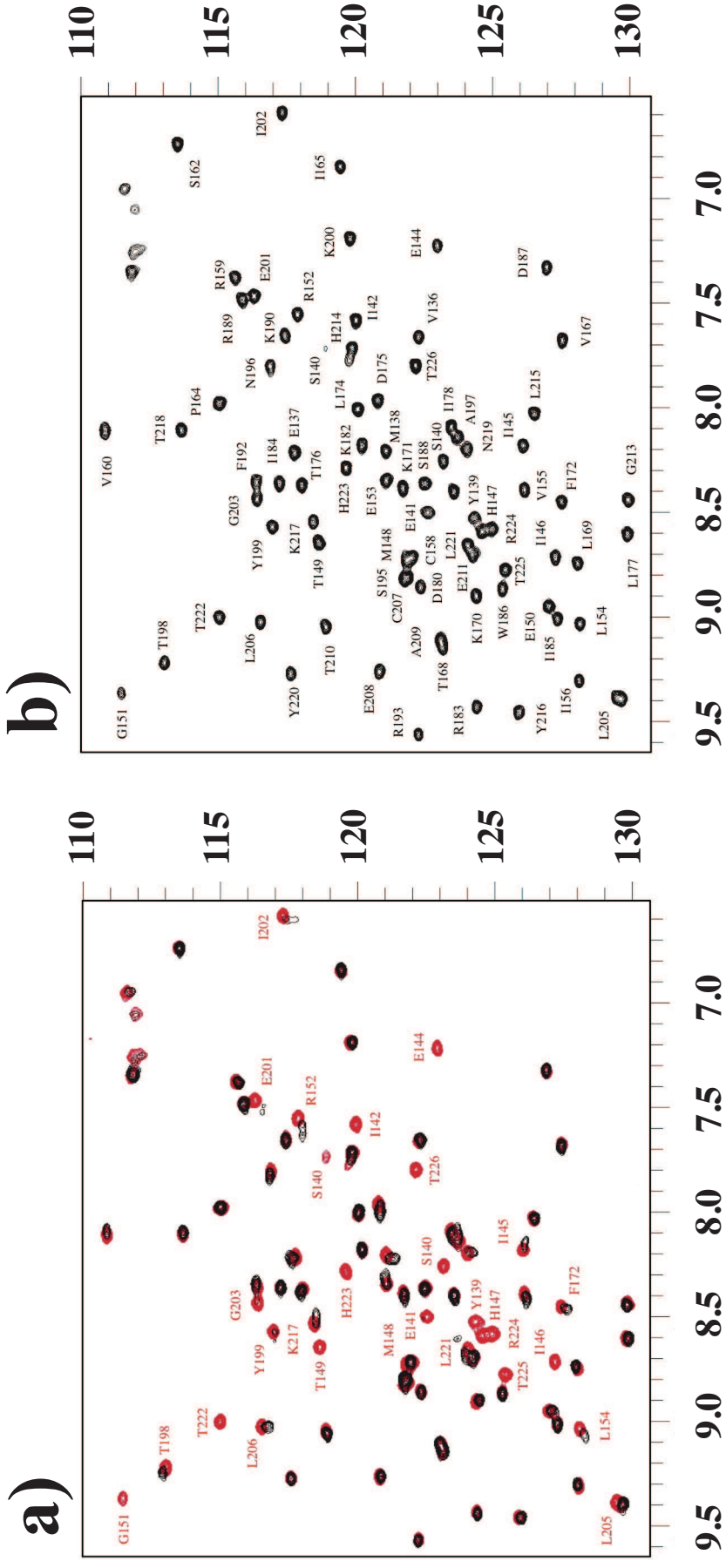


Figure 5

TROSY normalized
peak volumes

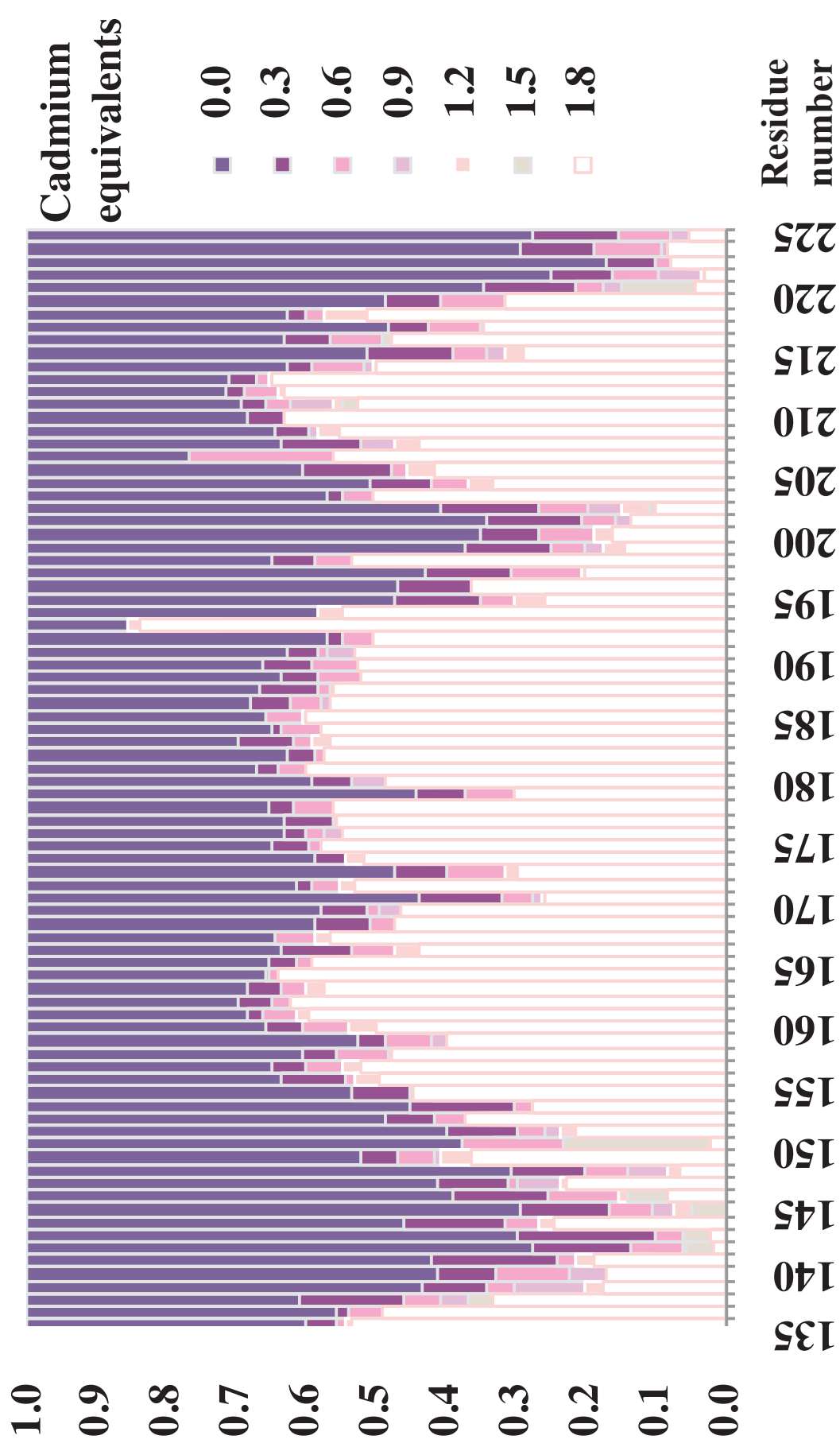
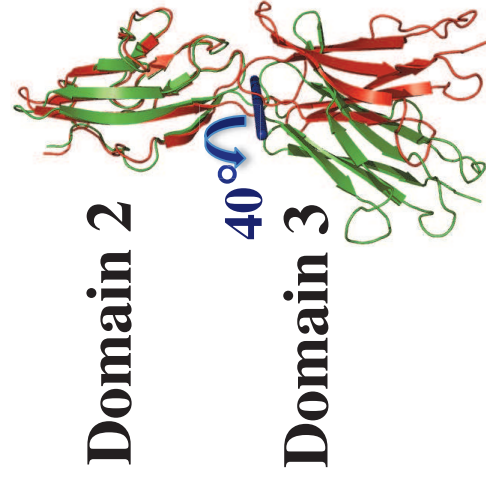


Figure 6

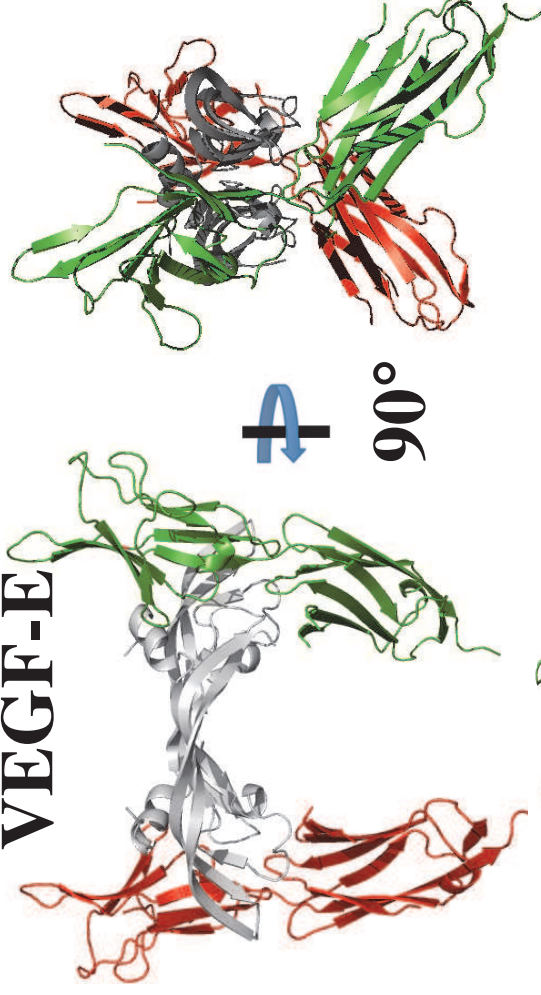
a)



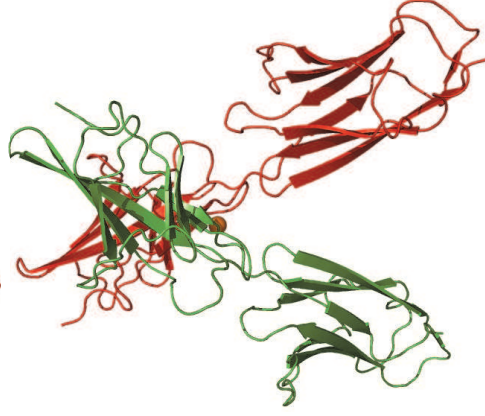
b)

2(VEGFR2-d2d3)/

VEGF-E



90°



90°

2(VEGFR1-d2d3)/Zn²⁺

Figure 7

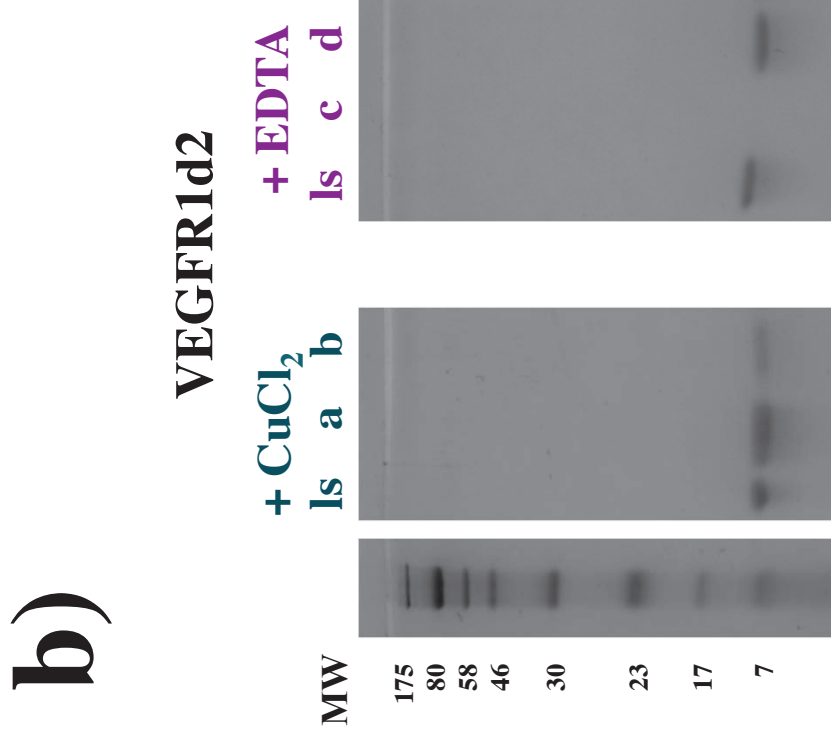
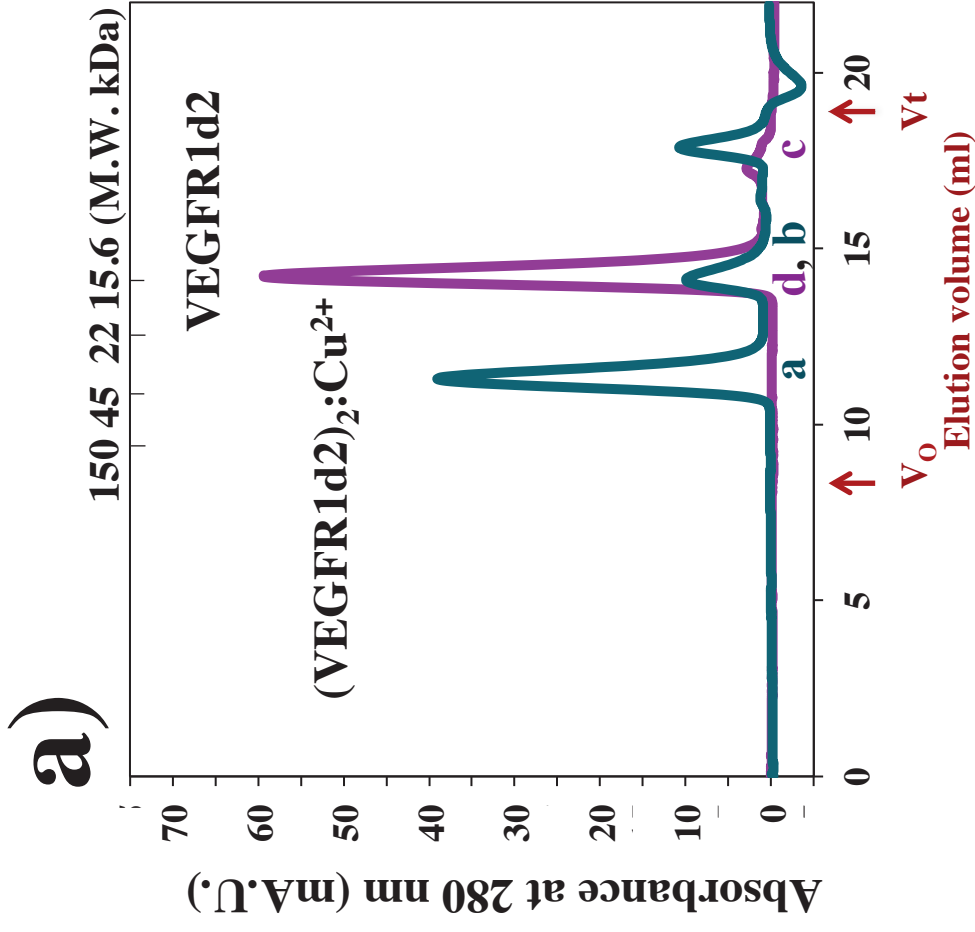


Figure 8

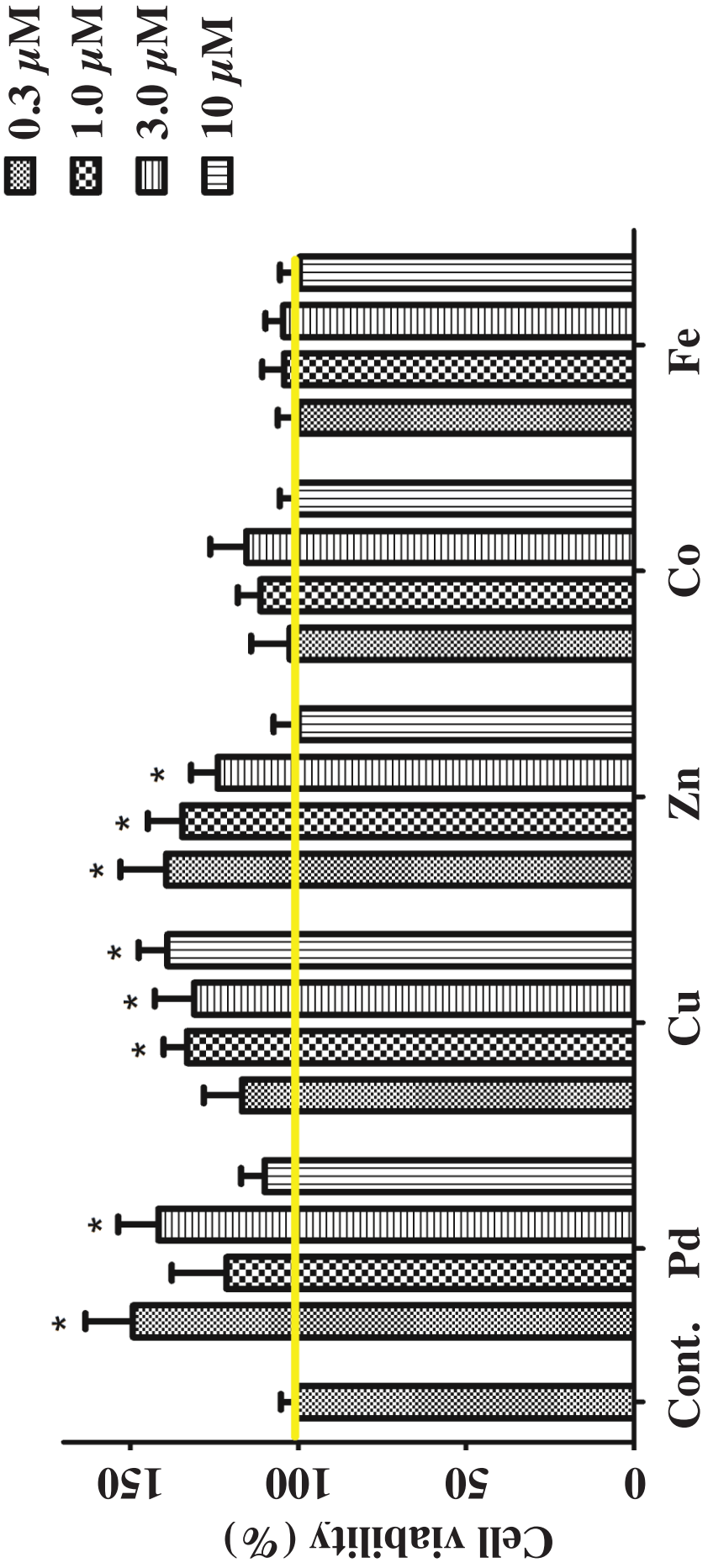
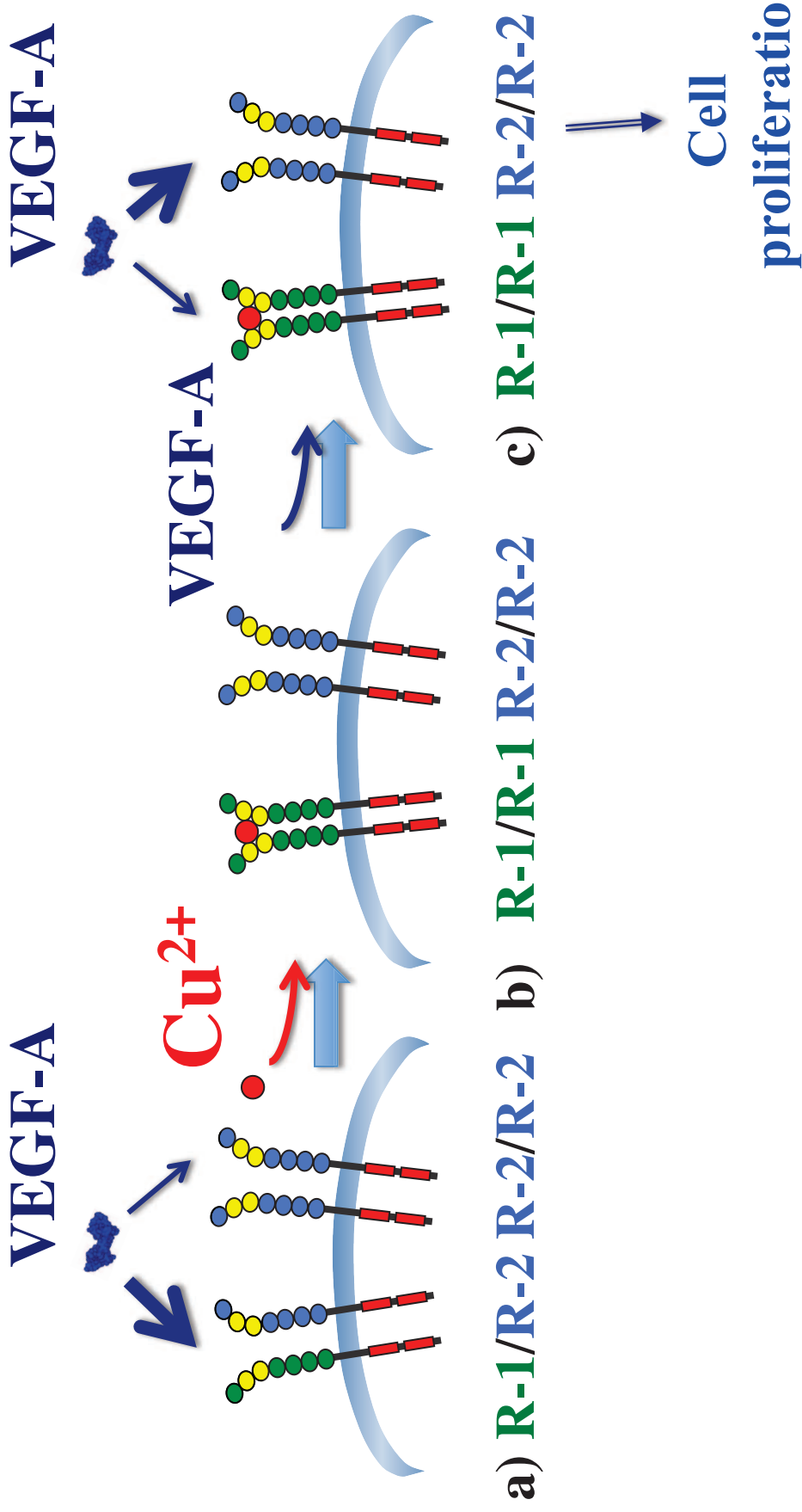


Figure 9



Chapitre 4 : Conception, synthèse et développement de nouveaux peptides ciblant le VEGF circulant

En raison de son rôle crucial dans le développement tumoral et de sa faible implication dans des phénomènes physiologiques à l'âge adulte, le VEGF est une cible thérapeutique de choix. Comme précisé précédemment, deux grandes approches sont décrites et validées dans la littérature pour inhiber l'effet de ce facteur de croissance : d'une part, le développement d'agents ciblant les récepteurs au VEGF, et d'autre part celui de molécules ciblant le facteur de croissance lui-même. Jusqu'à présent, les travaux décrits dans le chapitre 2 ont porté sur le développement de molécules ciblant les récepteurs au VEGF, et plus particulièrement le VEGFR1. Cependant, suite aux résultats obtenus dans cette partie, nous avons réorienté le sujet et souhaité développer des molécules ciblant le VEGF.

Cibler le VEGF présente de nombreux avantages dont une spécificité de la réponse biologique. En effet, alors que des molécules qui agissent sur les VEGFRs peuvent bloquer l'interaction de ces récepteurs avec d'autres ligands naturels (membres de la superfamille du VEGF) et donc affecter d'autres phénomènes que l'angiogenèse, l'utilisation d'agents ciblant le VEGF semble plus spécifiques. D'un point de vue plus général, le VEGF étant une molécule circulante, cibler ce facteur de croissance ne nécessite pas de pénétrer dans la cellule. De plus, il a été montré que l'inhibition du VEGF permettait de favoriser la pénétration dans les tumeurs, et donc une meilleure action, d'autres agents thérapeutiques anticancéreux plus classiques.¹⁹⁸

Parmi les agents ciblant le VEGF, l'Avastin® (bevacizumab), anticorps anti-VEGF prévenant la fixation du VEGF sur son récepteur, est utilisé en association avec d'autres traitements et améliore nettement la survie de patients atteints de différents types de cancers. De plus, il est également prescrit dans le cadre de traitements de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

En dépit du succès thérapeutique de l'Avastin, l'utilisation d'inhibiteurs de faible poids moléculaire pourrait offrir de nombreux avantages en termes de production, stabilité, coût et administration.

Dans ce contexte et s'appuyant sur les données de la littérature, nous avons souhaité développer de nouveaux peptides et peptidomimétiques ciblant le VEGF circulant.

¹⁹⁸ N. Ferrara, *Oncology*, **2005**, 69 (suppl.3), 11-16

I. Données bibliographiques : Découverte et étude des peptides v107, v114 et v114*ciblants le VEGF.

1. Peptides ciblant le VEGF

1.1 Découverte de peptides ciblant le VEGF par phage display

Les peptides ciblant le VEGF circulants obtenus par phage display ayant servi de point de départ pour développer, au cours de ma thèse, de nouveaux peptides et peptidomimétiques, cette partie sera décrite plus en détail.

1.1.1 Technique de phage display

Le phage display est une technique qui a été développée pour la première fois en 1985 par G. Smith. Ce procédé associe deux grandes étapes : une de synthèse et une de sélection. La première étape repose sur l'exposition d'un répertoire protéique (protéine, peptide, fragment d'anticorps) à la surface d'un bactériophage *via* la fusion d'une séquence aléatoire d'oligonucléotides avec un gène du phage. La seconde consiste à étudier des interactions potentielles entre les molécules portées par ces bactériophages et des protéines cibles.¹⁹⁹

Cette méthode est couramment utilisée pour étudier des interactions protéiques et permet non seulement de caractériser et cartographier des interactions protéines/protéines mais également de développer de nouveaux ligands. En effet, le phage display permet d'identifier et de sélectionner, à l'aide de bibliothèques très diversifiées, de nouveaux ligands peptidiques capables de se lier à une protéine cible.²⁰⁰

Les bactériophages sont des virus infectant les bactéries. Dans le cadre du phage display, ils sont exprimés, après modification, par la bactérie *E. Coli*. Les phages les plus utilisés sont des phages filamenteux de type M13, f1 ou fd. Ces derniers présentent comme avantage de se multiplier de façon importante et de posséder un génome d'ADN simple et donc facilement manipulable. Le phage M13 est constitué de différentes protéines dont pIII et pVIII qui constituent la capsid (Figure 76).

¹⁹⁹ G. P. Smith and V. A. Petrenko, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 391-410

²⁰⁰ S. S. Sidhu, W. J. Fairbrother and K. Deshayes, *Chem. Bio. Chem.* **2003**, 4, 14-25

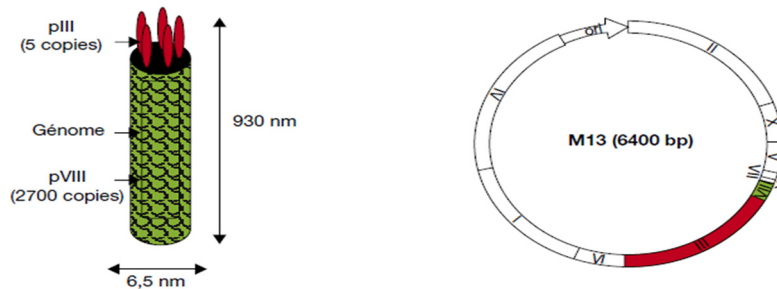


Figure 76 : Représentation de la structure et du génome du bactériophage filamenteux de type M13 ²⁰¹

Les banques de séquences aléatoires d'ADN codant pour les peptides d'intérêts sont généralement insérées au niveau des gènes des protéines pIII ou pVIII. Après expression dans la bactérie, les peptides souhaités sont ainsi liés au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine choisie et donc exposés à la surface du phage.

Les phages recombinants ainsi produits sont ensuite sélectionnés pour leur capacité à interagir de façon réversible avec une cible. Cette étape se fait en utilisant des méthodes classiques de biochimie. Lorsque, comme dans le cas du VEGF, la cible est une protéine purifiée, celle-ci peut être utilisée en phase solide dans des conditions de test ELISA par exemple. La protéine cible, immobilisée sur support solide, est incubée avec un mélange de phages et donc de séquences peptidiques. Après plusieurs lavages, les phages présentant les peptides les plus affins pour la protéine cible sont donc fixés tandis que les autres sont éliminés. Les phages sélectionnés sont ensuite élués, mis en contact de bactéries et amplifiés. Après plusieurs cycles de sélection/amplification, l'ADN des phages retenus peut être séquencé pour identifier et caractériser les ligands les plus affins (Figure 77).

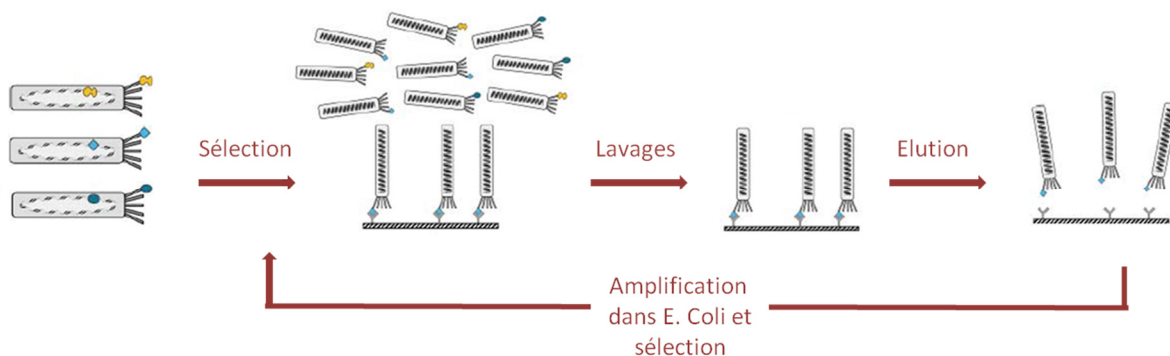


Figure 77 : Illustration des différentes étapes de sélection/amplification du phage display. Dans cet exemple, les peptides sont exprimés sur la protéine de surface pIII de bactériophage de type M13.²⁰⁰

Le phage display apparaît donc comme un outil efficace de criblage permettant d'identifier rapidement de nouveaux ligands de nature peptidique. Cette technique a été utilisée sur des cibles protéiques variées et a ainsi permis de développer des ligands ayant des propriétés de type agonistes

²⁰¹ G. Castel, B. Heyd and N. Tordo, *Virologie*, **2009**, *13*, 93-102

ou antagonistes. Quelques exemples de peptides obtenus avec succès par phage display sont présentés sur la figure 78.

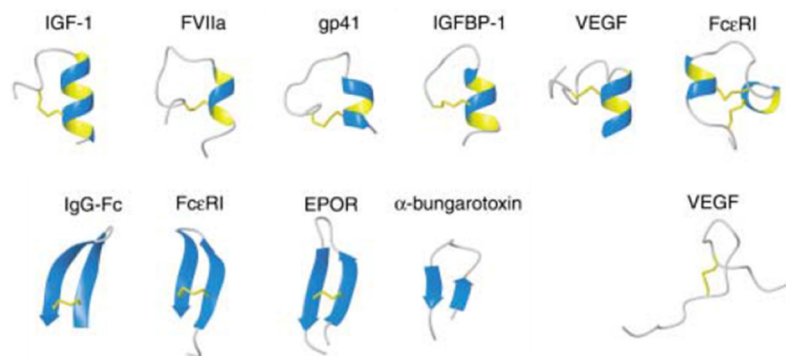


Figure 78 : Représentation de peptides agonistes ou antagonistes obtenus par phage display dont les structures ont été déterminées libres en solution ou liés à leur protéine cible ²⁰⁰

1.1.2 Application au VEGF: Découverte de peptides v107 et v114*

En 1998, Fairbrother et son équipe ont identifié, par phage display, trois classes de peptides capables de se lier au VEGF au niveau de la zone de reconnaissance du récepteur.²⁰² Cette partie vise à résumer leurs travaux.

Identification et optimisation de trois classes de peptides ciblant le VEGF

Contraindre les peptides et donc les pré-organiser a généralement un effet favorable sur leurs interactions avec des protéines cibles. Les contraintes imposées par une cyclisation (pont disulfure par exemple) semblent, d'une part, stabiliser la structuration du peptide et, d'autre part, conduire à une meilleure conservation de la conformation du peptide et donc de ces capacité de liaison une fois dissocié du phage. Dans ce contexte, deux bibliothèques de peptides possédant un pont disulfure ont été sélectionnées par les auteurs et exprimées sur la protéine pVIII d'un phage de type M13.

La première bibliothèque regroupe des peptides contraints de 19 et 20 acides aminés de type $X_iCX_jCX_k$. La seconde bibliothèque contient, quant à elle, des peptides de 18 acides aminés de type $X_4CX_2GPX_4CX_4$. Le motif GP (Glycine-Proline) présent dans cette dernière bibliothèque a été introduit afin d'induire une conformation de type coude β .

Suivant le protocole de phage display (phage-ELISA) décrit précédemment, trois peptides ont été identifiés et organisés en trois classes en fonction de leurs structures.

²⁰² W. J. Fairbrother, H. W. Christinger, A. G. Cochran, G. Fuh, C. J. Keenan, C. Quan, S. K. Shriver, J. Y. K. Tom, J. A. Wells and B. C. Cunningham, *Biochemistry*, **1998**, 37, 17754-17764

Classe 1 (18 résidus)	<i>cyc</i> -GERWCFDGPLTWVCGEES
Classe 2 (20 résidus)	<i>cyc</i> -RGWVEICVADDNGMCVTEAQ
Classe 3 (19 résidus)	<i>cyc</i> -GWDECDVARMWEWECFAGV

Alors que le peptide de la classe 1 provient de la seconde librairie et possède un motif GP, les deux autres peptides (classe deux et trois) sont issus de la première et diffèrent par le nombre d'acides aminés présents dans le peptide ainsi que par la position des cystéines.

L'analyse par phage-ELISA de ces peptides a mis en évidence que, bien qu'ayant des affinités faibles ($K_d > 10 \mu\text{M}$), ces trois composés sont capables de se lier au VEGF. De plus, les auteurs ont également montré que la liaison de ces phages sur le VEGF était inhibée en présence de VEGFR2.

Suite à ces observations, une première série d'optimisation a été réalisée en conservant cependant un nombre important d'acides aminés d'origines (« soft randomization »). L'analyse par phage-ELISA a conduit à mettre en évidence des nouveaux peptides plus affins que ceux d'origine pour les trois classes (CI_{50} classe 1 : 0,6 - 6,6 μM ; CI_{50} classe 2 : 0,6 - 1,7 μM ; CI_{50} classe 3 : 0,3 - 1,3 μM).

Afin de confirmer l'affinité observée et vérifier que celle-ci n'était pas induite par la présence du phage, un peptide de chaque classe a été synthétisé par les auteurs. Ces trois peptides ont été synthétisés sur support solide en stratégie Fmoc et sont représentés ci-dessous (*cyc* = cyclique).

Classe 1 (v106)	<i>cyc</i> -GERWCFDGPRAWVCGWEI-NH ₂	$CI_{50} = 7,0 \mu\text{M}$
Classe 2 (v108)	<i>cyc</i> -RGWVEICAADDYGRCLTEAQ-NH ₂	$CI_{50} = 2,2 \mu\text{M}$
Classe 3 (v107)	<i>cyc</i> -GGNECDIARMWEWECFERL-NH ₂	$CI_{50} = 0,7 \mu\text{M}$

Analysé par résonance plasmonique de surface (SPR), les valeurs de CI_{50} de ces peptides libres correspondent à celles obtenues en présence des phages. Ce résultat a donc permis aux auteurs de conclure que l'affinité observée n'était pas due à la présentation du peptide par le phage. De plus, des expériences de compétition en ELISA ont mis en évidence que la région de fixation sur le VEGF était commune pour les trois classes de peptides.

Aux vues de ces résultats et du gain d'affinité obtenu, notamment pour les classes 2 et 3, les auteurs ont réalisé une dernière série d'optimisation. Des modifications ont été réalisées en contrôlant le choix et la position des codons mutés (« tailored randomization »). Comme précédemment, après phage-ELISA, l'ADN des phages sélectionnés a été séquencé et a permis d'identifier les séquences des peptides les plus affins pour le VEGF. Ces analyses ont mis en évidence de nouvelles mutations d'acides aminés ainsi que certaines communes avec la première étape d'optimisation.

Suite à ces résultats, un peptide représentatif de chaque série a été synthétisé puis analysé par biacore®. Ces différents peptides sont représentés ci-dessous.

Classe 1 (v127)	cyc-EELWCFDGPRAWVCGYVK-NH ₂	Cl ₅₀ = 10,0 μM
Classe 2 (v128a)	cyc-RGWVEICESDVWGRCL-NH ₂	Cl ₅₀ = 1,1 μM
Classe 3 (v114)	cyc-VEPNCDIHVMWEWE \underline{C} FERL-NH ₂	Cl ₅₀ = 0,2 μM

L'analyse des peptides de la classe 1 a permis de montrer d'une part que la seconde série d'optimisation n'a pas conduit à une amélioration de l'affinité et que d'autre part ces peptides sont beaucoup moins actifs que ceux des deux autres classes. Les données obtenues pour les peptides de la classe 2 suggérant que les quatre résidus en C-terminal n'étaient pas nécessaire, un peptide tronqué a été synthétisé. Celui-ci, composé de 16 acides aminés seulement, est plus affiné que le peptide v108 obtenu suite à la première série d'optimisation. Ce nouveau peptide v128, inhibe l'interaction VEGF/VEGFR2 avec une Cl₅₀ de 1,1 μM.

Pour la classe 3, le peptide v114 issu de cette seconde étape d'optimisation a été synthétisé. Celui-ci est trois fois plus affiné pour le VEGF que le peptide v107 et présente une Cl₅₀ de 0,2 μM sur le test VEGFR/VEGFR2. Les peptides v107 et v114 étant les deux peptides les plus actifs, une mesure directe de la liaison de ces composés sur le VEGF a été effectuée par SPR. Ceci a permis de déterminer des valeurs de K_d de 0,53 μM et 0,11 μM respectivement pour le v107 et le v114.

En conclusion, ces étapes ont ainsi permis aux auteurs d'identifier différents peptides capables de se lier au facteur de croissance et d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR2 avec des Cl₅₀ comprises entre 0,2 μM et 10 μM.

Etude des peptides v106, v108 et v107

Afin de caractériser ces peptides et ainsi déterminer leur conformation en solution, des études RMN ont été réalisées. Contrairement au peptide v106 qui, pour des raisons de solubilité, n'a pas pu être étudié, la structure des peptides v108 et v107 a été analysée par RMN dans l'eau à pH 5,6. Ces analyses ont mis en évidence que ces deux peptides n'adoptent pas une conformation figée en solution. Cependant, contrairement au v108 qui n'est pas structuré, l'analyse des constantes de couplage du peptide v107 ($^3J_{NH-H\alpha}$) indique que ce peptide tend à adopter une structure en hélice.

Suite à ces premières analyses, le site de liaison de ces trois peptides sur le VEGF a été déterminé par RMN par comparaison des spectres ¹H-¹⁵N HSQC du ¹⁵N-VEGF en présence et en absence de peptides. Cette analyse a montré que, bien que les zones de fixation se recouvrent, les modes de liaisons de ces trois peptides sont très différents. Les régions correspondantes sont représentées sur la figure 79.

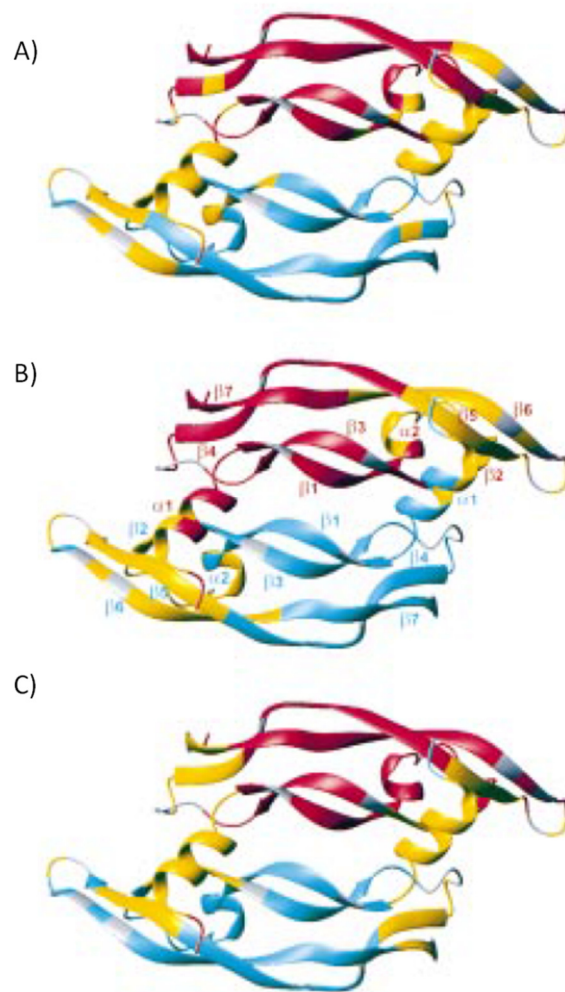


Figure 79 : Représentations schématique du dimère VEGF₈₋₁₀₉ sur lequel sont colorés en jaune les résidus affectés par la liaison des peptides v106 (A), v108 (B) et v107 (C).²⁰²

Etude des peptides v107 et v108

En raison de leurs affinités pour le VEGF, les peptides v107 et v108 ont été étudiés plus en détail. La structure des ces deux peptides en complexe avec le VEGF a été résolue.

La structure du complexe VEGF₈₋₁₀₉/v108 a été résolue par cristallographie RX^{202bis} et est représentée dans la figure 80-A. Cette structure apporte de nombreuses informations sur le mode de liaison de ce peptide sur le facteur de croissance. D'un point de vue général, ce peptide interagit majoritairement avec le VEGF *via* des liaisons hydrogènes. Alors que les cinq résidus en C-terminal du peptide n'interagissent pas avec le VEGF, les sept acides aminés en N-terminal ainsi que ceux présents dans le cycle semblent essentiels. En accord avec les données RMN, cette structure met en avant que le v108 se lie aux deux monomères de VEGF. En effet, il interagit d'une part avec les résidus 17 et 18 de l'hélice α1 (monomère1) et d'autre part avec les régions α2-β2, β5 et β6 (monomère2).

La structure du complexe v107/VEGF a, quant à elle, été déterminée par RMN²⁰³ et est représentée sur la figure 80-B. Celle-ci met en avant qu'au contact du VEGF, le peptide se structure et adopte notamment une conformation hélicoïdale. Les quatre résidus en N-terminal restent néanmoins désordonnés et ne semblent pas interagir avec le VEGF. Ce peptide présente une face polaire exposée au solvant et une face hydrophobe en interaction avec le VEGF. L'interface entre ce peptide et le facteur de croissance repose donc essentiellement sur des interactions de type hydrophobes. Le peptide v107 se lie principalement au monomère 1 du VEGF. Contrairement au v108, il n'interagit pas avec les domaines α 2- β 2 et β 6. Les sites de liaison de ce peptide sur le VEGF se situent d'une part sur l'hélice α 1 et les feuillets β 4 et β 5 (monomère 1), et d'autre part sur les domaines β 2 et β 5 (monomère 2).

L'analyse structurale des complexes v107/VEGF et v108/VEGF a donc permis de confirmer que, bien que les domaines de fixation des peptides sur le VEGF se recouvrent partiellement, les modes de liaisons du v107 et v108 sont distincts.

Dans ce contexte, les auteurs ont comparé les modes de liaison de ces peptides sur le VEGF d'une part avec le domaine d2 du VEGFR1, et d'autre part avec un anticorps anti-VEGF.^{202,200,203} Cette approche a ainsi mis en évidence que le mode de fixation du peptide v107 sur le VEGF est très similaire à celui du VEGFR1-d2 (Figure 80-B et D). En effet, l'ensemble des résidus du VEGF impliqués dans l'interaction avec le v107 participent également à la liaison au récepteur. Comme pour le v107, l'interface VEGF/VEGFR1-d2 repose donc sur des interactions de nature hydrophobes. Dans le cas du v107, la surface d'interaction est de 1167 Å² tandis qu'elle est de 1672 Å² pour le récepteur.

De la même manière cette comparaison a montré que le peptide v108 interagit avec le VEGF de façon semblable au fragment Fab de l'anticorps anti-VEGF (Figure 80-A et C). En effet, seulement 5 des 13 résidus du VEGF impliqués dans l'interface v108/VEGF interagissent avec le VEGFR1-d2. Au contraire, 12 des ces 13 acides aminés sont impliqués dans l'interface avec le fragment Fab de l'anticorps. Ceci confirme donc que le mode de liaison de ce peptide ressemble plus à celui de l'anticorps qu'à celui du récepteur. Le v108 et l'anticorps interagissent avec le VEGF essentiellement grâce à des liaisons hydrogènes. En effet, on peut observer 13 liaisons hydrogènes dans le cas du v108 et 10-12 pour l'anticorps. Tous les atomes du VEGF formant des liaisons hydrogènes avec le v108 sont également en interaction avec le fragment Fab de l'anticorps. Pour finir, la surface totale de liaison sur le VEGF est de 1350 Å² pour le v108 et de 1750-1800 Å² pour le fragment Fab.

^{202bis} C. Wiesmann, H. W. Christinger, A. G. Cochran, B. C. Cunningham, W. J. Fairbrother, C. J. Keenan, G. Meng and A. M. de Vos, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 17765-17772

²⁰³ B. Pan, B. Li, S. J. Russell, J. Y. K. Tom, A. G. Cochran and W. J. Fairbrother, *J. Mol. Biol.*, **2002**, *316*, 769-787

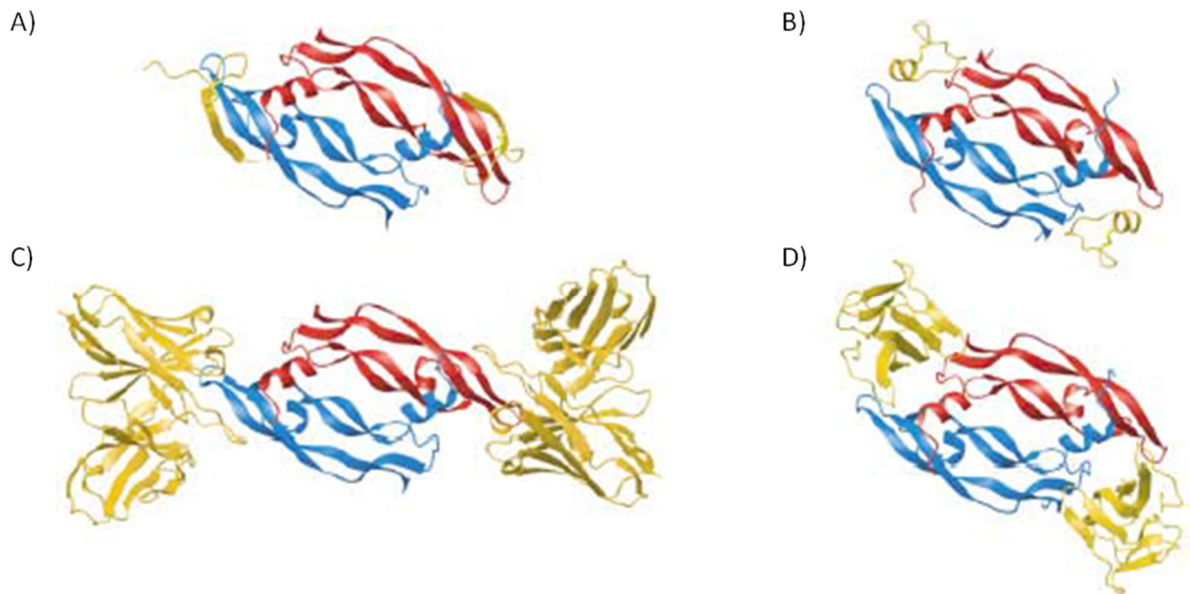


Figure 80 : Représentations du VEGF en complexe avec différents ligands. A) Structure RX du complexe VEGF/v108 (PDB 1VPP) ; B) Structure en solution du complexe VEGF/v107 obtenue par RMN (PDB 1KAT) ; C) Structure RX du complexe VEGF/fragment Fab d'un anticorps anti-VEGF (PDB 1CZ8) ; Structure RX du complexe VEGF/VEGFR1-d2 (PDB 1FLT).²⁰⁰

Conclusion

Cette étude par phage display a ainsi mis en évidence trois classes de peptides capables de se lier au VEGF. Bien que leurs modes de liaisons soient différents, ces peptides peuvent bloquer l'interaction du facteur de croissance avec les récepteurs et notamment dans le cas du VEGFR2 avec des CI_{50} comprises entre 0,2 μ M et 10 μ M.

Le fait que ces peptides se lient sur le VEGF au niveau de la zone de reconnaissance de ligands naturels ne semble pas entièrement dû au hasard. Ce résultat suggère que seule une région restreinte du VEGF permet d'obtenir des interactions de hautes affinités.

Parmi les peptides obtenus par phage display, les plus affins ont été étudiés plus en détail et valorisés. Un peptide tronqué dérivant du v108 a, par exemple, été utilisé pour développer un peptide fluorescent afin de détecter et quantifier le VEGF circulant.²⁰⁴ Les peptides v107 et v114 étant les plus actifs, ils ont également été très étudiés. Ces deux peptides ayant servi de point de départ pour développer, au cours de ma thèse, de nouveaux peptides ciblant le VEGF, les données structurales et biologiques connues seront décrites plus en détail ultérieurement dans ce chapitre (*cf. partie II*).

²⁰⁴ Y. Suzuki and K. Yokoyama, *Chem. Bio. Chem.* **2009**, *10*, 1793-1795

1.2. Recherche de peptides ciblant le VEGF par bacterial display et confirmation des données obtenues par phage display

Le bacterial display, technique similaire au phage display, a été reporté pour la première fois en 1986. Ce procédé repose sur l'exposition de banques de peptides à la surface de bactéries. Une fois modifiées, ces bactéries peuvent ensuite être criblées par des méthodes de type FACS (« Fluorescence-Activated Cell Sorting ») ou MACS (« Magnetic-Activated Cell Sorting ») afin d'identifier, par exemple, des peptides affins pour une protéine cible.

En 2010, Daugherty et son équipe ont utilisé cette technique de bacterial display pour identifier de nouveaux ligands du VEGF.²⁰⁵ Pour cela, les auteurs ont utilisé une unique librairie aléatoire de peptides de 15 acides aminés (pas de pont disulfure imposé). Suite à cette étape de sélection, différents peptides possédant un motif commun de type W-E/D-W-E/D ont été obtenus.

Cette séquence étant également présente dans les peptides v107 et v114 obtenus par phage display, une étape d'optimisation a été réalisée en imposant ce motif. Une seconde librairie de peptides de type X₆WE/DXE/DX₉ a donc été construite et criblée. Après séquençage, les peptides sélectionnés ont été regroupés en quatre classes en fonction de leurs structures et de motifs consensus (*Tableau 11*).

<u>Classe 1</u> (cyclique)	cyc-CPVQTMWDWE $\underline{\text{C}}$ MRAFIEG (2.08)
<u>Classe 2</u> (linéaire)	AAGWWLWDWEAGRQLRDRL
<u>Classe 3</u> (linéaire)	AWWLQRWDWEDRQGERGMW
<u>Classe 4</u>	NFGYKWEWDYGKWLEKVG (2.04)
(linéaire et cyclique)	cyc-WCPLSGWDWEGSV $\underline{\text{C}}$ RSGGS (2.03)

Tableau 11: Exemples de séquences peptidiques de chaque classe. Les motifs consensus sont écrits en bleu.

L'analyse des séquences de ces peptides a conduit les auteurs à suggérer qu'ils lient le VEGF de façons similaires. Il a également été mis en évidence que les peptides linéaires étaient moins affins que les peptides cycliques, ce qui confirme l'importance de la contrainte imposée par le pont disulfure. De plus, cette étape a permis d'obtenir des peptides, dont le 2.08, très similaires au peptide de référence v114. En effet, ces peptides présentent une taille de cycle et un positionnement du motif WE/DWE/D équivalent au v114.

Suite à ces résultats, une troisième étape de sélection a été réalisée. Une nouvelle librairie de type X₄CX₅WE/DWE/DCX₄ a été construite. Cette étape a ainsi conduit à des peptides de structures similaires au v114. Les peptides 3.33 et 3.30, présentant des Kd respectif de 0,58 μM et 0,47 μM , ont ainsi été identifiés (*Tableau 12*).

²⁰⁵ S. A. Kenrick and P. S. Daugherty, *Protein Engineering, Design & Selection*, **2010**, 23, 9-17

Séquence		Kd (peptide sur la bactérie)	Kd (peptide synthétique)
<u>Peptide contrôle</u>			
<i>cyc</i> -VEPN <u>C</u> DIHVMWEWE <u>C</u> FERL-NH ₂	V114	2 μM	0,23 ± 0,01 μM
<u>2^{ème} sélection</u>			
<i>cyc</i> - <u>C</u> PVQTMWDWE <u>C</u> MRAFIEG-NH ₂	2.08	43 μM	
NFGYGKWEWDYGKWLEKVG-NH ₂	2.04	> 50 μM	> 50 μM
<u>3^{ème} sélection</u>			
<i>cyc</i> -GPG <u>C</u> SRLVMWEWE <u>C</u> FAAL-NH ₂	3.33	5 μM	0,58 ± 0,05 μM
<i>cyc</i> -WPVR <u>C</u> SRFVMWEWE <u>C</u> FLRA-NH ₂	3.30	6 μM	0,47 ± 0,07 μM
<i>cyc</i> -SVG <u>P</u> CGRFVMWEWE <u>C</u> FWPR-NH ₂	3.53	6 μM	NA

Tableau 12: Peptides obtenus par bacterial display. Les résidus cystéine soulignés sont engagés dans des ponts disulfures intramoléculaires. Kd mesurés par Biacore. NA : Non Affin

En conclusion, à partir d'une banque de peptides aléatoire et de deux séries d'optimisation, ce bacterial display a permis d'obtenir des peptides dont les séquences et les affinités sont similaires au peptide v114 obtenu par phage display.

Cette étude met également en avant la présence d'un motif W-E/D-W-E/D favorable voire nécessaire pour interagir avec le VEGF. L'importance de cette séquence a fait l'objet d'un brevet.²⁰⁶ Dans ce brevet, les auteurs du bacterial display décrivent également la structure de peptides bidentates capables de lier le VEGF. Ces derniers ligands, construits à partir de deux peptides affins pour le VEGF et d'un « linker » de type GGGSGGG, présentent des affinités de l'ordre du nM pour le VEGF.

1.3. Conclusion

La convergence des résultats obtenus par les techniques décrites précédemment permet, d'une part, de confirmer les données obtenues par phage display et, d'autre part, de valider que le bacterial display peut être un outil puissant pour identifier de nouveaux ligands.

De plus, récemment, une étude théorique basée sur des critères énergétiques et conformationnels a été utilisée pour caractériser l'interaction de peptides tels que le v107 et le v114. En s'appuyant sur les données de phage et bacterial display, cette étude confirme notamment l'importance du motif WEWE ainsi que des interactions hydrophobes pour l'interaction de ces peptides avec le VEGF.

En conclusion, ces différentes techniques ont permis d'identifier des peptides cycliques de 19 résidus contenant un motif WEWE capables de se lier au VEGF avec de très bonnes affinités et ainsi de bloquer l'interaction VEGF/VEGFR.

²⁰⁶ P. S. Daugherty and S. Kenrick, US2009/0035317A1, 2009

2. Peptides v107 et v114

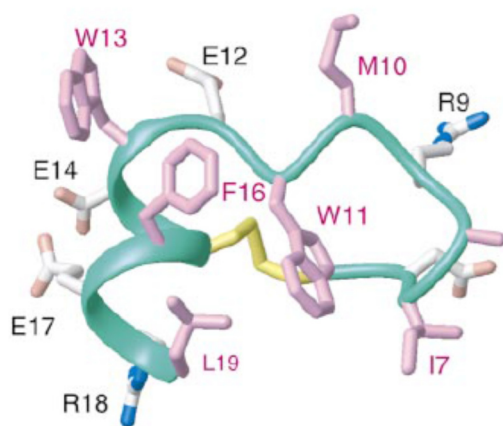
Le peptide v114 ayant été choisi comme produit de référence pour développer, au cours de cette thèse, de nouveaux peptides ciblant le VEGF circulant, une présentation plus détaillée des travaux et données connus sur les peptides v114 et v107 est décrite dans cette partie.

2.1. Peptide v107 : cyc-GGNECDIARMWEWECFERL

Comme précisé précédemment, la structure du complexe v107/VEGF été déterminée par RMN. Cette analyse a permis d'une part de caractériser l'interface entre le peptide et le facteur de croissance mais également d'autre part de déterminer la structure du peptide.²⁰³

En effet, alors que le peptide v107 seul en solution aqueuse n'adopte pas une conformation unique, il se structure en présence du VEGF. L'analyse de la structure RMN a ainsi mis en évidence que ce peptide est composé d'une région désordonnée en position N-terminale qui n'interagit pas avec le VEGF, d'un coude β de type I, d'une région étendue et d'un fragment d'hélice α en C-terminal. De plus, le tryptophane W₁₁, situé au centre de la région structurée, semble interagir avec les résidus I₇, F₁₆ et L₁₉ et stabiliser ainsi la conformation du peptide. Il est également intéressant de noter que ce peptide v107 présente une face polaire exposée au solvant et une face hydrophobe en interaction avec le VEGF.

La structure de ce peptide ainsi que la description de ces différentes conformations sont présentées sur la figure 80.

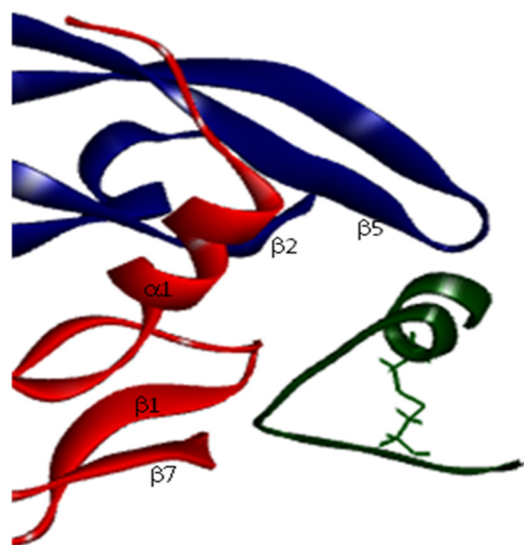


Résidus	structuration
1-4 GGNE	Structure désordonnée
6-9 DIAR	Coude β de type I
9-12 RMWE	Structure étendue
13-19 WECFERL	Hélice α

Figure 80 : Représentation de la structure du peptide v107 (résidus 5 à 19) et description de la conformation des différentes régions du peptide.²⁰³

Comme précisé précédemment, ce peptide se lie principalement au monomère 1 du VEGF. Les résidus du VEGF impliqués dans cette liaison se situent d'une part sur l'hélice α 1 et les feuillets β 4 et β 7 (monomère 1), et d'autre part sur les feuillets β 2 et β 5 (monomère 2). L'interface entre ce peptide et le facteur de croissance repose essentiellement sur des interactions de type hydrophobes.

Ces différentes interactions entre les chaînes latérales des résidus du VEGF et du peptide sont présentées dans figure 81.



V107	VEGF
I ₇	D ₆₃ , L ₆₆
A ₈	L ₆₆ , C ₁₀₄
R ₉	E ₁₀₃ (formation d'un pont salin)
M ₁₀	M ₁₀ dans cavité formée par : Y ₂₁ , Y ₂₅ , Q ₂₂
W ₁₁	Y ₂₁ , K ₄₈ , N ₆₂
W ₁₃	F ₁₇ , M ₁₈ , M ₈₁
F ₁₆	F ₁₇ , M ₁₈ , Y ₂₁ , K ₄₈ , M ₈₁ (contacts importants)
L ₁₉	M ₈₁ , I ₈₃ , K ₄₈

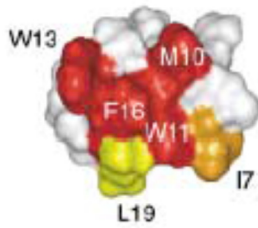
Figure 81: Représentation de l'interface VEGF/v107 (PDB : 1KAT) et liste des résidus du VEGF interagissant avec ceux du peptide v107.²⁰³

La caractérisation de cette interface VEGF/v107 a également été complétée par des expériences d'alanine scan sur le peptide v107 et sur le VEGF. Cette technique repose sur le remplacement d'un acide aminé par une L-Alanine dans une séquence peptidique ou protéique afin d'étudier son rôle ou sa contribution dans un phénomène d'interaction protéique. Réalisée sur le peptide v107, cette expérience d'alanine scan a mis en évidence que les acides aminés W₁₁, F₁₆, W₁₃ et M₁₀ sont indispensables pour l'interaction avec le facteur de croissance. Parmi ces quatre résidus, la mutation des résidus F₁₆ et W₁₁ induit une perte totale de l'affinité (C_{I50} > 2 mM) tandis que celle de M₁₀ et W₁₃ conduit à une multiplication par 200 de la C_{I50} (Figure 82-A).

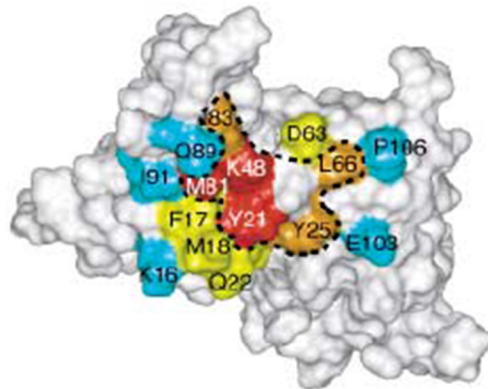
L'utilisation de cette technique sur le VEGF a conduit Fairbrother et son équipe à mettre en évidence 15 acides aminés impliqués dans l'interaction avec le peptide v107. En accord avec la structure du complexe, les plus importants sont les résidus M₈₁, K₄₈ et Y₂₁. Bien que la perte d'affinité soit moins importante, les acides aminés Y₂₅, L₆₆ et M₈₃ sont également très impliqués dans cette interaction avec le v107 puisque leur mutation conduit à une multiplication par 10 de la C_{I50}. Enfin, les résidus F₁₇, M₁₈ et Q₂₂ qui pourtant sont en contact avec les résidus du v107 n'entraînent qu'une faible perte de l'affinité quand ils sont mutés en alanine (multiplication de la C_{I50} par un facteur 6-7) (Figure 82-B).

De façon intéressante, les résidus F₁₇, M₁₈ et L₆₆ qui sont des résidus essentiels pour l'interaction avec le domaine d2 du VEGFR1, ne sont pas les plus impliqués dans la liaison du peptide v107. Donc, bien que ce peptide et le domaine d2 du récepteur se fixent sur la même zone du VEGF, leurs modes de liaison sont différents.

A)



B)



cycl-GGNECDIARMWEWECFERL

Figure 82: Etude par Ala scan des résidus impliqués dans l'interaction VEGF/v107. Ala scan sur le peptide v107 (A) et le VEGF (B). Rouge : augmentation $Cl_{50} > 30$ fois ; Orange : augmentation de 10 à 30 fois de la valeur de Cl_{50} ; Jaune : augmentation de 3 à 10 fois de la valeur de Cl_{50} ; Bleu : augmentation de la Cl_{50} inférieure à 3 fois.²⁰⁰

L'analyse et la compréhension du mécanisme d'interaction entre le peptide v107 et le VEGF a également été complétée par Giralt et son équipe.²⁰⁷ Ces auteurs ont analysé l'affinité de ce peptide pour le VEGF et la stabilité du complexe formé en utilisant différentes techniques : RMN, ITC (« Isothermal Titration Calorimetry ») et spectrométrie de masse. Les affinités observées par ITC et RMN, deux méthodes directes de détermination du K_d en solution, corrélaient correctement. Cependant, alors que le v107 était décrit pour interagir avec le VEGF essentiellement grâce à des interactions hydrophobes, les résultats de l'ITC montrent que, contrairement à ce que l'on pouvait attendre dans un tel cas, la composante principale de l'énergie d'interaction est de nature enthalpique ΔH (pour une description des paramètres thermodynamique voir partie B. I. 2.) (Figure 83).

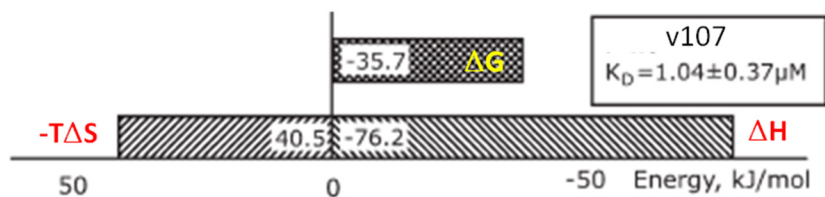


Figure 83: paramètres thermodynamiques de l'interaction VEGF/v107. Expériences réalisées à 37°C.

Afin de comprendre ce résultat, le complexe v107/VEGF a été analysé par le logiciel MOE (« Molecular Operating Environment ») qui permet de prédire les interactions non-covalentes entre une protéine et un ligand *via* leurs positions relatives. Les auteurs ont ainsi mis en évidence qu'en plus des interactions hydrophobes, le peptide interagit avec le VEGF grâce à quatre liaisons

²⁰⁷ A. Dyachenko, M. Goldflam, M. Vilaseca and E. Giralt, *Biopolymers (Peptide Science)*, **2010**, 94, 689-700

hydrogènes (F₁₆ - Q₈₉ (VEGF1), W₁₁- Y₂₁ (VEGF2), I₇ - N₆₂ (VEGF2), R₉ - N₆₂ (VEGF2)). Celles-ci pourraient expliquer la forte composante enthalpique, et non entropique, de l'énergie d'interaction.

De plus, Giralt et son équipe ont étudié l'effet du remplacement de certains acides aminés L par leurs analogues D (I₇, M₁₀, F₁₆, R₁₈). L'inversion de la configuration absolue du centre asymétrique de certains acides aminés (dans le cas de l'isoleucine : 2 centres asymétriques inversés lors du passage de L à D) conduit à une altération importante de l'interaction et de l'affinité pour le VEGF en solution. Ce résultat peut être expliqué par une perturbation de la surface hydrophobe ainsi que par une pénalité entropique causée notamment par une perte de la pré-organisation de la structure du peptide.

Afin de compléter leur étude, les auteurs ont mesuré la stabilité du complexe formé entre le VEGF et ces nouveaux analogues par spectrométrie de masse. De façon surprenante, le changement de chiralité conduit, pour certains peptides, à des résultats opposés en solution et en phase gazeuse. Cette constatation doit nécessairement s'expliquer par des effets dus au solvant (l'eau), qui est absent en phase gazeuse. Par conséquent, les interactions de nature hydrophobes sont restreintes et au contraire les interactions électrostatiques, incluant des liaisons hydrogènes, sont renforcées (diminution de la permittivité diélectrique du milieu). En conclusion, les perturbations de la surface hydrophobe du peptide réduisent l'affinité en solution mais la laissent inchangée, voire l'améliorent, en phase gazeuse.

2.2. Peptides v114/v114* : cycl-VEPNCDIHVXWEWECFERL (X=M ou ⁿL)

Le peptide v114, issu de l'étape d'optimisation par phage display, est plus actif que le v107. Sa structure diffère de celle du v107 par six acides aminés dont quatre qui n'interagissent pas directement avec le VEGF (résidus en position N-terminale).²⁰² En conséquence, bien qu'il n'y ait pas à l'heure actuelle de structure de ce peptide en complexe avec le VEGF, son mode de liaison est assimilé à celui de peptide v107.

En s'appuyant sur la structure de ce peptide, Gellman et son équipe ont développé un test de compétition de polarisation de fluorescence permettant d'identifier des molécules capables de se lier au VEGF au niveau de la zone de reconnaissance du récepteur.²⁰⁸ Celui-ci repose sur la liaison d'un peptide dérivant du v114 marqué par un BODIPY-tetramethylrhodamine sur le VEGF. Ce peptide traceur est constitué du groupement BODIPY relié par un espaceur à l'extrémité N-terminal d'un peptide dérivant du v114 dans lequel les quatre premiers acides aminés (VEPN) ont été éliminés.



Afin de valider leur test, les auteurs ont évalué la capacité de différents composés à déplacer l'interaction de ce peptide sur le VEGF. Ils ont notamment testé le v107, le v114 ainsi que le peptide traceur non marqué (*Tableau 13*).

²⁰⁸ K. J. Peterson, J. D. Sadowsky, E. A. Scheef, S. Pal, K. D. Kourentzi, R. C. Willson, E. H. Bresnick, N. Sheibani and S. H. Gellman, *Analytical Biochemistry*, **2008**, 378, 8-14

Peptide	Séquence	Ki
v107	GGNECDIARMWEWECFERL-NH ₂	0,070 μM
v114	VEPNCDIHVMWEWECFERL-NH ₂	0,62 μM
Traceur non marqué	X-CDIHVMWEWECFERL-NH ₂	0,61 μM

(X= [2-(2-amino-ethoxy)-ethoxy] acide acétique)

Tableau 13: validation du test de polarisation de fluorescence. Evaluation de l'activité des peptides v107, v114 et du traceur non marqué.²⁰⁸

En s'appuyant sur ce test, ces mêmes auteurs ont réalisés récemment un alanine scan et un β scan (mutation par un résidu β) du peptide v114. L'activité des différents peptides mutants a été évaluée par polarisation de fluorescence et comparée à celle obtenue pour le peptide v114 de référence (Figure 84).²⁰⁹ En accord avec l'alanine scan réalisé sur le peptide v107 et la structure du complexe v107/VEGF, les auteurs ont montré que les résidus M₁₀, W₁₁, W₁₃ et F₁₆ étaient indispensables pour interagir avec le VEGF. Ils ont également mis en évidence que dans ce peptide la valine en position 9, qui remplace une arginine dans le v107, est importante pour la fixation du peptide. De plus, bien que n'interagissant pas directement avec le VEGF, le pont disulfure est nécessaire à la structuration du peptide et donc à son activité.

Le β scan a, quant à lui, été réalisé non pas sur le v114 mais sur le dérivé v114* dans lequel, pour éviter la formation de sulfoxyde, la méthionine M₁₀ est remplacée par une norleucine (°L). Ce β scan conserve les chaînes latérales des acides aminés mais modifie le squelette polypeptidique. Excepté dans le cas de la norleucine, ces modifications semblent moins affecter l'interaction du peptide avec le VEGF que le remplacement par des alanines.

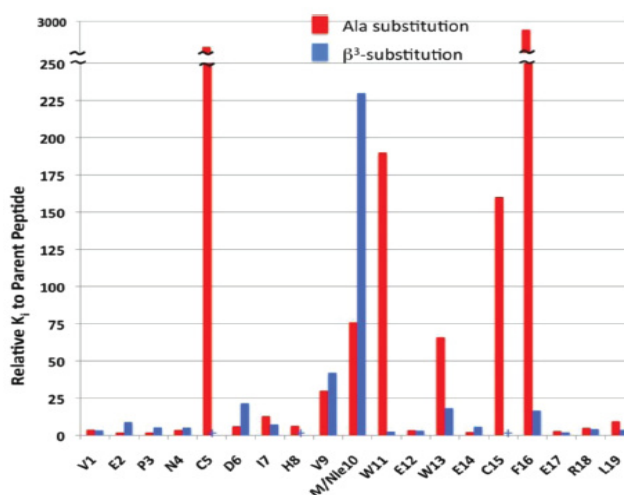


Figure 84: alanine scan du peptide v114 et β scan du peptide v114*.²⁰⁹

²⁰⁹ H. S. Haase, K. J. Peterson-Kaufman, S. K. Lan Levensgood, J. W. Checco, W. Murphy and S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7652-7655

Suite aux résultats du β scan et dans le but d'augmenter la résistance du peptide V114* face aux protéases, les auteurs ont inséré dans ce peptide des acides aminés β linéaires ou contraints. Ils ont ainsi obtenu des peptides plus stables tout en conservant l'affinité pour le VEGF. Le site principal de clivage par la protéinase K étant situé entre la $^nL_{10}$ et le W_{11} , la mutation du tryptophane par un β amino acide augmente très significativement le temps de demi-vie du peptide (*Tableau 14*).

Peptide	$t_{1/2}$ en présence de protéinase K
VEPNCDIHV ⁿ LWEWECFERL-NH ₂	1,6 min
VEPNCDIHV ⁿ LWEWECF β RL-NH ₂	300 min



Tableau 14 : Mesure du temps de demi-vie en présence de protéinase K.²⁰⁹

Des études réalisées sur cellules HUVE ont montré que les peptides v114 et v114* inhibent la prolifération cellulaire induite par le VEGF. En 2002, Fairbrother et son équipe ont mis en évidence que le peptide v114 bloque l'incorporation de ³H thymidine avec une CI_{50} de 9,6 μ M. L'utilisation de FGF a permis aux auteurs de confirmer que cet effet sur la prolifération n'est pas due à un effet cytotoxique. Plus récemment, Gellman et son équipe ont confirmé ces résultats en mettant en évidence que le peptide v114* inhibe également la prolifération des HUVEC.

En conclusion, les peptides v107, v114 et v114* présentent des propriétés structurales et biologiques intéressantes pour être utilisés comme produits de référence pour développer une étude de relation structure activité et se diriger vers des peptidomimétiques.

II. Résultats : Conception et développement de nouveaux peptides et peptidomimétiques ciblant le VEGF

1. Stratégie: Synthèse peptidique et évaluation de l'activité

En s'appuyant sur les données structurales des peptides v107, v114 et v114*, nous avons développé de nouveaux peptides et peptidomimétiques ciblant le VEGF capables d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR. A partir du peptide de référence v114*, l'objectif de notre approche a été de concevoir des composés de structure chimique plus simple et plus stable tout en optimisant ou conservant l'affinité pour le VEGF. Différentes séries de modifications, incluant le raccourcissement de la séquence d'origine, l'introduction de résidus non naturels, la modification de la nature et de la taille cycle ainsi que la stabilisation de la conformation du peptide ont été réalisées.

1.1 Méthode de synthèse

- Généralités et choix des conditions réactionnelles pour la synthèse de peptides linéaires

La technique utilisée pour accéder aux peptides souhaités a été la Synthèse Peptidique sur Phase Solide (SPPS). Cette méthode, développée dans les années 1960 par Merrifield²¹⁰, repose sur l'addition successive d'acides aminés sur un support solide (*Figure 85*).

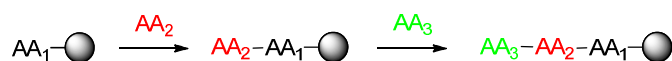


Figure 85 : Synthèse peptidique sur support solide

La synthèse sur support solide présente de nombreux avantages par rapport à celle en solution. D'un point de vue général, l'utilisation d'un support solide permet d'isoler le produit synthétisé du milieu réactionnel par simple filtration et donc de simplifier les étapes de lavages et purifications. De ce fait, cette méthode est compatible avec l'utilisation d'un excès de réactifs, ce qui conduit à une amélioration du taux de conversion des réactions et ainsi à une optimisation des rendements. De plus, ce procédé induit un phénomène de « pseudo-dilution » qui est décrit pour favoriser des réactions intramoléculaires. Cette dernière notion peut donc être un avantage lors de réaction de cyclisation de peptides sur support solide.

Parmi les différents supports existants, les résines sont couramment utilisées. Celles-ci sont généralement constituées d'un polymère insoluble réticulé possédant des bras espaceurs

²¹⁰ R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154

fonctionnalisés permettant la liaison du premier acide aminé. De nombreuses variétés de résines sont disponibles. Elles diffèrent notamment par leurs propriétés de solvations, le taux de groupements fonctionnels ainsi que par la nature des bras espaceurs et donc des fonctions chimiques permettant l'ancrage du peptide. Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi la résine Nova Syn TGR (Figure 86). Cette résine, dérivée des résines Rink amide, permet d'accéder, après clivage, à un peptide possédant un groupement fonctionnel de type amide en position C-terminale.

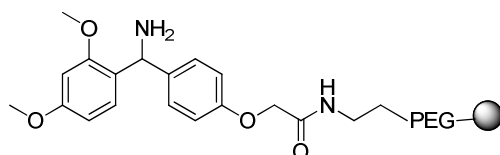


Figure 86: Résine Nova Syn TGR

Les acides aminés à incorporer sont protégés par un groupement temporaire sur la fonction amine et si besoin par un groupement orthogonal, dit permanent, sur la chaîne latérale. L'addition de chaque acide aminé est réalisée selon un cycle de deux étapes. La première étape consiste à déprotéger la fonction amine de l'acide aminé fixé sur la résine et la seconde à réaliser le couplage à proprement parler. Afin d'éviter des problèmes d'épimérisation, l'élongation peptidique est réalisée de l'extrémité C-terminale vers celle N-terminale.

Deux grandes stratégies sont développées en synthèse peptidique : la stratégie Fmoc et celle Boc. Elles diffèrent par le choix du groupement protecteur temporaire et donc par conséquent des groupements permanents. En raison des conditions réactionnelles douces et automatisables, la stratégie Fmoc est la plus utilisée. Cette stratégie, choisie pour ce projet, utilise un groupement temporaire de type fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc), stable en milieu acide, pouvant être déprotégé en milieu alcalin en présence de pipéridine (schéma 36). De façon orthogonale, les groupements dits permanents sont quant à eux stables en milieu basique et peuvent être éliminés en milieu acide.

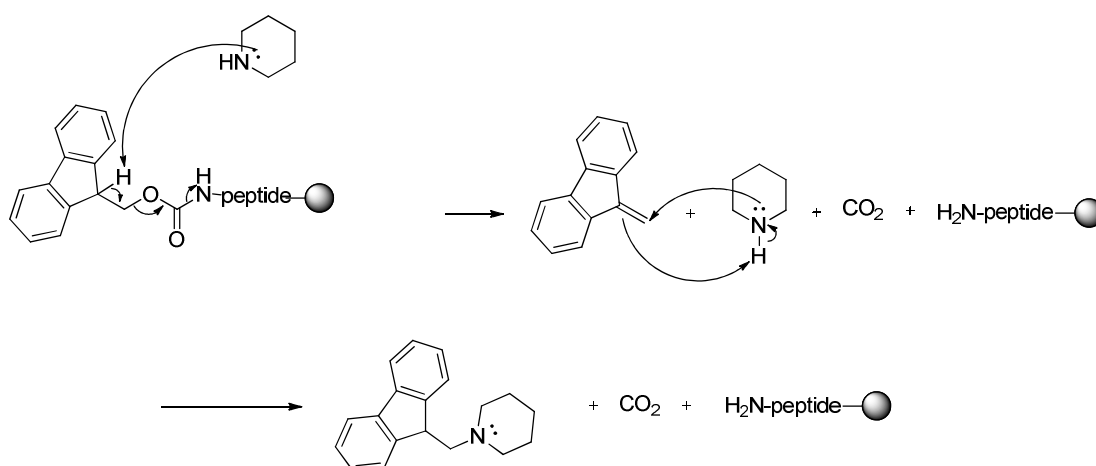


Schéma 36 : Mécanisme de déprotection du groupement protecteur Fmoc par la pipéridine.

Un autre paramètre important en synthèse peptidique est le choix des agents de couplage. Là encore, de nombreux agents existent et sont commerciaux. Dans le cadre de ce travail de thèse, la synthèse en phase solide de peptides linéaires a été réalisée en présence d'un mélange de diisopropylcarbodiimide (DIC) et « d'Oxyma Pure ». Ce dernier est un agent de couplage non explosif qui remplace le composé 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) classiquement utilisé.²¹¹ La combinaison de ces agents de couplages permet ainsi d'activer la fonction acide de l'acide aminé à coupler sous forme d'ester activé tout en diminuant le risque formation de produits secondaires non désirés (racémisation et formation de N-acylurée) (Schéma 37).

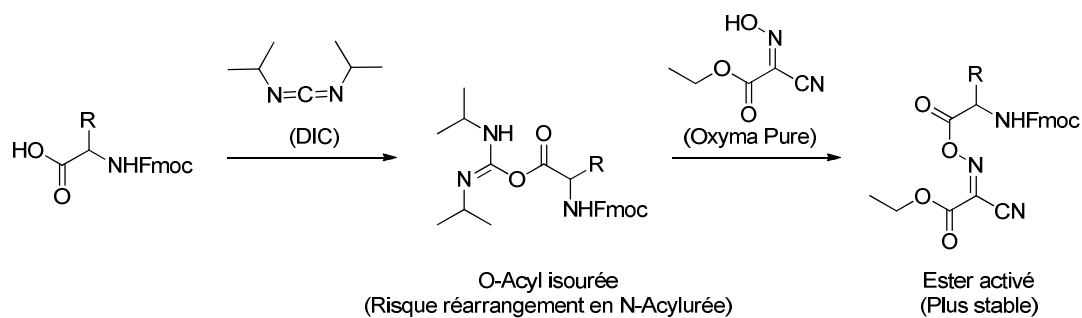


Schéma 37: formation de l'ester activé en présence de DIC/Oxyma Pure

Enfin, la technique de synthèse sur support solide ainsi que l'ensemble de ces réactifs étant compatibles avec une procédure automatisée, la synthèse de la plupart des peptides a été effectuée sur un synthétiseur automatique de peptides de la marque CEM, le Liberty 1. En plus d'être automatisé, cet appareil présente l'avantage de pouvoir réaliser si on le souhaite les réactions de couplage et déprotection sous activation micro-onde. Ceci diminue le temps de synthèse tout en permettant l'obtention de produits relativement purs. De plus, dans certains cas, l'irradiation micro-onde permet de faciliter des réactions difficiles dans des conditions classiques.

- Résumé des différentes étapes de synthèse d'un peptide linéaire sur support solide

La résine est mise à réagir, dans le DMF et sous activation micro-onde, avec le premier acide aminé (5 éq.) et les agents de couplage DIC (4,9 éq.)/Oxyma pure (10 éq.). La fonction acide de l'acide aminé protégé réagit avec le DIC puis avec l'Oxyma pure pour produire un ester activé. Une fois formé, celui-ci réagit avec la fonction amine de la résine pour former la liaison peptidique. L'excédant de réactif est ensuite éliminé par filtration et le produit lavé avec du DMF. Le groupement protecteur Fmoc est ensuite éliminé, sous activation micro-onde, en présence d'une solution de 20 % de pipéridine dans le DMF. En fonction des séquences peptidiques, 0,1 % d'Oxyma pure peut être ajouté à cette solution de déprotection afin de défavoriser la formation d'aspartimide. Une fois déprotégé, un second acide aminé peut ainsi être additionné et couplé. L'élongation du peptide se fait donc par cycle de déprotection, activation et couplage (Schéma 38).

²¹¹ R. Subiros-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, A. El-Faham and F. Albericio, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9394-9403

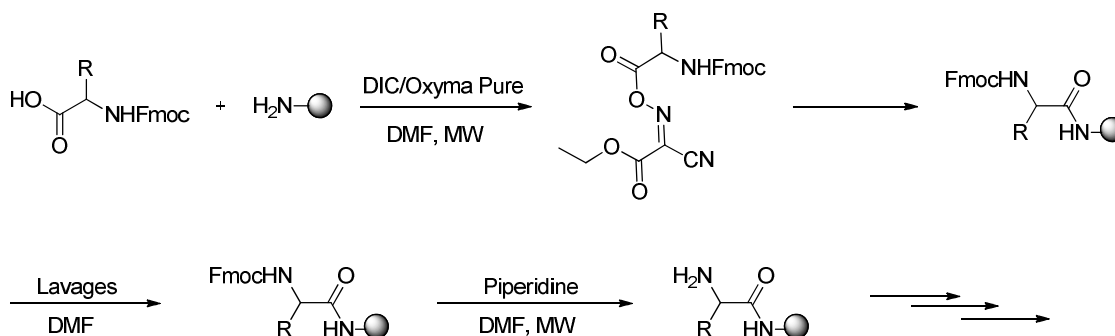


Schéma 38: représentation schématique du protocole de synthèse en phase solide

- Dernières étapes de synthèse

Une fois les peptides linéaires synthétisés, différentes stratégies ont été envisagées pour obtenir les composés souhaités.

Dans certains cas, la résine a été conservée pour réaliser des étapes supplémentaires en phase solide telles que des réactions d'acétylation, de couplage d'acides aminés non naturels ou d'acides fonctionnalisés ou bien encore des réactions de cyclisation intramoléculaire.

Dans d'autres cas, les peptides ont été décrochés de la résine. Cette étape, réalisée en présence d'acide fort, conduit d'une part à l'obtention du peptide en solution et d'autre part à la déprotection des chaînes latérales des acides aminés du peptide. Cette étape de clivage est généralement réalisée dans l'acide trifluoacétique (TFA) en présence de triisopropylsilane (TIPS) et d'eau. Le TIPS et l'eau jouent le rôle de « scavenger » et permettent de piéger les carbocations formés pour limiter les réactions secondaires. Lorsque les séquences peptidiques contiennent des cystéines, de l'éthanedithiol (EDT) est également utilisé pour éviter des réactions d'oxydation non désirées. De façon classique, les peptides sont donc clivés de la résine dans un mélange TFA (95%) / TIPS (2,5%) / H₂O (2,5%) ou TFA (94%) / TIPS (1%) / H₂O (2,5%) / EDT (2,5%).

Une fois en solution et déprotégés, les peptides peuvent soit être purifiés soit engagés dans des réactions supplémentaires. Les chaînes latérales des acides aminés étant déprotégées, ces dernières réactions doivent être orthogonales. Il s'agit généralement d'étapes de cyclisation par formation de pont disulfure. Ces différentes étapes étant spécifiques du produit attendu, elles seront explicitées et détaillées lors de la description des peptides synthétisés.

Une fois le produit final obtenu, celui-ci est purifié par HPLC semi-préparative et analysé par spectrométrie de masse.

1.2 Evaluation de l'activité des peptides synthétisés

Afin d'étudier l'effet des modifications chimiques réalisées sur l'activité des peptides synthétisés, leur aptitude à déplacer l'interaction VEGF/VEGFR a été évaluée sur les tests ELISA VEGFR1-ECD et d2-HRP. Le principe de ces deux tests est présenté et détaillé dans le chapitre 1.

De plus, pour la majorité des peptides, ces résultats ont été complétés par des mesures d'ITC (« Isothermal Titration Calorimetry ») en présence de VEGF₉₅, permettant ainsi de déterminer les paramètres thermodynamiques de liaison (ΔH et ΔS), la stœchiométrie de l'interaction, ainsi que les valeurs de K_d . Ces expériences d'ITC ont été réalisées en collaboration avec le Dr. J.-F. Gaucher (équipe d'I. Broutin, UMR 8015, Université Paris Descartes). Comme précisé précédemment, cette méthode avait également été utilisée par Giralt et son équipe afin d'étudier notamment le mode d'interaction du peptide v107 avec le VEGF.²⁰⁷

L'ITC est une méthode qui permet de mesurer directement l'énergie associée à une interaction entre deux molécules. En plus de déterminer tous les paramètres thermodynamiques en une seule expérience, cette technique présente de nombreux avantages. Notamment, cette méthode peut être réalisée dans des solutions tampons proches des milieux physiologiques, et elle ne nécessite ni marquage ni immobilisation des partenaires.

Ces expériences d'ITC sont généralement réalisées par une succession d'injections d'un ligand dans une enceinte adiabatique (réacteur) contenant un second ligand (protéine cible). L'interaction se produisant lors de chaque injection induit un dégagement ou une absorption de chaleur (q_i) qui est proportionnelle à la quantité de ligand qui lie la protéine cible ($v \times \Delta L_i$) ainsi qu'à l'enthalpie de liaison (ΔH) :

$$q_i = v \times \Delta L_i \times \Delta H \quad (v : \text{volume de la cellule de réaction et } \Delta L_i : \text{augmentation de la concentration en ligand lié après la } i^{\text{ème}} \text{ injection}).$$

La plupart des instruments d'ITC opèrent selon un principe de compensation de chaleur. A savoir, la mesure du signal correspond à la puissance (en microcalories/seconde) nécessaire pour maintenir constante la différence de température entre la cellule de réaction (celle dans laquelle est injectée le ligand) et celle de référence (tampon identique à celle de référence mais sans protéine cible). La chaleur dégagée ou absorbée après chaque injection est obtenue en mesurant l'aire de chaque pic. Après chaque injection de ligand, la quantité de protéine libre, et donc disponible pour une interaction, diminue. Par conséquent, l'amplitude des pics devient de plus en plus petite jusqu'à ce que la protéine soit saturée et que plus aucune interaction ne soit possible. Une fois cette situation atteinte, les pics obtenus sont uniformes et d'intensités très faibles et correspondent aux effets de dilutions, aux effets mécaniques dus à l'injection et au mélange des deux solutions. L'aire de ces derniers pics correspond au bruit de fond et peut donc être soustraite à celles des autres pics d'injections avant analyse (Figure 87).²¹²

²¹² S. Leavitt and E. Freire, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 560-566

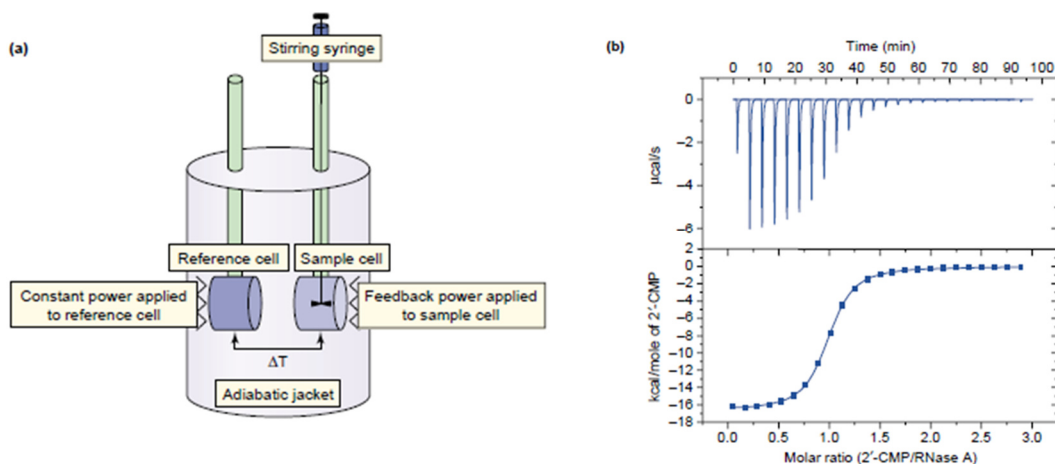


Figure 87 : schéma de l'appareil d'ITC (Microcal™ITC200 system Healthcare) et exemple de données brutes et de courbe de titration après traitement.²¹³

Les mesures d'ITC permettent donc d'obtenir directement et en une seule expérience la valeur de la constante de dissociation K_d , la valeur de l'enthalpie de liaison ΔH ainsi que la stœchiométrie de l'interaction. Après mesure de ces paramètres, les valeurs d'entropie de liaison ΔS et d'énergie ΔG peuvent être facilement déduites d'après les équations de thermodynamique.

$$RT \ln K_d = \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ = -RT \ln K$$

En réalisant l'expérience de titration à différentes températures il est également possible de déterminer la capacité calorifique de liaison ΔC_p .

$$\Delta C_p = d(\Delta H^\circ)/dT = T \times (d(\Delta S^\circ)/dT) = (\Delta H^\circ_{T_2} - \Delta H^\circ_{T_1}) / (T_2 - T_1)$$

La détermination des paramètres thermodynamiques est un avantage important lors d'étude de relation-structure activité et donc du développement de nouveaux ligands. L'énergie de liaison ΔG détermine la stabilité d'un complexe ligand-protéine. Deux paramètres, ΔH et ΔS , contribuent à cette énergie de liaison.²¹⁴

L'enthalpie de liaison ΔH reflète la force et la spécificité d'une interaction. Les variations d'enthalpie sont le résultat de formation et rupture de liaisons. Lors d'une interaction protéine-ligand, cela reflète de nombreux phénomènes : perte de liaisons hydrogène et de van der Waals entre le solvant (généralement les molécules d'eau) et la protéine, perte d'interaction solvant-ligand, formation de liaisons ligand-protéine, réorganisation du réseau de liaisons hydrogène de la protéine,

²¹³ G. A. Holdgate and W. H. J. Ward, *Drug Discovery Today*, **2005**, *10*, 1543-1550

²¹⁴ A. K. Bronowska **2011**. Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design, Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases, Dr. Juan Carlos Moreno Piraján (Ed.), ISBN: 978-953-307-563-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/thermodynamicsinteraction-studies-solids-liquids-andgases/thermodynamics-of-ligand-protein-interactions-implications-for-molecular-design>

réorganisation du solvant à proximité de la surface de la protéine. Au vu des nombreux facteurs influençant l'enthalpie, il est généralement difficile de distinguer un effet individuel.

L'entropie ΔS , calculée à partir du ΔG et du ΔH , est liée à la dynamique et à la flexibilité d'un système. Lors d'une interaction protéine-ligand, à une température donnée, l'entropie est généralement la somme de la contribution de nombreux effets. Une composante importante est liée aux effets de solvatation. Lors d'une interaction, il y a généralement une libération de nombreuses molécules d'eau qui étaient jusqu'alors plus ou moins enfouies au niveau de la protéine. Ceci contribue souvent favorablement à la variation d'entropie globale. Une seconde composante très importante de l'entropie est liée aux changements conformationnels et à la réduction de degrés de libertés des chaînes latérales de la protéine ainsi que du ligand lors de l'interaction et de la fixation.

L'entropie et l'enthalpie se compensent généralement. C'est pourquoi on observe parfois pour une même affinité des paramètres thermodynamiques très différents. En effet, une modification structurale d'un composé pour augmenter le nombre et la force des interactions est souvent compensée par une pénalité entropique. De même que les contraintes imposées à une molécule pour gagner en entropie sont souvent accompagnées d'une pénalité enthalpique. Il est donc très souvent difficile de prévoir avec certitude l'effet d'une modification structurale sur l'affinité et les paramètres thermodynamiques de liaison. De plus, comme précisé plus haut, les variations d'énergie sont généralement associées à de nombreux paramètres et contributions. Par conséquent, il est également parfois difficile de les « déconvoluer » les unes des autres et donc d'attribuer une variation de $\Delta(\Delta H)$ à une interaction et de corrélérer une variation d'énergie à une modification chimique.²¹³

Afin de corrélérer au mieux structure, activité et énergie, nous avons, au cours de cette étude, essayé de comparer les paramètres énergétiques de peptides de structures très proches. Cependant dans certains cas, pour les raisons citées ci-dessus, l'analyse et la compréhension des variations des paramètres thermodynamiques n'a pas été aisée. De plus, la précision des mesures de ces paramètres thermodynamiques par ITC est une question importante et sérieusement étudiée et débattue dans la littérature. En effet, des variations de l'ordre de quelques pourcents dans la détermination de la concentration en ligand se traduisent par des variations directement proportionnelles dans la valeur des ΔH . Les différences de ΔH obtenues au sein des séries de ligands étudiées étant généralement de l'ordre de quelques kcal/mol^{-1} (représentant 10-20% de l'enthalpie globale de l'interaction), il est très important de s'interroger sur la précision des mesures.

Afin de déterminer avec le maximum de précision possible les paramètres thermodynamiques, nous avons pris des précautions particulières et ajusté les concentrations de macromolécule et de ligand de façon à trouver un compromis satisfaisant entre des contraintes parfois contradictoires :

- Pour une mesure optimale du K_d , le produit du nombre « n » de sites de fixation du ligand (ici $n = 2$) par la concentration molaire de macromolécule doit être compris entre 5 et 500 fois le K_d . La concentration molaire du ligand injecté doit être environ 20 fois plus élevée que celle de la macromolécule, de façon à avoir un ratio molaire en fin de mesure $r = [\text{Ligand}]/[\text{macromolécule}] \approx 2*n$.

- Sur l'appareil utilisé (MicrocalTMITC₂₀₀ system Healthcare), une mesure optimale du $\Delta H_{\text{liaison}}$ est obtenue avec une énergie pour la première injection « utile » d'environ $1 \mu\text{cal.s}^{-1}$.

- Le nombre d'injections doit être suffisamment important pour mesurer avec précision plusieurs paramètres de la courbe de titration : la pente de ΔH molaire = $f(r)$ à la demi-saturation en ligand ($r = n$) (détermination du K_d), la limite à l'origine ($r \rightarrow 0$) du ΔH molaire (ΔH molaire de fixation), et la limite à l'infini ($r \rightarrow \infty$) du ΔH molaire (chaleur de dilution à saturation).

Les mesures ont été effectuées avec du $(\text{VEGF}_{95})_2$ et des ligands dans un tampon 50mM Hepes/NaOH, pH 7,5, 150mM NaCl, 1 % (v/v) DMSO. Les concentrations de ligand ont été déterminées par mesures d'absorption à 280nm à partir de 4 dilutions indépendantes. La concentration de VEGF a été estimée par absorption UV, puis ajustée afin que la stœchiométrie de fixation déterminée par ITC soit égale à 2. Les volumes et nombres d'injections ainsi que les concentrations ont été adaptés en fonction des affinités des peptides afin d'obtenir une meilleure précision sur les paramètres thermodynamiques. Les valeurs de K_d , ΔH et ΔS indiquées dans ce chapitre sont les moyennes de deux mesures indépendantes.

Dans ces conditions expérimentales, nous avons observé que les valeurs de ΔH obtenues entre deux expériences indépendantes ne diffèrent en général pas de plus de $0,4 \text{ kcal/mol}^{-1}$, une limite de confiance classiquement observée dans la littérature.^{215,216} Pour plus de clarté, seules les valeurs numériques de K_d et des paramètres thermodynamiques seront reportées dans le corps du texte. Une courbe représentative de chaque peptide sera cependant présentée en annexe (*annexe 1*).

1.3 Détermination de la structuration des peptides par dichroïsme circulaire

Afin d'étudier l'impact des modifications chimiques réalisées sur leur conformation, la plupart des peptides ont été analysés par dichroïsme circulaire.

La lumière polarisée dans un plan peut être conçue comme la résultante de deux composantes de lumières polarisées circulairement vers la droite et vers la gauche. Lorsque cette lumière polarisée passe à travers une solution contenant des composés chiraux, l'amplitude de l'absorption de ces deux composantes n'est pas identique. La technique de dichroïsme circulaire (DC) repose sur la mesure de la différence d'absorption de ces deux composantes et permet de déduire des caractéristiques structurales de certains composés. Cette méthode spectroscopique est notamment très utilisée pour étudier et déterminer la structuration des peptides et protéines. Les résultats bruts obtenus sont donc des variations d'absorbance en fonction de longueur d'onde. Cependant, ce terme est généralement converti en ellipticité θ grâce à la formule : $\theta = 32,98 \Delta A$. De plus, cette valeur peut également être normalisée par rapport à la concentration et au nombre de résidus et donc s'exprimer en $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}.\text{residu}^{-1}$.

²¹⁵ F.E. Torres, M.I. Recht, J.E. Coyle, R.H. Bruce and G. Williams, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 598-605

²¹⁶ V.M. Krishnamurthy, B.R. Bohall, V. Semetey and G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5802-5812

Chaque type de structure secondaire présente un spectre caractéristique (Figure 88). Par conséquent, la comparaison qualitative du spectre expérimental obtenu avec ceux de références permet d'identifier le type de conformation adopté en solution par une protéine ou un peptide.²¹⁷

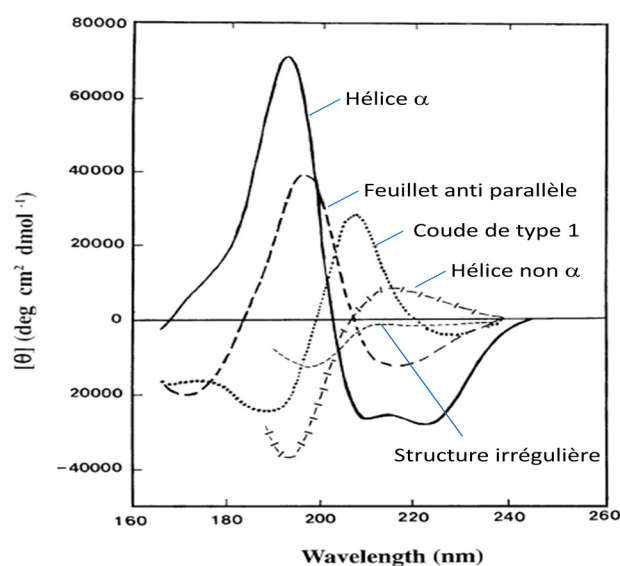


Figure 88 : Spectres théoriques de référence

Cette technique peut également conduire à des résultats quantitatifs. Il est notamment possible par exemple d'estimer le pourcentage d'hélicité d'un peptide. De plus, il existe à l'heure actuelle de nombreux logiciels et programmes, développés principalement à partir de banques de données, qui permettent de déconvoluer les spectres et donc d'obtenir une estimation des pourcentages de structuration en hélice, coude ou feuillet d'un peptide.

Dans le cadre de notre étude, les mesures de dichroïsme circulaire ont été réalisées dans un tampon phosphate 10 mM fraîchement préparé, à pH 7.4 et 20 °C, sur une gamme de longueurs d'onde allant de 190 nm à 260 nm. Une fois les spectres acquis, la variation d'absorbance a été convertie en ellipticité et normalisée par rapport à la concentration des peptides. La concentration en peptide a été calculée par rapport à la masse pesée et ajustée *à posteriori* par spectrométrie UV. La valeur du coefficient d'extinction molaire utilisée pour déterminer la concentration par UV a été choisie d'après la littérature.²¹⁸ Une fois retraités, les spectres ont été déconvolués en utilisant le serveur DICHROWEB afin de calculer le pourcentage d'hélicité et donc de pouvoir analyser quantitativement l'effet des modifications chimiques sur la structuration des peptides.²¹⁹ Il est important de noter que, au contact du VEGF, seul un fragment du peptide v114* se structure en hélice α . Par conséquent, les pourcentages d'hélicité observés sont faibles.

Pour plus de clarté, pour la plupart des modifications chimiques réalisées, seuls les pourcentages d'hélicité seront reportés dans le corps du texte. Les spectres seront cependant présentés en annexe.

²¹⁷ S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2005**, 1751, 119 - 139

²¹⁸ C. N. F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley and T. Gray, *Protein Science*, **1995**, 4, 2411-2423

²¹⁹ L. Whitmore and B. A. Wallace, *Biopolymers*, **2008**, 89, 392-400

2. Peptide v114* et premières modifications structurales

2.1 Synthèse et évaluation de l'activité du peptide de référence v114*

Afin d'initier une étude de Relation Structure-Activité, le peptide de référence v114* a été synthétisé et son activité a été évaluée d'une part sur les deux tests de déplacement de type ELISA et d'autre part par ITC. Le composé v114* (Cyc-VEPNCDIHVⁿLWEWE^cFERL-NH₂) est un peptide cyclique de 19 acides aminés contraint par un pont disulfure. De façon classique, ce peptide a été synthétisé en deux étapes distinctes. Dans un premier temps, la synthèse du peptide linéaire a été réalisée, sur support solide et sous irradiation micro-onde, en utilisant la stratégie Fmoc décrite précédemment. Après assemblage des 19 acides aminés, ce peptide a été clivé de la résine. Une fois en solution, ce peptide a été engagé dans une réaction de cyclisation afin de former le pont disulfure. Cette réaction a été réalisée en milieu dilué (concentration en peptide de 1 mM), sous forte agitation et à l'air libre, dans un tampon basique NH₄HCO₃ (100 mM). Après 24 heures de réaction le peptide cyclique v114* a été obtenu (Schéma 39).

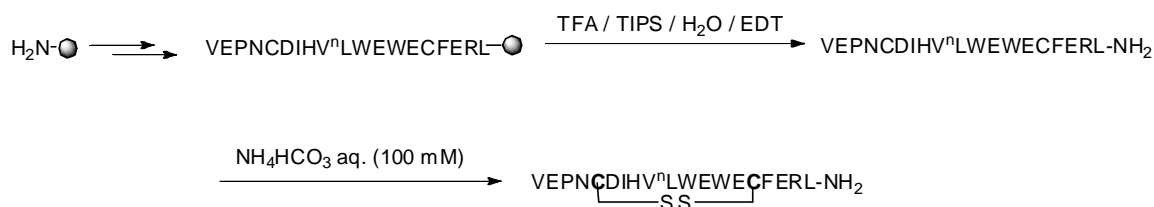


Schéma 39: synthèse du peptide v114*

Le suivi de la cyclisation a été effectué à l'aide d'un test d'Ellman et confirmé par HPLC. Ce test, effectué en milieu basique et en plaque 96 puits, repose sur la réaction de thiols libres avec l'acide 5,5-dithio 2-nitrobenzoïque (DTNB). Lorsque la réaction de cyclisation est incomplète, les thiols libres réagissent avec le DTNB, ce qui conduit à la libération d'un chromophore de couleur jaune ayant un maximum d'absorbance à 412 nm (Schéma 40).^{220,221}

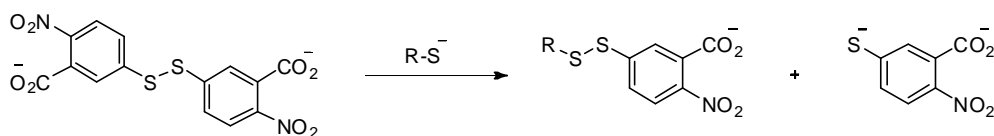


Schéma 40 : principe du test d'Ellman

Ce test permet donc de suivre très facilement à la fois d'un point de vue qualitatif (colorimétrie) et quantitatif (mesure de l'absorbance) l'état d'avancement de la réaction de cyclisation en pont disulfure.

²²⁰ P. W. Riddles, R. L. Blakeley and B. Zerner, *Anal. Biochem.* **1979**, *94*, 75-81

²²¹ G. L. Ellman, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1959**, *82*, 70-77

Après purification par HPLC et analyse par spectrométrie de masse, l'activité du peptide v114* a été évaluée sur les tests de déplacement VEGFR1-ECD et d2-HRP. En accord avec les données de la littérature, nous avons confirmé que ce peptide pouvait inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1. Sur ces deux tests nous avons obtenu des valeurs de IC_{50} respectives de 1,8 μ M et 0,51 μ M (Figure 89).

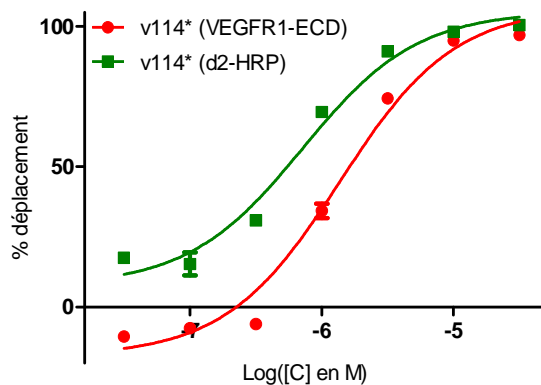


Figure 89 : Courbes de IC_{50} du peptide v114* sur les tests ELISA VEGFR1-ECD et d2-HRP

Suite à ce résultat, et afin de pouvoir servir de référence pour notre étude de Relation Structure-Activité, l'affinité de ce peptide pour le VEGF a été déterminée par ITC. Nous avons ainsi obtenu un K_d de 40 nM et déterminé les valeurs des paramètres thermodynamiques ΔH et ΔS (tableau 15). La différence entre la valeur de IC_{50} et du K_d peut être expliquée par le manque de sensibilité de nos tests ELISA.

Ref.	Sequence	IC_{50} (ECD) [IC 95 %]	IC_{50} (d2-HRP) [IC 95 %]	K_d	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
V114*	VEPNQDIHV ⁿ LWEWE ^c FERL-NH ₂ <u>SS</u>	1,8 μ M [1,1-3,0]	0,51 μ M [0,42-0,62]	40 \pm 3 nM	-18,5 \pm 0,6	-29,4 \pm 1,5

Tableau 15 : Résultats obtenus pour le peptide v114*

2.2 Raccourcissement de la séquence du peptide v114*

En s'appuyant sur la co-structure RMN du complexe v107/VEGF₉₉ ainsi que sur les données d'Alanine scan des peptides v107 et v114, nous avons dans un premier temps souhaité raccourcir la séquence peptidique du v114*.

Les quatre premiers acides aminés en position N-terminale étant désordonnés et n'effectuant apparemment aucune interaction avec le VEGF, un peptide tronqué du v114* a été préparé. Ce peptide de 15 acides aminés a été synthétisé en suivant le même protocole que celui décrit pour le peptide de référence v114*. Après purification et confirmation de la structure (masse et RMN), nous avons évalué l'activité de ce peptide **63** sur les deux tests ELISA. Nous avons ainsi obtenu des valeurs

de Cl_{50} de 5,2 μ M et 2,7 μ M respectivement sur les tests VEGFR1-ECD et d2-HRP. En accord avec les données d'Ala scan, nous avons ainsi mis en évidence que la délétion de ces acides aminés n'induit qu'une perte très modérée de l'activité.

Suite à ce résultat, un second analogue du peptide v114* a été préparé en supprimant d'une part ces quatre résidus en N-terminal, mais également la leucine en C-terminal. Une fois synthétisé, l'activité de ce nouveau peptide cyclique de 14 acides aminés **64** a été testée. Nous avons ainsi obtenu des valeurs de Cl_{50} de 10,4 μ M et 24,3 μ M respectivement sur les tests VEGFR1-ECD et d2-HRP. Evalué sur nos tests ELISA, la délétion de la leucine semble donc induire une perte relativement importante de l'activité.

Afin de confirmer ces résultats et de tenter d'expliquer la perte d'activité observée, l'affinité de ces deux nouveaux peptides pour le VEGF a été évaluée par ITC et comparée au v114*. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 16.

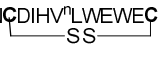
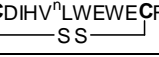
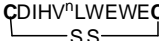
Ref.	Sequence	Cl_{50} (ECD) [IC 95 %]	Cl_{50} (d2-HRP) [IC 95 %]	Kd	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
v114*	VEPNQCDIHV ⁿ LWEWECFERL-NH ₂ 	1,8 μ M [1,1-3,0]	0,51 μ M [0,42-0,62]	40 \pm 3 nM	-18,5 \pm 0,6	-29,4 \pm 1,5
63	CDIHV ⁿ LWEWECFERL-NH ₂ 	5,2 μ M [3,6-7,5]	2,7 μ M [2,3-3,2]	228 \pm 50 nM	-17,7 \pm 0,2	-29,8 \pm 0,4
64	CDIHV ⁿ LWEWECFER-NH ₂ 	10,4 μ M [8,3-13,7]	24,3 μ M [17,8-33,1]	1,1 \pm 0,2 μ M	-17,5 \pm 0,3	-32,5 \pm 0,5

Tableau 16: Résultats obtenus pour le raccourcissement de la séquence du v114*

En accord avec les résultats obtenus par ELISA et ceux de la littérature, ces données confirment que la délétion des quatre résidus en position N-terminale n'induit qu'une perte modérée d'affinité pour le VEGF (le Kd n'est augmenté que d'un facteur 5,7). Cette perte d'affinité semble corrélée uniquement à une perte d'enthalpie de 1,0 kcal.mol⁻¹, à la limite de l'erreur expérimentale. Sachant que ces résidus n'interagissent pas avec le VEGF, restent désordonnés et ne semblent pas établir de liaisons stabilisantes intramoléculaires avec les autres acides aminés du peptide, la perte d'affinité observée pourrait être expliquée par une protection du cœur hydrophobe du peptide par ces résidus et donc par un effet de solvation.

De plus, ces résultats confirment que la délétion de la leucine en position C-terminale induit également une perte d'affinité supplémentaire pour le VEGF (le Kd est augmenté d'un facteur 4,8 pour 1 seul acide aminé). Ce résultat n'est pas incohérent avec les données de la littérature. En effet, l'étude de la structure du complexe v107/VEGF indique d'une part que cette leucine est en contact avec les résidus M₈₁, I₈₃ et K₄₈ du VEGF et que d'autre part elle interagit, de façon intramoléculaire, avec le tryptophane en position 11 et participe ainsi à la stabilisation de la conformation du peptide. Cette dernière donnée semble en accord avec la perte d'entropie observée lors de la délétion de cet acide aminé.

L'analyse par dichroïsme circulaire de ces trois peptides a permis de mettre en évidence que la perte d'activité et d'affinité observée était corrélée, en solution, à une très légère perte de structuration en hélice α . Bien qu'en absence de VEGF, le peptide v114 soit peu structuré (9,8 % d'hélicité), la délétion des quatre résidus en N-terminal ainsi que de la leucine en C-terminal conduit à une perte supplémentaire de structuration (hélicité de 6 % et 5% pour le peptide **63** et **64**).

En conclusion, bien que moins actifs, ces deux peptides de 14 et 15 acides aminés restent suffisamment affins pour le VEGF pour pouvoir être utilisés comme produits de départ pour le reste de notre étude.

2.3 Introduction de variations en position N-terminale du peptide 63

- Effet des modifications en position N-terminale sur l'activité

Suite à la délétion des quatre acides aminés VEPN, nous avons ensuite étudié l'importance de la fonction amine N-terminale. Pour cela, un premier analogue acétylé du peptide **63** a été préparé. Cette réaction d'acétylation a été réalisée sur support solide en présence d'anhydride acétique et de DIEA. Une fois acétylé, ce peptide a été clivé du support solide, cyclisé par un pont disulfure et purifié par HPLC (*Schéma 41*).

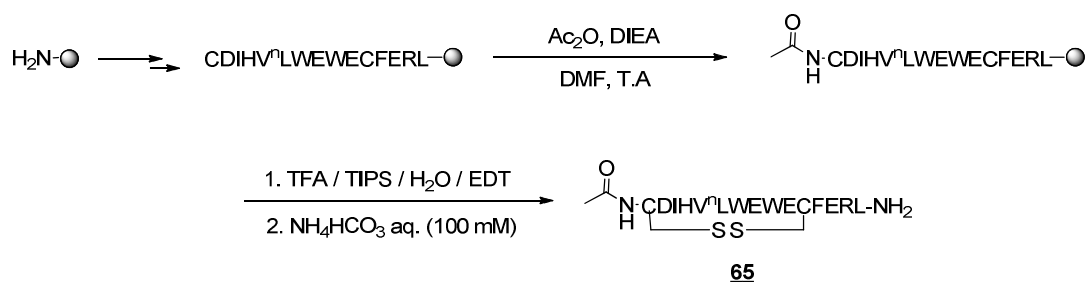


Schéma 41 : synthèse du peptide **65**

L'activité de ce peptide **65** a ensuite été évaluée sur le test de déplacement VEGFR1-ECD et comparée avec celle du peptide de référence **63**. Nous avons ainsi obtenu une valeur de Cl_{50} de 3,5 μ M pour le peptide acétylé **65** et de 4,7 μ M pour le peptide **63**. Ce résultat nous a conduits à conclure que masquer la charge positive du NH_2 terminal n'induit pas de perte d'activité.

Suite à ce résultat, un second peptide a été préparé en supprimant la fonction NH_2 terminale. Ce peptide a été synthétisé de façon classique en remplaçant la cystéine en position 1 par l'acide 3-mercaptopropionique dont la fonction thiol est protégée par un groupement protecteur de type trityl (*Schéma 42*).

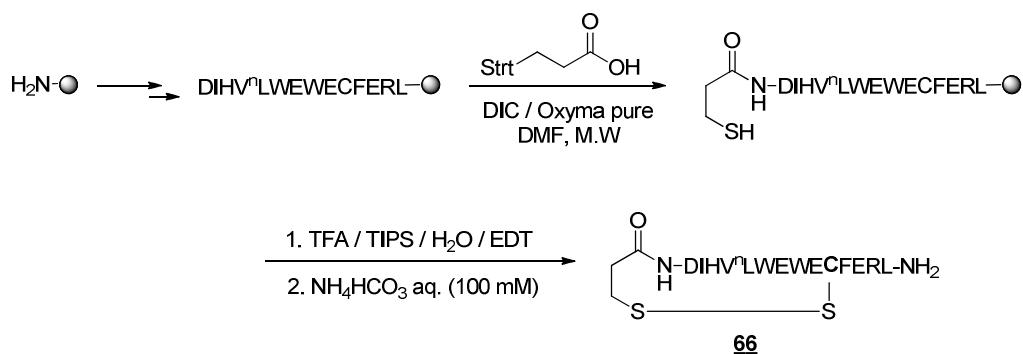



Schéma 42: Synthèse du peptide **66**

Évalué sur le test VEGFR1-ECD, ce nouveau peptide **66** présente une Cl_{50} de 2,1 μM . Bien que la différence d'activité entre ce peptide et celui de référence **63** soit faible et que ce résultat nécessite d'être confirmé par ITC, nous avons ainsi mis en évidence que la suppression de cette fonction amine et donc d'un carbone asymétrique conduit donc à une légère amélioration de l'activité. Les courbes et les valeurs de Cl_{50} obtenues sur le test VEGFR1-ECD pour ces premiers peptides sont représentées sur la figure 90.

Peptide	N-terminal	Cl_{50} [IC à 95 %]
63	NH_2	4,7 [3,5 - 6,3]
65		3,5 [2,7 - 4,5]
66	H	2,1 [1,3 - 3,3]

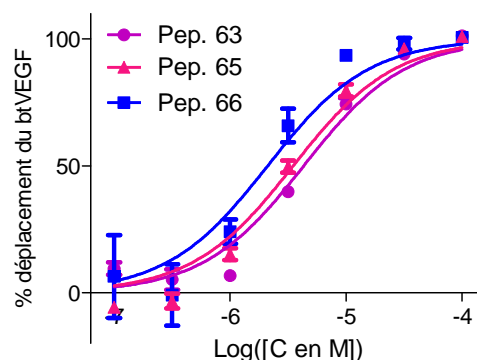


Figure 90 : courbes de Cl_{50} des peptides **63**, **65** et **66** sur le test VEGFR1-ECD

En s'appuyant sur le résultat obtenu avec le peptide acétylé **65** ainsi que sur la structure connue d'un peptide de 15 résidus marqué en N-terminal par des fluorophores ²⁰⁸, nous avons introduit en position N-terminale différents groupements aliphatiques et aromatiques. Pour cela, des réactions de couplage ont été réalisées entre la fonction amine de la cystéine terminale du peptide raccourci **63** de 15 résidus et trois acides carboxyliques : l'acide 4 pentynoïque, l'acide phénylacétique et l'acide 2 naphtylacétique. Ces réactions de couplage ont été réalisées manuellement sur support solide en utilisant les agents de couplage DIC/HOBt. Le suivi de ces réactions a été effectué à l'aide d'un test de chloranil. Il s'agit d'un test colorimétrique permettant de distinguer la présence d'amine libre. Une fois cette réaction de couplage effectuée, les peptides ont été décrochés de la résine et cyclisés en milieu basique (Schéma 43).

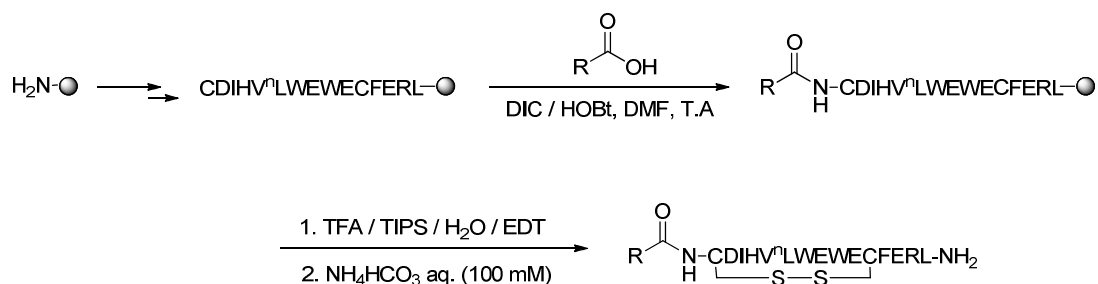


Schéma 43: modifications en N-terminal

L'activité de ces trois nouveaux peptides a été évaluée sur le test de déplacement VEGFR1-ECD et comparée aux peptides de référence **63** et **65**. Ces résultats sont présentés sur la figure 91.

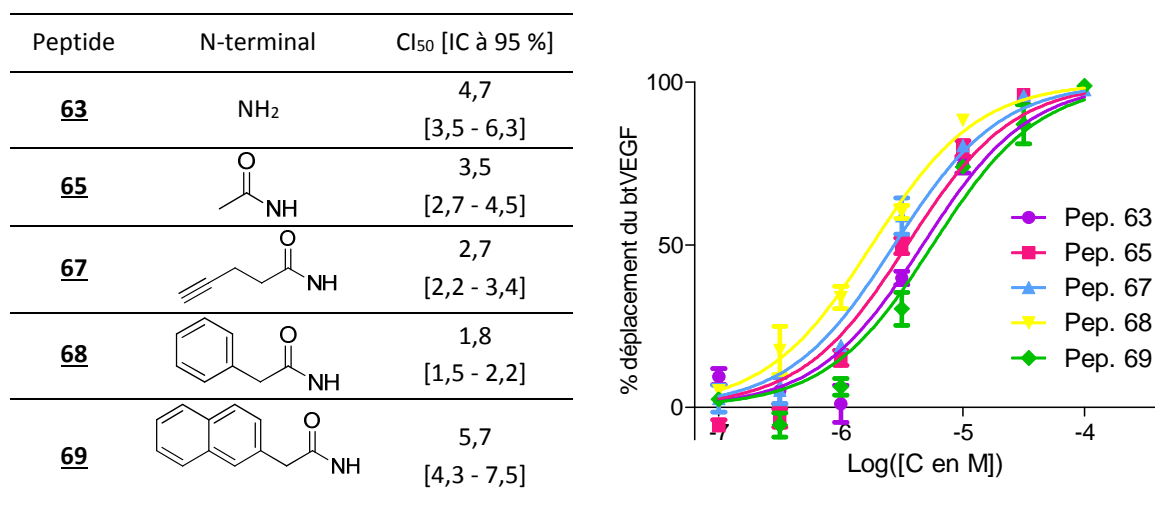


Figure 91 : Activité des peptides fonctionnalisés en N-terminal sur le test VEGFR1-ECD

Les différences d'activité observées sur le test VEGFR1-ECD sont assez faibles et pour certains peptides les intervalles de confiance à 95 % se recourent. Par conséquent, il n'est donc pas évident de conclure avec certitude. L'ajout d'un groupement linéaire en position N-terminale semble avoir peu d'effet sur l'activité. L'effet dû à l'ajout d'un groupement aromatique semble, quant à lui, être corrélé à sa taille et son encombrement stérique. Alors qu'un groupement benzylique dans le peptide **68** tend à améliorer l'activité, l'ajout d'un groupement plus encombré de type naphthyle dans le peptide **69** semble induire une perte d'activité. Afin de conclure avec plus d'assurance, l'affinité des peptides **67** et **68** pour le VEGF a été étudiée par ITC (Tableau 17).

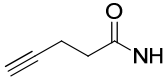
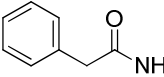
Ref.	N-terminal	Cl ₅₀ (ECD) [IC 95 %]	Cl ₅₀ (d2-HRP) [IC 95 %]	Kd	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
63	NH ₂	5,2 μM [3,6-7,5]	2,7 μM [2,3-3,2]	228 ± 50 nM	-17,7 ± 0,2	-29,8 ± 0,4
67		2,7 [2,2 - 3,4]	-	256 ± 31 nM	-17,6 ± 0,1	-30,0 ± 0,2
68		1,8 [1,5 - 2,2]	-	179 ± 12 nM	-18,5 ± 0,3	-32,1 ± 0,7


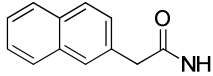
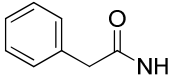
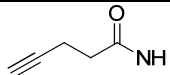
Tableau 17: résultats obtenus pour les peptides **67** et **68**

Ces résultats confirment donc que l'ajout d'un groupement aliphatique n'a que peu d'effet sur l'affinité (Kd très proche et enthalpie/entropie inchangées). De même, ces mesures confirment que l'ajout d'un groupement aromatique de type benzyle améliore légèrement l'activité. Cette augmentation de l'affinité est corrélée à un gain enthalpique proche de celui obtenu lors de l'ajout des résidus VEPN (P1-> v114*). Cependant, contrairement au v114*, ce gain d'enthalpie est compensé par une pénalité entropique. Cette compensation explique la faible amélioration de Kd (**63** : Kd = 228 nM et **68** : Kd = 179 nM).

En conclusion, ces résultats sont donc encourageants et laissent envisager la possibilité de modifier et de marquer cette extrémité du peptide pour de futures explorations chimiques et biologiques sans perte d'affinité pour le VEGF.

- Effet des modifications en position N-terminale sur la cinétique de la réaction de cyclisation

Au cours de cette étude, nous avons constaté que les temps de réaction de formation du pont disulfure sont très différents d'un peptide à l'autre. En effet, la vitesse de cette réaction semble fortement corrélée à la fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale. Suite à cette constatation, un suivi cinétique de cette réaction de cyclisation a été effectué par Ellman pour ces différents peptides. La quantification du pourcentage de thiol libre restant a été obtenue par mesure de l'absorbance du chromophore libéré lors de la réaction avec le DTNB. En assimilant la réaction de cyclisation à un pseudo-ordre 1, nous avons ainsi déterminé le temps de demi-réaction pour ces différents peptides. Ces résultats sont présentés dans la figure 92.

Peptide	N-terminal	t _{1/2} (min)
63	NH ₂	108
65		1602
69		32
68		255
67		266

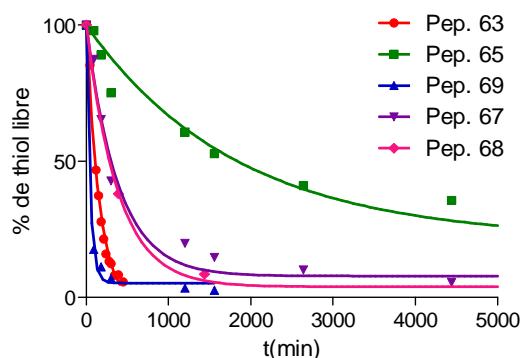


Figure 92: cinétique de la réaction de formation du pont disulfure

De façon inattendue et sans que nous puissions l'expliquer, la cyclisation du peptide acétylé **65** s'est révélée très lente par rapport aux autres peptides. Au contraire, la cyclisation du peptide **69** fonctionnalisé en position N-terminale par un groupement naphthyle est particulièrement rapide. Il est connu que l'interaction entre deux chaînes latérales de tryptophanes sur une séquence peptidique peut induire, favoriser et stabiliser la conformation en coude β .^{222,223} La structure du naphthyle étant proche de celle d'un tryptophane, on pourrait envisager que la différence de réactivité du peptide **69** soit due à un phénomène similaire. En effet, le groupement naphthyle pourrait interagir avec les tryptophanes 11 ou 13 et pré-organiser ainsi la structure du peptide. Cette interaction pourrait ainsi rapprocher les cystéines, faciliter la cyclisation et ainsi expliquer la vitesse de réaction observée.

2.4 Modification de la phénylalanine sur le peptide **64**

La phénylalanine en position 16 dans les peptides v107 et v114 semble fondamentale pour l'interaction avec le VEGF. Comme précisé précédemment, la mutation de cette phénylalanine par une alanine dans les peptides v107 et v114 induit une perte drastique d'affinité (augmentation du K_d par un facteur supérieur à 3000 et 3700 respectivement pour le v114 et le v107). Ce résultat est également corrélé avec les données structurales obtenues par RMN pour le peptide v107. En effet, il s'agit de l'acide aminé formant le maximum de contacts avec les résidus du dimère de VEGF. Il interagit d'une part avec les acides aminés F₁₇, M₁₈ et Y₂₁ du monomère 1 et d'autre part avec K₄₈ et M₈₁ du monomère 2 (Figure 93).

²²² A. G. Cochran, N. J. Skelton and M. A. Starovasnik, *PNAS*, **2001**, *98*, 5578-5583

²²³ L. Wu, D. McElheny, R. Huang and T. A. Keiderling, *Biochemistry*, **2009**, *48*, 10362-10371

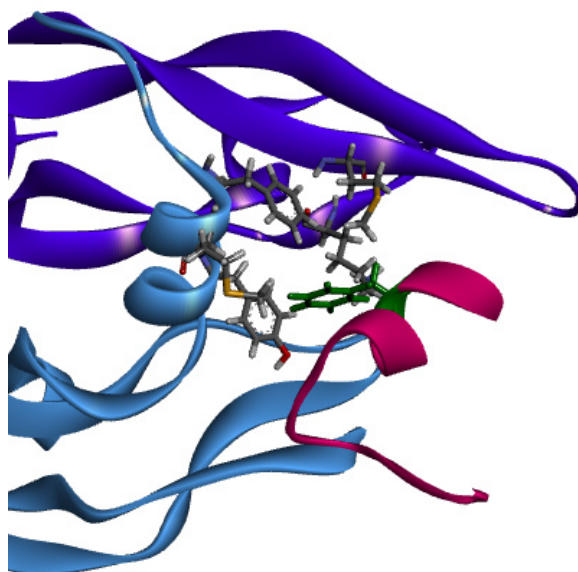
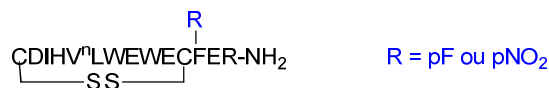


Figure 93 : structure du peptide v107 en complexe avec un dimère de VEGF (PDB 1KAT). Le v107 est représenté en rose, avec la phénylalanine F₁₆ en vert. Les chaînes latérales des acides aminés F₁₇, M₁₈, Y₂₁, K₄₈ et M₈₁ du dimère de VEGF sont représentées.

Au vu du caractère essentiel de cet acide aminé, nous avons tout d’abord introduit des variations structurales simples. Pour cela, deux peptides ont été synthétisés en remplaçant la phénylalanine par deux analogues non naturels substitués en position *para* par un fluor ou par un groupement NO₂ (ces dérivés de la phénylalanine sont commerciaux).



Le dérivé fluoré a été choisi d’une part pour sa petite taille et son caractère électro-négatif mais également d’autre part pour ces propriétés et applications potentielles en RMN. Le groupement NO₂ a, quant à lui, été sélectionné pour ces propriétés électro-attractives. Ces deux peptides ont été préparés comme décrit pour le v114*. Après purification, leur activité a été évaluée sur le test VEGFR1-ECD et comparée au peptide **64** (Figure 94).

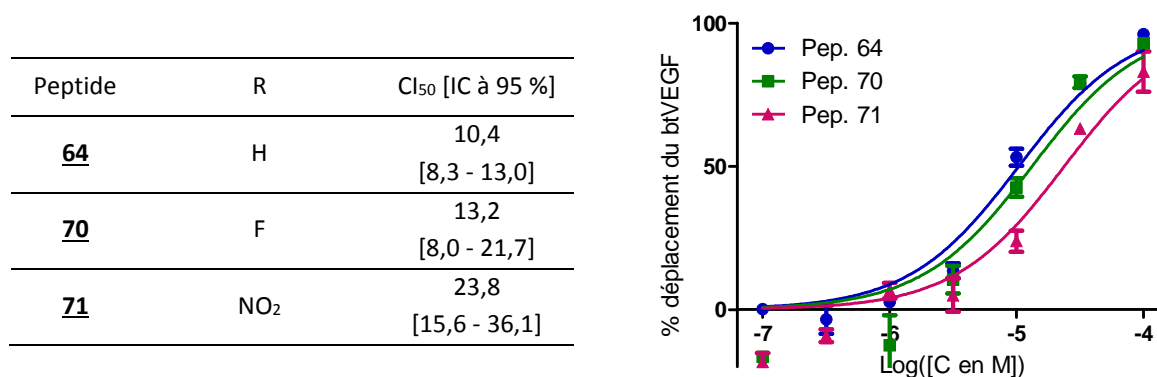


Figure 94 : Activité des peptides **64**, **70** et **71** sur le test VEGFR1-ECD

De façon attendue, le peptide **71** dans lequel l'atome d'hydrogène est remplacé par un groupement NO₂ est moins actif que le peptide de référence **64**. Le groupement nitro étant volumineux, ce résultat semble en accord avec les données structurales et d'Alanine scan. Cependant il est important de noter que la perte d'activité n'est pas très drastique. En effet, évalués sur le même test, on observe seulement un facteur 2,2 dans les Cl₅₀ (10,4 μM pour le **64** et 23,8 μM pour le **71**). Ce résultat est donc encourageant pour de futures explorations.

Le peptide fluoré **70** s'est, quant à lui, révélé aussi actif que le peptide de référence **64** (facteur 1,3 dans les Cl₅₀). Ce résultat peut être corrélé à la taille de l'atome de fluor. En effet, bien que légèrement supérieur, le rayon de Van der Waals de l'atome de fluor est proche de celui d'un hydrogène (1,47 Å pour un fluor et 1,20 Å pour un hydrogène). Il n'est donc pas anormal que la substitution d'un atome d'hydrogène par un fluor ne provoque que de faibles perturbations stériques et donc par conséquent d'affinité. La conservation de l'activité de ces peptides est très encourageante et ouvre plusieurs perspectives.

L'une des perspectives envisagées est d'utiliser le peptide fluoré **70** pour développer un nouveau test de criblage. En effet, en raison de son affinité pour le VEGF et de la présence d'un atome de fluor, ce peptide pourrait être utilisé pour mettre au point un test de compétition utilisant la RMN du fluor comme système de détection.

Le développement de test de criblage à haut débit utilisant la RMN du fluor a été décrit dans les années 2000 par Dalvit et son équipe.^{224,225} Cette technique, nommée FAXS (« fluorine chemical shift anisotropy and exchange for screening »), repose sur la détection par RMN de la fixation et du déplacement d'un ligand fluoré sur une protéine cible. Seul, le ligand fluoré émet un signal unique en RMN (singulet). Si l'atome de fluor est correctement positionné sur le ligand, lors de l'interaction avec la protéine, ce signal diminue, voire disparaît. Par conséquent, l'ajout d'un ligand non fluoré plus affin, interagissant au niveau de la même zone de fixation sur la protéine cible, peut déplacer cette interaction, libérer le ligand fluoré et conduire à un retour du signal en RMN. Une preuve de concept de cette méthode, est présentée sur la figure 95.²²⁵



Figure 95 : expérience de compétition et détection par RMN du fluor. D'après Dalvit et al.²²⁵
A gauche : ligand fluoré seul. Au centre : ajout de la protéine cible. A droite : ajout d'un ligand non fluoré.

²²⁴ C. Dalvit, M. Flocco, M. Veronesi, B. J. Stockman, *Comb. Chem., High Throughput Screening*, **2002**, 5, 605-611.

²²⁵ C. Dalvit, P. E. Fagerness, D. T. A. Hadden, R. W. Sarver and B. J. Stockman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 7696-7703

Dans le cas présent, sachant que l'atome de fluor est sur la phénylalanine et que cet acide aminé interagit fortement avec le VEGF, on peut envisager que cette technique fonctionne. En effet, on devrait observer d'une part une disparition du signal en RMN du fluor lors de l'interaction avec le VEGF et d'autre part une réapparition lors du déplacement de cette interaction par un autre peptide non fluoré dérivant du v114. Cette technique, peu consommatrice en protéine, pourrait ainsi permettre d'identifier de nouveaux ligands et de déterminer leur affinité pour le VEGF.

En conclusion, comme l'avait fait Gellman par polarisation de fluorescence ²⁰⁸, nous pourrions ainsi développer un nouveau test de compétition qui pourrait être utilisé pour cribler des molécules qui se lient au VEGF au niveau de la zone de fixation du récepteur. De plus, il est intéressant de noter qu'en fonction de ce que l'on souhaite tester et de l'avancée de notre projet, de nouveaux peptides fluorés plus ou moins affins pour le VEGF pourront facilement être synthétisés et utilisés comme référence.

Une seconde perspective, que nous avons commencé à mettre en place, est de synthétiser un nouveau peptide dans lequel la phénylalanine est substituée par la benzoylphénylalanine. Ce dérivé est encombré et pourrait créer une gêne stérique avec la tyrosine Y₂₁ du VEGF. Cependant si, comme dans le cas du dérivé nitro **71**, l'affinité est conservée ou augmentée (par exemple grâce à une rotation de l'acide aminé), il sera possible d'utiliser ce dérivé pour inhiber le VEGF de façon irréversible. En effet, sachant que la phénylalanine interagit avec deux méthionines du VEGF (M₁₈ et M₈₁), la photo-activation de la benzophénone conduira à la formation d'un di-radical pouvant s'insérer dans les liaisons C-H des chaînes latérales des méthionines. ^{226,227,228} Ceci conduira ainsi à la formation d'un inhibiteur irréversible du VEGF (Figure 96).

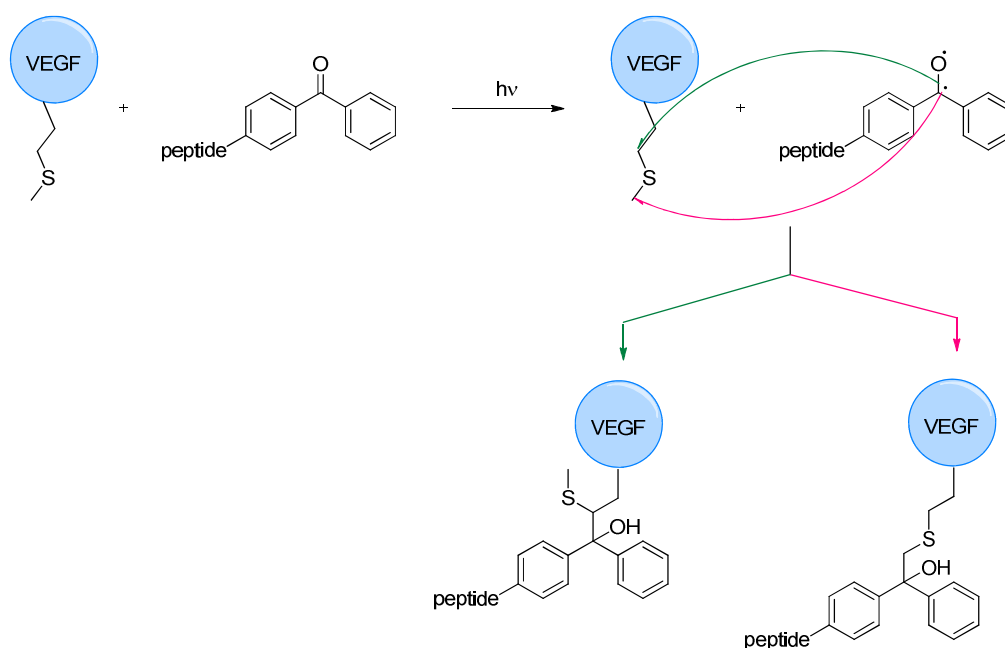


Figure 96 : Photo-activation d'un dérivé benzophénone et insertion dans les liaisons C-H des méthionines d'une protéine cible type VEGF.

²²⁶ E. L. Vodovozova, *Biochemistry (Moscow)*, **2007**, 72, 1-20.

²²⁷ J. Sumranjit and S. J. Chung, *Molecules*, **2013**, 18, 10425-10451

²²⁸ K. T. O'Neil, S. Erickson-Viitanen and W. F. DeGrado, *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 14571-14578

Une approche similaire utilisant un électrophile aromatique introduit en position C-terminale du peptide v107 a récemment été décrite. Cette technique a permis de réaliser *in vitro* l'attachement covalent du peptide v107 modifié avec une lysine du VEGF.²²⁹ L'avantage de l'approche par photoactivation serait d'augmenter la sélectivité pour le VEGF par rapport à d'autres protéines (« off-target »), qui contiennent de nombreuses lysines. L'optimisation du temps de pré-incubation avant irradiation devrait minimiser la liaison non spécifique. De plus, en vue de futures applications *in vivo*, la sélection des zones tumorales à irradier, dans lesquelles la concentration en VEGF est maximale, devrait également permettre de réduire la fixation non-spécifique.

Des essais préliminaires de synthèse de ce peptide ont été réalisés en utilisant une phénylalanine substituée par un groupement benzophénone. Cependant, en raison de la réactivité de la benzophénone le peptide cyclique n'a pas été obtenu. De nouveaux essais, en modifiant le protocole de synthèse seront donc réalisés.

3. Exploration de la taille du cycle et de la nature du lien

Le peptide v107 seul en solution aqueuse n'adopte pas une conformation unique, alors qu'il se structure en présence du VEGF. Comme précisé précédemment, contraindre les peptides dans une conformation favorable induit généralement, pour des raisons énergétiques, une forte augmentation de l'affinité.

Dans ce contexte, nous avons tout d'abord souhaité confirmer l'importance de la cyclisation en synthétisant l'analogue linéaire du peptide **63**. Afin d'éviter des réactions d'oxydation qui risquent de se produire au pH utilisé pour les tests biochimiques, ce composé **72** a été préparé en remplaçant les deux cystéines par des résidus sérines. Une fois synthétisé et purifié, l'activité de ce peptide linéaire a été évaluée sur les tests ELISA VEGFR1-ECD et d2-HRP. Comme attendu, ce peptide s'est avéré inactif sur ces deux tests (Figure 97).

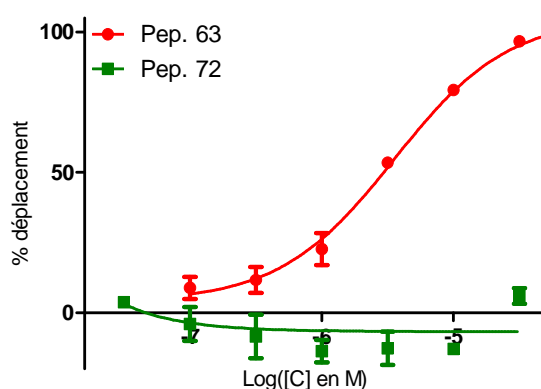


Figure 97: courbes Cl₅₀ des peptides **63** et **72** sur le test d2-HRP

²²⁹ B. V. Marquez, H. E. Beck, T. A. Aweda, B. Phinney, C. Holsclaw, W. Jewell, D. Tran, J. J. Day, M. N. Peiris, C. Nwosu, C. Lebrilla and C. F. Meares, *Bioconjugate Chem.*, **2012**, *23*, 1080-1089

Suite à ce résultat, nous avons débuté une étude afin d'explorer l'influence de la taille et de la nature du lien chimique servant à la cyclisation sur la conformation du peptide en solution et donc sur l'affinité.

3.1 Variation de la taille du cycle

Nous avons souhaité étudier l'influence de sa taille sur la conformation en solution ainsi que sur l'activité des peptides. La stratégie choisie pour augmenter la taille et donc la flexibilité du cycle a été de remplacer successivement une puis deux cystéines du pont disulfure par des homocystéines. Cette étude a été réalisée sur le peptide de référence **64** ainsi que sur son analogue acétylé **73**. Les cycles de ces deux peptides sont composés de 35 atomes. Deux séries de peptides possédant des cycles de 35, 36 et 37 atomes ont donc été synthétisées en incorporant ou non des homocystéines (*Figure 98*).

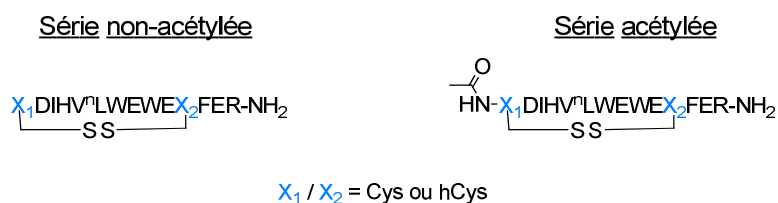


Figure 98 : variation de la taille de cycle : séries acétylée et non acétylée.

Afin de corréliser flexibilité et activité, ces deux séries de 3 peptides ont été testées en effet dose sur les tests ELISA VEGFR1-ECD et d2-HRP. De façon générale, nous avons observé un écart important entre les CI_{50} obtenues sur ces deux tests. Dans le cas de la série non acétylée, les valeurs de CI_{50} obtenues sur le test VEGFR1-ECD sont plus faibles que sur le test d2-HRP. Cependant, ces valeurs sont cohérentes. Sur ces deux tests, lorsque l'on augmente la taille et donc la flexibilité du cycle, on observe une diminution de l'inhibition de l'interaction VEGF/VEGFR.

Pour la série acétylée, les valeurs obtenues de CI_{50} sur les deux tests ELISA ne sont pas cohérentes. En accord avec les résultats obtenus pour la série non-acétylée, sur le test d2-HRP, une augmentation de la flexibilité conduit à une perte de l'activité. Au contraire, sur le test VEGFR1-ECD, l'augmentation de la taille de cycle induit une très légère amélioration de l'activité. Bien qu'étonnant, ce résultat s'est avéré reproductible (tests effectués 3 fois à partir de solutions stocks fraîchement préparées).

Au vu de la différence d'activité observée sur les deux tests pour la série acétylée, l'affinité de ces six peptides pour le VEGF a été évaluée par ITC (*Tableau 18*)




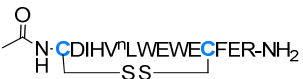
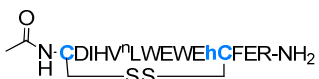

Ref.	Taille cycle	Séquence	Cl ₅₀ (ECD) [IC 95 %]	Cl ₅₀ (d2-HRP) [IC 95 %]	Kd	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
64	35		10,4 μM [8,3-13,7]	24,3 μM [17,8-33,1]	1,1 ± 0,2 μM	-17,5 ± 0,3	-32,5 ± 0,5
76	36		36,6 μM [28,9-46,3]	> 100 μM	5,1 ± 0,4 μM	-15,9 ± 0,1	-29,9 ± 0,2
77	37		117 μM [80,1-171]	> 500 μM	30 μM	-14,5	-28,9
73	35		12,4 μM [10,5-14,8]	6,5 μM [4,7-8,8]	0,46 ± 0,02 μM	-20,7 ± 0,3	-41,6 ± 0,9
74	36		7,8 μM [5,9-10,5]	45,2 μM [35,5-57,6]	3,4 ± 0,3 μM	-19,1 ± 0,2	-40,1 ± 0,7
75	37		7,3 μM [5,4-10,0]	> 500 μM	36 μM	-17,4	-39,2

Tableau 18: résultats d'évaluation biochimique obtenus pour les modifications de taille de cycle. Expériences de calorimétrie effectuée à 20°C et dupliquées, à l'exception des composés **75** et **77**.

En accord avec les résultats obtenus pour les peptides **63** et **65** sur le test VEGFR1-ECD, ces mesures de Kd ont permis de confirmer que l'acétylation de la fonction N-terminale induit une augmentation de l'affinité pour le VEGF (facteur 2,4 entre le Kd du peptide non acétylé **64** et acétylé **73**). Cette amélioration de l'affinité s'explique par un gain important d'enthalpie ($\Delta(\Delta H) = -3,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$) qui est en partie compensé par une perte d'entropie ($\Delta(-T\Delta S) = 2,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$).

Ces résultats confirment également que, pour ces deux séries de peptides (acétylé ou non), l'augmentation de la taille du cycle et donc de la flexibilité est corrélée à une perte d'activité. En effet, on observe une diminution importante de l'affinité en insérant successivement un puis deux carbones supplémentaires dans le cycle (**64** -> **76** -> **77** et **73** -> **74** -> **75**). Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, cette diminution de l'affinité s'accompagne d'une perte significative de l'enthalpie qui est faiblement compensée par un gain d'entropie. Ce résultat, difficile à expliquer, est probablement dû à une combinaison de nombreux facteurs. Les résultats obtenus par ITC invalident donc ceux observés sur le test VEGFR1-ECD pour la série acétylée. Les résultats obtenus en ELISA étant reproductibles et donc non liés à une erreur expérimentale, ils pourraient éventuellement être expliqués par des problèmes d'agrégations, de spécificité ou encore par des problèmes de sensibilité inhérents au test.

La série des trois peptides non acétylés ainsi que le peptide acétylé de référence **73** ont été analysés par dichroïsme circulaire. Cependant, nous n'avons pas réussi à déconvoluer de façon satisfaisante les spectres obtenus pour ces peptides. Bien que cela soit difficile à interpréter, l'analyse visuelle des courbes semble indiquer que l'acétylation a un léger effet sur la structuration. Par contre, l'augmentation de la taille du cycle ne semble pas induire de différences significatives de la structure des peptides en solution.

En conclusion, sachant que l'augmentation de la flexibilité induit une perte de l'activité, il serait intéressant de synthétiser un peptide cyclique plus contraint. D'un point de vue synthétique, préparer un analogue des peptides **64** ou **73** possédant un cycle de 34 atomes semble plus compliqué. Cependant, en s'appuyant sur les résultats obtenus pour le peptide **66**, une stratégie pourrait être de remplacer la première cystéine par un acide mercapto propionique. Cette stratégie permettrait simultanément de raccourcir la taille du cycle et de masquer la charge (non nécessaire) de la fonction NH₂ terminale.

3.2 Variation de la nature de la cyclisation

L'utilisation de pont disulfure est une approche simple, efficace et très répandue pour former des macrocycles, contraindre des peptides et ainsi stabiliser des conformations tridimensionnelles. Cependant, en milieu biologique, ces ponts disulfures ne sont pas stables. Ils peuvent être réduits et conduire ainsi à une perte de l'activité biologique désirée. En raison de ce manque de stabilité, divers liens de natures chimiques très différentes (thioéther, amide, di-carba, triazole) ont été étudiés et utilisés avec succès ces dernières années.

Afin de stabiliser la conformation des peptides dérivant du v114*, et de les rendre plus résistants en milieu réducteur, nous avons exploré la possibilité de remplacer le pont disulfure par un lien thioéther.

Les lanthionines sont des motifs thioethers dans lesquels un des deux atomes de soufre du pont disulfure est supprimé. Ils ont été fortement utilisés comme mime de pont disulfure ainsi que comme élément structural permettant d'induire des contraintes supplémentaires. De plus, ces motifs sont également présents dans des peptides naturels bioactifs tels que les lantibiotiques. Cependant, bien que les lanthionines soient intéressants, ce ne sont pas de réels isostères des cystines (pont disulfure).^{230,231}

Les cystathionines (Ctt) sont, quant à eux, des motifs dans lesquels un des deux atomes de soufre du pont disulfure est substitué par un groupement méthylène. Ces motifs possèdent donc le même nombre d'atomes que dans un pont disulfure et sont donc plus proches des cystines. Par conséquent, il est postulé que ces motifs peuvent être utilisés pour remplacer un pont disulfure sans induire de fortes perturbations structurales.^{232,233}

²³⁰ M. Paul and W.A. van der Donk *Mini-Review in Organic Chemistry*, **2005**, *2*, 23-27

²³¹ A. B. Tabor, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7606-7628

²³² P. J. Knerr, A. Tzekou, D. Ricklin, H. Qu, H. Chen, W. A. van der Donk and J. D. Lambris, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 753-760

²³³ A. K. Galande, K. S. Bramlett, T. P. Burris, J. L. Wittliff, A. F. Spatola, *J. Peptide Res.* **2004**, *63*, 297-302

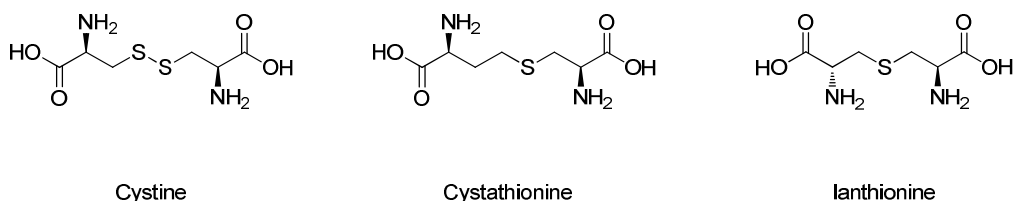


Figure 99 : structure des motifs cystine, cystathionine et lanthionine

Bien que très attrayant, l'introduction de motifs thioethers dans un peptide cyclique reste compliqué. Différentes stratégies de synthèses ont cependant été développées ces dernières années. Celles-ci regroupent l'addition de thiols sur des alcènes (formé ou non *in situ*), la substitution de dérivés halogénés ou autres nucléofuges (également formé ou non *in situ*) par un thiol, la désulfuration de liaisons disulfures ou la cyclisation par liaison amide de synthons incluant le motif thioether protégé orthogonalement.²³⁰

Dans ce contexte, différentes stratégies ont été développées pour introduire cette modification chimique dans nos peptides raccourcis dérivant du v114*.

- 1^{ère} stratégie : substitution d'un dérivé halogéné par un thiol

La première stratégie envisagée a été de réaliser cette réaction de cyclisation intramoléculaire par substitution d'un dérivé halogéné en position 1 par la fonction thiol de la cystéine en position 11 sur le peptide raccourci de 15 résidus (*Schéma 44*).

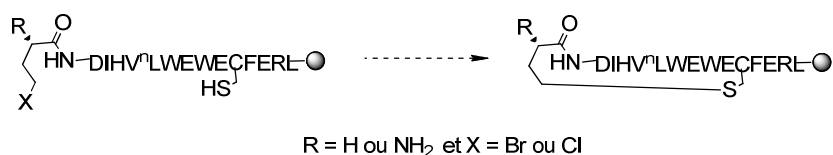


Schéma 44 : stratégie de synthèse : substitution d'un dérivé halogéné par la cystéine en position 11

En s'appuyant sur les résultats obtenus avec le peptide **66** (conservation de l'activité lors de la suppression de la fonction NH₂ terminale), nous avons tout d'abord envisagé introduire le dérivé halogéné en remplaçant la cystéine 1 par l'acide 4-bromobutanoïque (*Schéma 45*).



Schéma 45 : introduction du dérivé halogéné par couplage de l'acide 4-bromobutanoïque

Le peptide de 14 résidus a donc été synthétisé sur support solide et sous activation microonde. Souhaitant réaliser la réaction de substitution sur support solide, nous avons choisi d'utiliser une cystéine en position 11 protégée par un groupement orthogonal para méthoxy trityl (mmt). Après avoir vérifié que la synthèse de ce peptide s'était déroulée correctement, différents essais de couplages ont ainsi été effectués, dans le DMF, en faisant varier la nature et la quantité des agents de couplages ainsi que la température (*Tableau 19*). Ces différentes réactions ont été suivies en utilisant le test de chloranil.

Agent de couplage	Dérivé bromé	Base	Température	Résultat
DIC (4 éq.)/Oxyma pure (4 éq.)	10 éq.	-	MW	Mélange
DIC (10 éq.)/Oxyma pure (10 éq.)	10 éq.	-	TA	Mélange
DCC (> 10 éq.)	> 10 éq.	-	TA	Pas de couplage
HATU (5 éq.)/HOAt (5 éq.)	5 éq.	DIEA (15 éq.)	TA	Pas de couplage

Tableau 19 : conditions réactionnelles testées

L'utilisation de DCC et de HATU/HOAt n'a pas permis d'obtenir le produit souhaité. Bien que d'après le test de chloranil nous pensions que la réaction de couplage avait eu lieu, dans ces conditions seul le produit de départ a été isolé. L'utilisation de DIC et Oxyma pure a, quant à elle, conduit à un mélange de produit. L'analyse par HPLC du mélange obtenu lors de la réaction sous activation microonde nous a conduits à observer que, dans un tampon H₂O/Acétonitrile, ce mélange n'était pas stable et évoluait dans le temps.

Suite à cette constatation, nous avons isolé et analysé par HPLC et spectrométrie de masse d'une part le mélange obtenu à T 0h et d'autre part le produit majoritaire formé après 24h d'évolution. Nous avons ainsi mis en évidence que dans ces conditions, à T 0h, le mélange de produits était constitué du peptide de départ, du produit attendu (couplage avec dérivé bromé) ainsi que d'un produit de couplage dans lequel l'atome de brome était substitué par un alcool. Après 24h d'évolution, le produit majoritaire formé s'est révélé être le peptide de départ non couplé à l'acide 4-bromobutanoïque. Cette régénération du produit de départ pourrait être expliquée par une réaction de cyclisation intramoléculaire. En accord avec les produits identifiés par spectrométrie de masse, on pourrait envisager que l'acide 4-bromobutanoïque se couple correctement au peptide mais qu'en présence de traces d'eau l'atome de brome soit hydrolysé. Une fois cet intermédiaire formé, la fonction alcool pourrait réagir avec le carbonyle de la liaison amide, et par réaction d'addition élimination libérer le peptide de départ et la γ -lactone (*Schéma46*).



Schéma 46: première hypothèse de cyclisation intramoléculaire

Aussi, sachant que le groupement protecteur mmt est sensible et se déprotège dans des conditions douces, une seconde hypothèse pour expliquer ce résultat serait d'envisager que l'acide 4-bromobutanoïque se couple non pas sur la fonction NH₂ terminale mais sur la fonction SH de la cystéine (*Schéma 47*). Le thioester formé, moins stable qu'une liaison amide, pourrait conduire à la régénération du peptide de départ.

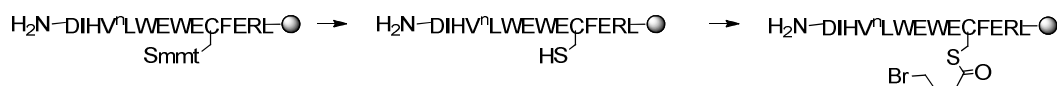


Schéma 47 : deuxième hypothèse de formation d'un thioester

Afin de s'affranchir du problème éventuel causé par la présence du groupement mmt, de nouveaux essais de couplage ont été réalisés à partir d'un peptide de 14 résidus dont la cystéine était protégé par un groupement moins labile de type trityl (trt). Deux premiers essais de couplage ont été réalisés en présence du mélange DIC/Oxyma pure (4éq. ou 10éq.) Cependant, dans ces conditions, seul le produit de départ a été obtenu (*Tableau 20*).

En s'appuyant sur les données de la littérature^{234,235,236}, une nouvelle stratégie de couplage a ensuite été étudiée. En présence de NMM et de chloroformate d'éthyle, nous avons formé l'anhydride mixte de l'acide 4-bromobutanoïque que nous avons ensuite fait réagir avec le peptide de 14 acides aminés. Dans ces conditions, nous avons obtenu d'une part le produit attendu mais également le produit de départ et un dérivé hydroxylé. De façon similaire à ce que nous avons montré précédemment, ce mélange s'est avéré instable et après plusieurs heures d'évolution, nous avons obtenu le peptide de départ de 14 résidus (*Tableau 20*).

Agent de couplage	Dérivé bromé	Solvant	Température	Résultat
DIC (4eq.) / Oxyma pure (4eq.)	4 éq.	DMF	TA	Pas de couplage
DIC (10eq.) / Oxyma pure (10eq.)	10 éq.	DMF	TA	Pas de couplage
NMM (7,5eq.) / chloroformate d'éthyle (3eq.)	6 éq.	CH ₂ Cl ₂ anhydre	TA	Mélange

Tableau 20 : conditions réactionnelles testées

²³⁴ E. E. Alberto, L. C. Soares, J. H. Sudati, A. C. A. Borges, J. B. T. Rocha and A. L. Braga, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 25, 4211-4214

²³⁵ A. L. Braga, E. E. Alberto, L. C. Soares, J. B. T. Rocha, J. H. Sudati and D. H. Roos, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 43-45

²³⁶ K. A. Evans, C. T. Kane and C. M. Tice, *Pest. Manag. Sci.* **2002**, 58, 392-396

Au vu de ces derniers résultats, nous avons essayé de réaliser cette réaction de couplage de l'acide 4-bromobutanoïque sur un modèle beaucoup plus simple. Nous avons ainsi essayé de coupler en solution cet acide avec une alanine dont la fonction acide est protégée par un groupement *tert*-butyle (tBu) (Schéma 48).

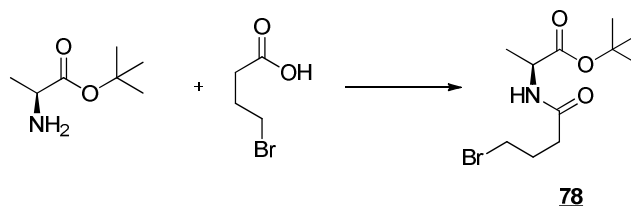


Schéma 48 : couplage de l'acide 4-bromobutanoïque avec une alanine

En présence de DIC et oxyma pure, nous n'avons pas obtenu le produit souhaité. Nous nous sommes alors placés dans des conditions réactionnelles décrites dans la littérature utilisant un anhydride mixte.^{234,235} Celui-ci, formé en présence de NMM et de chloroformate d'éthyle, a été mis à réagir avec l'alanine. Dans ces conditions, un mélange de différents produits a été obtenu (Figure 100).

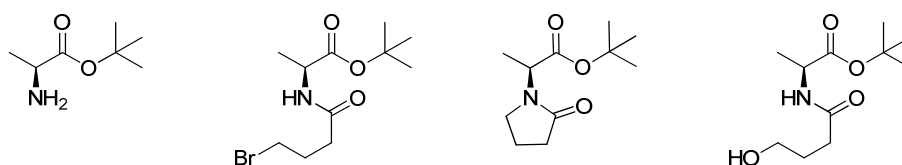


Figure 100 : produits obtenus lors de la réaction de couplage de l'acide 4-bromobutanoïque avec l'alanine

Après purification, seul 13 % de produit attendu a été isolé. Ce rendement pourrait s'expliquer d'une part par la formation de produits secondaires et d'autre part par l'hydrolyse du dérivé bromé suivie très certainement d'une réaction de cyclisation intramoléculaire conduisant à la régénération de l'alanine. Bien que validant notre hypothèse et confirmant que cette réaction est difficile, nous avons souhaité vérifier que la dégradation du produit de couplage du dérivé bromé sur notre peptide n'était pas liée à l'étape de contrôle de clivage. Afin de mimer les conditions de clivage, le produit obtenu lors du couplage avec l'alanine a été mis à réagir dans le TFA. Après 3 heures, le TFA a été évaporé et le milieu réactionnel analysé par RMN. Excepté la perte du groupement *tert*-butyle de l'alanine, nous avons pu constater que le produit ne s'était pas dégradé. Nous avons donc décidé de changer de stratégie et d'introduire le dérivé halogéné en position 1 sans utiliser l'acide 4-bromobutanoïque.

En s'appuyant sur les travaux de Coutts²³⁷ et Alewood²³⁸, une seconde approche a été développée. Celle-ci repose sur la formation *in situ* d'un dérivé chloré à partir d'une homosérine modifiée. Suivant

²³⁷ L. Yu, Y. Lai, J. V. Wade and S. M. Coutts, *Tetrahedron Letters*, **1998**, 39, 6633-6636

²³⁸ Z. Dekan, I. Vetter, N. L. Daly, D. J. Craik, R. J. Lewis and P. F. Alewood, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 15866-15869

le protocole décrit par Alewood et son équipe, cette homosérine modifiée a été obtenue en deux étapes à partir de la L-homosérine (Schéma 49).

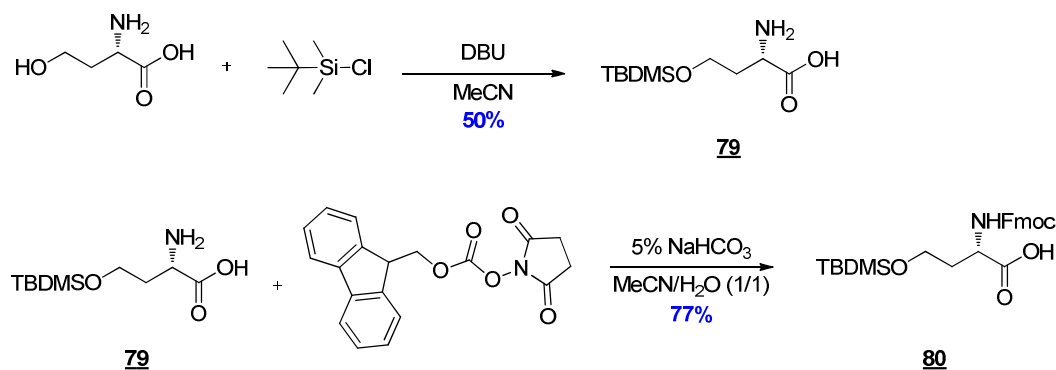


Schéma 49 : synthèse de l'homosérine protégée **80**

Une fois synthétisé, cet acide aminé **80** a été couplé sur le peptide **81** préalablement synthétisé sur support solide et sous activation microonde (cystéine protégée par un groupement Trt). Cette réaction de couplage a été réalisée dans le DMF en présence de HBTU (5 équ.) et de DIEA (4 équ.). Cette réaction a été suivie à l'aide du test de chloranil et l'obtention du produit **82** a été confirmée, après clivage, par HPLC et spectrométrie de masse. L'éther de silyle de l'homosérine a ensuite été converti en dérivé chloré en présence de dichlorure de triphénylphosphine (Ph_3PCl_2). Après 6h sous atmosphère inerte dans le dichlorométhane, une partie du peptide a été clivée de la résine et analysée par HPLC et spectrométrie de masse afin de vérifier que la réaction s'était bien déroulée. Il est important de noter que cette réaction doit être réalisée en présence de Ph_3PCl_2 fraîchement préparé ou neuf si commercial. En effet, dans le cas contraire, le dérivé chloré n'est pas formé et l'on reforme le peptide de départ **81**. Ce résultat pourrait être expliqué, comme dans le cas de l'acide 4-bromobutanoïque, par une réaction de cyclisation intramoléculaire. Une fois le dérivé chloré **83** formé, la cystéine a été sélectivement déprotégée en présence de 3% de TFA et 5% de TIPS dans le dichlorométhane pour conduire au peptide **84**. La déprotection de la fonction trityl du thiol a été confirmée à l'aide d'un test d'Ellman adapté sur support solide (Schéma 50).²³⁹

²³⁹ J. P. Badyal, A. M. Cameron, N. R. Cameron, D. M. Coe, R. Cox, B. G. Davis, L. J. Oates, G. Oyea and P. G. Steela, *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 8531-8533

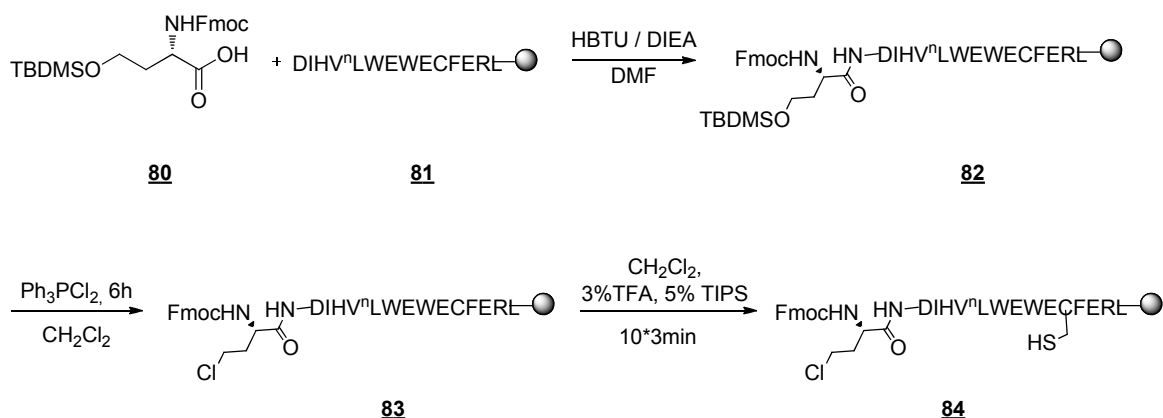


Schéma 50 : synthèse du peptide **84**

L'étape de formation du thioether a ensuite été initiée sur la moitié de la résine **84**. Celle-ci a été réalisée dans un mélange DMF/H₂O en présence de 0,1 M de NaHCO₃ (conditions décrites par Alewood)²³⁸. Cependant, après 4 jours de réaction, le produit attendu n'a pas été observé et le dérivé chloré a commencé à s'hydrolyser (Schéma 51).

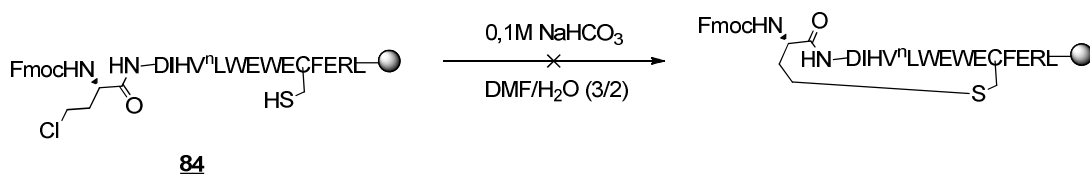


Schéma 51 : essai de cyclisation sur support solide

Suite à cette constatation, nous avons tenté de réaliser cette réaction de substitution intramoléculaire en solution sur la seconde moitié de résine. Après déprotection du groupement Fmoc, le peptide a donc été clivé de la résine. En s'appuyant sur les travaux de Coutts, le peptide a été mis à réagir dans un mélange H₂O/MeCN (1 : 1) en présence de 0,1 M de Na₂CO₃. Cependant, dans ces conditions, seules des traces de thioether ont été obtenues (Schéma 52).

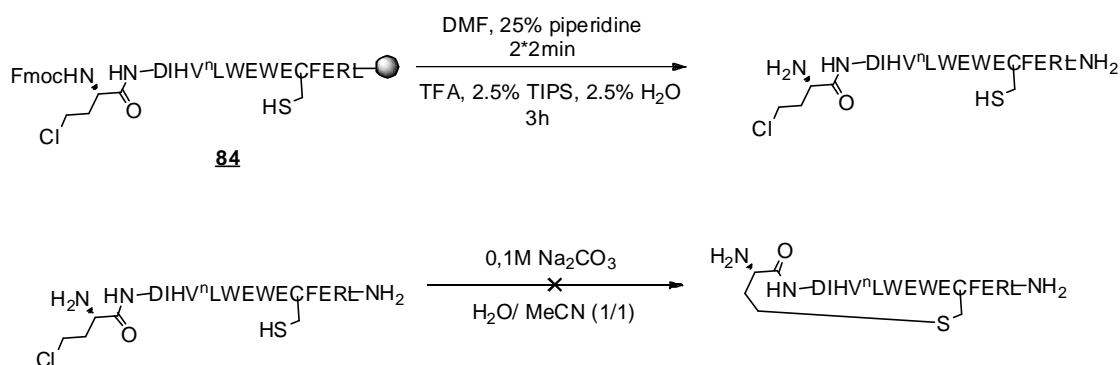


Schéma 52 : essai de cyclisation en solution

- 2^{ème} stratégie : réaction de désulfurisation

Au vu des résultats précédents, nous avons changé de stratégie et souhaité synthétiser le peptide thioether par réaction de désulfurisation. Cette méthode, développée en 1970 par Harpp et Gleason, repose sur la suppression d'un atome de soufre d'un pont disulfure existant et conduit donc à des cycles plus contraints de type lanthionine.^{240,241} La réaction de désulfurisation est effectuée en deux étapes en milieu basique. La première étape est une réaction de β élimination impliquant un atome d'hydrogène en position α du carbonyle de l'une des deux cystéines. Cette étape conduit donc à la formation d'un intermédiaire de type déhydroalanine et par conséquent à la perte de la stéréochimie de l'atome de carbone de la cystéine. Suite à cette première réaction, l'atome de soufre de la seconde cystéine s'additionne sur cette double liaison et par réaction d'addition de Michael conduit ainsi au composé thioether. En théorie, la déprotonation peut être effectuée sur les deux cystéines, ce qui conduit donc généralement à un mélange de quatre diastéréoisomères (Figure 101).²⁴²

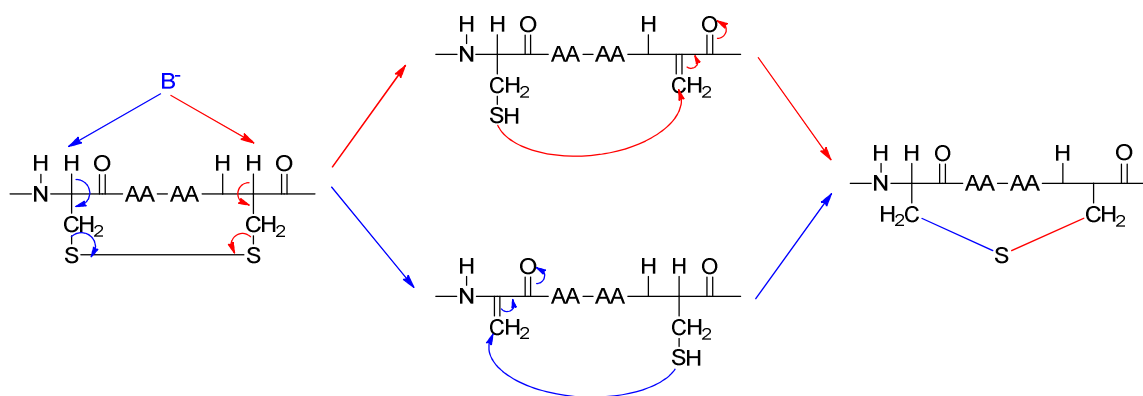


Figure 101 : mécanisme de la réaction de désulfurisation²⁴²

Cette réaction est généralement réalisée à pH 12-13 en présence de bases de type NEt_3 ou NH_4OH . Cependant, le pKa des protons portés par les carbones $\text{C}\alpha$ du squelette peptidique est estimé à 20. Le fait que ces protons puissent tout de même être déprotonés laisse envisager que d'autres facteurs influencent cette réaction. Parmi ces facteurs, il semble y avoir un effet important de la conformation. Une étude réalisée sur des petits peptides cycliques (4 résidus dans le cycle) a mis en évidence que la présence de cystéines de conformation D favorise et accélère la formation de thioether. Différentes hypothèses ont été formulées par les auteurs pour expliquer ce résultat. Par exemple, l'introduction de cystéines D pourrait augmenter la flexibilité des angles de torsion et ainsi favoriser la réaction de β élimination. Pour appuyer leur hypothèse, trois peptides contenant 0, 1 ou 2 cystéines D ont été synthétisés. L'analyse par dichroïsme circulaire de ces peptides associée à l'étude du temps de réaction de désulfurisation, a ainsi conduit les auteurs à établir une corrélation

²⁴⁰ D. N. Harpp and J. G. Gleason, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 73-80

²⁴¹ D. N. Harpp and J. G. Gleason, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2437-2445

²⁴² A. K. Galande, J. O. Trent, A. F. Spatola, *Biopolymers*, **2003**, *71*, 534-551

entre présence de cystéine D, perte de structuration et augmentation de la vitesse de réaction.²⁴² De plus, ces auteurs ont également montré que cette réaction de désulfuration pouvait être réalisée en présence d'une homocystéine. Dans ces conditions, cette réaction permet ainsi d'obtenir 2 diastéréoisomères seulement. De plus, de façon très intéressante pour notre étude, cette réaction conduit non plus à des lanthionines mais à des cystathionines (donc à un nombre d'atome identique au pont disulfure).²⁴²

Au vu de cette dernière constatation, nous sommes donc partis du peptide **74** possédant une homocystéine en position 11 pour effectuer la réaction de désulfuration et préparer le thioether. Après différents essais en présence de NH₄OH (0,3 - 10 %), cette réaction a été réalisée dans l'eau en présence de 10 % de NEt₃ et a conduit au produit attendu **85** (Schéma 53). Cette réaction est cependant très lente, 10 jours sont nécessaires pour avoir une conversion totale. Ce résultat semble en accord avec les données de la littérature (en absence de cystéine D).

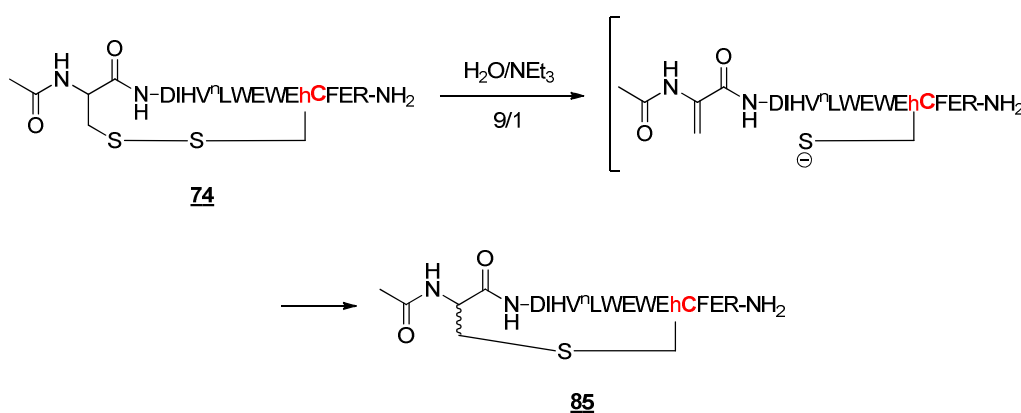


Schéma 53 : formation du peptide thioether par réaction de désulfuration.

En optimisant les conditions d'analyse par HPLC, nous avons réussi à identifier deux pics correspondant a priori aux deux diastéréoisomères. Cependant, ces deux pics n'ont pas pu être séparés lors de l'étape de purification.

L'activité du peptide thioether **85**, sous forme de diastéréoisomères, a été évaluée sur le test VEGFR1-ECD et comparée à l'activité du peptide de référence **73** (Figure 102). Ces deux peptides ont une taille de cycle identique (35 atomes). Evalués sur le même test, nous avons obtenu des valeurs de Cl₅₀ de 11,7 μM [10,1 - 13,6] et 21,7 μM [18,9 - 25,0] respectivement pour les peptides **73** et **85**. Le remplacement du pont disulfure par un lien thioether induit donc une légère perte de l'activité. Cependant, il est intéressant de noter que cette perte n'est pas totale (facteur 2 dans les Cl₅₀). Ce résultat reste néanmoins à confirmer par ITC.

Ce peptide a également été analysé par dichroïsme circulaire. Cette modification chimique semble induire de faibles différences de la structure en solution. Cependant cela reste difficile à interpréter.

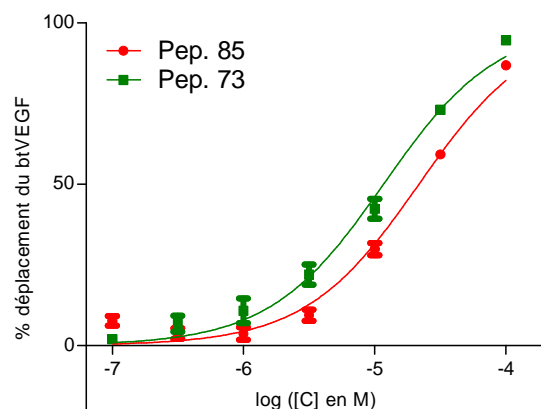


Figure 102 : évaluation de l'activité du peptide thioether **85** sur le test VEGFR1-ECD

En s'appuyant sur la structure du peptide **66**, nous avons ensuite envisagé de pouvoir obtenir un thioether de manière stéréosélective à partir d'un peptide dans lequel la cystéine en position 1 serait remplacée par l'acide 3-mercaptopropionique et celle en position 11 par une homocystéine. D'un point de vue théorique, cette réaction semble plus difficile à envisager que pour le peptide précédent. En effet, le pKa du proton α est plus élevé en absence de la fonction amide en N-terminal, il semble par conséquent plus difficile de réaliser la réaction de β élimination. Cependant, la suppression du carbone asymétrique en N-terminal, pourrait induire une certaine flexibilité et donc favoriser cette réaction.

Le peptide **86** a donc été synthétisé et cyclisé en pont disulfure, puis engagé dans la réaction de désulfurisation (Schéma 54). Différents essais ont été effectués : NH_4OH de 0,3 à 3 % et NEt_3 de 10 à 30 %.

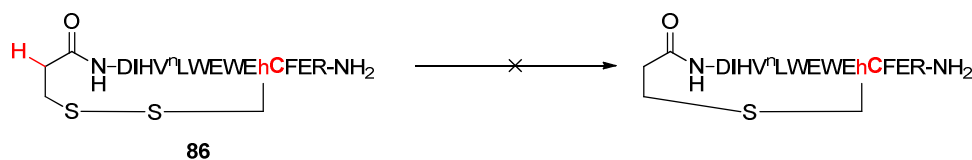


Schéma 54 : essai de synthèse stéréosélective du thioether à partir de **86** en présence de NH_4OH ou NEt_3 .

Dans ces conditions, le thioether attendu n'a pas été formé en quantité utile. Cependant, il est intéressant et encourageant de noter que lors de l'utilisation de 30 % de NEt_3 , l'analyse par spectrométrie de masse a mis en évidence sa présence sous forme de traces.

4. Stabilisation du segment hélice α

Comme de nombreux peptides, le peptide v107 n'adopte pas une conformation unique en solution. Cependant, il se structure au contact du VEGF. Alors que la partie N-terminale de ce peptide reste peu structurée, la région C-terminale (WECFERL) adopte une conformation en hélice α . Ces résidus

étant conservés dans le peptide v114*, nous pouvons supposer que ce dernier ainsi que nos peptides raccourcis **63** et **64**, adoptent la même structuration en hélice α en présence de VEGF.

Dans ce contexte, une stratégie attrayante pour améliorer l'affinité des peptides dérivant du v114* pour le VEGF est de stabiliser leur conformation en hélice α . Pré-organiser les peptides et donc contraindre, en solution, la conformation en hélice α pourrait minimiser le coût entropique du à la formation de l'hélice et par conséquent augmenter l'affinité et l'activité des peptides.

4.1 Données bibliographiques : méthodes pour stabiliser les hélices α

- Structure en hélice α

Les hélices α sont constituées de 3,6 résidus par tour et se caractérisent par un pas de 0,54 nm et généralement des angles Φ et ψ de -60° et -45° . Ces motifs sont stabilisés grâce à la présence de liaisons hydrogènes entre l'atome d'oxygène du carbonyle de l'acide aminé i et l'atome d'hydrogène porté par l'azote en position $i+4$. Les chaînes latérales des acides aminés constituant l'hélice sont orientées vers l'extérieur. De plus, il est important de noter que les chaînes latérales des résidus i , $i+4$, $i+7$ et $i+11$ sont positionnées sur la même face de l'hélice (Figure 103).²⁴³

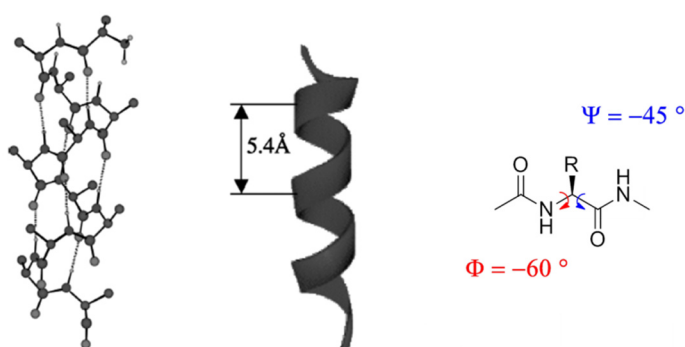


Figure 103 : structure d'une hélice α ²⁴³

Les hélices α , et plus généralement les hélices, sont des conformations très répandues. Plus de 30 % des structures secondaires des protéines sont de nature hélicoïdale. Les domaines en hélice α des protéines servent souvent de motifs de reconnaissance pour les interactions protéines-protéines. Par conséquent, une stratégie très employée pour inhiber des interactions protéines-protéines est de mimer ces domaines et donc de synthétiser des fragments d'hélices. Cependant, hors de la structure globale d'une protéine, ces peptides n'adoptent pas toujours la conformation requise en solution.

^{244,245}

²⁴³ H. Yin, G. I. Le, A. D. Hamilton, *Alpha-helix Mimetics in Drug Discovery in Drug Discovery Research: new Frontiers in the Post-Genomic Era In Huang, Z.* **2007**, Ed. Wiley: Hoboken, 281-299

²⁴⁴ V. Azzarito, K. Long, N. S. Murphy and A. J. Wilson, *Nature Chemistry*, **2013**, 5, 161-173

- Stratégies pour stabiliser une conformation en hélice α

Dans ce contexte, de nombreuses méthodes ont été développées ces dernières années pour induire, stabiliser ou encore mimer les structures en hélices α . Ces stratégies sont détaillées et référencées dans de nombreuses revues.^{244,243,246} Quelques unes de ces approches sont décrites succinctement ci-dessous. Les chaînes latérales des résidus i , $i+4$, $i+7$ et $i+11$ étant orientées sur du même côté, une stratégie pour induire ou stabiliser une hélice α , est de créer un lien covalent ou non entre deux de ces chaînes latérales. Une seconde approche consiste à remplacer une liaison hydrogène stabilisante par un lien covalent et donc à relier deux atomes du squelette peptidique. Cette stratégie, nommée Hydrogen-Bonding Surrogates (HBS) a notamment été utilisée par Arora et son équipe.²⁴⁷ Ce motif peut également être stabilisé entre introduisant dans la séquence peptidique des résidus particuliers, naturels ou non. Notamment il a été mis en évidence que l'ajout d'acides aminés β pouvait conduire à une conformation hélicoïdale tout en induisant une stabilité protéolytique. Enfin, différents foldamères, scaffolds et ligands aromatiques ont été développés ces dernières années pour mimer l'orientation et la géométrie des chaînes latérales.

- Construction de liens entre les chaînes latérales des résidus d'une hélice α (« staple »)

Parmi ces approches, la construction de liens entre les chaînes latérales des acides aminés a été particulièrement étudiée et a conduit, avec succès, à la stabilisation de nombreux peptides structurés hélices α . Les liens covalents développés ces dernières années sont de nature très diversifiée. De façon classique, on retrouve des liens de type amide, disulfure, thioether et éther. De nombreuses stratégies supplémentaires telles que par exemple la formation de liaisons C-C par métathèse, l'utilisation de chimie click, de liens hydrazone, oxime ou encore de liens très rigides contenant des cycles aromatiques ont également été utilisés avec succès (*Figure 104*). Récemment, deux études comparant la capacité de différents liens en i , $i+4$ à induire une structuration en hélice α sur des peptides modèles de 5 ou 8 résidus ont été décrites.^{248,249}

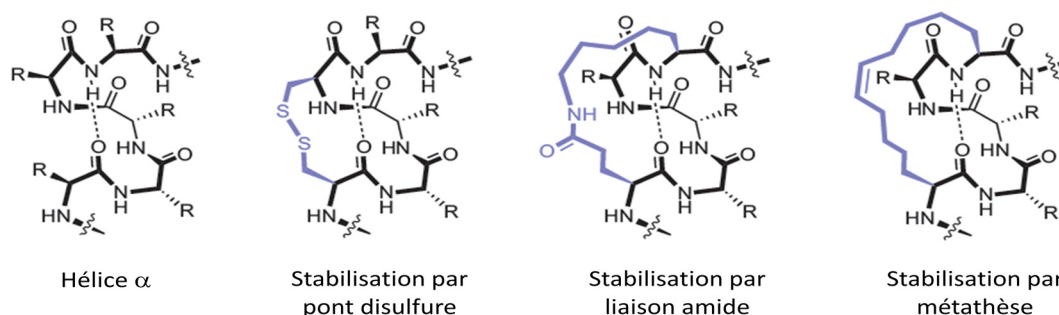


Figure 104 : exemples de stabilisation par formation de liaisons covalentes entre les chaînes latérales des résidus de l'hélice α .²⁴⁴

²⁴⁵ M. W. Peczuh and A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479-2494

²⁴⁶ J. Garner and M. M. Harding, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3577-3585

²⁴⁷ R. N. Chapman, G. Dimartino and P. S. Arora, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12252-12253

²⁴⁸ L. Frankiewicz, C. Betti, K. Guillemin, D. Tourwé, Y. Jacquot and S. Balletta, *J. Pept. Sci.* **2013**, *19*, 423-432

²⁴⁹ A. D. de Araujo, H. N. Hoang, W. M. Kok, F. Diness, P. Gupta, T. A. Hill, R. W. Driver, D. Price, S. Liras and D. P. Fairlie, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6965-6969

A titre d'exemple, une approche originale consiste à introduire un lien azobenzène qui, après photo-activation, induit la structuration en hélice α via une isomérisation *cis-trans* (Figure 105).²⁵⁰

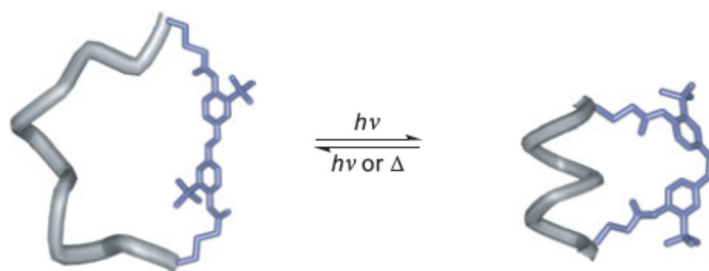


Figure 105 : induction par photo-activation de la conformation en hélice α .

Il est également possible de stabiliser la conformation en hélice α d'un peptide via des interactions non covalentes entre les chaînes latérales de ses acides aminés. Différentes approches telles que formation de sels, ligand d'un métal, Π -stacking ou interaction cation- Π ont été développées. Quelques exemples sont présentés dans la figure 106 ci-dessous.²⁴³

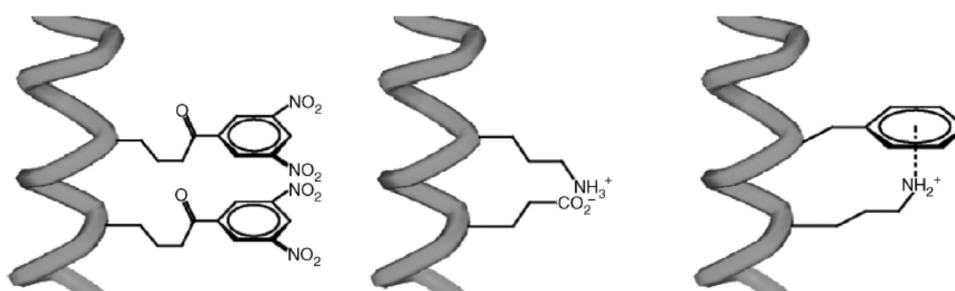


Figure 106 : exemples de stabilisation par formation de liaisons non-covalentes entre les chaînes latérales des résidus de l'hélice α .²⁴³

- Pont lactame

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de liaisons amides pour stabiliser la conformation en hélice α de nos peptides. Cette stratégie a été très étudiée et utilisée pour développer de nombreux composés biologiquement actifs.^{251, 252,243, 244, 246} Ces ponts lactames sont généralement formés entre les chaînes latérales de résidus lysine/ornithine et aspartate/glutamate. Ces acides aminés peuvent être séparés par 2 (*i, i+3*), 3 (*i, i+4*) ou 6 (*i, i+7*) résidus. Cependant, la formation de ponts lactames entre les résidus *i, i+4* semble être la meilleure séparation.

²⁵⁰ S. Kneissl, E. J. Loveridge, C. Williams, M. P. Crump and R. K. Allemann, *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 3046-3054

²⁵¹ J. W. Taylor, *Biopolymers*, **2002**, *66*, 49-75

²⁵² R.S. Harrison, N. E. Shepherd, H. N. Hoang, G. Ruiz-Gómez, T. A. Hill, R. W. Driver, V. S. Desai, P. R. Young, G. Abbenante and D. P. Fairlie, *PNAS*, **2010**, *107*, 11686-11691

En 2005, Fairlie et son équipe ont réalisé une étude sur des peptides modèles pour essayer de déterminer une combinaison optimale entre nature des résidus impliqués dans la liaison amide, taille du cycle et séquence d'acide aminés. Cette étude a été effectuée sur des penta-peptides contraints par un pont lactame en position $i, i+4$. L'effet de ce pont sur la structuration a été analysé par dichroïsme circulaire (Figure 107) et RMN.²⁵³

peptide	relative helicity ^c
Ac-(cyclo-1,5)-[KARAE]-NH ₂	0.08
Ac-(cyclo-1,5)-[EARAK]-NH ₂	0.58
Ac-(cyclo-1,5)-[KARAD]-NH ₂	1.00
Ac-(cyclo-1,5)-[DARAK]-NH ₂	0.60
Ac-(cyclo-1,5)-[OARAD]-NH ₂	0
Ac-(cyclo-1,5)-[DARAO]-NH ₂	0.37
Ac-(cyclo-1,5)-[OARAE]-NH ₂	0
Ac-(cyclo-1,5)-[EARAO]-NH ₂	0
Ac-KARAD-NH ₂	0.04

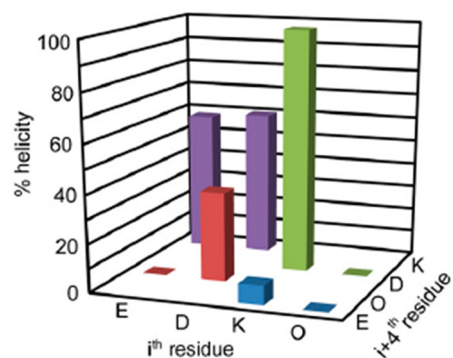


Figure 107: analyse par dichroïsme circulaire de penta-peptides modèles. Corrélation entre séquence et hélicité.^{253, 252}

Bien que les différences structurales entre ces peptides puissent sembler anodines, elles ont en réalité un impact important sur la structuration. En effet, seul certains de ces penta-peptides sont capables d'adopter une structure en hélice α . Au vu des résultats présentés dans la figure 107, différentes constatations peuvent être faites. La présence d'ornithine défavorise la formation d'hélice. De plus, l'ordre des deux acides aminés impliqués dans la formation du pont lactame semble important pour la structuration (K/E vs E/K et K/D vs D/K). Parmi ces peptides modèles, le peptide cyclisé en position $i, i+4$ respectivement par une lysine et un aspartate est celui qui donne le pourcentage d'hélicité maximal. L'analyse de ce peptide, *cyc*-[KARAD]-NH₂, a mis en évidence que la structuration en hélice α était stable en milieu aqueux dans un tampon phosphate ainsi qu'en milieu acide, basique et en conditions dénaturantes (guanidine 8M). De plus, il a été démontré que la présence de TFE n'induisait pas une augmentation de l'hélicité. Ce dernier résultat confirme que l'hélicité est bien due à la contrainte imposée par le pont lactame.

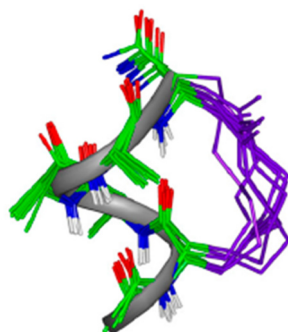


Figure 108 : structure du penta-peptide cyclique *cyc*-[KARAD]-NH₂.

²⁵³ N. E. Shepherd, H. N. Hoang, G. Abbenante and D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2974-2983

De plus, l'analyse de la stabilité protéolytique de ce peptide cyclique, ainsi que de celle de son analogue linéaire, a conduit les auteurs à conclure que la présence de ce pont lactame induisait une amélioration de la stabilité des peptides dans le sérum humain.

Ils ont ensuite étudié l'influence de la nature des trois acides aminés centraux sur la structuration du peptide. Ils ont ainsi mis en évidence que des variations de séquence pouvaient être tolérées.

En conclusion, les auteurs ont montré qu'un pont lactame entre une lysine et un aspartate en position $i, i+4$ semble optimal pour induire une structuration en hélice dans des petits peptides modèles.

Suite à cette étude, Fairlie et son équipe ont utilisé ce petit synthon cyclique pour développer différents peptides hélicoïdaux biologiquement actifs. En couplant plusieurs penta-peptides cycliques, ils ont ainsi mimé avec succès différentes hélices α de protéines humaines, bactériennes et virales.^{252,254} Cette approche offre donc de nombreuses possibilités pour la synthèse et le développement de peptides biologiquement actifs.

Malgré ces succès obtenus avec le système K/D, il reste difficile d'énoncer des règles générales pour la conception de peptides contraints en hélice α dans le but d'interagir avec une cible protéique. Tout d'abord, certains cas de perte d'affinité ont été reportés, probablement lorsque le gain d'énergie entropique n'est pas suffisant pour compenser la perte enthalpique.^{255,254} De plus, la prise en compte exhaustive de tous les changements impliqués par l'introduction d'une contrainte covalente paraît encore à l'heure actuelle impossible. Ces changements incluent des variations de degrés de liberté et d'interactions longues distances du ligand et de la cible (inter **et intramoléculaires**), ainsi que des variations de solvatation.²⁵⁶ C'est pourquoi l'optimisation de tels ligands doit passer par la production et l'évaluation de plusieurs systèmes, et que, en fonction de chaque ligand et de chaque protéine cible, la nature du lien ainsi que la position du lien dans la séquence doit être optimisée.^{257,258}

4.2 Résultats : stabilisation du fragment en hélice α des peptides dérivant du v114*

4.2.1 Synthèses de peptides bi-cycliques et d'un peptide contrôlé

Dans ce contexte, nous avons donc choisi d'introduire un pont lactame dans le peptide de référence **63** (cyc-CDIHVⁿLWEWE \underline{C} FERL-NH₂) afin de stabiliser le fragment d'hélice α et ainsi augmenter leur affinité pour le VEGF. D'après les résultats de l'alanine scan du peptide v114 (cyc-VEPNCDIHVMWEWE \underline{C} FERL-NH₂), les résidus E₁₄ et R₁₈ ne sont pas indispensables pour l'activité. Par

²⁵⁴ T. Rao, G. Ruiz-Gómez, T. A. Hill, H. N. Hoang, D. P. Fairlie, J. M. Mason, *Pos One*, **2013**, *8*, 59415-59427

²⁵⁵ T. Okamoto, K. Zobel, A. Fedorova, C. Quan, H. Yang, W. J. Fairbrother, D. C. S. Huang, B. J. Smith, K. Deshayes and P. E. Czabotar, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 297-302

²⁵⁶ C. Bissantz, B. Kuhn and M. Stahl, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061-5084

²⁵⁷ M.A. Camerino, D.C.M. Kong, D.K. Chalmers, P.E. Thompson, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2008**, *14*, 323-331

²⁵⁸ G.H. Bird, E. Gavathiotis, J.L. LaBelle, S.G. Katz and L.D. Walensky, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 831-837

conséquent, nous avons choisi d'utiliser ces deux positions pour introduire un pont lactame sur le peptide de référence **63**. Nous avons décidé de synthétiser quatre peptides bi-cycliques possédant des ponts lactames : K/D, D/K, E/K et K/E.

Afin d'initier notre étude, un peptide contrôle **87** dit « linéaire » a été synthétisé en conservant le glutamate en position 10 et en remplaçant l'arginine en position 14 par une lysine. Ce peptide a été synthétisé en suivant le même protocole que pour le peptide **63**. L'activité de ce peptide a été évaluée sur le test de déplacement VEGFR1-ECD. En accord avec les données de l'alanine scan, nous avons mis en évidence que la mutation de l'arginine en position 14 par une lysine n'induit pas de perte d'activité (3,6 μ M [3,1 - 4,0] et 5,2 μ M [3,6 - 7,5] respectivement pour les peptides **87** et **63**). Au vu de ce résultat, nous avons donc initié la synthèse des peptides bi-cycliques. La mise au point des conditions réactionnelles a été effectuée sur l'analogue bi-cyclique **88** du peptide « linéaire » **87**. La première stratégie envisagée a été de synthétiser sur support solide et activation microonde le précurseur linéaire de 14 résidus et de réaliser la réaction de cyclisation amide sur support solide puis, après élimination du groupement Fmoc en position N-terminale, de cliver le peptide et de former en solution le pont disulfure (*Schéma 55*).

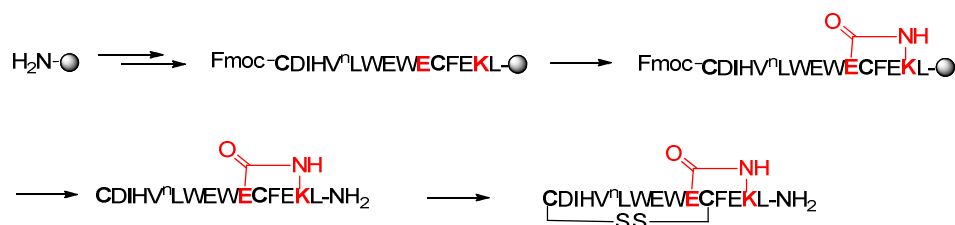


Schéma 55 : première stratégie de synthèse du peptide **88**

Pour cela, le précurseur linéaire, possédant des groupements protecteurs orthogonaux sur les chaînes latérales du glutamate (OPhiPr) et de la lysine (mtt), a été synthétisé. Après déprotection orthogonale de ces deux acides aminés en présence de 2 % de TFA et 2 % de TIPS dans le dichlorométhane (2 x 30 min), différentes conditions de cyclisation ont été testées pour former le pont lactame (*Tableau 21*).

Conditions réactionnelles
DIC (10 éq.) / Oxyma pure (10 éq.) / DMF
HOAt (5 éq.) / HATU (5 éq.) / DIEA (10 éq.) / DMF
DEPBT (2 éq.) / DIEA (2 éq.) / DMF
PyBOP (4 éq.) / DIEA (6 éq.) / DMF

Tableau 21 : conditions réactionnelles testées

Cependant, dans ces différentes conditions, le peptide cyclique n'a pas été obtenu. Nous avons donc changé de stratégie et décidé de synthétiser le peptide **88** en deux étapes distinctes (*Schéma 56*) :

- Synthèse sur support solide d'un peptide court de 6 acides aminés suivi de la réaction de formation du pont lactame.
- Elongation du peptide toujours sous activation microonde et formation du pont disulfure en solution.

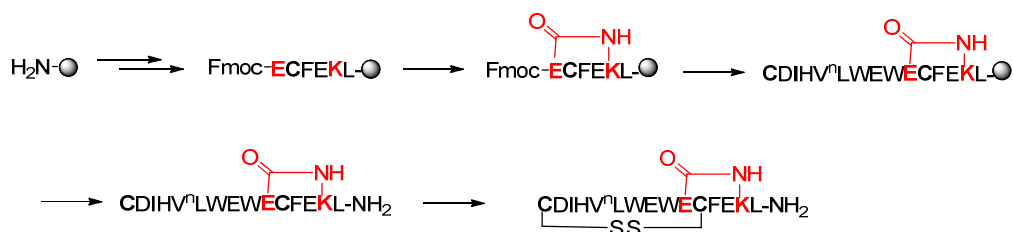


Schéma 56 : seconde stratégie de synthèse du peptide **88**

Le peptide court de 6 acides aminés a donc été synthétisé sur support solide et sous activation microonde en utilisant des groupements orthogonaux mtt et OPhiPr pour la lysine et le glutamate. Afin de réaliser la réaction de cyclisation, nous avons pris le soin de conserver le groupement Fmoc en N-terminal. Comme précédemment, après déprotection de ces deux acides aminés, différentes conditions de cyclisation ont été testées pour former le pont lactame (*Tableau 22*).

Conditions réactionnelles	Solvant	Temp.	Résultat
DEPBT (2 éq.) / DIEA (2 éq.)	DMF	T.A	Mélange
HATU (1,1 éq.) / DIEA (2 éq.)	DMF	T.A	Produit
PyBOP (4 éq.) / DIEA (10 éq.)	DMF	T.A	Produit
PyBOP (4 éq.) / DIEA (10 éq.)	NMP/DMSO (1/1)	T.A	Produit

Tableau 22 : conditions réactionnelles testées

Au vu de ces résultats et des différents chromatogrammes, nous avons choisi de réaliser cette réaction dans le DMF, à température ambiante, en présence de PyBOP et DIEA (produit plus pur et conditions réactionnelles simples).

Après avoir re-synthétisé le peptide linéaire de 6 acides aminés, nous avons donc appliqué ces conditions. Cependant, la réaction ne s'est pas avérée très reproductible et plusieurs cycles ont été nécessaires pour obtenir le produit cyclisé attendu. Ce problème a également été observé sur d'autres peptides. Suite à cette constatation, nous nous sommes attachés à optimiser la voie de

synthèse et avons envisagé que le problème pouvait venir de l'étape de déprotection des groupements orthogonaux. Cette réaction étant réalisée en milieu acide, des traces de TFA pourraient rester piégés dans la résine et donc neutraliser la DIEA lors de l'étape de cyclisation. Nous avons donc changé le protocole de déprotection et ajouté des étapes de lavages en présence de DIEA avant l'étape de cyclisation.²⁵⁹

Cette étape de déprotection a donc été effectuée en présence de 3 % de TFA (5 × 2 min) et suivie de 4 lavages en milieu neutre (DMF et CH₂Cl₂), 3 lavages en milieu basique (5 % DIEA) et enfin 4 lavages en milieu neutre (DMF et CH₂Cl₂). Après déprotection et lavages, la réaction de cyclisation a été effectuée comme décrit précédemment (PyBOP/DIEA/DMF). Dans ces conditions, cette réaction s'est avérée être reproductible. Ces conditions réactionnelles étant optimisées, nous avons donc déprotégé le groupement Fmoc et réalisé l'élongation du peptide. Le peptide a ensuite été clivé de la résine pour effectuer la réaction de formation du pont disulfure.

Dans les conditions de cyclisation mises au point pour le peptide v114* et les premiers dérivés monocycliques ([peptide] = 1 mM et tampon [NH₄HCO₃] 100 mM), le peptide bi-cyclique **88** a été obtenu avec un très mauvais rendement. Par conséquent, nous avons changé les conditions réactionnelles. Après plusieurs cycles d'optimisations, cette réaction a été réalisée en condition plus diluée ([peptide] = 100 μM), dans un mélange H₂O / MeCN/ NH₄HCO₃ (200 mM) (25 %/25 %/ 50 %). Après purification par HPLC, le peptide bi-cyclique **88** a ainsi été obtenu avec une pureté supérieure à 99 %.

Cette stratégie de synthèse a donc été appliquée pour préparer les trois autres peptides bi-cycliques (*Schéma 57*).

²⁵⁹ N.E. Shepherd, H.N. Hoang, G. Abbenante and D.P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15877-15886

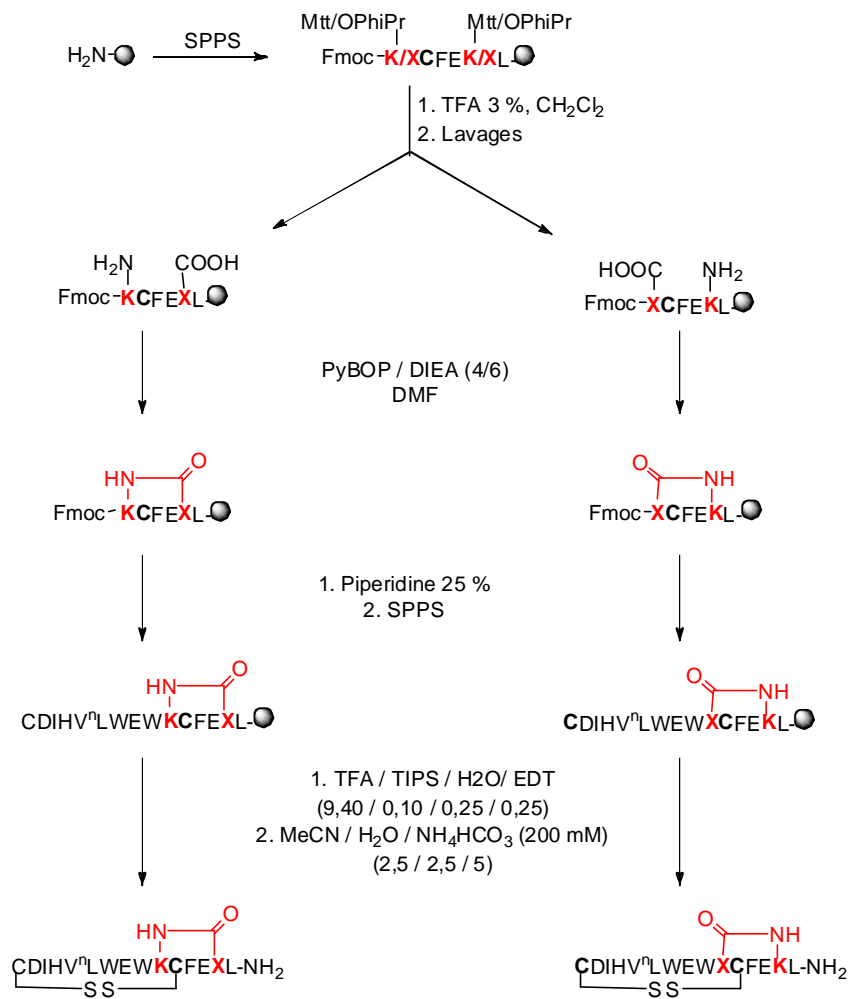


Schéma 57 : voie de synthèse des peptides bi-cycliques. X = D ou E.

4.2.2 Effet du pont lactame sur l'activité et sur la structuration

Une fois synthétisés et purifiés, l'activité de ces quatre peptides a été évaluée sur le test ELISA VEGFR1-ECD et ITC, et comparée au résultat obtenu pour le peptide dit « linéaire » **87**. (Tableau 23).


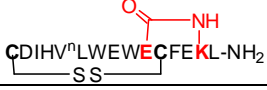
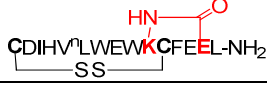
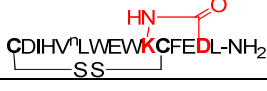
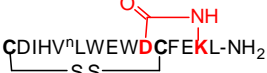
Ref.	Séquence	Cl ₅₀ (ECD) [IC 95 %]	K _d (nM)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.mol ⁻¹ . K ⁻¹)
87		3,6 μM [3,1-4,0]	173 ± 6	-16,4 ± 0,4	-25,1 ± 1,3
88		2,3 μM [2,1-2,5]	54 ± 2	-14,9 ± 0,3	-17,5 ± 1,0
89		2,8 μM [2,2-3,6]	312 ± 50	-15,7 ± 0,1	-23,7 ± 0,7
90		1,3 μM [1,1-1,5]	81,3 ± 0,7	-18,3 ± 0,3	-29,8 ± 0,9
91		4,6 μM [2,7-7,8]	118 ± 0,7	-18,0 ± 1,1	-29,8 ± 4,4

Tableau 23 : résultats obtenus lors de l'étude de stabilisation de l'hélice α

De plus, afin d'analyser l'effet du pont lactame (i, i+4) sur la structuration en hélice α, ces différents peptides ont été analysés par dichroïsme circulaire (Figure 109).

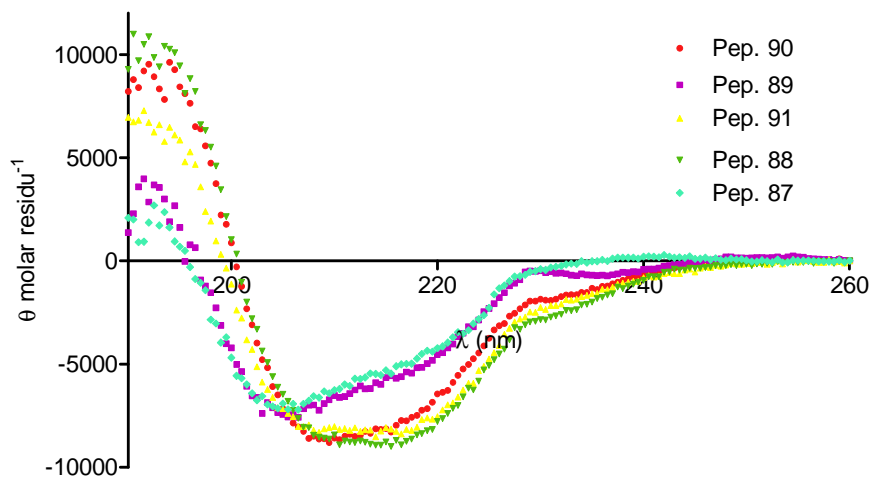


Figure 109 : spectres de dichroïsme circulaire des peptides bi-cycliques **88**, **90**, **91** et **89** ainsi que du contrôle **87** réalisés dans un tampon phosphate 10 mM (pH 7,4 et 20°C). Concentrations normalisées à 100 μM par correction à *posteriori* de la concentration par mesure UV.

En accord avec les données de la littérature, les résultats d'ITC et de dichroïsme circulaire obtenus pour les peptides **87** et **88** mettent en avant que la présence d'un pont lactame en i, i+4 induit la structuration du peptide et améliore par conséquent l'affinité pour le VEGF.

Il apparaît de façon évidente sur les spectres de dichroïsme circulaire que la contrainte imposée par la présence du pont lactame induit la structuration en hélice α même en absence de VEGF. En effet,

les deux spectres sont très différents. De façon similaire à ce que nous observions pour le v114* ainsi que pour nos premiers peptides, le composé **87** présente un minimum négatif à 205 nm correspondant certainement à une conformation peu structurée. Le peptide contraint **88** présente, quant à lui, un maximum positif marqué à 190 nm ainsi que deux minima négatifs à 208 et 215 nm. On observe un léger décalage par rapport aux valeurs classiquement obtenues pour une hélice α (190, 208 et 222 nm). Cependant ce phénomène a déjà été observé, notamment par Fairlie lors de son étude sur les penta-peptides modèles. La déconvolution des courbes obtenues pour ces deux peptides a permis de quantifier le gain d'hélicité. Comme attendu, le peptide **87** est aussi peu structuré que le peptide **63** et présente 6 % d'hélicité tandis que le peptide **88** est significativement plus structuré et présente 17 % d'hélicité.

Ce gain de structuration est corrélé avec une amélioration de l'affinité pour le VEGF (facteur 3,2 entre le Kd du peptide du peptide **87** et celui du peptide contraint **88**). Comme attendu et en accord avec les résultats de dichroïsme circulaire, cet effet est associé à un gain important d'entropie. Cependant, celui-ci est compensé par une perte d'enthalpie s'expliquant probablement par la perte d'interactions stabilisantes *intra*-peptide (Glu₁₀ et Lys₁₄).

La différence d'hélicité, observée par dichroïsme circulaire, entre les peptides bi-cycliques est moins marquée que celle observée par Fairlie sur les penta-peptides modèles. Cet effet pourrait être expliqué par la taille et constitution de nos peptides (présence notamment de tryptophane) ainsi que par le fait que seul un fragment du peptide peut adopter une conformation en hélice.

De façon similaire au peptide **88** (E_i - K_{i+4}), le peptide **90** (K_i - D_{i+4}) est fortement structuré en hélice α en solution (17,3% et 15,7% d'hélicité respectivement pour les peptides **88** et **90**). Le peptide **91** (D_i - K_{i+4}) est légèrement moins structuré que les deux premiers et présente un pourcentage d'hélicité de 12 %. Le peptide **89** se distingue, quant à lui, des trois autres peptides. En accord avec les résultats obtenus par Fairlie, ce peptide, dont le pont lactame est formé par les résidus K_i et E_{i+4}, est le peptide bi-cyclique le moins structuré en hélice α . En effet, très proche des peptides **63** et **87**, il présente un taux de 7 % seulement d'hélicité.

Ces résultats corréleront parfaitement avec les affinités mesurées par ITC. En effet, on observe que plus les peptides sont structurés en solution, plus ils sont affins pour le VEGF et ont par conséquent des valeurs de Kd se rapprochant de celle du v114*.

De façon assez surprenante, l'analyse des paramètres thermodynamiques met en avant des différences importantes d'un peptide bi-cyclique à l'autre. Si l'on regarde par exemple le couple constitué des peptides **88** et **89** cyclisés par la liaison entre un glutamate et une lysine, on peut noter une différence très importante de Kd. Cette perte d'affinité correspondant à la différence d'orientation du pont lactame est liée à une perte très importante d'entropie. Les peptides **90** et **91** ont quant à eux des valeurs de Kd ainsi que de ΔH et ΔS très proches. Ceci pourrait être expliqué par la contrainte plus importante du cycle du à la présence de l'aspartate.

Il est également intéressant et intrigant de noter que les peptides **88** et **90** qui sont les peptides les plus affins (avec des Kd proches) ont pourtant des paramètres thermodynamiques ΔH et ΔS très différents : $\Delta (\Delta H) = 3,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et $\Delta T(\Delta S) = 3,6 \text{ cal.mol}^{-1}$. Afin de comprendre et expliquer ces différences, le contrôle « linéaire » du peptide **90** est en cours de synthèse au laboratoire. Si, par ITC,

les paramètres thermodynamiques de ce peptide sont proches de ceux du peptide **90** et par conséquent très différents de ceux du peptide **87**, nous pourrions conclure que l'introduction d'un aspartate dans la séquence a un effet important sur la liaison avec le VEGF. Si, au contraire, ces paramètres sont proches de ceux du **87**, nous pourrions envisager que les différences observées entre les paramètres thermodynamiques des deux peptides bi-cycliques **88** et **90** soient dues à une accumulation de nombreuses et faibles variations structurales ou à un mode de liaison sur le VEGF différent. Ces résultats ouvrent donc de nombreuses pistes de réflexion et d'étude.

Au cours de cette étude, nous avons donc confirmé que l'utilisation d'un pont lactame peut stabiliser la conformation en hélice et ainsi augmenter l'affinité du peptide pour le VEGF. Ce résultat est de plus en plus décrit dans la littérature. Cependant, rares sont les exemples, où comme dans notre cas, seul un fragment peptidique adopte une structure en hélice α .

En conclusion, cette stratégie nous a donc permis d'améliorer l'affinité de nos peptides et notamment d'obtenir un peptide aussi affin pour le VEGF que le peptide de référence v114*.

5. Etudes complémentaires et valorisation des peptides dérivant du v114*

5.1 Structure cristallographique du complexe VEGF/peptide **88**

Le peptide **88** étant aussi affin pour le VEGF que le peptide v114* (Kd respectifs de 54 et 40 nM), la structure de ce peptide en complexe avec le VEGF a été déterminée par cristallographie en collaboration avec le Dr. J.F. Gaucher (UMR 8015, Université Paris Descartes) (*Figure110*).

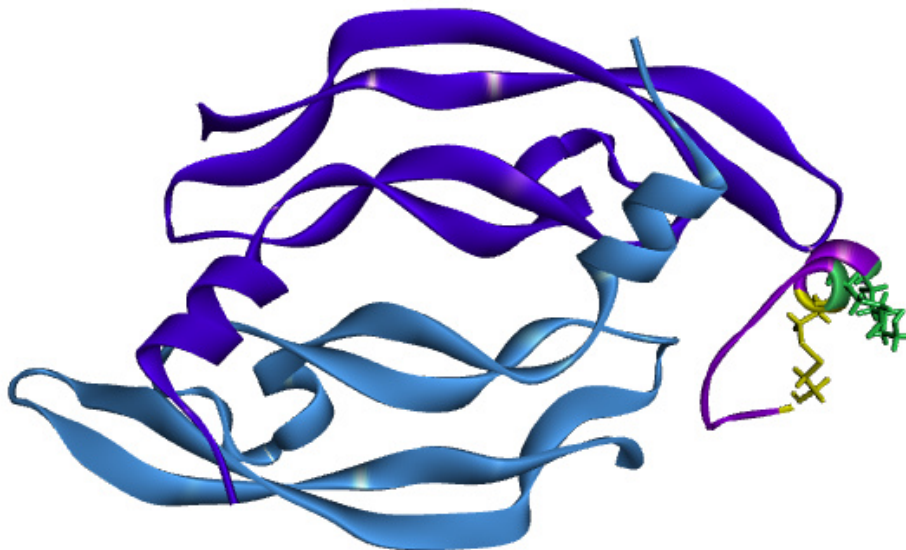


Figure 110 : structure du complexe VEGF/peptide **88** obtenue par cristallographie. En raison des conditions expérimentales de cristallisation, seule une molécule de **88** est liée à l'homodimère de VEGF. (d = 1,85 Å, R.fact = 18,7 %, R.free = 24,9 %, rmsd angles = 1,456°, rmsd liaisons = 0,014 Å, 1 molécule/UA)

La comparaison de cette structure avec celle du complexe VEGF/v107, nous permet de confirmer que le peptide **88** interagit avec le VEGF au niveau de la même zone de fixation que le peptide de référence v107. De plus, cette structure met en évidence qu'au contact du VEGF le peptide **88** adopte globalement la même structuration que le peptide v107. A savoir, ce peptide est composé d'un coude β , d'une région étendue et d'un fragment d'hélice α en C-terminal (Figure 111).

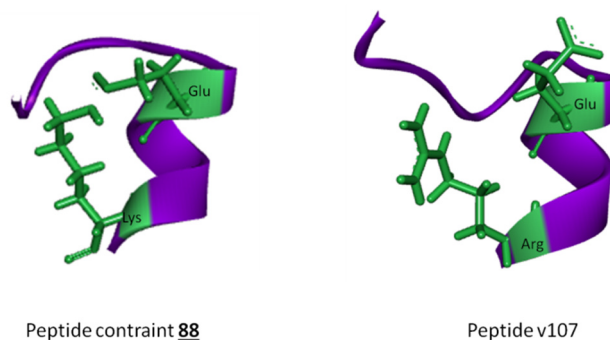


Figure 111 : comparaison des structures du v107 et du peptide **88**.

Cette structure apporte également la confirmation que le pont lactame n'interagit pas directement avec le VEGF. Cependant, celui-ci est assez mal défini dans la densité électronique, ce qui pourrait être expliqué par la présence de plusieurs conformations de la liaison amide (cis et trans). L'absence d'interaction directe entre le lien covalent et le VEGF est une information importante nous permettant de simplifier l'interprétation des résultats obtenus en calorimétrie, en considérant uniquement les effets conformationnels induits par le lien. Un tel comportement n'était pas *a priori* acquis, en effet, des exemples d'interaction entre un lien covalent hydrophobe et la cible protéique sont connus.^{260,261}

Cette structure confirme par ailleurs de nombreux résultats obtenus pour le peptide v107. Comme dans le peptide v107, l'isoleucine 3 interagit avec les résidus L₆₆ et D₆₃ du VEGF. La norleucine 6 interagit, comme la méthionine 10 dans le v107, avec les résidus Y₂₁ et Y₂₅ du VEGF et le tryptophane 7, et semble indispensable pour la stabilité conformationnelle du peptide ainsi que pour la liaison avec le VEGF. La phénylalanine 12 reste également un des acides aminés faisant le plus de contacts avec le VEGF. Elle interagit notamment en stacking orthogonal avec les résidus aromatiques F₁₇ et Y₂₁ du VEGF. Enfin, comme attendu, la leucine 15 effectue des interactions de van der Waals avec les résidus I₈₃ et M₈₁ du VEGF.

Quelques résidus diffèrent cependant entre le peptide **88** et le v107 et donc par conséquent, n'effectuent pas les mêmes interactions. C'est le cas notamment de la valine 5 du peptide **88**. Celle-ci, mal définie dans la densité électronique, n'interagit pas avec le VEGF et est exposée au solvant. Dans le v107, cet acide aminé est remplacé par une arginine et forme un pont salin avec l'aspartate

²⁶⁰ M.L. Stewart, E. Fire, A.E. Keating and L.D. Walensky, *Nat Chem Biol.* **2010**, *6*, 595-601

²⁶¹ C. Phillips, L.R. Roberts, M. Schade, R. Bazin, A. Bent, N.L. Davies, R. Moore, A.D. Pannifer, A.R. Pickford, S.H. Prior, C.M. Read, A. Scott, D.G. Brown, B. Xu and S.L. Irving, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9696-9699

103 du VEGF. De même, l'histidine 4, remplaçant l'alanine 8 dans le peptide v107, n'effectue pas les mêmes interactions. Contrairement au v107 dans lequel l'alanine interagit avec des résidus du VEGF, l'histidine semble stabiliser la structure du peptide en formant un pont salin avec l'aspartate en position 6.

En s'appuyant sur la structure de ce complexe, différentes perspectives pour améliorer l'affinité et la spécificité du peptide pour le VEGF ont été envisagées. Quelques exemples d'optimisation possibles sont présentés ci-dessous.

Au vu de la position et de la distance entre les résidus D₂ et V₅, une première possibilité serait de remplacer ces deux acides aminés par des cystéines et former ainsi un pont disulfure (*Figure 112*). La contrainte imposée par ce cycle supplémentaire pourrait stabiliser la conformation en coude du peptide et donc induire une amélioration de l'affinité.

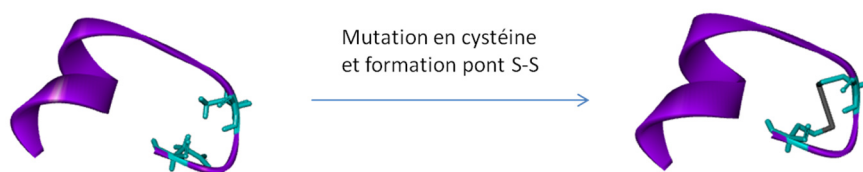


Figure 112 : optimisation envisagée : formation d'un pont disulfure supplémentaire

Une seconde optimisation pourrait être de remplacer la leucine C-terminale par une méthionine ou un résidu possédant une chaîne aliphatique plus longue de type norleucine, afin de renforcer les interactions de van der Waals existantes.

Contrairement à la structure RMN du complexe VEGF/v107, cette nouvelle structure permet de localiser les molécules d'eau à l'interface entre le peptide et le VEGF. L'analyse de la position de ces molécules d'eau ainsi que des interactions qu'elles effectuent avec le VEGF et le peptide nous a également conduits à envisager d'autres modifications chimiques (*Figure 113*).

A proximité de l'histidine 4 du peptide **88**, se trouve une molécule d'eau susceptible d'interagir d'une part avec le carbonyle de la liaison amide de ce peptide (2,68 Å) et d'autre part avec la tyrosine 25 (2,86 Å) et l'asparagine 62 (2,94 Å) du VEGF. Par conséquent, une optimisation possible serait de remplacer l'histidine par un acide aminé D présentant une chaîne latérale portant une fonction hydroxyle. Cela permettrait de substituer cette molécule d'eau et ainsi créer de nouvelles interactions avec le VEGF (*Figure 113 Gauche*).

De plus, à proximité de la norleucine se trouve également une molécule d'eau interagissant avec la glutamine 22 et la tyrosine 25 du facteur de croissance. De la même façon que pour l'exemple précédent, une modification possible serait donc de remplacer la norleucine par un résidu présentant une chaîne latérale plus longue et substituée par une fonction amine ou hydroxyle (*Figure 113 droite*).

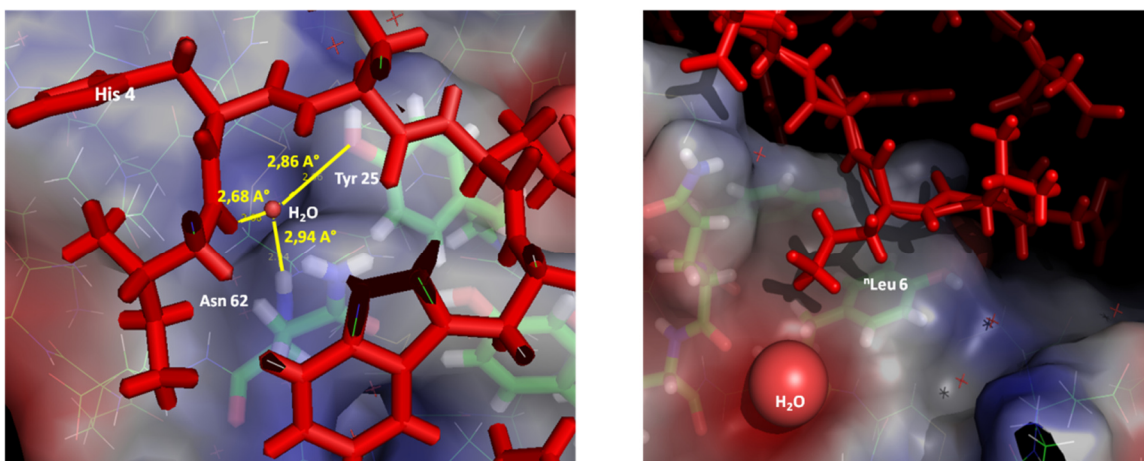


Figure 113 : optimisation envisagée en tenant compte de la présence des molécules d'eau. A gauche : utilisation d'une molécule d'eau à proximité de l'histidine 4. A droite : utilisation d'une molécule d'eau à proximité de la norleucine 6.

En conclusion, cette structure cristallographique apporte de nombreuses informations et confirmations, ainsi que de nouvelles perspectives pour développer de nouveaux ligands du VEGF.

5.2 Etude de l'activité des peptides v114* et 88 sur un panel de kinases.

Afin de compléter l'étude du peptide **88**, nous avons souhaité évaluer son effet sur cellules HUVE. Pour cela nous avons initié une étude, en collaboration avec la société PamGene®, pour déterminer le profil de kinases (tyrosine kinase) inhibées par le peptide **88** ainsi que par le v114*. Cette étude a été réalisée en collaboration avec la société PamGene®, à l'occasion d'une démonstration et d'un prêt de l'appareil à l'hôpital Cochin (unité pharmacocinétique et pharmacochimie).

Le profil d'activité des tyrosines kinases modulées par ces deux peptides a été déterminé en utilisant un système de puces à tyrosine kinase Pamchip®. Cette technique repose sur la détermination de la phosphorylation spécifique de peptides substrats greffés sur la surface poreuse des puits de cette puce par des kinases présentes dans un extrait cellulaire. Chaque Pamchip® est composé de quatre puits indépendants possédants tous 144 peptides substrats de kinases, dont un contrôle négatif et deux contrôles positifs (Figure 114).^{262,263,264} (Rq. : Les références 263 et 264 renvoient à des exemples d'utilisation de cette technique)

²⁶² Site internet : <https://www.pamgene.com/>

²⁶³ A. Eriksson, A. Kalushkova, M. Jarvius, R. Hilhorst, L. Rickardson, H. G. Kultima, R. de Wijn, L. Hovestad, M. Fryknäs, F. Oberg, R. Larsson, V. Parrow and M. Höglund, *Biochemical Pharmacology*, **2014**, *87*, 284-291

²⁶⁴ I. Kawada, R. Hasina, Q. Arif, J. Mueller, E. Smithberger, A. N. Husain, E. E. Vokes and R. Salgia, *Cancer Res.* **2014**, *74*, 884-895

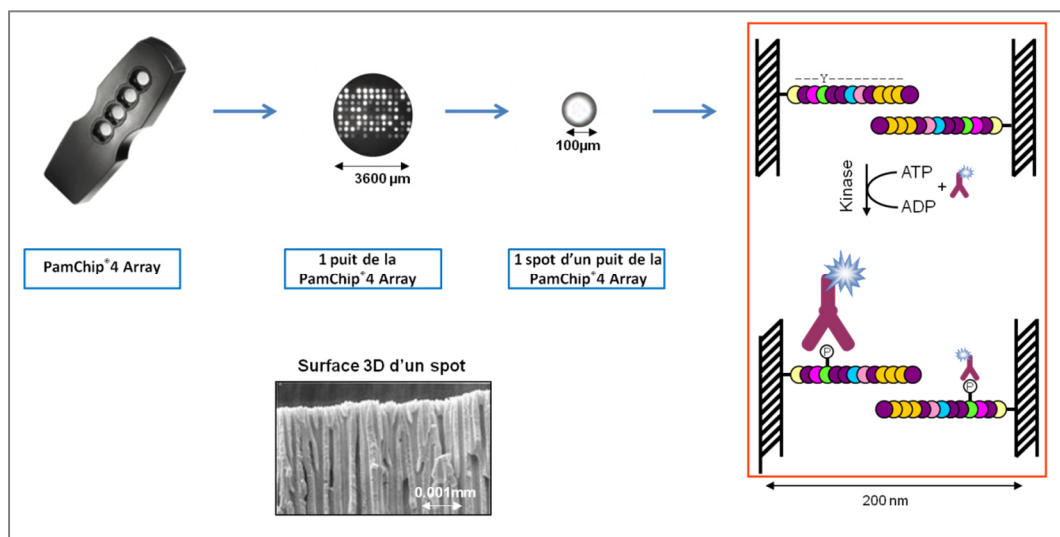


Figure 114: structure et principe d'utilisation d'une Pamchip

Afin de déterminer l'activité des peptides **88** et v114* sur cellules HUVE, nous avons testé en duplicata quatre échantillons différents (2 Pamchip) : contrôle négatif, contrôle positif, peptide v114* et peptide **88**.

Ces différents extraits cellulaires ont été préparés comme décrit ci-dessous en collaboration avec l'équipe du Dr. Birgit Georger (UMR 8002, Institut Gustave Roussy).

Après déprivation en sérum pendant 3 heures, quatre traitements différents ont été appliqués sur les cellules HUVE afin d'obtenir quatre échantillons requis. Un premier lot de cellules a été stimulé par du VEGF (10 ng, 1 heure) pour obtenir un contrôle positif. Un second a été traité en absence de VEGF dans un milieu basal pendant la même durée pour conduire au contrôle négatif. Enfin, les deux lots de cellules restant ont été traités pendant 1 heure en présence d'une part de VEGF (10 ng/mL) et d'autre part respectivement des peptides v114* et **88** (concentration en peptide de 30 μM). Une fois traités, ces extraits ont été lysés et mis à réagir avec les peptides substrats. Comme attendu, en absence de VEGF, peu de peptides substrats phosphorylés ont été observés (contrôle négatif). Au contraire, dans les extraits cellulaires traités par du VEGF seul, la plupart des peptides ont été phosphorylés, signe d'une activité tyrosine kinase importante (contrôle positif). L'ajout des peptides v114* et **88** sur les extraits cellulaires traités par du VEGF a conduit à une forte inhibition de la phosphorylation de 25 des peptides observés en présence de VEGF seul.

L'analyse, à l'aide de différentes banques de données, de ces 25 peptides a permis de mettre en évidence que 13 de ces substrats semblent dépendants de la voie du VEGF. En croisant les informations obtenues pour les différents peptides substrats, une quarantaine de kinases dont l'activité est inhibée par ces deux peptides ont pu être identifiées.

L'ensemble de ces résultats (peptides substrats, kinases dépendantes ou non de la voie VEGF et taux d'inhibition par les peptides v114* et **88**) sont présentés dans la figure 115 ci-dessous.

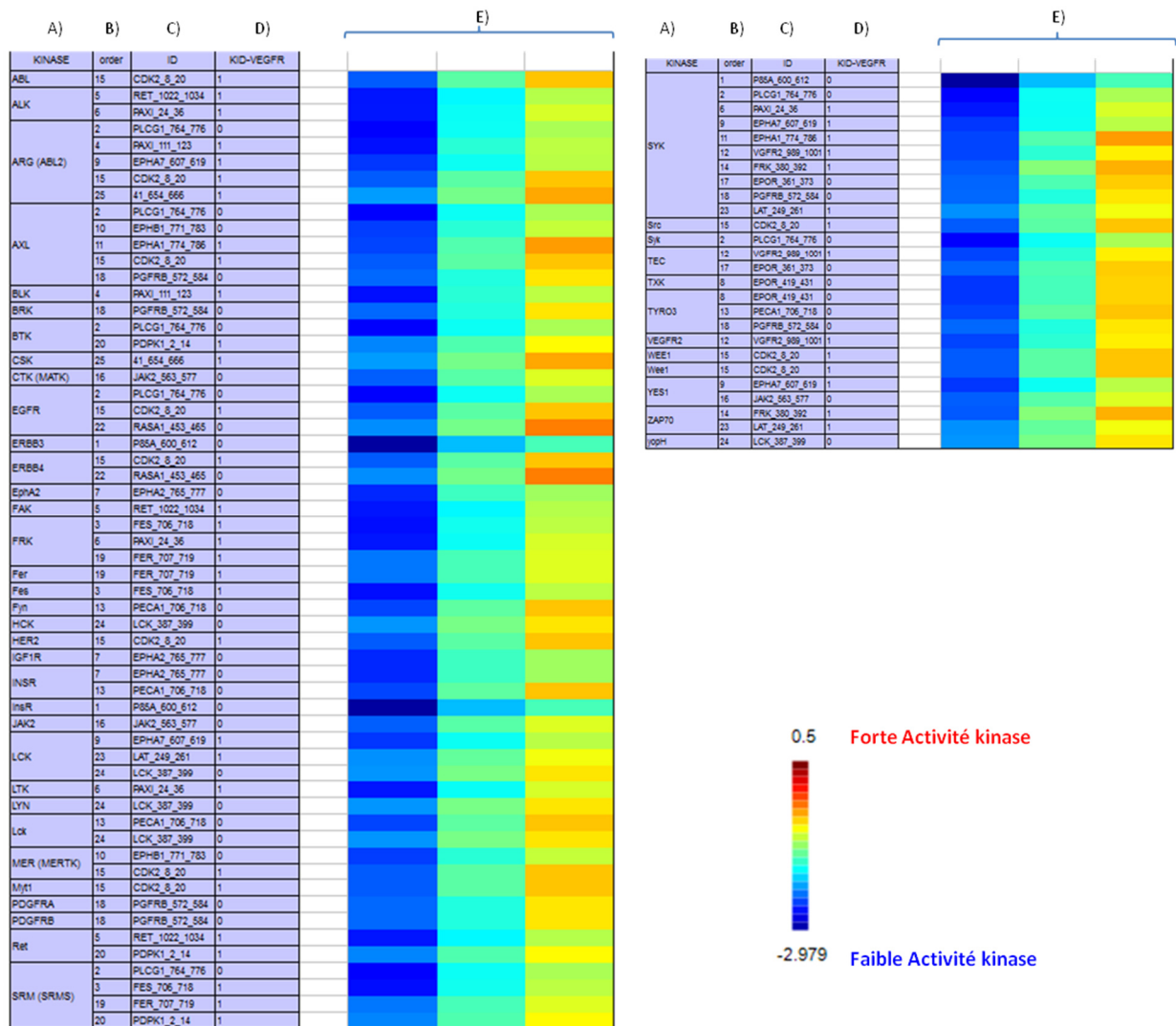


Figure 115 : profil des kinases inhibées en absence de VEGF ou en présence de 30 μ M des peptides v114* et **88**. A) Type de kinase déterminée à partir des séquences des peptides substrats à l'aide de banques de données telles que <http://www.phosphosite.org>, <http://www.reactome.org>, <http://www.kinexus.org>, KID-VEGFR database ; B) Peptide substrat ; C) Identifiant ; D) Appartenance à la voie du VEGF : 1 correspond à un peptide qui dépend de la voie du VEGF et 0 à un peptide indépendant de la voie du VEGF ; E) Pourcentage d'inhibition des kinases pour le contrôle VEGF-, le v114* et le peptide 43. Echelle : Rouge (0) : 0% d'inhibition des kinases par rapport au contrôle VEGF+, Bleu (-3) : > 75 % d'inhibition.

De façon générale, le peptide V114* ainsi que le peptide bi-cyclique **88** inhibent la phosphorylation des mêmes peptides substrats et par conséquent les mêmes kinases. L'effet observé pour le peptide **88** est cependant légèrement plus faible que pour le peptide de référence v114* (Il est important de noter que l'échelle choisie pour la représentation des résultats est une échelle logarithmique de base 2, ce qui facilite la visualisation de faibles écarts de pourcentages d'inhibition).

Parmi les kinases inhibées par ces deux peptides on retrouve notamment le VEGFR2. Ceci, en accord avec les résultats obtenus en ELISA, nous confirme bien que la liaison de ces peptides sur le VEGF inhibe l'interaction VEGF/VEGFR et par conséquent bloque les voies de transductions associées.

Ces résultats, bien que nécessitant d'être confirmés, sont très encourageants et mettent bien en évidence qu'à une concentration de 30 μM , le peptide v114* ainsi que le peptide **88** ont un effet sur cellules HUVE et inhibent différentes kinases dont de nombreuses dépendantes de la voie du VEGF. L'appareil étant actuellement en prêt à l'hôpital Cochin (unité pharmacocinétique et pharmacochimie), une poursuite de cette étude est envisagée.

De plus, il est très intéressant et surtout valorisant de noter que, malgré les modifications chimiques réalisées, le peptide bi-cyclique de 15 acides aminés **88** a un effet très similaire au peptide de référence v114*.

5.3 Etude de la stabilité des peptides en présence de protéinase K

Les différentes modifications chimiques du peptide v114* réalisées dans ce chapitre pouvant avoir un effet sur la résistance aux peptidases, un test de stabilité a été développé.

En s'appuyant sur les travaux de Gellman ²⁰⁹, ce test utilise la protéinase K qui est une peptidase modèle connue pour être agressive et surtout ne pas avoir de site de coupure spécifique. Le principe de ce test repose sur la quantification par HPLC du pourcentage de peptide restant après mise en contact avec la protéinase K. Afin de déterminer un temps de demi-vie et donc de pouvoir comparer la résistance des différents peptides, plusieurs mesures sont effectuées au cours du temps.

La mise au point de ce test a été effectuée sur le peptide de référence **63** (Figure 116). Différentes gammes de concentration en peptide ainsi qu'en protéinase K ont été testées afin d'optimiser la visibilité sur les chromatogrammes HPLC et la valeur du temps de demi-vie du peptide de référence ($t_{1/2}$).

Ne connaissant pas l'effet des modifications effectuées sur la stabilité des peptides, nous avons choisi une concentration en protéase K de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ donnant un $t_{1/2}$ de 5,53 min pour le peptide **63**. Ce $t_{1/2}$ présente différents avantages. Cette valeur est suffisamment importante pour pouvoir déterminer, avec précision et en minimisant l'erreur de la mesure expérimentale, des variations faibles de $t_{1/2}$ mais également pas trop élevée pour pouvoir réaliser de longues expériences, en cas de gain de stabilité, sans risquer que la protéase ne se dégrade.

En conclusion, après différentes étapes d'optimisation ([peptide], [protéase K], gradient HPLC), les peptides ont été testés à 100 μM en présence de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de protéase K dans du tampon TBS (pH = 7,5) avec 1% de DMSO.

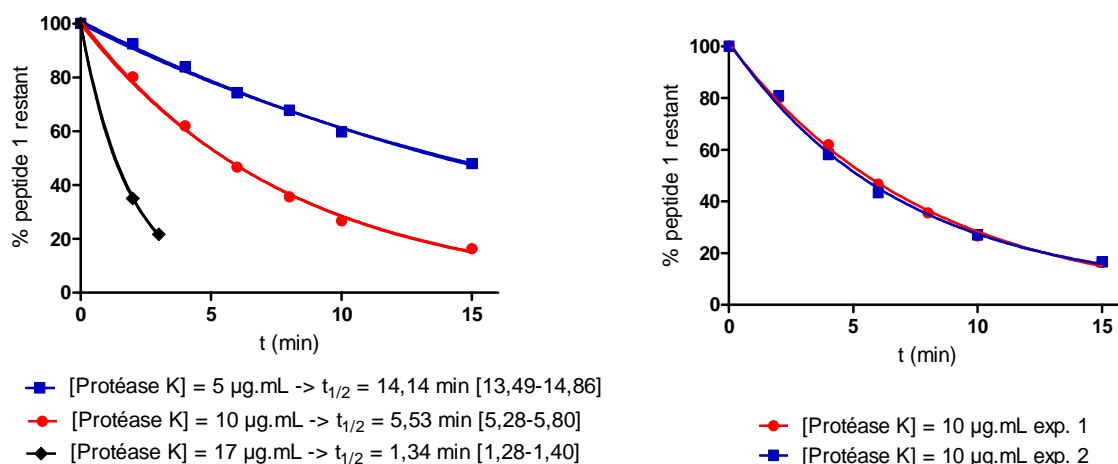


Figure 116 : optimisation des conditions du test de résistance aux protéases. A gauche : détermination de la concentration en Protéase K. A droite : validation de la reproductibilité du test.

Après avoir optimisé les conditions et vérifié la reproductibilité du test, l'ensemble des peptides synthétisés ont été testés. Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de différences significative de stabilité entre le peptide v114*, le peptide **63** ainsi que les autres dérivés (Différence de $t_{1/2}$ < 15%). Seul le peptide **68** (possédant un groupement aromatique en position N-terminale) s'est avéré légèrement différent. Cependant, dans ce cas, nous n'avons pas obtenu un gain mais perte de résistance ($t_{1/2}$ (Pep.**63**) = 6,43 min [5,56-7,65] et $t_{1/2}$ (Pep.**68**) = 2,97 min [2,70-3,31]).

Le peu de différence de stabilité entre le v114* et l'ensemble des dérivés synthétisés (raccourcissement de la séquence, introduction de résidus non naturels, modification de la taille et nature du cycle, contrainte et stabilisation de l'hélice α par un pont lactame) peut probablement être expliqué par le site de coupure principal de cette enzyme. Gellman et son équipe ont mis en évidence que la protéase K clivait le peptide v114* principalement entre la norleucine 10 et le tryptophane 11.²⁰⁹ Par conséquent, il ne semble pas anormal que nous n'ayons pas obtenu de réel gain de stabilité.

Sachant que le tryptophane est indispensable pour l'interaction avec le VEGF et semble donc difficile à muter sans perdre d'activité, une perspective intéressante serait de modifier la norleucine pour gagner en stabilité. Une première possibilité serait de remplacer cet acide aminé par son analogue D (non reconnu par les protéases). Cependant, Giralt et son équipe ont mis en évidence sur le peptide v107 que la mutation de méthionine L (remplaçant la norleucine) en méthionine D induisait une perte importante de l'affinité.²⁰⁷ Dans ce contexte, il semble difficile d'envisager d'effectuer cette mutation. Une seconde possibilité serait de remplacer la norleucine par un résidu non naturel présentant une chaîne latérale plus longue et portant une fonction polaire. Cela permettrait donc potentiellement de gagner en affinité (*cf. étude structure RX*) mais également en stabilité.

III. Conclusion

Le développement d'inhibiteurs ciblant spécifiquement le VEGF circulant présente de nombreux avantages : spécificité de la réponse, cible extracellulaire, et réduction de la perméabilité membranaire pouvant permettre une meilleure action d'autres agents thérapeutiques anticancéreux.

Dans ce contexte, et en s'appuyant sur la structure connue d'un peptide cyclique de 19 acides aminés, le v114*, nous avons initié une étude de relation structure activité afin de développer de nouveaux peptides et peptidomimétiques de structures plus simples tout en conservant ou optimisant l'activité du peptide de référence. Différentes modifications incluant le raccourcissement de la séquence, l'introduction de résidus non naturels, la variation de la nature et de la taille du cycle, ainsi que l'introduction d'un second cycle afin de stabiliser la conformation en hélice α ont été réalisées.

Nous avons ainsi obtenu une variété de peptides de 14 et 15 acides aminés ayant des affinités pour le VEGF comprises entre 36 μ M pour le peptide monocyclique le moins affiné et 54 nM pour le peptide bi-cyclique le plus affiné.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont donc très prometteurs et offrent de nombreuses ouvertures et perspectives pour améliorer encore l'affinité et la stabilité conformationnelle, ainsi que la stabilité vis-à-vis des protéases : contraction de la taille du cycle disulfure, poursuite de l'étude sur la nature de la cyclisation, incorporation de nouveaux acides aminés non naturels, introduction de nouveaux cycles pour stabiliser la conformation en coude d'une partie du peptide, formation de pont lactames éventuellement supplémentaires, et synthèses de dérivés de nature de moins en moins peptidique.

De plus, les peptides synthétisés ouvrent également de nombreuses possibilités d'études supplémentaires. En effet, ces peptides composés ou non de résidus non-naturels apparaissent comme des outils de choix pour l'étude de l'interaction du VEGF avec le récepteur : développement d'inhibiteurs covalents par photochimie, développement d'un nouveau test de criblage pour identifier de nouveaux inhibiteurs se fixant au VEGF au niveau de la zone de reconnaissance du récepteur par RMN du fluor, et fonctionnalisation en position N-terminale pour concevoir des nouveaux outils pour l'imagerie.

Enfin, ces résultats, appuyés, d'une part par la structure cristallographique du complexe entre le peptide **88** et le VEGF et d'autre part par des mesures de dichroïsme circulaire et d'ITC, nous ont également permis de confirmer, caractériser et mieux appréhender le mode d'interaction des peptides tels que le v114* ou d'autres analogues avec le VEGF.

Conclusions et perspectives

Les interactions protéine-protéine jouent un rôle clé dans divers processus biologiques et offrent par conséquent de nombreuses opportunités en chimie médicinale. Cependant malgré cet attrait, le développement de molécules capable de moduler une interaction protéine-protéine reste un aujourd'hui un défi scientifique important. En effet, de nombreux facteurs limitant tels que la surface généralement plane et étendue des zones de contact, le manque de molécules de départ ou encore la difficulté de distinguer une réelle fixation des petites molécules sur les protéines d'artefacts de liaison, rendent difficile la conception de nouveaux inhibiteurs.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au système VEGF/VEGFR, qui est connu pour jouer un rôle primordial dans l'angiogenèse et le développement tumoral. Trois principaux axes de recherche ont été développés (Figure 117). Deux premières approches de synthèse ont été initiées dans le but de concevoir de nouveaux inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR. La troisième approche développée s'inscrit, quand à elle, dans une démarche plus fondamentale d'étude du mécanisme de régulation de cette interaction par les métaux.

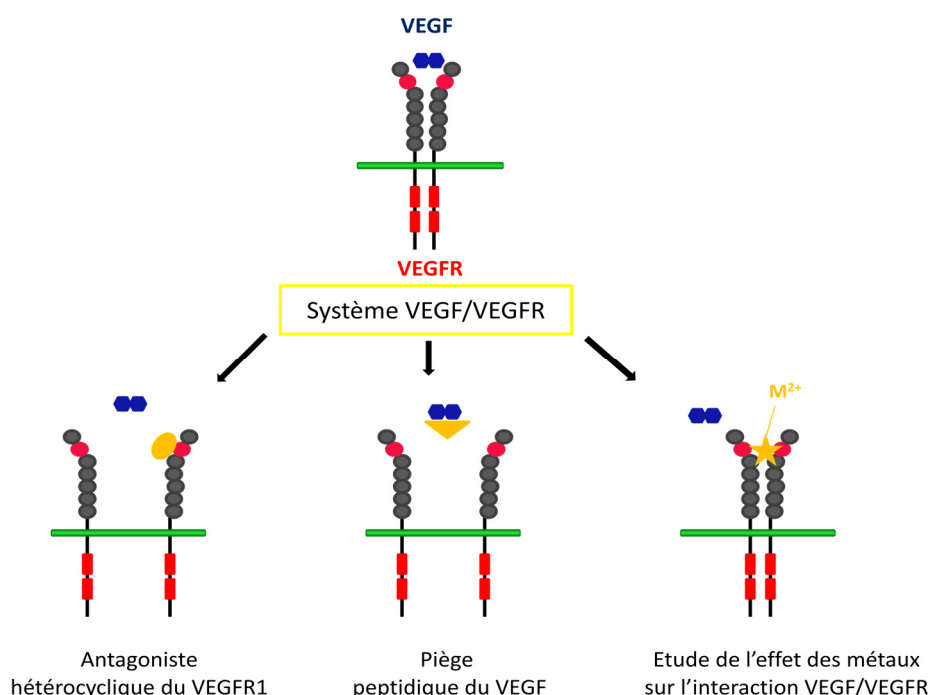


Figure 117: Approches développées autour de l'axe VEGF/VEGFR

Dans le cadre du développement de nouveaux inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR, la première stratégie initiée visait à concevoir de nouveaux antagonistes du VEGFR1 à partir de la structure d'un

composé hétérocyclique identifié par criblage *in silico*. Cependant, une première limitation est vite apparue. Synthétisé à nouveau suivant une nouvelle voie de synthèse, ce composé de référence s'est révélé inactif et incapable de fixer le récepteur. Suite à cette constatation, une analyse comparative de ces deux lots de composés a été mise en œuvre et a permis de montrer que l'activité du premier lot de composé était due à la présence d'impuretés. Bien que nous n'ayons pu déterminer leur nature exacte, nous avons montré que ces impuretés n'interagissent à priori pas directement avec le récepteur. Cependant, elles ont un effet sur la molécule. En effet, alors que pur, le composé ne peut se lier au récepteur, en présence d'impureté(s) il est capable de perturber l'interaction VEGF/VEGFR1. Bien que des analyses complémentaires restent à réaliser, différentes hypothèses prenant en compte des problèmes d'agrégation, de solubilité ou de conformations ont été exposées pour expliquer ce résultat. En parallèle de cette étude, divers composés hétérocycliques ont été synthétisés par réaction de chimie click catalysée au cuivre. Nous avons ainsi obtenu des composés semblant bloquer la fixation du VEGF sur le récepteur. Cependant, l'analyse approfondie de ces composés nous a conduits à découvrir que la capacité de ces molécules à bloquer *in vitro* l'interaction ciblée était en réalité due à la présence de cuivre résiduelle provenant de notre voie de synthèse. Cette dernière constatation, bien que limitant le développement d'une petite molécule antagoniste des récepteurs au VEGF, nous a conduit à développer un nouvel axe de recherche consistant à étudier l'effet des métaux sur l'interaction VEGF/VEGFR et donc leur rôle dans la régulation de l'angiogenèse. Donc, malgré des réactivités chimiques intéressantes, cette première approche ne s'est pas révélée concluante en termes de pharmacochimie. Celle-ci a ainsi confirmé les difficultés décrites pour identifier et concevoir des petites molécules ciblant une interaction protéine-protéine. Les principales limitations rencontrées au cours de cette première approche étant dues à des problèmes de reproductibilité, d'artefacts et de faux positifs, ces observations mettent en avant la nécessité de réaliser des expériences contrôlées adéquates et de conserver un sens critique lorsque l'on développe de nouveaux composés biologiquement actifs.

La seconde stratégie initiée pour développer des inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR a eu pour objectif de concevoir de nouveaux peptides et peptidomimétiques ciblant le VEGF circulant. En s'appuyant sur la structure connue d'un peptide cyclique, nous avons initié une étude de relation structure activité. Différentes approches incluant la modification de la séquence d'origine, la variation de la nature et de la taille du cycle, ainsi que la stabilisation de la conformation en hélice α ont été réalisées. Ces modifications nous ont permis non seulement d'obtenir de nouveaux peptides capables de se lier au VEGF mais également, grâce à différentes études structurales, d'approfondir nos connaissances sur le mode d'interaction de ces peptides avec leur cible. Les résultats obtenus lors de cette étude sont très prometteurs et offrent de nombreuses ouvertures et perspectives pour améliorer encore l'affinité, la stabilité conformationnelle, ainsi que la stabilité vis-à-vis des protéases de ces peptides. A court terme, différentes modifications ponctuelles ont été envisagées :

- Contraction de la taille du cycle
- Modification de la nature de la cyclisation
- Incorporation d'acides aminés non naturels
- Formation de pont lactames supplémentaires
- Introduction de nouveaux cycles pour stabiliser la conformation en coude de l'autre partie du peptide.

A plus long terme, et afin d'augmenter considérablement leurs stabilités et ainsi pouvoir envisager de les utiliser en thérapeutique, une perspective serait de conserver l'organisation tridimensionnelle de ces peptides mais de se rapprocher de la structure de petites molécules organiques, tout en conservant bien sur leur spécificité d'action. Enfin, en dehors du cadre de développement de médicaments potentiels, ces différents peptides pourraient être utilisés comme des outils de choix pour l'étude de l'interaction du VEGF avec le récepteur. Différentes possibilités telles que le développement d'un nouveau test pour identifier des inhibiteurs potentiels se fixant au VEGF (RMN du fluor), le marquage de ces peptides pour concevoir des nouveaux outils pour l'imagerie ou encore le développement d'inhibiteurs covalents par photochimie ont été envisagées.

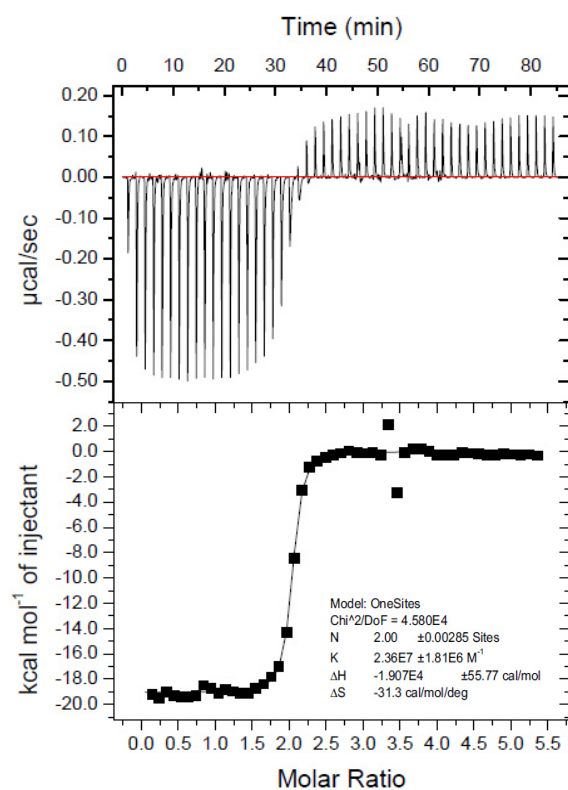
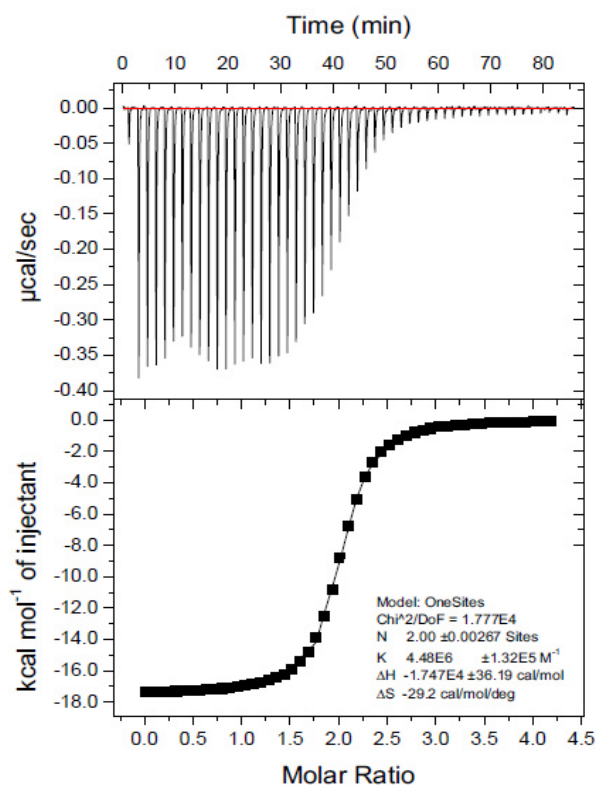
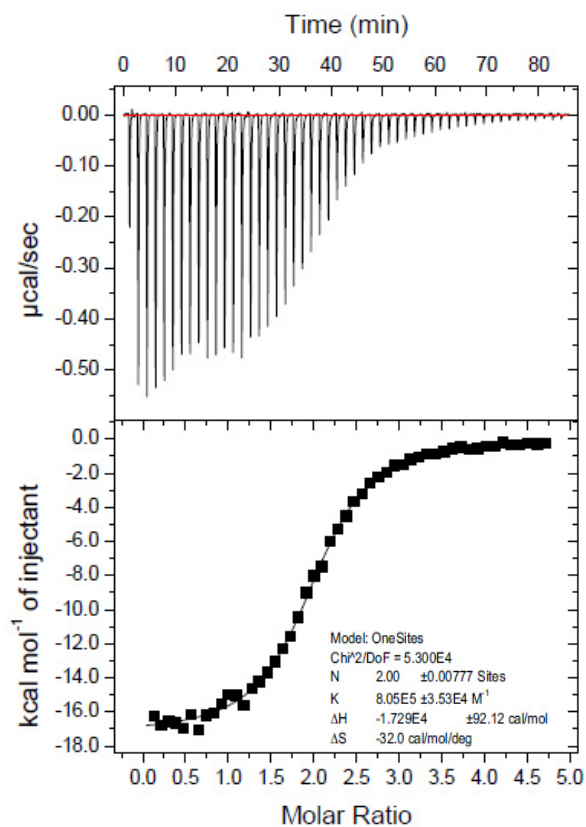
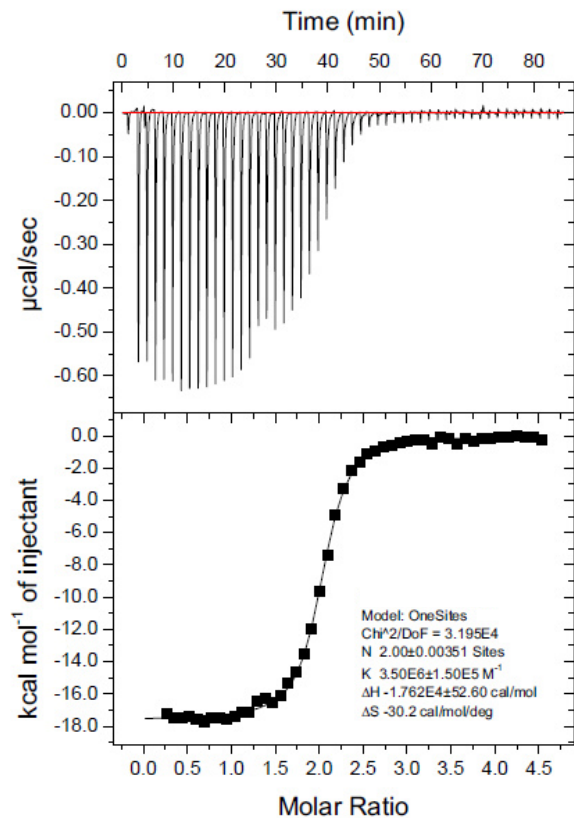
Suite à la découverte du pouvoir inhibiteur du cuivre sur l'interaction VEGF/VEGFR1 et sachant que les métaux sont connus pour jouer un rôle important dans l'angiogenèse, la dernière approche a été d'étudier l'effet du cuivre ainsi que plus généralement de différents ions métalliques sur l'interaction VEGF/VEGFR et donc sur l'angiogenèse. Au travers de différentes expériences, réalisées au laboratoire ainsi qu'en collaboration, nous avons montré que le cuivre et d'autres métaux divalents étaient capables non seulement d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1 mais également d'induire une dimérisation du domaine d2 du VEGFR1. Ces résultats, reliés aux données de la littérature, apportent de nouveaux éléments de réponse sur le mécanisme d'action des métaux. Cependant, afin de valider les hypothèses faites lors de cette étude, différentes expériences cellulaires sont nécessaires et devront être réalisées afin de vérifier par exemple la spécificité d'action de ces métaux pour le VEGFR1 ou encore l'activation préférentielle de la voie du VEGFR2 en présence de cuivre. Si ces différentes données sont validées, cette découverte permettrait d'imaginer de nouveaux agents thérapeutiques basés sur des chélatants de métaux. L'étude des mécanismes régulant l'angiogenèse est une approche plus fondamentale que les premières développées au cours de cette thèse. Cependant, une meilleure connaissance des mécanismes moléculaire impliqués dans le développement tumoral est également un aspect fondamental de la recherche de nouveaux traitements thérapeutiques.

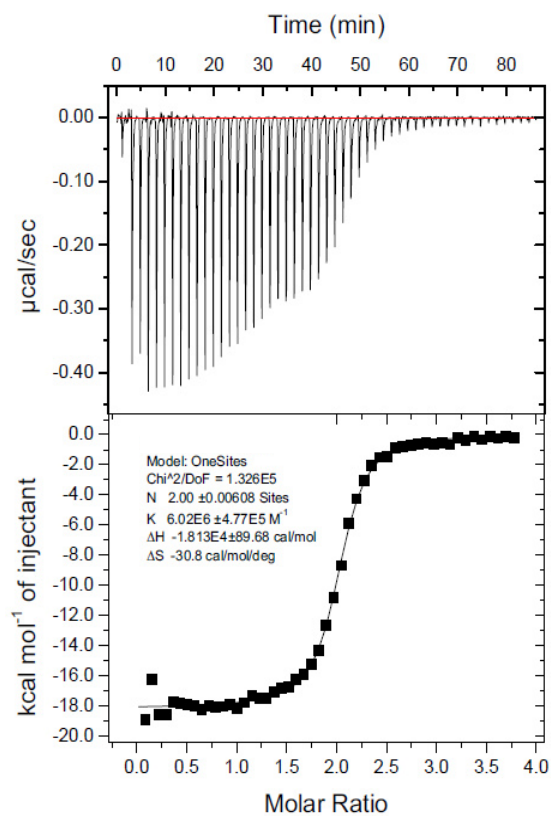
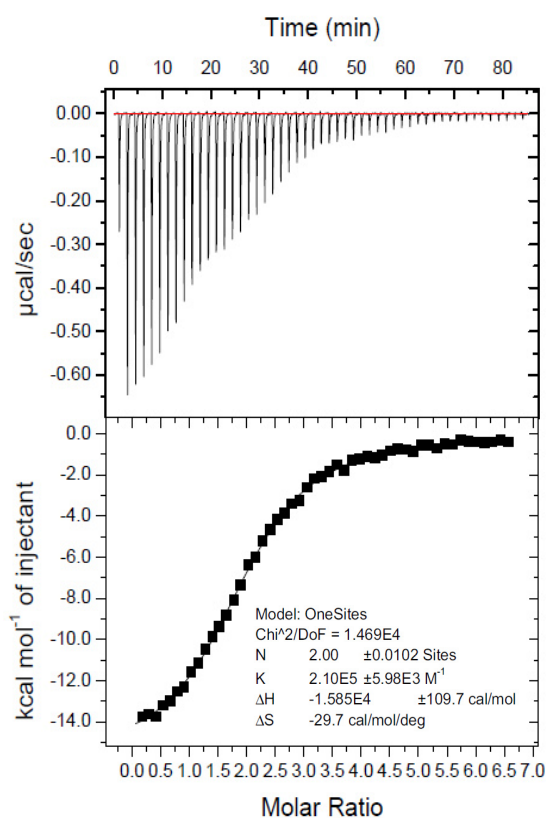
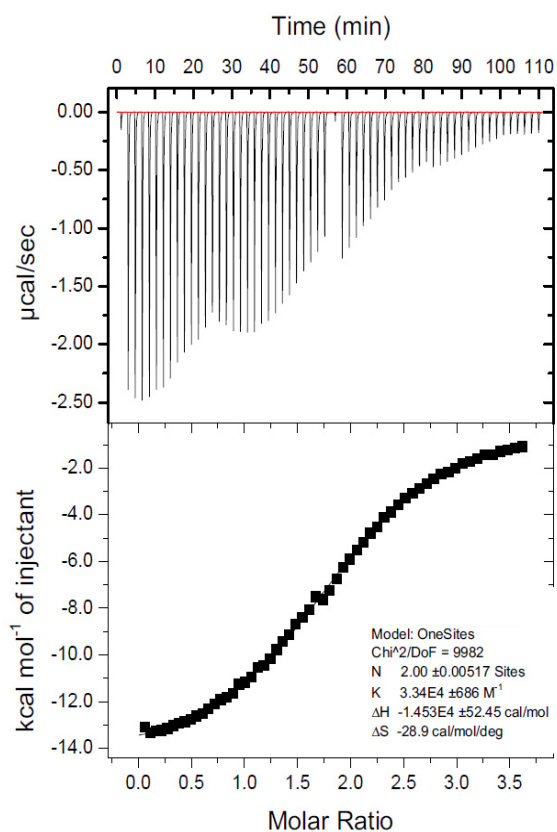
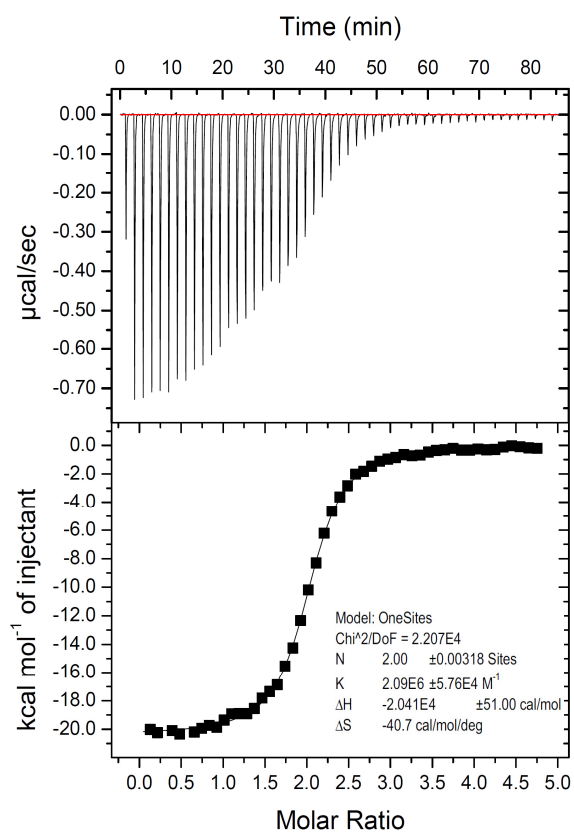
En conclusion, ce travail de thèse, inscrit entre la chimie et la biologie, ouvre de nombreuses pistes d'études telles que le développement de composés chimiques, l'étude des effets biologiques des métaux et des molécules synthétisées ou encore le développement de nouveaux outils pour étudier l'interaction VEGF/VEGFR.

Annexe 1 : Résultats ITC

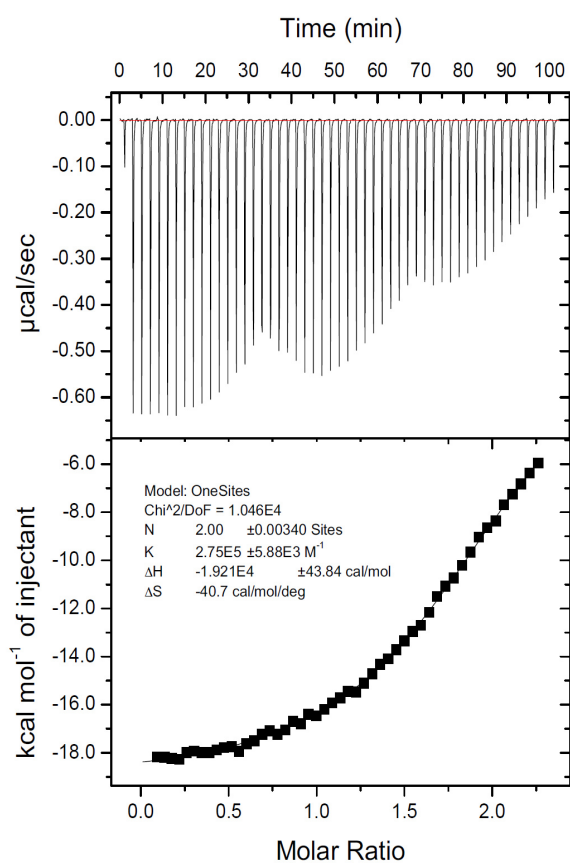
Ref.	Sequence	Kd	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔS (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
v114*	VEPN CDIHVⁿLWEWEC FERL-NH ₂ 	40 ± 3 nM	-18,7 ± 0,5	-29,4 ± 1,5
63	CDIHVⁿLWEWEC FERL-NH ₂ 	228 ± 50 nM	-17,7 ± 0,2	-29,8 ± 0,4
64	CDIHVⁿLWEWEC FER-NH ₂ 	1,1 ± 0,2 μM	-17,5 ± 0,3	-32,5 ± 0,5
67	CDIHVⁿLWEWEC FERL-NH ₂	256 ± 31 nM	-17,6 ± 0,1	-30,0 ± 0,2
68	CDIHVⁿLWEWEC FERL-NH ₂	179 ± 12 nM	-18,5 ± 0,3	-32,1 ± 0,7
76	CDIHVⁿLWEWEhC FER-NH ₂ 	5,1 ± 0,4 μM	-15,9 ± 0,1	-29,9 ± 0,2
77	hCDIHVⁿLWEWEhC FER-NH ₂ 	30 μM	-14,5	-28,9
73	CDIHVⁿLWEWEC FER-NH ₂	0,46 ± 0,02 μM	-20,7 ± 0,3	-41,6 ± 0,9
74	CDIHVⁿLWEWEhC FER-NH ₂	3,4 ± 0,3 μM	-19,1 ± 0,2	-40,1 ± 0,7
75	hCDIHVⁿLWEWEhC FER-NH ₂	36 μM	-17,4	-39,2
87	CDIHVⁿLWEWEC FEKL-NH ₂ 	173 ± 5,8	-16,4 ± 0,4	-25,1 ± 1,3
88	CDIHVⁿLWEWEC FEKL-NH ₂	54 ± 3	-14,9 ± 0,3	-17,5 ± 1,0
89	CDIHVⁿLWEW KCFEEL-NH ₂ 	312 ± 50	-15,7 ± 0,1	-23,7 ± 0,7
90	CDIHVⁿLWEW KCFEDL-NH ₂ 	81 ± 1	-18,3 ± 0,3	-29,8 ± 0,9
91	CDIHVⁿLWEWDC FEKL-NH ₂ 	118 ± 0,7	-18,0 ± 1,1	-29,8 ± 4,4

Tableau récapitulatif des valeurs des paramètres thermodynamiques obtenus par ITC. Les valeurs présentées dans ce tableau correspondent aux moyennes calculées à partir de plusieurs expériences indépendantes. (Valeurs présentées dans le chapitre 3)

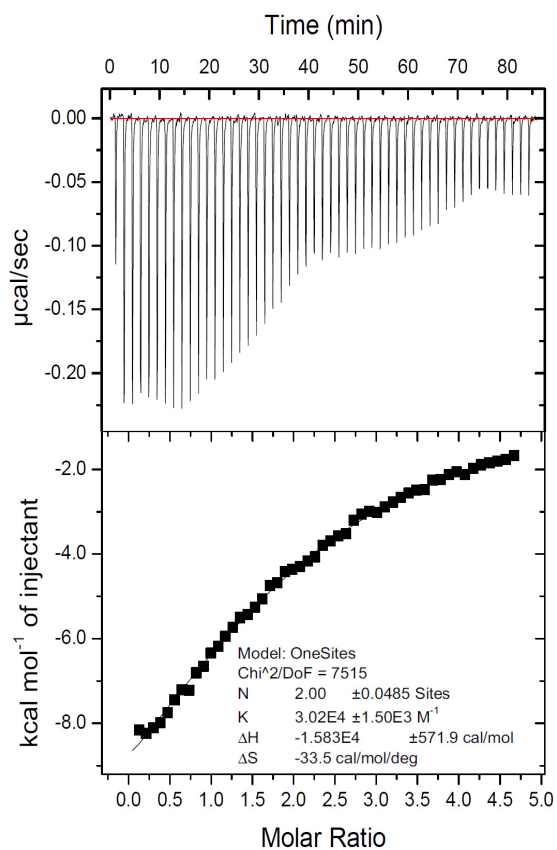
Peptide v114***Peptide 63****Peptide 64****Peptide 67**

Peptide 68**Peptide 76****Peptide 77****Peptide 73**

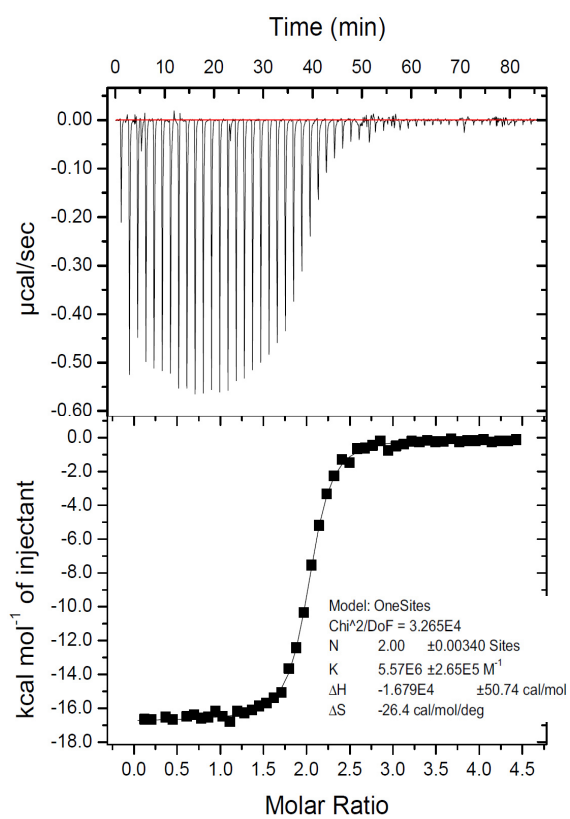
Peptide 74

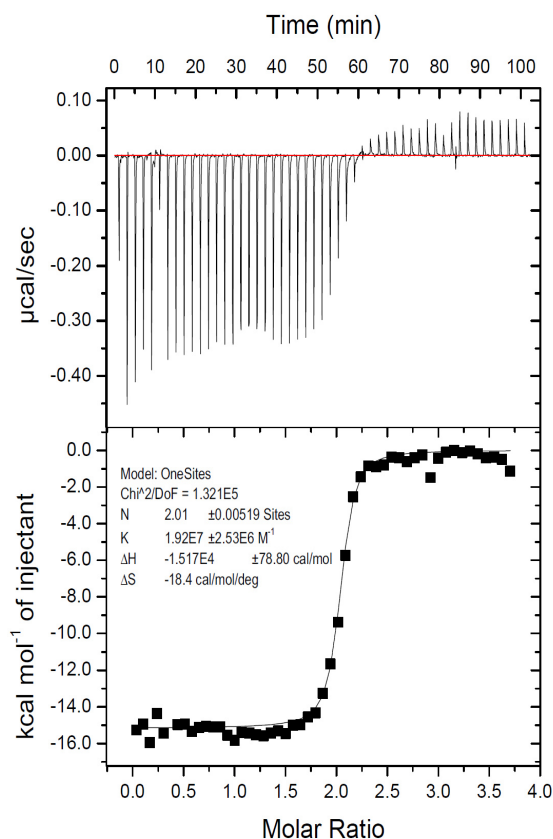
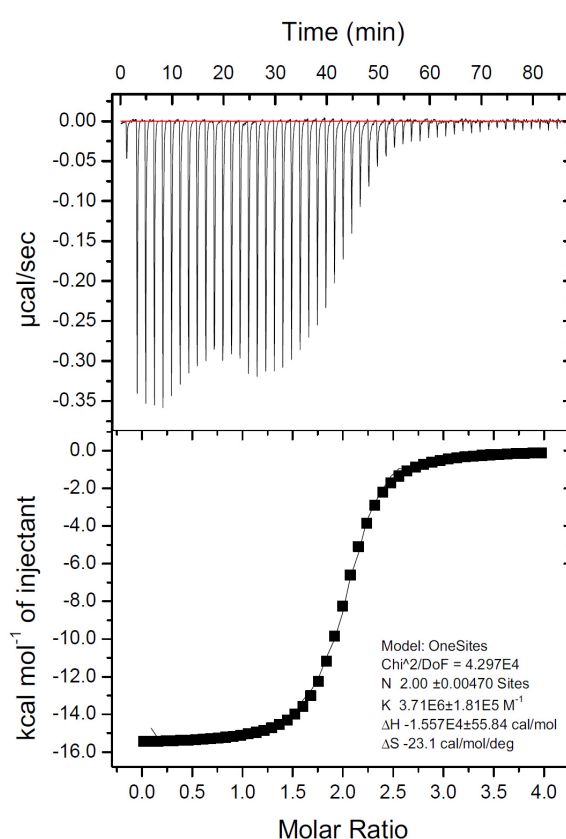
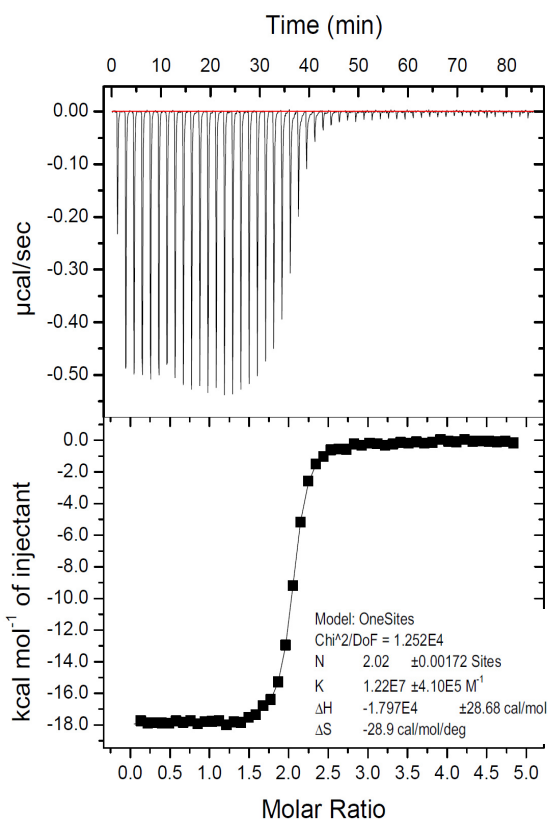
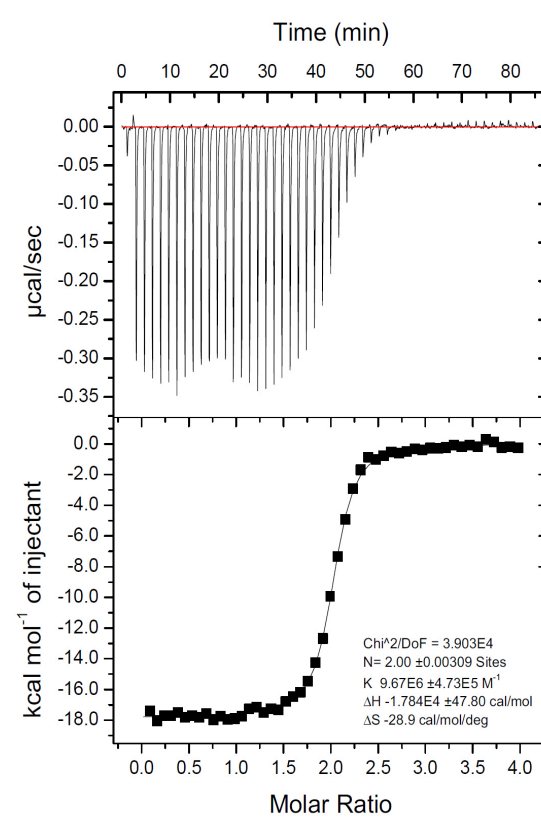


Peptide 75



Peptide 87

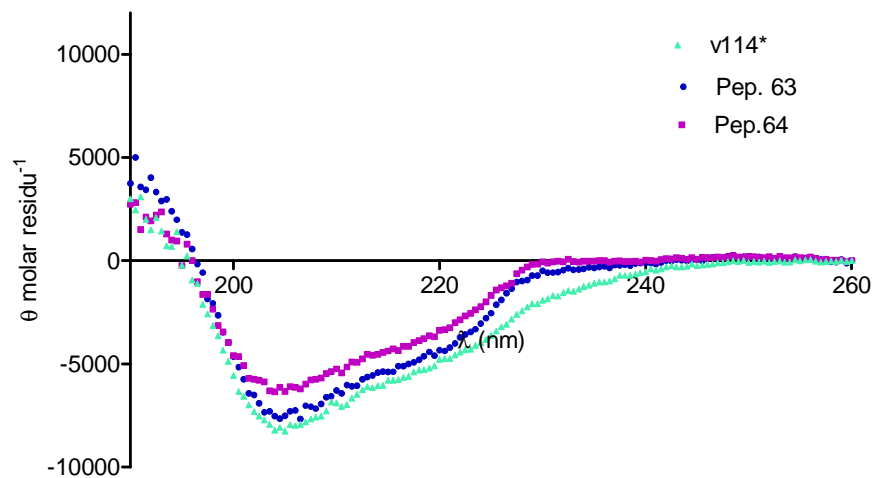


Peptide 88**Peptide 89****Peptide 90****Peptide 91**

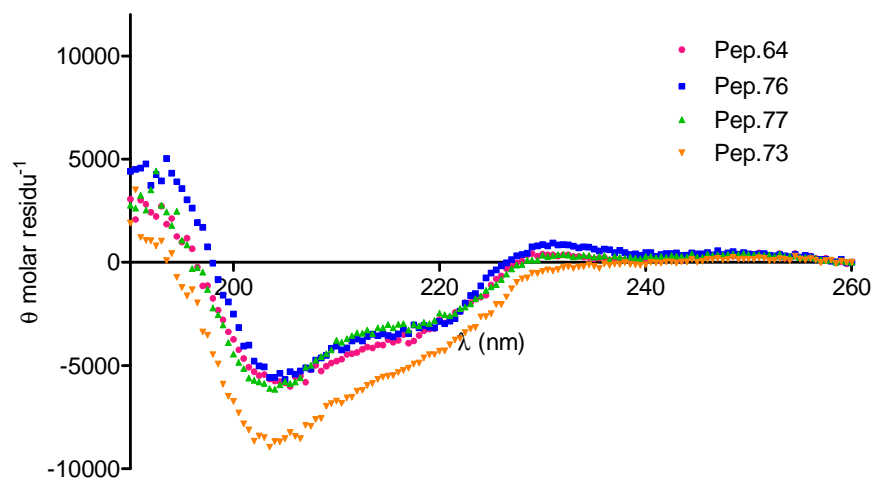
Annexe 2 : Résultats dichroïsme circulaire

I. Courbes expérimentales

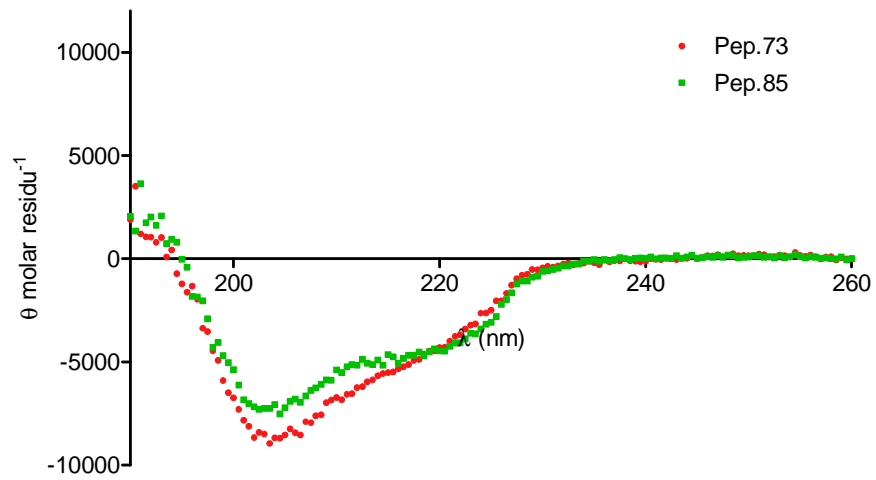
Raccourcissement de la séquence



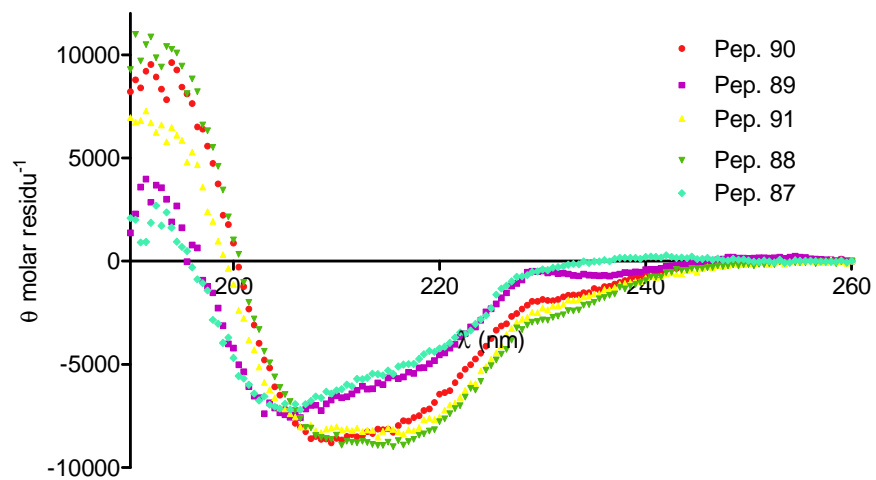
Variation de la taille du cycle



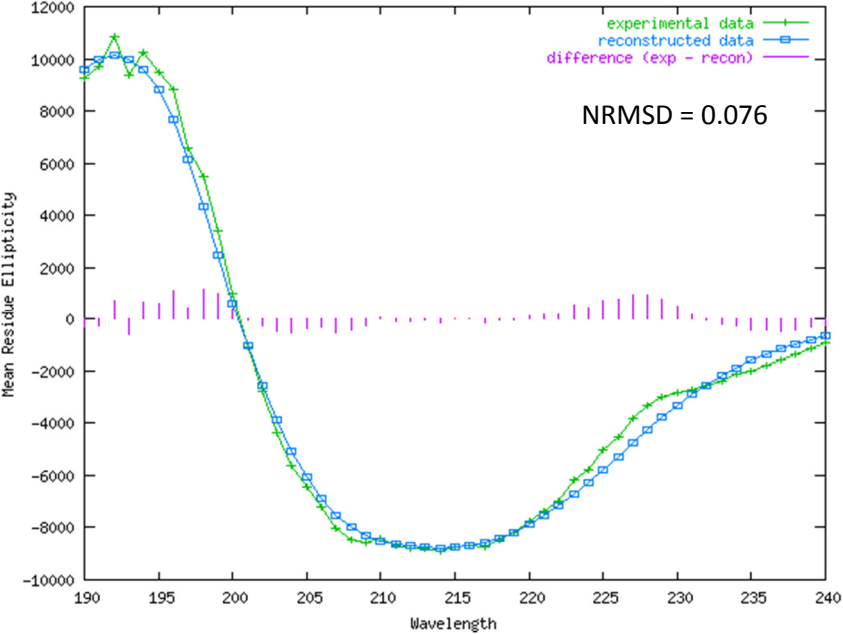
Variation de la nature du cycle



Stabilisation de l'hélice α : série bicyclique



II. Exemple de courbe obtenue après déconvolution : Peptide 88



Partie expérimentale

Part 1: sr4321 and analogs

Only the sr 4321 analogs prepared for the Structure-Activity Relationship are described in this experimental part. The other organic compounds synthesized for the methodological study are presented in the article 2 (*Synthesis* **2013**, 45, 479-490).

General remarks

The reagents were purchased from Aldrich, Alfa Aesar, Fluka or Acros. The solvents used for the synthesis (anhydrous or not) were purchased from SDS Carlo-Erba and the NMR solvents from Eurisotop.

Organic reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) on 0.25 mm silica gel 60-F plates (EM Reagents). The developed chromatogram was visualized by fluorescence. Flash column chromatography was performed on silica gel chromatography with 32–64 mesh silica.

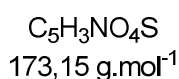
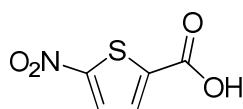
NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer (250, 300, 400 or 500 MHz), and were internally referenced to residual protonated solvent signals. The abbreviations used for signal multiplicity are the following: s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet or massif). The annotation br is used when signals are broad. Mass spectrometry spectra were recorded on a Waters ZQ 2000 spectrometer. High Resolution mass spectra were recorded on a Bruker MicrO-Tof-Q 2 spectrometer at CRMPO (Rennes, France). Melting points were determined with a Köfler apparatus or were measured on a Stuart SMP3 melting point apparatus. Optical rotations were measured at 20°C with a Perkin-Elmer Model 341 polarimeter, in a 10 cm, 1 mL cell. Infrared spectra were recorded with a Nicolet 510 FT-IR spectrometer.

Thiophene synthesis

The synthesis pathway is adapted from the procedure described by Dervan et al. (*Helvetica Chimica Acta*, **2002**, 85, 4485-4517).

5-nitrothiophene-2-carboxylic acid 51

A solution of NaO₂Cl (5.27 g, 58.2 mmol) and Na₂HPO₄ (6.22 g, 43.8 mmol) in H₂O (50 ml) was added dropwise to a solution of a 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde (1.00 g, 6.36 mmol) in acetone (120 ml) at room temperature. Then, the reaction mixture was stirred at room temperature. After TLC analysis showed total consumption of the starting aldehyde, the mixture was washed with cyclohexane (20 ml) and filtered through cotton. The solution was acidified to pH 2 with HCl 1.2N and extracted with Et₂O. The combined organic extracts were dried over magnesium sulfate (MgSO₄) and concentrated under vacuum to give **51** as a beige solid (876 mg, 80 %).



¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.73 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, CH_{AR}), 8.12 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, CH_{AR}), 12.17 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 130.3 (CH_{AR}), 132.6 (CH_{AR}), 140.9 (C⁴), 154.5 (C⁴), 162.6 (C⁴).

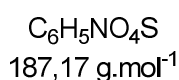
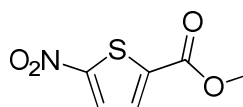
IR: ν (cm⁻¹) 3120, 2952, 2923, 2852, 1682, 1509, 1456, 1334, 1267, 905, 817, 749, 730.

MS (ESI-): *m/z* = 172 [M-H]⁻

Spectroscopic data were in agreement with those presented in the literature.

Methyl 5-nitrothiophene-2-carboxylate 52

A mixture of the compound **51** (400 mg, 2.3 mmol) in SOCl₂ (1 ml, 13.7 mmol) was refluxed for 3 h. Then, the solution concentrated under vacuum and 2 ml of methanol was added. The solution was refluxed for 3 h. Then, it was cooled and stirred at room temperature over night. After concentration under vacuum, a solution of NaHCO₃ was added. The solution was extracted with AcOEt. The combined organic extracts were dried over magnesium sulfate (MgSO₄) and concentrated under vacuum to give **52** as a beige solid (301 mg, 70 %).



¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.97 (s, 3H, CH₃), 7.71 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.89 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H, CH_{AR}).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 53.12 (CH₃), 130.0 (CH_{AR}), 131.7 (CH_{AR}), 138.7 (C⁴), 155.0 (C⁴), 161.5 (C⁴).

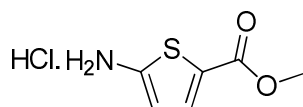
IR: ν (cm⁻¹) 3110, 1728, 1705, 1537, 1508, 1418, 1359, 1339, 1282, 1247, 1082, 1036, 845, 744, 733.

MS (ESI+): *m/z* = 194 [M+Li]⁺

Spectroscopic data were in agreement with those presented in the literature.

Methyl 5-Aminothiophene-2-carboxylate Hydrochloride 53

HCl (6 ml) was added dropwise to a solution of the compound **52** (310 mg, 1.7 mmol) and SnCl₂·2H₂O (2.51 g, 13.3 mmol) in methanol (6 ml). This addition was realized keeping the reaction temperature under 35°C. The mixture was stirred under 35°C for 2 h. Then, the methanol was evaporated and the aqueous layer was washed with cyclohexane. After wash, the aqueous layer was neutralized with 1 NaOH to pH 9. After added H₂O, the solution (white emulsion) was extracted with AcOEt. The combined organic extracts were dried over magnesium sulfate (MgSO₄) and concentrated under vacuum to give **53** as a beige solid (171 mg, 66 %).

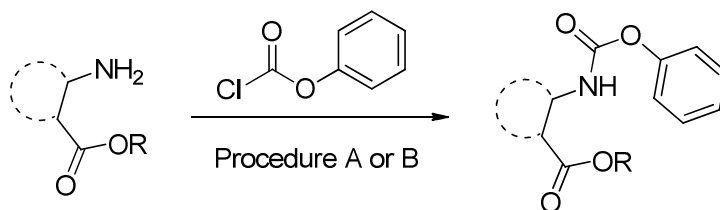


C₆H₈NO₂SCI
193,59 g.mol⁻¹

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.87 (s, 3H, CH₃), 6.11 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.47 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, CH_{AR}).

Spectroscopic data were in agreement with those presented in the literature.

Carbamate formation: General procedure

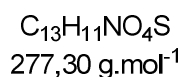
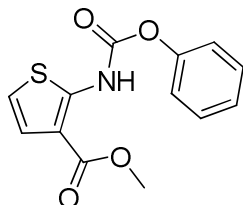


Procedure A: To a stirred solution of the appropriate amine in THF (10 mL for 2 mmol) was added phenyl chloroformate (1.1 equiv.) in one portion. The reaction mixture was stirred at room temperature until complete consumption of starting materials as monitored by TLC and then diluted with H₂O. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic extracts were washed with brine, dried over magnesium sulfate (MgSO₄) and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography on silica gel using appropriate eluent afforded the desired carbamate.

Procedure B: To a stirred solution of the appropriate amine in THF (10 mL for 2 mmol) was added phenyl chloroformate (1.1 equiv.) and NEt₃ (x equiv.) in one portion. The reaction mixture was stirred at room temperature until complete consumption of starting materials as monitored by TLC and then diluted with H₂O. The mixture was extracted with EtOAc and the combined organic extracts were washed with brine, dried over magnesium sulfate (MgSO₄) and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography on silica gel using appropriate eluent afforded the desired carbamate.

Methyl 2-[(phenoxy carbonyl) amino] thiophene-3-carboxylate 1

Prepared from methyl 2-aminothiophene-3-carboxylate on a 10.0 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 70:30) afforded **1** as a white solid (2.80 g, 100 %).



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.93 (s, 3H, CH₃), 6.76 (d, ³J_{HH} = 5.5, 1H, CH_{Ar}), 7.20-7.30 (m, 4H, 4 × CH_{Ar}), 7.43 (m, 2H, 2 × CH_{Ar}), 10.47 (br, 1H, NH).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 51.7 (CH₃), 112.4 (C⁴), 115.6 (CH_{Ar}), 121.3 (2 × CH_{Ar}), 124.3 (CH_{Ar}); 126.1 (CH_{Ar}), 129.5 (2 × CH_{Ar}), 150.1 (C⁴), 150.4 (C⁴), 151.4 (C⁴), 165.7 (C⁴).

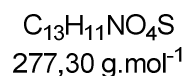
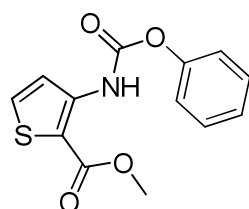
IR: ν (cm⁻¹) 3286, 2953, 2923, 1740, 1680, 1554, 1491, 1441, 1253, 1208, 1191.

Mp: 126–127 °C.

MS (ESI+): *m/z* = 300 [M+Na]⁺

Methyl 3-[(Phenoxy carbonyl) amino] thiophene-2-carboxylate 4

Prepared from methyl 3-aminothiophene-2-carboxylate on a 10.0 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 50:50) afforded **4** as a white solid (2.64 g, 95 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.92 (s, 3 H, CH₃), 7.2–7.3 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.3–7.4 (m, 2 H, CH_{Ar}), 7.48 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 7.90 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.88 (br, 1 H, NH).

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 51.9 (CH₃), 109.5 (C⁴), 121.1(CH_{Ar}), 121.4 (2 × CH_{Ar}), 125.7 (CH_{Ar}), 129.3 (2 × CH_{Ar}), 131.7 (CH_{Ar}), 144.3 (C⁴), 150.4 (C⁴), 151.2 (C⁴), 164.4 (C⁴).

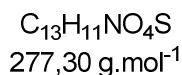
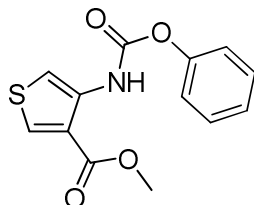
IR: ν (cm⁻¹) 3340, 2953, 1742, 1693, 1529, 1255, 1200.

Mp: 117–118 °C.

MS (ESI+): *m/z* = 316 [M+K]⁺.

Methyl 4-[(phenoxycarbonyl) amino] thiophene-3-carboxylate **5**

Prepared from methyl methyl 4-aminothiophene-3-carboxylate on a 2.0 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 50:50) afforded **5** as a white solid (437 mg, 79 %).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.94 (s, 3 H, CH₃), 7.2–7.3 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.4–7.5 (m, 2 H, CH_{Ar}), 7.68 (d, J = 3.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 8.08 (d, J = 3.5 Hz, 1 H, CH_{Ar}), 9.70 (s, 1 H, NH).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 51.8 (CH₃), 108.3 (C⁴), 121.1 (CH_{Ar}), 121.4 (2 × CH_{Ar}), 125.5 (CH_{Ar}), 129.2 (2 × CH_{Ar}), 132.6 (CH_{Ar}), 136.0 (C⁴), 150.4 (C⁴), 151.6 (C⁴), 163.9 (C⁴).

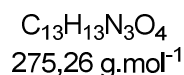
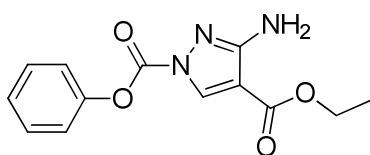
IR: ν (cm⁻¹) 3312, 2953, 1754, 1674, 1578, 1282, 1186.

Mp: 93–94 °C.

MS (ESI+): m/z = 300 [M+Na]⁺.

4-ethyl 1-phenyl 3-amino-1H-pyrazole-1,4-dicarboxylate **10**

Prepared from ethyl 3-amino-1H-pyrazole-4-carboxylate on a 1.0 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 80:20) afforded **10** as a beige solid (120 mg, 44 %).



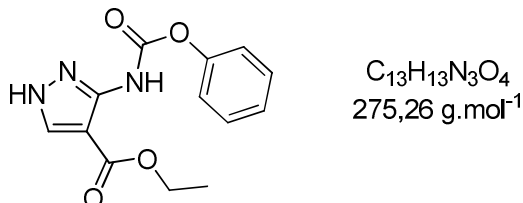
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 4.30 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 6.90 (br, 2H, NH₂), 7.26-7.34 (m, 2H, CH_{Ar}), 7.42-7.47 (m, 3H, CH_{Ar}), 7.82 (s, 1H, CH_{Ar}).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.3 (CH₃), 59.7 (CH₂), 94.7 (C⁴), 121.2 (2 × CH_{Ar}), 126.8 (CH_{Ar}), 129.6 (2 × CH_{Ar}), 144.0 (CH_{Ar}), 149.8 (C⁴), 150.2 (C⁴), 154.0 (C⁴), 164.3 (C⁴).

MS (ESI+): m/z = 276 [M+H]⁺.

Ethyl 3-[(phenoxy-carbonyl) amino]-1H-pyrazole-4-carboxylate **11**

Prepared from ethyl 3-amino-1H-pyrazole-4-carboxylate on a 1.0 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 80:20) afforded **11** as a beige solid (89 mg, 32 %).



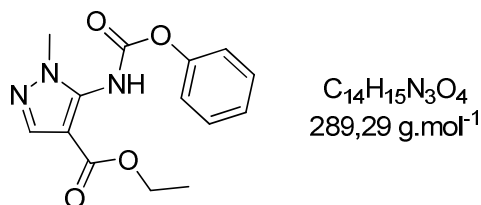
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 4.36 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 7.21-7.47 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.86 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.41 (br, 1H, NH), 9.30 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.3 (CH₃), 60.4 (CH₂), 98.8 (C⁴), 121.2 (2 × CH_{Ar}), 126.3 (CH_{Ar}), 129.5 (2 × CH_{Ar}), 138.6 (C⁴), 143.d1 (CH_{Ar}), 150.0 (C⁴), 151.4 (C⁴), 164.3 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 276 [M+H]⁺.

Ethyl 1-methyl-5-[(phenoxy-carbonyl) amino]-1H-pyrazole-4-carboxylate **15**

Prepared from ethyl 5-amino-1-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylate on a 1.0 mmol scale according to the general procedure B. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 60:40) afforded **15** as a white solid (70 mg, 24 %).



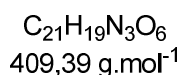
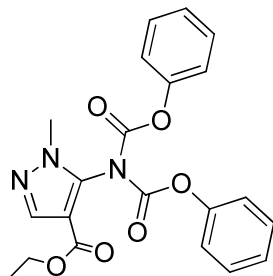
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.87 (s, 3H, CH₃), 4.32 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 7.23-7.42 (m, 5H, CH_{Ar}), 7.83 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.22 (br, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.2 (CH₃), 37.6 (CH₃), 60.3 (CH₂), 104.8 (C⁴), 121.3 (2 × CH_{Ar}), 126.0 (CH_{Ar}), 129.4 (2 × CH_{Ar}), 139.0 (C⁴), 139.4 (CH_{Ar}), 150.2 (C⁴), 151.8 (C⁴), 163.3 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 290 [M+H]⁺.

Ethyl 5-(bis (phenoxy carbonyl) amino)-1-méthyle-1H-pyrazole-4-carboxylate **16**

Prepared from ethyl 5-amino-1-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylate on a 1.0 mmol scale according to the general procedure B. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 60:40) afforded **16** as a white solid (170 mg, 42 %).

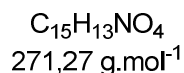
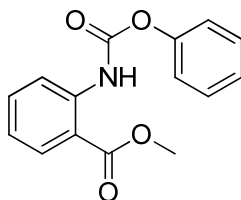


¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.96 (s, 3H, CH₃), 4.37 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 7.13-7.42 (m, 10H, CH_{AR}), 8.03 (s, 1H, CH_{AR}).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.2 (CH₃), 35.7 (CH₃), 60.5 (CH₂), 109.5 (C⁴), 120.9 (4 × CH_{AR}), 126.5 (2 × CH_{AR}), 129.5 (4 × CH_{AR}), 137.1 (C⁴), 140.6 (CH_{AR}), 148.8 (2 × C⁴), 149.9 (2 × C⁴), 161.6 (C⁴).

Methyl 2-[(Phenoxy carbonyl) amino] benzoate **19**

Prepared from methyl 2-aminobenzoate on a 2.0 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 5:1) afforded **19** as a white solid (436 mg, 74 %).



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.96 (s, 3 H, CH₃), 7.08 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, CH_{AR}), 7.2–7.3 (m, 3 H, CH_{AR}), 7.3–7.5 (m, 2 H, CH_{AR}), 7.56 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, CH_{AR}), 8.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, CH_{AR}), 8.46 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, CH_{AR}), 10.91 (br, 1 H, NH).

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 52.4 (CH₃), 114.9 (C⁴), 118.9 (CH_{AR}), 121.7 (2 × CH_{AR}), 122.1 (CH_{AR}), 125.6 (CH_{AR}), 129.3 (2 × CH_{AR}), 130.9 (CH_{AR}), 134.7 (CH_{AR}), 141.3 (C⁴), 150.5 (C⁴), 151.8 (C⁴), 168.6 (C⁴).

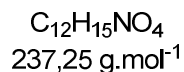
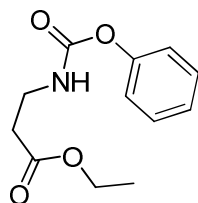
IR: ν (cm⁻¹) 3268, 2953, 1756, 1695, 1588, 1528, 1267, 1190.

Mp: 101–102 °C.

MS (ESI+): *m/z* = 294 [M+Na]⁺.

Ethyl 3-[(phenoxycarbonyl) amino] propanoate **22**

Prepared from ethyl 3-aminopropanoate on a 6.5 mmol scale according to the general procedure B. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 80:20) afforded **22** as a white solid (890 mg, 57 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.63 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 3.56 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.20 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 5.62 (br, 1H, NH), 7.12-7.40 (m, 5H, CH_{Ar}).

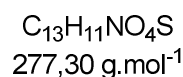
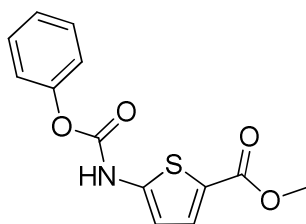
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13.6 (CH₃), 33.7 (CH₂), 36.2 (CH₂), 60.2 (CH₂), 121.2 (2 × CH_{Ar}), 124.7 (CH_{Ar}), 128.7 (2 × CH_{Ar}), 150.6 (C⁴), 154.3 (C⁴), 171.7 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3359, 3018, 2953, 2932, 1728, 1522, 1491, 1377, 1204, 754.

MS (ESI+): *m/z* = 238 [M + H]⁺.

Methyl 5-[(phenoxycarbonyl)amino]thiophene-2-carboxylate **54**

Prepared from the methyl 5-aminothiophene-2-carboxylate hydrochloride **53** on a 1.08 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: dichloromethane / cyclohexane 95:5) afforded **54** as a white solid (140 mg, 47 %).

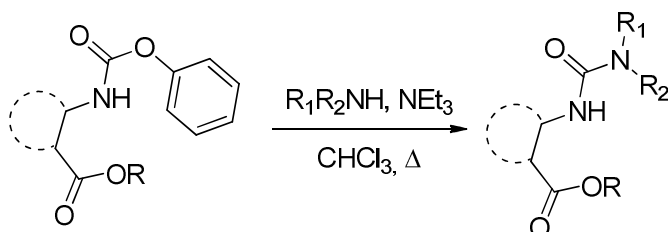


¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.77 (s, 3H, CH₃), 6.71 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.27-7.48 (m, 5H, 5 × CH_{Ar}), 7.63 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H, CH_{Ar}), 11.84 (q, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 52.3 (CH₃), 112.2 (CH_{Ar}), 116.0 (C⁴), 122.2 (2 × CH_{Ar}), 126.4 (CH_{Ar}), 130.0 (2 × CH_{Ar}), 133.3 122.2 (CH_{Ar}), 148.2 (C⁴), 150.7 (C⁴), 152.0 (C⁴), 162.8 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 300 [M+Na]⁺.

Urea formation: General procedure

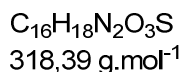
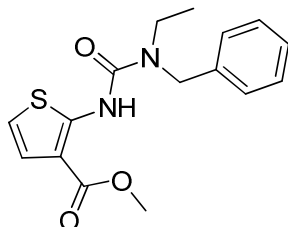


Procedure A: A mixture of carbamate (1.0 eq.), NEt_3 (3 eq.), and selected amine (1.3 eq.) in chloroform (10 mL for 1 mmol) was refluxed until complete consumption of starting materials as monitored by TLC. The cooled reaction mixture was diluted with chloroform and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was and evaporated to dryness. Purification by column chromatography on silica gel using appropriate eluent afforded the desired.

Procedure B: A mixture of carbamate (1.0 eq.), NEt_3 (3 eq.), and selected amine (2.3 eq.) in chloroform (10 mL for 1 mmol) was refluxed until complete consumption of starting materials as monitored by TLC. The cooled reaction mixture was diluted with chloroform and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ and brine. The organic phase was and evaporated to dryness. Purification by column chromatography on silica gel using appropriate eluent afforded the desired.

Methyl 2-(3-benzyl-3-ethylureido) thiophène-3-carboxylate 2

Prepared from the carbamate **1** on a 6 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 80:20) following by a crystallization (solvent: light petroleum / ethyl acetate) afforded the compound **2** as a white crystals (1.23 g, 67 %).



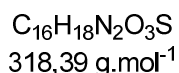
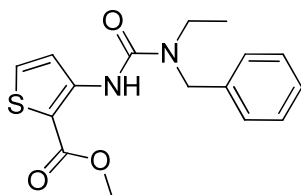
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.45 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, CH₃), 4.66 (s, 2H, CH₂), 6.63 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.15 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.28-7.39 (m, 5H, CH_{AR}), 10.81 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13.0 (CH₃), 41.7 (CH₂), 49.7 (CH₂), 51.7 (CH₃), 107.2 (C⁴), 121.8 (CH_{AR}), 127.3 (CH_{AR}), 127.4 (2 × CH_{AR}), 128.5 (2 × CH_{AR}), 131.5 (CH_{AR}), 137.6 (C⁴), 147.1 (C⁴), 153.8 (C⁴), 165.2 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 341 [M+Na]⁺

Methyl 3-(3-benzyl-3-ethylureido) thiophène-2-carboxylate 6

Prepared from the carbamate **4** on a 3.6 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 95:15) afforded the compound **6** as a white solid (1.03 g, 91 %).



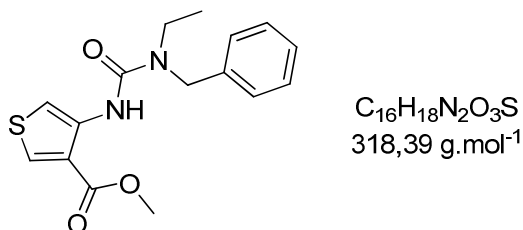
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.31 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.49 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.85 (s, 3H, CH₃), 4.69 (s, 2H, CH₂), 6.88-7.41 (m, 5H, CH_{AR}), 7.45 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH_{AR}), 8.15 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH_{AR}), 10.11 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13.0 (CH₃), 41.7 (CH₂), 49.7 (CH₂), 51.7 (CH₃), 107.2 (C⁴), 121.8 (CH_{AR}), 127.3 (CH_{AR}), 127.4 (2 × CH_{AR}), 128.5 (2 × CH_{AR}), 131.5 (CH_{AR}), 137.6 (C⁴), 147.1 (C⁴), 153.8 (C⁴), 165.2 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 319 [M+H]⁺

Methyl 4-(3-benzyl-3-ethylureido) thiophène-3-carboxylate de méthyle 7

Prepared from the carbamate **5** on a 0.4 mmol scale according to the general procedure A of urea formation. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 90:10) afforded the compound **7** as a white solid (114 mg, 90 %).



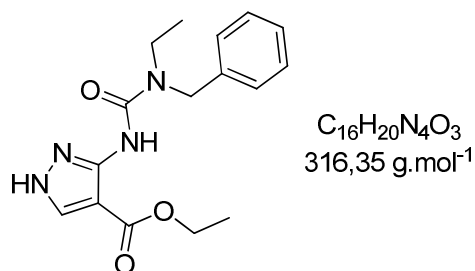
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 3.42 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.86 (s, 3H, CH₃), 4.65 (s, 2H, CH₂), 7.33-7.35 (m, 5H, CH_{AR}), 7.83 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, CH_{AR}), 8.03 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, CH_{AR}), 9.71 (br, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.9 (CH₃), 41.5 (CH₂), 49.5 (CH₂), 51.8 (CH₃), 107.0 (CH_{AR}), 121.0 (C⁴), 127.2 (CH_{AR}), 127.4 (2 × CH_{AR}), 128.4 (2 × CH_{AR}), 132.1 (CH_{AR}), 137.8 (C⁴), 137.9 (C⁴), 154.8 (C⁴), 164.7 (C⁴).

MS (ESI⁺): *m/z* = 341 [M+Na]⁺

Ethyl 3-(3-benzyl-3-ethylureido)-1H-pyrazole-4-carboxylate 12

Prepared from the carbamate **11** on a 0.33 mmol scale according to the general procedure A of urea formation. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 60:40) afforded the compound **12** as a white solid (74 mg, 54 %).



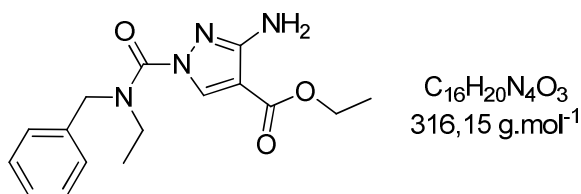
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 1.33 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.2 (m, 2H, CH₂), 4.28 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 4.63 (s, 2H, CH₂), 7.26-7.37 (m, 5H, CH_{AR}), 7.76 (s, 1H, CH_{AR}), 9.30 (s, 1H, NH), 10.77 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13.1 (CH₃), 14.4 (CH₃), 42.1 (CH₂), 49.9 (CH₂), 60.1 (CH₂), 97.0 (C⁴), 127.5 (2 × CH_{AR}), 127.7 (CH_{AR}), 128.7 (2 × CH_{AR}), 137.0 (C⁴), 139.1 (CH_{AR}), 144.6 (C⁴), 153.9 (C⁴), 165.1 (C⁴).

MS : *m/z* = 339 [M+Na]⁺

Ethyl 3-amino-1-(benzyl(ethyl)carbamoyl)-1H-pyrazole-4-carboxylate 14

Prepared from the carbamate **10** on a 0.47 mmol scale according to the general procedure A of urea formation. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 90:10) afforded the compound **14** as a white solid (72 mg, 49 %).



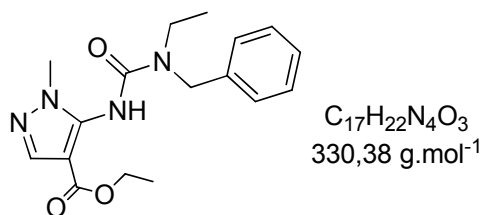
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.27 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.42 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.57 (s, 2H, NH₂), 4.31 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 6.67 (s, 2H, CH₂), 7.13-7.40 (m, 5H, CH_{AR}), 7.65 (s, 1H, CH_{AR}).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.2 (CH₃), 14.5 (CH₃), 43.5 (CH₂), 50.3 (CH₂), 59.7 (CH₂), 94.8 (C⁴), 127.6 (CH_{AR}), 127.6 (2 × CH_{AR}), 128.6 (2 × CH_{AR}), 136.8 (C⁴), 140.9 (CH_{AR}), 152.0 (C⁴), 154.4 (C⁴), 164.1 (C⁴).

MS : *m/z* = 339 [M+Na]⁺

Ethyl 5-(3-benzyl-3-ethylureido)-1-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylate 17

Prepared from the carbamate **16** on a 0.43 mmol scale according to the general procedure B of urea formation. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 60:40) afforded the compound **17** as a white solid (109 mg, 80 %).



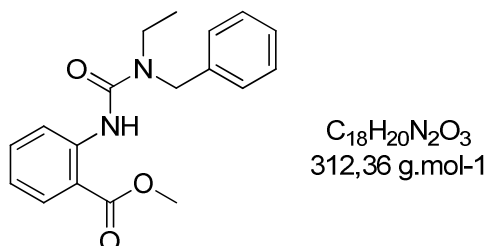
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.21-1.41 (m, 6H, 2 × CH₃), 3.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.79 (s, 3H, CH₃), 4.23 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 4.59 (s, 2H, CH₂), 7.28-7.37 (m, 5H, CH_{AR}), 7.73 (s, 1H, CH_{AR}), 7.99 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.9 (CH₃), 14.2 (CH₃), 37.8 (CH₃), 41.9 (CH₂), 49.9 (CH₂), 59.9 (CH₂), 102.5 (C⁴), 127.2 (CH_{AR}), 127.4 (2 × CH_{AR}), 128.6 (2 × CH_{AR}), 137.0 (C⁴), 138.7 (CH_{AR}), 142.3 (C⁴), 154.2 (C⁴), 164.1 (C⁴).

MS : *m/z* = 353 [M+Na]⁺

Methyl 2-(3-benzyl-3-ethylureido) benzoate 20

Prepared from the carbamate **19** on a 1 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 80:20) afforded the compound **20** as a yellow oil (290 mg, 93 %).

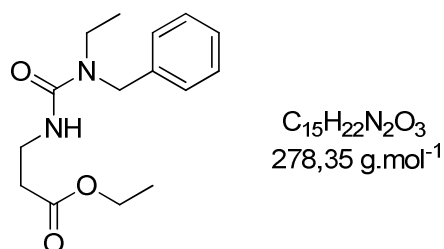


¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.18 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 3.37 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.82 (s, 3H, CH₃), 4.59 (s, 2H, CH₂), 6.7-7.0 (m, 3H, CH_{AR}), 7.1-7.4 (m, 3H, CH_{AR}), 7.44 (dd, *J* = 8.7 et 7.5 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.93 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, CH_{AR}), 8.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH_{AR}), 10.68 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 12.8 (CH₃), 41.4 (CH₂), 49.4 (CH₂), 51.8 (CH₃), 113.7 (C⁴), 119.3 (CH), 120.4 (CH), 127.2 (2 x CH), 128.2 (2 x CH), 129.0 (CH), 130.4 (CH), 134.2 (CH), 137.6 (C⁴), 143.1 (C⁴), 154.9 (C⁴), 168.8 (C⁴).

Ethyl 3-(3-benzyl-3-éthylureido) propanoate 23

Prepared from the carbamate **22** on a 0.93 mmol scale according to the general procedure B. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 70:30) afforded the compound **23** as a beige solid (140 mg, 54 %).



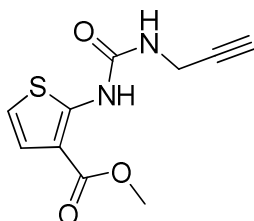
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.08 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.20 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.49 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH₂), 3.25 (q, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH₂), 3.46 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 4.07 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 4.43 (s, 2H, CH₂), 5.13 (m, 1H, NH), 7.19-7.31 (m, 5H, CH_{AR}).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 13.2 (CH₃), 14.1 (CH₃), 34.6 (CH₂), 36.3 (CH₂), 41.6 (CH₂), 49.7 (CH₂), 60.5 (CH₂), 127.0 (2 x CH_{AR}), 127.2 (CH_{AR}), 128.6 (2 x CH_{AR}), 137.9 (C⁴), 157.5 (C⁴), 172.8 (C⁴).

MS : *m/z* = 279 [M+H]⁺

Methyl 2-(3-prop-2-ynylureido)thiophene-3-carboxylate de méthyle 25

Prepared from the carbamate **1** on a 5.8 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 80:20) afforded the compound **25** as a beige solid (1.18 g, 86 %).



$C_{10}H_{10}N_2O_3S$
238,26 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.30 (s, 1H, CH), 3.90 (s, 3H, CH₃), 4.15 (s, 2H, CH₂), 5.20 (s, 1H, NH), 6.64 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, CH_{AR}), 7.14 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, CH_{AR}), 10.34 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 30.3 (CH₂), 51.5 (CH₃), 71.9 (CH), 79.4 (C⁴), 110.4 (C⁴), 114.7 (CH_{AR}), 123.5 (CH_{AR}), 151.7 (C⁴), 153.3 (C⁴), 165.6 (C⁴).

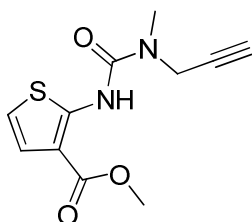
IR: ν (cm⁻¹) 3293, 2952, 2921, 1661, 1543, 1240.

Mp: 128–129 °C.

MS (ESI+): $m/z = 261$ [M+Na]⁺

Methyl 2-(3-methyl-3-(prop-2-yn-1-yl) ureido) thiophene-3-carboxylate 35

Prepared from the carbamate **1** on a 2 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 75:25) afforded the compound **35** as a white solid (369 mg, 73 %).



$C_{11}H_{12}N_2O_3S$
252,29 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.30 (s, 1H, CH), 3.19 (s, 3H, CH₃), 3.90 (s, 3H, CH₃), 4.15 (s, 2H, CH₂), 6.64 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, CH_{AR}), 7.14 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, CH_{AR}), 10.34 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 33.5 (CH₃), 51.5 (CH₃), 72.5 (CH), 78.1 (C⁴), 110.5 (C⁴), 114.7 (CH_{AR}), 123.5 (CH_{AR}), 152.2 (C⁴), 153.3 (C⁴), 166.5 (C⁴).

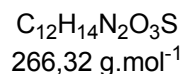
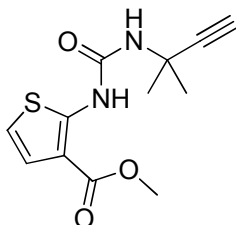
IR: ν (cm⁻¹) 3220, 2110, 1659, 1551, 1507, 1439, 1246, 1195, 706.

Mp: 110–112 °C.

HRMS (ESI+): m/z [M+H]⁺ for [C₁₁H₁₂O₃N₂S + H]⁺ calcd : 253.06414, found : 253.06415.

Methyl 2-(3-(2-methylbut-3-yn-2-yl)ureido)thiophene-3-carboxylate 37

Prepared from the carbamate **1** on a 1.8 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 90:10) afforded the compound **37** as a white solid (460 mg, 96 %).



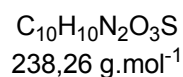
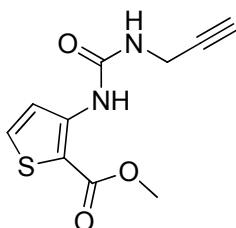
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.64 (s, 3H, CH₃), 1.72 (s, 3H, CH₃), 2.43 (s, 1H, CH), 3.87 (s, 3H, CH₃), 5.13 (s, 1H, NH), 6.63 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.14 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CH_{AR}), 10.29 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 29.5 (2 × CH₃), 47.2 (C⁴), 51.4 (CH₃), 69.9 (CH), 86.5 (C⁴), 110.1 (C⁴), 114.4 (CH_{AR}), 123.4 (CH_{AR}), 151.4 (C⁴), 152.4 (C⁴), 165.8 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 289 [M+Na]⁺

Methyl 3-(3-(prop-2-yn-1-yl)ureido)thiophene-2-carboxylate 41

Prepared from the carbamate **4** on a 0.9 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 80:20) afforded the compound **41** as a white solid (167 mg, 78 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.27 (s, 1H, CH), 3.86 (s, 3H, CH₃), 4.10 (s, 2H, CH₂), 5.51 (s, 1H, NH), 7.43 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH_{AR}), 8.01 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH_{AR}), 9.53 (s, 1H, NH).

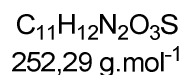
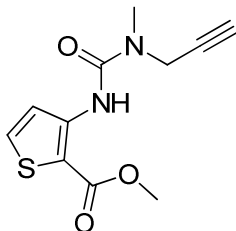
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 30.2 (CH₂), 51.9 (CH₃), 71.7 (CH), 79.8 (C⁴), 107.5 (C⁴), 122.8 (CH_{AR}), 131.7 (CH_{AR}), 146.4 (C⁴), 153.4 (C⁴), 165.2 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3297, 1666, 1571, 1446, 1419, 1284, 1248, 1100, 778.

MS (ESI+): *m/z* = 261 [M+Na]⁺

Methyl 3-(3-methyl-3-(prop-2-yn-1-yl)ureido)thiophene-2-carboxylate 42

Prepared from the carbamate **4** on a 1.08 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 80:20) afforded the compound **42** as a white solid (226 mg, 83 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.28 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH), 3.16 (s, 3H, CH₃), 3.89 (s, 3H, CH₃), 4.25 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH₂), 7.44 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH_{AR}), 8.03 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH_{AR}), 9.97 (s, 1H, NH).

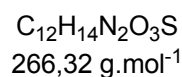
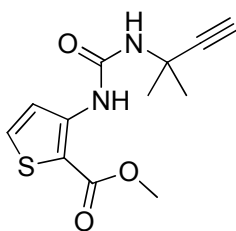
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 33.9 (CH₃), 37.8 (CH₂), 51.9 (CH₃), 72.2 (CH), 78.7 (C⁴), 107.7 (C⁴), 121.7 (CH_{AR}), 131.7 (CH_{AR}), 146.9 (C⁴), 153.8 (C⁴), 165.5 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3297, 1664, 1577, 1495, 1449, 1420, 1284, 1250, 1096, 779.

MS (ESI⁺): *m/z* = 275 [M+Na]⁺

Methyl 3-(3-(2-methylbut-3-yn-2-yl)ureido)thiophene-2-carboxylate 43

Prepared from the carbamate **4** on a 1.0 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 80:20) afforded the compound **43** as a yellow oil (498 mg, 100 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.65 (s, 6H, 2 × CH₃), 2.39 (s, 1H, CH), 3.83 (s, 3H, CH₃), 5.48 (s, 1H, NH), 7.40 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH_{AR}), 8.02 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH_{AR}), 9.45 (s, 1H, NH).

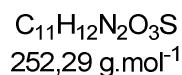
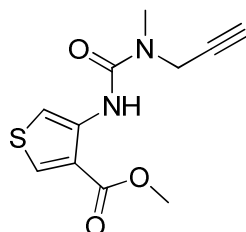
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 29.7 (2 × CH₃), 47.2 (C⁴), 51.8 (CH₃), 69.7 (CH), 87.1 (C⁴), 107.4 (C⁴), 122.1 (CH_{AR}), 131.5 (CH_{AR}), 146.4.4 (C⁴), 152.7 (C⁴), 165.0 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3303, 2982, 2952, 1669, 1572, 1552, 1445, 1417, 1284, 1248, 1096, 1074, 778.

MS (ESI⁺): *m/z* = 289 [M+Na]⁺

Methyl 4-(3-methyl-3-(prop-2-yn-1-yl)ureido)thiophene-3-carboxylate 47

Prepared from the carbamate **5** on a 0.72 mmol scale according to the general procedure B. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 80:20) afforded the compound **47** as a white solid (178 mg, 98 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.29 (s, 1H, CH), 3.16 (s, 3H, CH₃), 3.92 (s, 3H, CH₃), 4.28 (s, 2H, CH₂), 7.81 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, CH_{AR}), 8.06 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, CH_{AR}), 9.72 (s, 1H, NH).

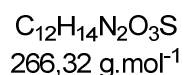
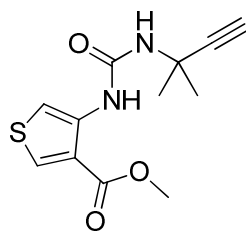
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 29.7 (CH₃), 33.7 (CH₂), 52.0 (CH₃), 72.0 (CH), 79.0 (C⁴), 107.4 (CH_{AR}), 121.0 (C⁴), 132.3 (CH_{AR}), 137.7 (C⁴), 154.8 (C⁴), 164.9 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3346, 3303, 1690, 1667, 1533, 1251, 777, 754.

MS (ESI+): *m/z* = 275 [M+Na]⁺

Methyl 4-(3-(2-methylbut-3-yn-2-yl)ureido)thiophene-3-carboxylate 48

Prepared from the carbamate **5** on a 0.72 mmol scale according to the general procedure B of. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 80:20) afforded the compound **48** as a beige oil (156 mg, 96 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.67 (s, 6H, 2 × CH₃), 2.40 (s, 1H, CH), 3.85 (s, 3H, CH₃), 5.40 (s, 1H, NH), 7.79 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.99 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, CH_{AR}), 9.19 (s, 1H, NH).

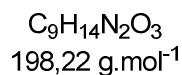
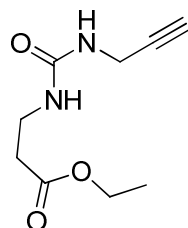
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 29.8 (2 × CH₃), 47.2 (C⁴), 51.9 (CH₃), 69.5 (CH), 87.2 (C⁴), 107.6 (CH_{AR}), 121.0 (C⁴), 132.2 (CH_{AR}), 137.4 (C⁴), 153.5 (C⁴), 164.6 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3304, 2981, 2952, 1693, 1667, 1554, 1522, 1448, 1383, 1266, 1242, 1092, 777, 756.

MS (ESI+): *m/z* = 267 [M+H]⁺

Ethyl 3-(3-(prop-2-yn-1-yl)ureido)propanoate 55

Prepared from the carbamate **22** on a 0.59 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 50:50) afforded the compound **55** as a beige solid (68 mg, 58 %).



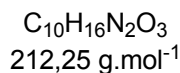
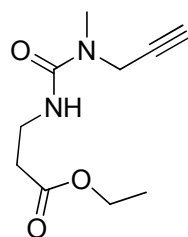
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.23 (s, 1H, CH), 2.55 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 3.50 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 3.98 (s, 2H, CH₂), 4.14 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 5.90 (s, 1H, NH), 7.31 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.2 (CH₃), 29.9 (CH₂), 35.0 (CH₂), 35.8 (CH₂), 60.6 (CH₂), 70.8 (CH), 81.0 (C⁴), 158.2 (C⁴), 172.8 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 199 [M+H]⁺

Ethyl 3-(3-methyl-3-(prop-2-yn-1-yl)ureido)propanoate 56

Prepared from the carbamate **22** on a 1.48 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 50:50) afforded the compound **56** as a colorless oil (243 mg, 77 %).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.22 (s, 1H, CH), 2.50 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 2.87 (s, 3H, CH₃), 3.44 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 4.10 (m, 4H, 2 × CH₂), 5.37 (s, 1H, NH).

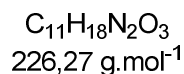
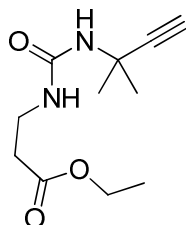
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.2 (CH₃), 33.6 (CH₂), 34.5 (CH₃), 36.4 (CH₂), 37.7 (CH₂), 60.6 (CH₂), 71.9 (CH), 79.2 (C⁴), 157.6 (C⁴), 173.2 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3293, 2981, 1726, 1631, 1530, 1370, 1182, 1066, 1020, 766.

MS (ESI+): *m/z* = 213 [M+H]⁺

Ethyl 3-(3-(2-methylbut-3-yn-2-yl)ureido)propanoate **57**

Prepared from the carbamate **22** on a 2.1 mmol scale according to the general procedure A. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 50:50) afforded the compound **57** as a white solid (272 mg, 57 %).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 1.58 (s, 6H, 2 × CH₃), 2.42 (s, 1H, CH), 2.56 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 3.50 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 4.15 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 5.32 (s, 1H, NH), 5.91 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.2 (CH₃), 30.1 (2 × CH₃), 34.2 (CH₂), 35.5 (CH₂), 46.6 (C⁴), 60.6 (CH₂), 70.1 (CH), 87.5 (C⁴), 157.3 (C⁴), 173.0 (C⁴).

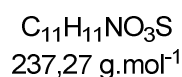
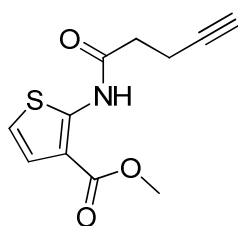
IR: ν (cm⁻¹) 3334, 3263, 2979, 2942, 1718, 1636, 1551, 1374, 1275, 1246, 1145, 1066, 1024, 691.

MS (ESI+): *m/z* = 227 [M+H]⁺

Amide synthesis

Methyl 2-(pent-4-ynamido)thiophene-3-carboxylate 39

To a stirred solution of a commercially available pent-4-ynoic acid (350 mg, 3.57 mmol) in anhydrous dichloromethane (8 ml) at room temperature was added dropwise oxalyl chloride (1.018 ml, 10.71 mmol). The mixture was stirred at 45°C and under an inert atmosphere during 5h30. Then, the reaction mixture was concentrated under vacuum. The crude product was dissolved in anhydrous THF (4ml) and added to a solution of methyl 2-aminothiophene-3-carboxylate (560.5 mg, 3.57 mmol) and NEt₃ (993.3 µl, 7.14 mmol) in anhydrous THF (4ml). The reaction was stirred at room temperature and under an inert atmosphere until complete consumption of starting materials as monitored by TLC. Then, the reaction mixture was diluted with ethyl acetate and filtered through a Celite pad. The organic layer was washed with water and brine, dried over magnesium sulfate (MgSO₄), filtered and concentrated under vacuum. The product was purified by column chromatography (eluent:cyclohexane / ethyl acetate 80:20) to afford the desired compound **39** as brown solid (677 mg, 80 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.08 (s, 1H, CH), 2.69 (m, 2H, CH₂), 2.79 (m, 2H, CH₂), 3.93 (s, 3H, CH₃), 6.79 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.24 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH_{AR}), 11.10 (s, 1H, NH).

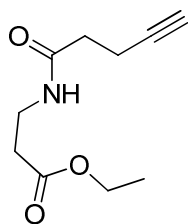
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 14.5 (CH₂), 35.5 (CH₂), 51.7 (CH₃), 69.7 (CH), 82.1 (C⁴), 112.6 (C⁴), 116.2 (CH_{AR}), 123.7 (CH_{AR}), 148.5 (C⁴), 165.9 (C⁴), 168.0 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3283, 2952, 2927, 1675, 1548, 1496, 1444, 1292, 1238, 1196, 1168, 703.

MS (ESI+): *m/z* = 260 [M+Na]⁺

Ethyl 3-(pent-4-ynamido) propanoate 61

To a stirred solution of a commercially available β-alanine ethyl ester hydrochloride (187.35 mg, 1.22 mmol), pent-4-ynoic acid (120 mg, 1.22 mmol) and HBTU (464.1 mg, 1.22 mmol) in dichloromethane (5 ml) at room temperature was added the DIEA (426.5 µl, 2.44 mmol). The mixture was stirred at room temperature until complete consumption of starting materials as monitored by TLC. Then, the reaction mixture was diluted with H₂O and extracted with chloroform. The organic layer was washed with acid and basic aqueous solution, dried over magnesium sulfate (MgSO₄), filtered and concentrated under vacuum. The product was purified by column chromatography (eluent: cyclohexane/ethyl acetate 80:20) to afford the desired compound as colorless oil (189 mg, 78 %).



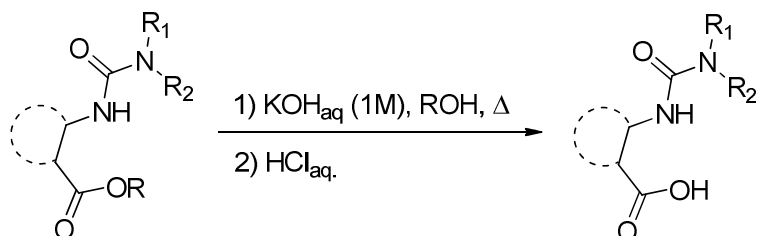
$C_{10}H_{15}NO_3$
 $197,23 \text{ g.mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1.22 (t, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 3H, CH_3), 1.95 (s, 1H, CH), 2.34 (m, 2H, CH_2), 2.44-2.52 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 3.49 (q, $J = 6.1 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 4.11 (q, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 2H, CH_2), 6.50 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 14.1 (CH_3), 14.8 (CH_2), 34.0 (CH_2), 34.9 (CH_2), 35.1 (CH_2), 60.6 (CH_2), 69.2 (CH), 82.8 (C^{triple}), 171.1 (C^{amide}), 172.4 (C^{amide}).

MS (ESI+): $m/z = 220$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

Hydrolysis: General procedure

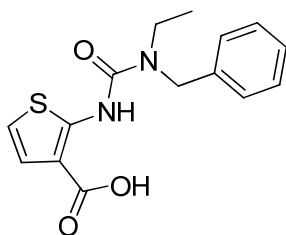


Procedure A: To a solution of ester derivative in appropriate solvent (methanol for methyl ester and ethanol for ethyl ester; 10 ml for 1 mmol) at room temperature was added an aqueous solution of KOH 1M (1.2 eq.). Then, the reaction mixture was refluxed until complete consumption of starting materials monitored by TLC. The aqueous layer was washed with dichloromethane, then acidified until pH=2 with HCl_{conc.} to obtain a solid precipitate, which was filtered off. The precipitate was thoroughly washed with water to afford the desired compound.

Procedure B: To a solution of ester derivative (1.0 eq.) in appropriate solvent (methanol for methyl ester and ethanol for ethyl ester; 10 ml for 1 mmol) at room temperature was added an aqueous solution of KOH 1M (1.2 eq.). Then, the reaction mixture was refluxed until complete consumption of starting materials monitored by TLC. The aqueous layer was washed with dichloromethane, then acidified until pH=2 with HCl_{conc.} to obtain a solid precipitate. In the case of no precipitation, the acid aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic extracts were washed with brine, dried over magnesium sulfate (MgSO₄) and concentrated under vacuum to afford the desired compound.

2-(3-benzyl-3-ethylureido) thiophene-3-carboxylic acid 3

Prepared from the ester **2** on a 0.4 mmol scale according to the general procedure A of the hydrolysis. Precipitation afforded the compound **3** as a white solid (103 mg, 85 %).



C₁₅H₁₆N₂O₃S
304,36 g.mol⁻¹

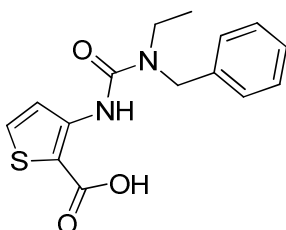
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.14 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 3.40 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 4.58 (s, 2H, CH₂), 6.81 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH), 7.06 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH), 7.20-7.40 (m, 5H, CH_{AR}), 10.90 (br, 1H, NH), 13.00 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11.5 (CH₃), 40.3 (CH₂), 47.8 (CH₂), 109.1 (C⁴), 113.3 (CH_{AR}), 122.2 (CH_{AR}), 125.6 (CH_{AR}), 125.7 (2 × CH_{AR}), 126.9 (2 × CH_{AR}), 136.2 (C⁴), 150.1 (C⁴), 151.2 (C⁴), 165.6 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 305 [M+H]⁺

3-(3-benzyl-3-ethylureido)thiophene-2-carboxylic acid 8

Prepared from the ester **6** on a 2.0 mmol scale according to the general procedure A of the hydrolysis. Precipitation afforded the compound **8** as a white solid (572 mg, 94 %).



C₁₅H₁₆N₂O₃S
304,36 g.mol⁻¹

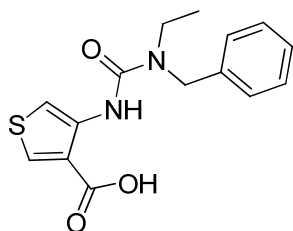
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.38 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 4.56 (s, 2H, CH₂), 7.23-7.37 (m, 5H, CH_{AR}), 7.79 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH), 7.93 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, CH), 10.07 (s, 1H, NH), 13.30 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13.6 (CH₃), 42.2 (CH₂), 49.7 (CH₂), 108.2 (C⁴), 121.7 (CH_{AR}), 127.6 (2 × CH_{AR}), 128.9 (2 × CH_{AR}), 129.0 (CH_{AR}), 132.7 (CH_{AR}), 138.6 (C⁴), 146.9 (C⁴), 153.5 (C⁴), 166.4 (C⁴).

MS (ESI-): *m/z* = 303[M-H]⁻

4-(3-benzyl-3-ethylureido)thiophene-3-carboxylic acid **9**

Prepared from the ester **7** on a 0.22 mmol scale according to the general procedure A of the hydrolysis. Precipitation afforded the compound **9** as a white solid (33 mg, 50 %).



$C_{15}H_{16}N_2O_3S$
304,36 g.mol⁻¹

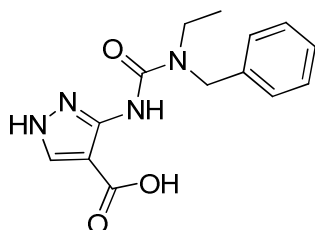
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.12 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃), 3.34 (br, 2H, CH₂), 4.54 (s, 2H, CH₂), 7.24-7.34 (m, 5H, CH_{AR}), 7.83 (s, 1H, H), 8.27 (s, 1H, H), 9.83 (s, 1H, NH), 13.37 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13.6 (CH₃), 42.0 (CH₂), 49.6 (CH₂), 106.8 (CH_{AR}), 122.3 (C⁴), 127.5 (CH_{AR}), 128.9 (4 × CH_{AR}), 133.8 (CH_{AR}), 138.3 (C⁴), 138.9 (C⁴), 154.3 (C⁴), 166.3 (C⁴).

MS (ESI⁻): *m/z* = 303 [M-H]⁻

3-(3-benzyl-3-ethylureido)-1H-pyrazole-4-carboxylic acid **13**

Prepared from the ester **12** on a 0.19 mmol scale according to the general procedure B of the hydrolysis. Extraction afforded the compound **13** as a beige oil (9 mg, 16 %).



$C_{14}H_{16}N_4O_3$
288,30 g.mol⁻¹

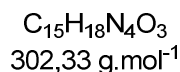
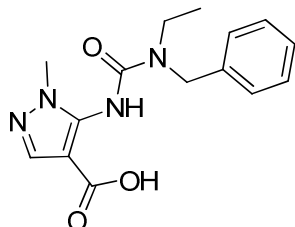
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 3.22-3.31 (m, 3H, CH₂ and NH), 4.57 (s, 2H, CH₂), 7.27-7.38 (m, 5H, CH_{AR}), 7.68 (s, 1H, CH), 9.26 (s, 1H, NH), 12.77 (s, 1H, OH)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 13.5 (CH₃), 42.3 (CH₂), 49.8 (CH₂), 114.6 (C⁴), 127.6 (CH_{AR}), 127.7 (2 × CH_{AR}), 129.0 (2 × CH_{AR}), 138.1 (CH_{AR}), 138.3 (C⁴), 144.5 (C⁴), 153.4 (C⁴), 166.3 (C⁴).

MS (ESI⁻): *m/z* = 287 [M-H]⁻

5-(3-benzyl-3-ethylureido)-1-methyl-1H-pyrazole-4-carboxylic acid 18

Prepared from the ester **17** on a 0.27 mmol scale according to the general procedure B of the hydrolysis. Extraction and purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 50:50) afforded the compound **18** as a beige solid (27 mg, 35 %).



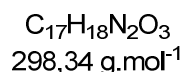
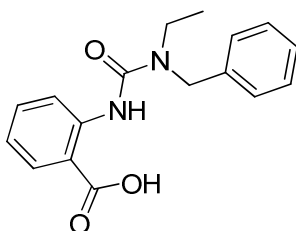
¹H-NMR (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 1.21-1.25 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃), 3.43 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 3.77 (s, 3H, CH₃), 4.64 (s, 2H, CH₂), 7.28-7.37 (m, 5H, CH_{AR}), 7.84 (br, 2H, CH and NH).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13.6 (CH₃), 36.3 (CH₃), 41.4 (CH₂), 49.4 (CH₂), 107.6 (CH_{AR}), 127.5 (CH_{AR}), 127.8 (2 × CH_{AR}), 128.9 (2 × CH_{AR}), 138.9 (C⁴), 139.8 (C⁴), 141.3 (C⁴), 155.1 (C⁴), 164.3 (C⁴).

MS (ESI⁻): $m/z = 301$ [M-H]⁻

2-(3-benzyl-3-ethylureido)benzoic acid 21

Prepared from the ester **20** on a 0.73 mmol scale according to the general procedure A of the hydrolysis. Precipitation afforded the compound **21** as a white solid (60 mg, 57 %).



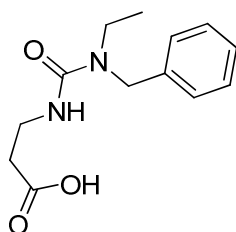
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 1.14 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃), 3.37 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂), 4.57 (s, 2H, CH₂), 6.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH_{AR}), 7.20-7,50 (m, 5H, CH_{AR}), 7.53 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, CH_{AR}), 7.94 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 1H, CH_{AR}), 8.53 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 1H, CH_{AR}), 11.01 (sl, 1H, NH), 13.57 (sl, 1H, OH).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13.7 (CH₃), 41.9 (CH₂), 49.5 (CH₂), 114.8 (C⁴), 119.2 (CH_{AR}), 120.9 (CH_{AR}), 127.5 (CH_{AR}), 127.7 (2 × CH_{AR}), 128.9 (2 × CH_{AR}), 131.5 (CH_{AR}), 134.6 (CH_{AR}), 138.9 (C⁴), 143.9 (C⁴), 154.7 (C⁴), 171.0 (C⁴).

MS (ESI⁺): $m/z = 299$ [M+H]⁺

3-(3-benzyl-3-ethylureido)propanoic acid 24

Prepared from the ester **23** on a 0.36 mmol scale according to the general procedure B of the hydrolysis. Extraction afforded the compound **24** as a beige oil (86 mg, 96 %).



$C_{13}H_{18}N_2O_3$
250,29 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 1.08 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃), 2.54 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH₂), 3.25 (q, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH₂), 3.46 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂), 4.50 (s, 2H, CH₂), 5.12 (br, 1H, NH), 7.22-7.35 (m, 5H, CH_{AR})

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 13.5 (CH₃), 35.1 (CH₂), 37.0 (CH₂), 40.7 (CH₂), 48.9 (CH₂), 127.1 (CH_{AR}), 127.6 (2 × CH_{AR}), 127.7 (2 × CH_{AR}), 139.7 (C⁴), 157.7 (C⁴), 172.6 (C⁴).

MS (ESI⁻): $m/z = 249$ [M-H]⁻

1H-imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride formation

The synthesis pathway was adapted from the procedure described by E. D. Goddart-Borger and R. V. Stick (*Organic Letters*, **2007**, *9*, 3797-3800).

1H-imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride 26

To a cooled suspension of NaN₃ (13.0 g, 200 mmol) in acetonitrile (200 ml) was added dropwise at 0°C sulfuryl chloride (16.1 mL, 200 mol). At the end of the addition, the reaction mixture was warmed to room temperature and stirred over night. Then, imidazole (25.9 g, 380 mmol) was added to the solution at 0°C. After being stirred for 4 h at room temperature, the mixture reaction was diluted with ethyl acetate (400 ml), washes with H₂O and a saturated aqueous NaHCO₃ solution (2 × 400 mL). The combined organic layer was dried over magnesium sulfate (MgSO₄) and filtered. A solution of HCl in ethanol was prepared by dropwise addition at 0°C of AcCl (21.3 ml, 300 mmol) in ethanol (75 ml). This freshly prepared solution was added dropwise to the organic layers. The reaction mixture was stirred at 0°C for 2h and give a white precipitate wich was filtered and wash with ethyl acetate to give the desired product **26** as a white powder (32.4 g, 77%).



¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm) 9.09 (s, 1H, CH_{AR}), 7.77 (s, 1H, CH_{AR}), 7.35 (s, 1H, CH_{AR}).

IR: ν (cm⁻¹) 2172, 1161.

Spectroscopic data were in agreement with those presented in the literature.

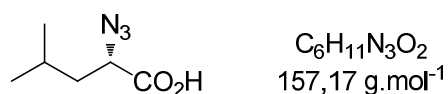
Azide formation: General procedure

The synthesis pathway was adapted from the procedure described by E. D. Goddart-Borger and R. V. Stick (*Organic Letters*, **2007**, *9*, 3797-3800).

To a solution of amino acid (4 mmol), K₂CO₃ (1.28 g, 9.3 mmol) and CuSO₄·5H₂O (10 mg, 0.04 mmol) in methanol (20 ml) was added the imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride. The mixture reaction was stirred at room temperature until complete consumption of the starting amino acid and then concentrated under vacuum. The crude product was diluted with H₂O (10 ml), acidified with HCl and extracted with ethyl acetate. The combined organic extracts were dried over magnesium sulfate (MgSO₄), filtered and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography on silica gel using appropriate eluent offered the desired azide.

(S)-2-azido-4-methylpentanoic acid 27

Prepared from the leucine on a 4.0 mmol scale according to the general procedure A of azide formation. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate/acetic acid : 84/15/1) afforded the compound **27** as a yellow oil (614 mg, 98 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.00 (m, 6H, CH₃), 1.64-1.75 (m, 2H, CH₂), 1.76-1.88 (m, 1H, CH), 3.87 (m, 1H, CH), 11.86 (s, 1H, OH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 20.7 (CH₃), 21.3 (CH₃), 24.9 (CH), 39.7 (CH₂), 60.7 (CH), 176.9 (C⁴).

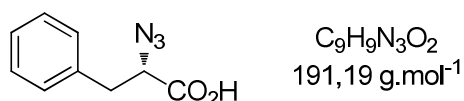
IR: ν (cm⁻¹) 3455, 2961, 2116, 1720, 1267, 1222, 740.

α_D: -13,4 (c = 1, CHCl₃)

Spectroscopic data were in agreement with those presented in the literature.

(S)-2-azido-3-phenylpropanoic acid 28

Prepared from the phenylalanine on a 4.0 mmol scale according to the general procedure A of azide formation. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate/acetic acid : 89/10/1) afforded the compound **28** as a transparent oil (654 mg, 86 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.12 (dd, *J* = 8.9 and 14.0 Hz, 1H, CH), 3.32 (dd, *J* = 4.9 and 14.0 Hz, 1H, CH), 4.23 (dd, *J* = 4.9 and 8.9 Hz, 1H, CH), 7.34-7.46 (m, 5H, CH_{AR}).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 37.6 (CH₂), 63.2 (CH), 127.5 (CH_{AR}), 127.6 (2 × CH_{AR}), 129.5 (2 × CH_{AR}), 135.7 (C⁴), 176.4 (C⁴).

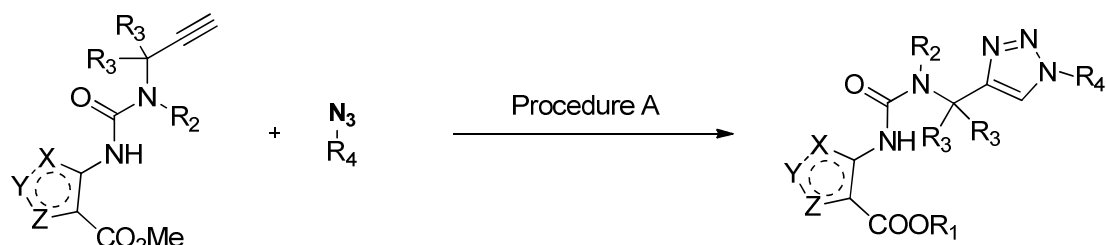
IR: ν (cm⁻¹) 3031, 2117, 1720, 1263, 699.

α_D: - 72,3 (c = 1, CHCl₃).

Spectroscopic data were in agreement with those presented in the literature.

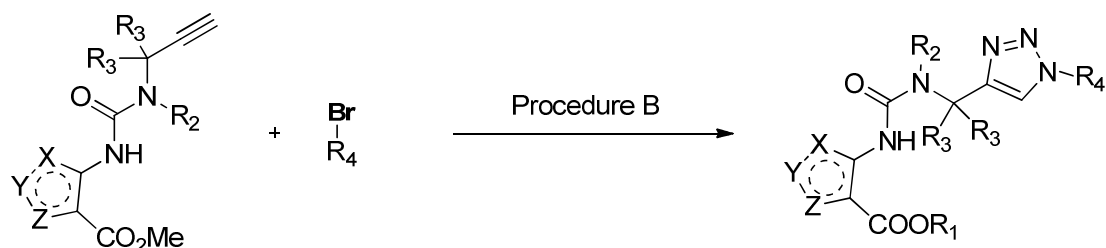
Click chemistry reaction: General procedures

Procedure A



To a stirred solution of the appropriate azide (1.3 eq.) in DMF (5 ml for 0.5 mmol) were added CuI (0.1 eq.) and sodium ascorbate (0.1 eq.) in catalytic amount. Then, the desired alkyne (1.0 eq.) was added to the mixture reaction. The mixture reaction was stirred at room temperature and under an inert atmosphere until complete consumption of the starting materials (If necessary 0.1 eq. of additional CuI and sodium ascorbate was added). The crude product was diluted with H₂O and extracted with ethyl acetate. The combined organic extracts were dried over magnesium sulfate (MgSO₄), filtered and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography on silica gel using appropriate eluent offered the desired product.

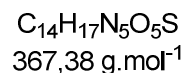
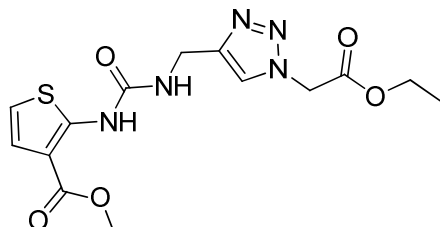
Procedure B



To a stirred solution of the appropriate bromo-derivative (1eq.) in DMF (5 ml for 0.75 mmol) were added sodium azide (1eq.) and the desired alkyne (1eq.) in one portion. Then, CuI (0.1eq.) and sodium ascorbate (0.1eq.) were added to the mixture reaction in catalytic amount. The mixture reaction was stirred 50-60°C and under an inert atmosphere until complete consumption of the starting materials (If necessary 0.1 eq. of additional CuI and sodium ascorbate was added). The crude product was diluted with H₂O and extracted with ethyl acetate. The combined organic extracts were dried over magnesium sulfate (MgSO₄), filtered and concentrated under vacuum. Purification by column chromatography on silica gel using appropriate eluent offered the desired product.

Methyl 2-(3-((1-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)ureido)thiophene-3-carboxylate
29

Prepared from the compound **25** and the commercially available ethyl 2-azidoacetate on a 1.0 mmol scale according to the general procedure A of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: cyclohexane / ethyl acetate 50:50) afforded the compound **29** as a white solid (300 mg, 82 %).



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 1.22 (t, $J = 4.0$ Hz, 3H, CH_3), 3.75 (s, 3H, CH_3), 4.18 (m, 2H, CH_2), 4.57 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H, CH_2), 5.16 (s, 2H, CH_2), 6.53 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, CH_{AR}), 7.05 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, CH_{AR}), 7.24 (m, 1H, NH), 7.74 (s, 1H, H_{AR}), 10.19 (s, 1H, NH).

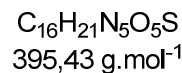
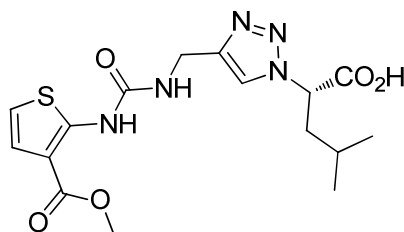
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 13.9 (CH_3), 35.6 (CH_2), 50.9 (CH_2), 51.4 (CH_3), 62.4 (CH_2), 110.1 (C^4), 114.3 (CH_{AR}), 123.6 (CH_{AR}), 124.0 (CH_{AR}), 145.6 (C^4), 151.8 (C^4), 153.9 (C^4), 165.8 (C^4), 166.6 (C^4).

IR: ν (cm^{-1}) 3278, 2947, 1740, 1678, 1547, 1234, 1219, 695.

MS (ESI+): $m/z = 390$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

(S)-2-(4-((3-(3-(methoxycarbonyl)thiophen-2-yl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-4-methylpentanoic acid
30

Prepared from the compound **25** and the (S)-2-azido-4-methylpentanoic acid **27** on a 1.0 mmol scale according to the general procedure A of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: dichloromethane / methanol 95:5) afforded the compound **30** as a beige solid (150 mg, 78 %).



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 0.93-0.99 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1.25-1.37 (m, 1H, CH), 2.09-2.14 (m, 2H, CH_2), 3.81 (s, 3H, CH_3), 4.53 (dd, $J = 5.1$ and 15.5 Hz, 1H, CH), 4.68 (dd, $J = 6.0$ and 15.5 Hz, 1H, CH), 5.49 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, CH), 6.55 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, CH_{AR}), 7.08 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, CH_{AR}), 7.33 (s, 1H, NH), 8.03 (s, 1H, CH_{AR}), 10.24 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, MeOD): δ (ppm) 20.0 (CH₃), 21.7 (CH₃), 24.6 (CH), 40.2 (CH₂), 50.6 (CH₃), 61.4 (CH), 110.1 (C⁴), 114.1 (CH_{AR}), 122.9 (CH_{AR}), 123.4 (CH_{AR}), 151.1 (C⁴), 151.3 (C⁴), 154.4 (C⁴), 165.4 (C⁴), 165.4 (C⁴), 170.8 (C⁴).

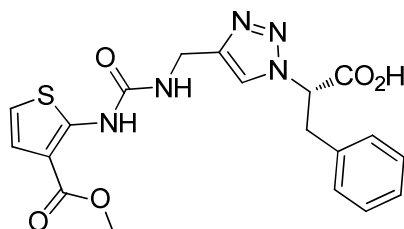
IR: ν (cm⁻¹) 3285, 2928, 1672, 1551, 1500, 1245, 702.

α_D : + 1,40 (c = 1, MeOH)

MS (ESI+): m/z = 418 [M+Na]⁺

(S)-2-(4-((3-(3-(methoxycarbonyl)thiophen-2-yl)ureido)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-3-phenylpropanoic acid **31**

Prepared from the compound **25** and the (S)-2-azido-3-phenylpropanoic acid **28** on a 1.0 mmol scale according to the general procedure A of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: dichloromethane / methanol 95:5) afforded the compound **31** as a pink solid (267 mg, 77 %).



C₁₉H₁₉N₅O₅S
429,45 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 3.45 (dd, J = 10.0 and 14.1 Hz, 1H, CH₂), 3.59 (dd, J = 5.1 and 14.1 Hz, 1H, CH₂), 3.85 (s, 3H, CH₃), 4.44 (d, J = 3.3 Hz, 2H, CH₂), 5.54 (dd, J = 5.1 et 10.0 Hz, 1H, CH), 6.62 (d, J = 5.8 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.03-7.16 (m, 7H, 7 × CH_{AR}), 7.58 (s, 1H, NH), 10.18 (s, 1H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz, MeOD): δ (ppm) 36.3 (CH₂), 39.0 (CH₂), 52.1 (CH₃), 65.7 (CH), 111.5 (C⁴), 115.6 (CH_{AR}), 124.8 (CH_{AR}), 124.9 (CH_{AR}), 128.2 (CH_{AR}), 129.6 (2 × CH_{AR}), 130.0 (2 × CH_{AR}), 137.1 (C⁴), 146.4 (C⁴), 152.6 (C⁴), 152.8 (C⁴), 166.9 (C⁴), 171.2 (C⁴).

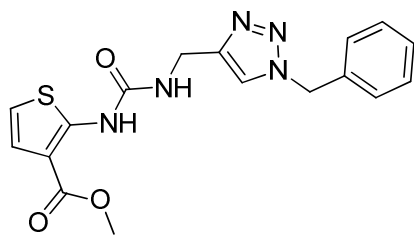
IR: ν (cm⁻¹) 3298, 2945, 2925, 1735, 1675, 1544, 1443, 1243, 699.

α_D : - 55,5 (c = 1, MeOH)

MS (ESI+): m/z = 452 [M+Na]⁺

Methyl 2-(3-((1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)ureido)thiophene-3-carboxylate **32**

Prepared from the compound **25** and the commercially available (azidomethyl) benzene on a 0.4 mmol scale according to the general procedure A of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate 50:50) afforded the compound **32** as a beige solid (120 mg, 77 %).



$C_{17}H_{17}N_5O_3S$
371,41 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.56 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 5.47 (s, 2H, CH₂), 6.55 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.08 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.23-7.34 (m, 6H, 5 × CH_{AR} and NH), 7.56 (s, 1H, CH_{AR}), 10.24 (s, 1H, NH).

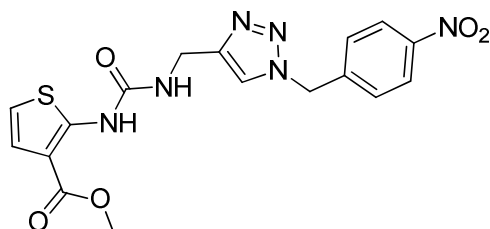
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 35.6 (CH₂), 51.4 (CH₃), 54.2 (CH₂), 110.1 (C⁴), 114.3 (CH_{AR}), 122.4 (CH_{AR}), 123.7 (CH_{AR}), 128.1 (2 × CH_{AR}), 128.7 (CH_{AR}), 129.1 (2 × CH_{AR}), 134.5 (C⁴), 145.5 (C⁴), 151.8 (C⁴), 153.8 (C⁴), 165.9 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3322, 2365, 2945, 2918, 1672, 1549, 1508, 1439, 1300, 1236, 693.

MS (ESI+): *m/z* = 394 [M+Na]⁺

Methyl 2-(3-((1-(4-nitrobenzyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)ureido)thiophene-3-carboxylate **33**

Prepared from the compound **25** and the commercially available 1-(2-bromoethyl)-4-nitrobenzene on a 1 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate 40:60) afforded the compound **33** as a yellow solid (312 mg, 75 %).



$C_{17}H_{16}N_6O_5S$
416,41 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 3.80 (s, 3H, CH₃), 4.39 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂), 5.77 (s, 2H, CH₂), 6.80 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.06 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.53 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 2 × CH_{AR}), 8.15 (s, 1H, CH_{AR}), 8.24 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, 2 × CH_{AR}), 8.43 (s, *J* = 5.3 Hz, 1H, NH), 10.13 (s, 1H, NH).

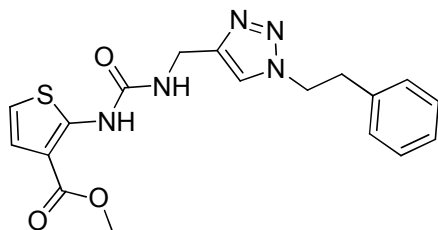
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 35.5 (CH₂), 51.8 (CH₃), 52.3 (CH₂), 109.6 (C⁴), 115.4 (CH_{AR}), 123.8 (CH_{AR}), 123.8 (CH_{AR}), 124.4 (2 × CH_{AR}), 129.5 (2 × CH_{AR}), 143.9 (C⁴), 145.7 (C⁴), 147.7 (C⁴), 151.8 (C⁴), 153.9 (C⁴), 165.0 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3280, 1678, 1541, 1346, 1235.

MS (ESI+): *m/z* = 439 [M+Na]⁺

Methyl 2-(3-((1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)ureido)thiophene-3-carboxylate **34**

Prepared from the compound **25** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.4 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate 50:50) afforded the compound **34** as a yellow solid (121 mg, 75 %).



$C_{18}H_{19}N_5O_3S$
385,44 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.16 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 3.73 (s, 3H, CH₃), 4.54 (m, 4H, 2 × CH₂), 6.56 (d, J = 5.7 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.06 -7.28 (m, 6H, CH_{AR}), 7.47 (m, 2H, CH_{AR} and NH), 10.24 (s, 1H, NH).

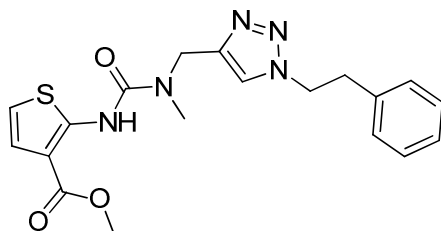
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 35.5 (CH₂), 36.6 (CH₂), 51.5 (CH₃), 51.7 (CH₂), 110.1 (C⁴), 114.3 (CH_{AR}), 123.1 (CH_{AR}), 123.7 (CH_{AR}), 127.1 (CH_{AR}), 128.6 (2 × CH_{AR}), 128.8 (2 × CH_{AR}), 136.9 (C⁴), 145.0 (C⁴), 151.8 (C⁴), 153.9 (C⁴), 165.8 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3284, 2924, 1676, 1560, 1439, 1239, 697.

MS (ESI+): m/z = 408 [M+Na]⁺

Methyl 2-(3-methyl-3-((1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)ureido)thiophene-3-carboxylate **36**

Prepared from the compound **35** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.39 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate 50:50) afforded the compound **36** as a colorless oil (112 mg, 72 %).



$C_{19}H_{21}N_5O_3S$
399,47 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.13-3.17 (m, 5H, CH₃ and CH₂), 3.86 (s, 3H, CH₃), 4.54 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 4.63 (s, 2H, CH₂), 6.61 (d, J = 5.8 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.04 -7.35 (m, 7H, 7 × CH_{AR}), 10.70 (s, 1H, NH).

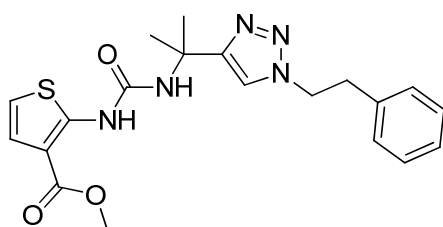
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 35.4 (CH₂), 36.7 (CH₂), 43.7 (CH₃), 51.7 (CH₂ and CH₃), 110.4 (C⁴), 114.7 (CH_{AR}), 123.2 (CH_{AR}), 123.5 (CH_{AR}), 127.1 (CH_{AR}), 128.6 (2 × CH_{AR}), 128.7 (2 × CH_{AR}), 136.8 (C⁴), 143.5 (C⁴), 152.4 (C⁴), 153.6 (C⁴), 165.8 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3277, 2949, 1662, 1550, 1507, 1439, 1246, 700.

MS (ESI+): *m/z* = 400 [M+H]⁺

Methyl 2-(3-(2-(1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propan-2-yl)ureido)thiophene-3-carboxylate 38

Prepared from the compound **37** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 1.13 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate 50:50) afforded the compound **38** as a white solid (327 mg, 70 %).



C₂₀H₂₃N₅O₃S
413,49 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.72 (s, 6H, 2 × CH₃), 3.14 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 3.67 (s, 3H, CH₃), 4.48 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 6.46 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.02 -7.37 (m, 8H, 7 × CH_{AR} and NH), 10.07 (s, 1H, NH).

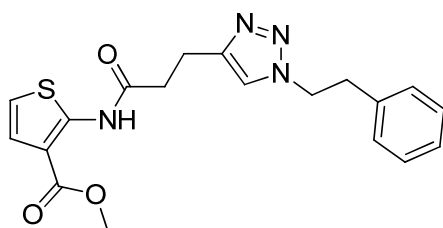
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 28.4 (2 × CH₃), 36.8 (CH₂), 51.1 (C⁴), 51.4 (CH₃), 51.8 (CH₂), 109.9 (C⁴), 114.1 (CH_{AR}), 121.1 (CH_{AR}), 123.6 (CH_{AR}), 127.1 (CH_{AR}), 128.8 (4 × CH_{AR}), 137.0 (C⁴), 151.7 (C⁴), 152.5 (C⁴), 153.0 (C⁴), 165.9 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3284, 2950, 1673, 1536, 1501, 1442, 1305, 1234, 753, 698.

MS (ESI+): *m/z* = 414 [M+H]⁺

Methyl 2-(3-(1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)thiophene-3-carboxylate 40

Prepared from the compound **39** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.84 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate 50:50) afforded the compound **40** as a brown solid (232 mg, 72 %).



$C_{19}H_{20}N_4O_3S$
384,45 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 2.88 (m, 2H, CH₂), 3.07-3.15 (m, 4H, 2 × CH₂), 3.84 (s, 3H, CH₃), 4.50 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 6.68 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.02 -7.28 (m, 7H, 7 × CH_{AR}), 10.93 (s, 1H, NH).

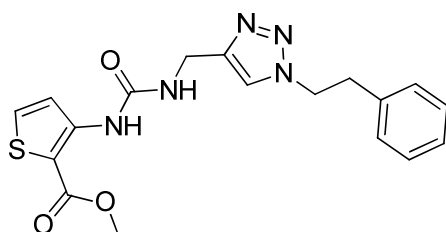
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 20.8 (CH₂), 35.7 (CH₂), 36.7 (CH₂), 51.5 (CH₂), 51.8 (CH₃), 112.5 (C⁴), 116.0 (CH_{AR}), 121.9 (CH_{AR}), 123.7 (CH_{AR}), 127.0 (CH_{AR}), 128.7 (4 × CH_{AR}), 137.1 (C⁴), 145.7 (C⁴), 148.5 (C⁴), 165.8 (C⁴), 169.0 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3290, 2916, 1676, 1548, 1497, 1445, 1239, 701.

MS (ESI+): *m/z* = 407 [M+Na]⁺

Methyl 3-(3-((1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)ureido)thiophene-2-carboxylate 44

Prepared from the compound **41** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.42 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate 50:50) afforded the compound **44** as a yellow solid (114 mg, 71 %).



$C_{18}H_{19}N_5O_3S$
385,44 g.mol⁻¹

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.21 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 3.81 (s, 3H, CH₃), 4.53-4.59 (m, 4H, 2 × CH₂), 6.86 (s, 1H, NH), 7.11-7.45 (m, 7H, 7 × CH_{AR}), 8.01 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, CH_{AR}), 9.49 (s, 1H, NH).

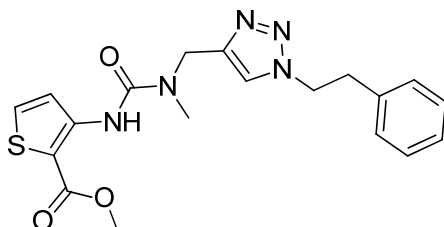
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 35.6 (CH₂), 36.7 (CH₂), 51.6 (CH₂), 51.7 (CH₃), 107.3 (C⁴), 121.9 (CH_{AR}), 122.7 (CH_{AR}), 127.1 (CH_{AR}), 128.6 (2 × CH_{AR}), 128.8 (2 × CH_{AR}), 131.4 (C⁴), 136.9 (C⁴), 145.3 (C⁴), 146.5 (C⁴), 154.1 (C⁴), 165.8 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3315, 2951, 1672, 1568, 1445, 1283, 1246, 1099, 1083, 779, 700.

MS (ESI+): *m/z* = 408 [M+Na]⁺

Methyl 3-(3-methyl-3-((1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)ureido)thiophene-2-carboxylate 45

Prepared from the compound **42** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.55 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate 70:30) afforded the compound **45** as a white solid (158 mg, 72 %).



$C_{19}H_{21}N_5O_3S$
399,47 g.mol⁻¹

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.15 (s, 3H, CH₃), 3.20 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz, CH₂), 3.89 (s, 3H, CH₃), 4.57 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, CH₂), 4.65 (s, 2H, CH₂), 7.07 -7.31 (m, 5H, 5 \times CH_{AR}), 7.37 (s, 1H, CH_{AR}), 7.46 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, CH_{AR}), 8.04 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, CH_{AR}), 9.92 (s, 1H, NH).

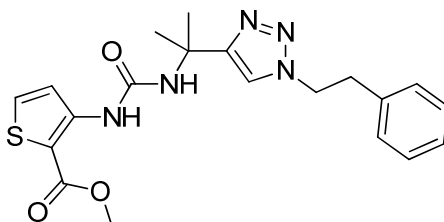
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 34.6 (CH₃), 36.7 (CH₂), 43.8 (CH₂), 51.7 (CH₂), 51.9 (CH₃), 107.5 (CH_{AR}), 121.7 (CH_{AR}), 122.8 (CH_{AR}), 127.1 (CH_{AR}), 128.8 (4 \times CH_{AR}), 131.7 (CH_{AR}), 136.9 (C⁴), 144.0 (C⁴), 147.1 (C⁴), 154.0 (C⁴), 165.5 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3322, 2952, 1663, 1574, 1447, 1249, 752.

MS (ESI+): $m/z = 422$ [M+Na]⁺

Methyl 3-(3-(2-(1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propan-2-yl)ureido)thiophene-2-carboxylate 46

Prepared from the compound **43** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.56 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate 50:50) afforded the compound **46** as a colorless oil (201 mg, 87 %).



$C_{20}H_{23}N_5O_3S$
413,49 g.mol⁻¹

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.75 (s, 6H, 2 \times CH₃), 3.19 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂), 3.76 (s, 3H, CH₃), 4.54 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH₂), 6.72 (s, 1H, NH), 7.08 -7.35 (m, 7H, 7 \times CH_{AR}), 7.93 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, CH_{AR}), 9.32 (s, 1H, NH).

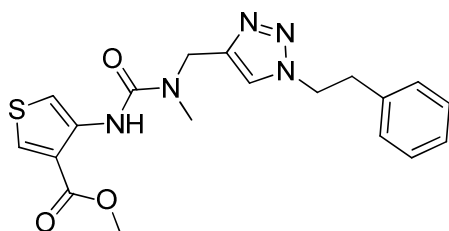
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 28.4 (2 × CH₃), 36.8 (CH₂), 51.1 (C⁴), 51.4 (CH₃), 51.9 (CH₂), 107.0 (C⁴), 121.7 (CH_{AR}), 122.1 (CH_{AR}), 127.1 (CH_{AR}), 128.8 (4 × CH_{AR}), 131.4 (CH_{AR}), 137.1 (C⁴), 146.7 (C⁴), 153.5 (C⁴), 154.0 (C⁴), 165.1 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3328, 2923, 1698, 1676, 1553, 1442, 1407, 1282, 1243, 1211, 1097, 752.

MS (ESI+): *m/z* = 436 [M+Na]⁺

Methyl 4-(3-methyl-3-((1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)ureido)thiophene-3-carboxylate 49

Prepared from the compound **47** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.55 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate 50:50) afforded the compound **49** as a colorless oil (176 mg, 80 %).



C₁₉H₂₁N₅O₃S
399,47 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 3.07 (s, 3H, CH₃), 3.15 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz, CH₂), 3.85 (s, 3H, CH₃), 4.52 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂), 4.60 (s, 2H, CH₂), 7.03 -7.28 (m, 5H, 5 × CH_{AR}), 7.33 (s, 1H, CH_{AR}), 7.72 (s, 1H, CH_{AR}), 8.01 (s, 1H, CH_{AR}), 9.58 (s, 1H, NH).

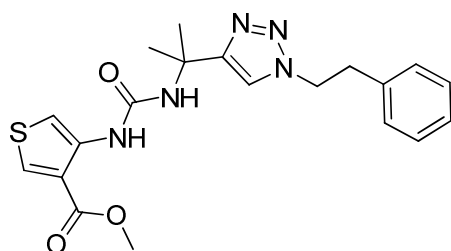
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 34.4 (CH₃), 36.7 (CH₂), 43.7 (CH₂), 51.6 (CH₂), 52.0 (CH₃), 107.0 (CH_{AR}), 121.0 (C⁴), 122.9 (CH_{AR}), 127.0 (CH_{AR}), 128.6 (2 × CH_{AR}), 128.7 (2 × CH_{AR}), 132.3 (CH_{AR}), 136.9 (C⁴), 137.9 (C⁴), 144.3 (C⁴), 154.9 (C⁴), 164.9 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3347, 2952, 1661, 1528, 1452, 1247, 749.

MS (ESI+): *m/z* = 422 [M+Na]⁺

Methyl 4-(3-(2-(1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propan-2-yl)ureido)thiophene-3-carboxylate 50

Prepared from the compound **48** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.49 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: Cyclohexane/ethyl acetate 50:50) afforded the compound **50** as a beige solid (150 mg, 74 %).



$C_{20}H_{23}N_5O_3S$
413,49 g.mol⁻¹

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.75 (s, 6H, 2 × CH₃), 3.20 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 3.81 (s, 3H, CH₃), 4.55 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 6.12 (s, 1H, NH), 7.10 - 7.34 (m, 6H, 6 × CH_{AR}), 7.64 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, CH_{AR}), 7.97 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, CH_{AR}), 9.06 (s, 1H, NH).

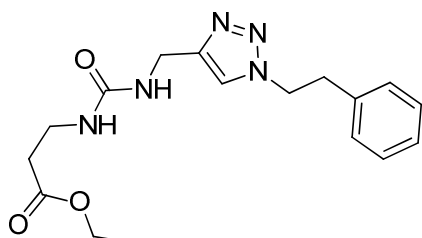
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 28.7 (2 × CH₃), 36.8 (CH₂), 51.0 (C⁴), 51.7 (CH₃), 51.9 (CH₂), 106.9 (CH_{AR}), 120.9 (CH_{AR}), 121.1 (C⁴), 127.1 (CH_{AR}), 128.8 (4 × CH_{AR}), 132.1 (CH_{AR}), 137.1 (C⁴), 137.7 (C⁴), 153.5 (C⁴), 153.8 (C⁴), 164.5 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3335, 2951, 1692, 1520, 1448, 1383, 1265, 1091, 777, 753.

MS (ESI⁺): *m/z* = 436 [M+Na]⁺

Ethyl 3-(3-((1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)ureido)propanoate 58

Prepared from the compound **55** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.73 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: dichloromethane/methanol 95:5) afforded the compound **58** as a beige oil (101 mg, 40 %).



$C_{17}H_{23}N_5O_3$
345,40 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.51 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂), 3.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 3.44 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H, CH₂), 4.09 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 4.38 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, CH₂), 4.53 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 5.77 (s, 1H, NH), 6.29 (s, 1H, NH), 7.10-7.31 (m, 5H, 5 × CH_{AR}), 7.46 (s, 1H, CH_{AR}).

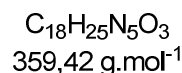
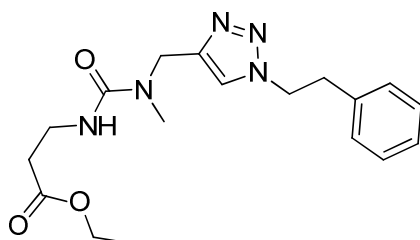
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.2 (CH₃), 35.1 (CH₂), 35.8 (CH₂), 36.5 (CH₂), 49.6 (CH₂), 51.9 (CH₂), 60.5 (CH₂), 121.1 (CH_{AR}), 127.0 (CH_{AR}), 128.6 (2 × CH_{AR}), 128.8 (2 × CH_{AR}), 136.9 (C⁴), 137.0 (C⁴), 158.7 (C⁴), 172.7 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3348, 2931, 1729, 1643, 1565, 1191, 1030, 770, 749, 701.

MS (ESI⁺): *m/z* = 368 [M+Na]⁺

Ethyl 3-(3-methyl-3-((1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)ureido)propanoate 59

Prepared from the compound **56** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.75 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: dichloromethane/methanol 98:2) afforded the compound **59** as a brown oil (162 mg, 60 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃), 2.45 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH₂), 2.79 (s, 3H, CH₃), 3.10 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 3.40 (q, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH₂), 4.05 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 4.40 (s, 2H, CH₂), 4.47 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 5.40 (t, $J = 5.8$ Hz, 1H, NH), 6.99-7.28 (m, 6H, 6 \times CH_{AR}).

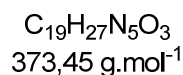
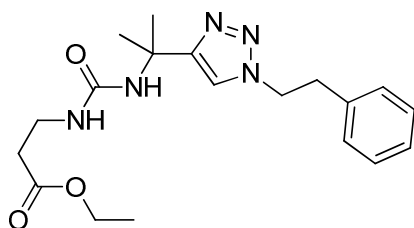
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.2 (CH₃), 34.2 (CH₃), 34.7 (CH₂), 36.4 (CH₂), 36.6 (CH₂), 43.7 (CH₂), 51.6 (CH₂), 60.5 (CH₂), 123.0 (CH_{AR}), 127.0 (CH_{AR}), 128.6 (2 \times CH_{AR}), 128.8 (2 \times CH_{AR}), 136.9 (C⁴), 137.0 (C⁴), 158.1 (C⁴), 172.9 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3351, 2936, 1726, 1633, 1527, 1371, 1220, 1180, 1050, 1028, 729, 700.

MS (ESI⁺): $m/z = 382$ [M+Na]⁺

Ethyl 3-(3-(2-(1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propan-2-yl)ureido)propanoate 60

Prepared from the compound **57** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.62 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: dichloromethane/methanol 98:2) afforded the compound **60** as a brown oil (208 mg, 90 %).



¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.20 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃), 1.64 (s, 6H, 2 \times CH₃), 2.42 (t, $J = 6.1$, 2H, CH₂), 3.16 (t, $J = 7.5$, 2H, CH₂), 3.32 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH₂), 4.07 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH₂), 4.49 (t, $J = 7.5$, 2H, CH₂), 5.63 (s, 1H, NH), 5.86 (s, 1H, NH), 7.12-7.37 (m, 6H, 6 \times CH_{AR}).

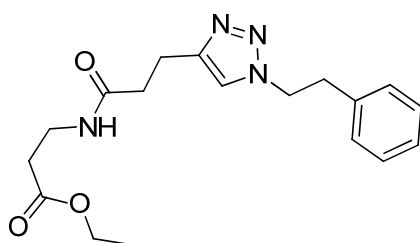
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 14.2 (CH₃), 28.8 (2 × CH₃), 35.0 (CH₂), 35.5 (CH₂), 36.7 (CH₂), 50.2 (C⁴), 51.7 (CH₂), 60.6 (CH₂), 121.1 (CH_{AR}), 127.0 (CH_{AR}), 128.7 (2 × CH_{AR}), 128.8 (2 × CH_{AR}), 137.1 (C⁴), 153.9 (C⁴), 157.4 (C⁴), 172.8 (C⁴).

IR: ν (cm⁻¹) 3558, 2955, 2922, 1728, 1650, 1556, 1455, 1377, 1250, 1184, 1167, 699.

MS (ESI+): *m/z* = 374 [M+H]⁺

Ethyl 3-(3-(1-phenethyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propanamido)propanoate **62**

Prepared from the compound **61** and the commercially available (2-bromoethyl) benzene on a 0.75 mmol scale according to the general procedure B of click reaction. Purification by column chromatography (eluent: dichloromethane/methanol 98:2) afforded the compound **62** as a brown oil (103 mg, 40 %).



C₁₈H₂₄N₄O₃
344,41 g.mol⁻¹

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.45 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂), 2.61 (br, 2H, CH₂), 3.03 (br, 2H, CH₂), 3.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 3.51 (m, 2H, CH₂), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂), 4.59 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 6.35 (s, 1H, NH), 7.13-7.36 (m, 6H, 6 × CH_{AR}).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 14.2 (CH₃), 21.4 (CH₂), 34.1 (CH₂), 34.9 (CH₂), 35.7 (CH₂), 36.7 (CH₂), 51.5 (CH₂), 60.7 (CH₂), 122.4 (CH_{AR}), 127.1 (CH_{AR}), 128.7 (2 × CH_{AR}), 128.8 (2 × CH_{AR}), 137.1 (C⁴), 147.1 (C⁴), 172.3 (C⁴), 172.4 (C⁴).

MS (ESI+): *m/z* = 345 [M+H]⁺

Part 2: v114* and analogs

General remarks

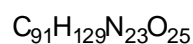
N^α-Fmoc amino acids with standard side chains protections and coupling reagents (HBTU, DIC, HOBT, OxymaPure and DIEA) were purchased from SDS Carlo-Erba. The NovaSyn[®] TGR resin (loading 0.25 mmol / g) and other coupling reagents (PyBOP, DEPBT), were obtained from Novabiochem. All other reagents were purchased from Aldrich. All solvents were purchased from SDS Carlo-Erba, except NMR solvents, which were obtained from Eurisotop.

Peptides were synthesized on solid phase and under microwave irradiation using a CEM Liberty 1 synthesizer. Microwave irradiation was employed following the synthesizer provider recommendations for both coupling and deprotection steps. Other peptide reactions were monitored by Ellman analysis, chloranil test or HPLC. HPLC analysis was realized using a Phenomenex Luna C18 column (5 μm, 2.5 x 250 mm). Peptides were purified by semi-preparative HPLC on a Grace Alltima C18 column (5 μm, 10 x 250 mm) using the indicated gradient program at a flow rate of 2 mL/min. For HPLC analysis, the following solvents were used: solvent A was water with 0.1% TFA and solvent B was a 70% acetonitrile in water solution with 0.09% TFA. The products were detected by UV at 220 and 254 nm. Mass spectrometry spectra were recorded on a Waters ZQ 2000 spectrometer. MALDI spectra were recorded on an Applied Biosystem 4700 proteomic analyzer spectrometer at UPMC (Paris, France). NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer (300 or 400MHz), and were internally referenced to residual solvent signals. The abbreviations used for signal multiplicity are the following: s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet).

Linear peptide synthesis

Peptide 72

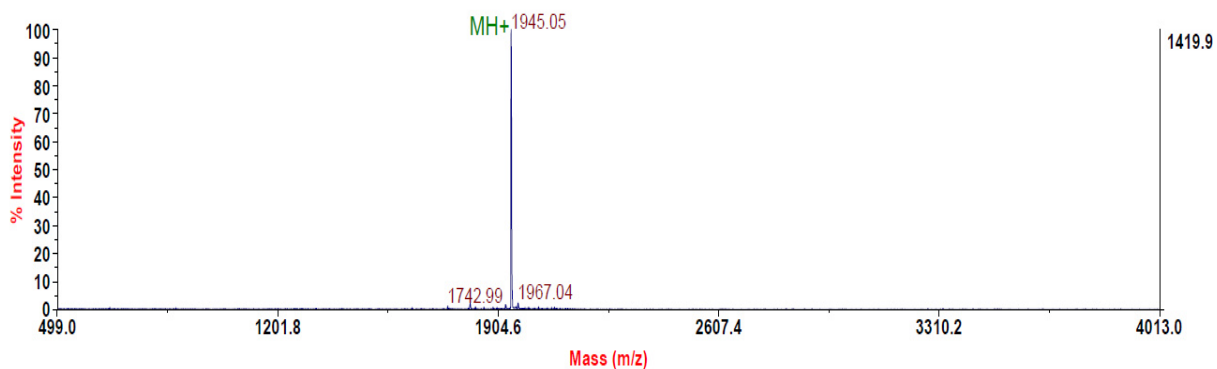
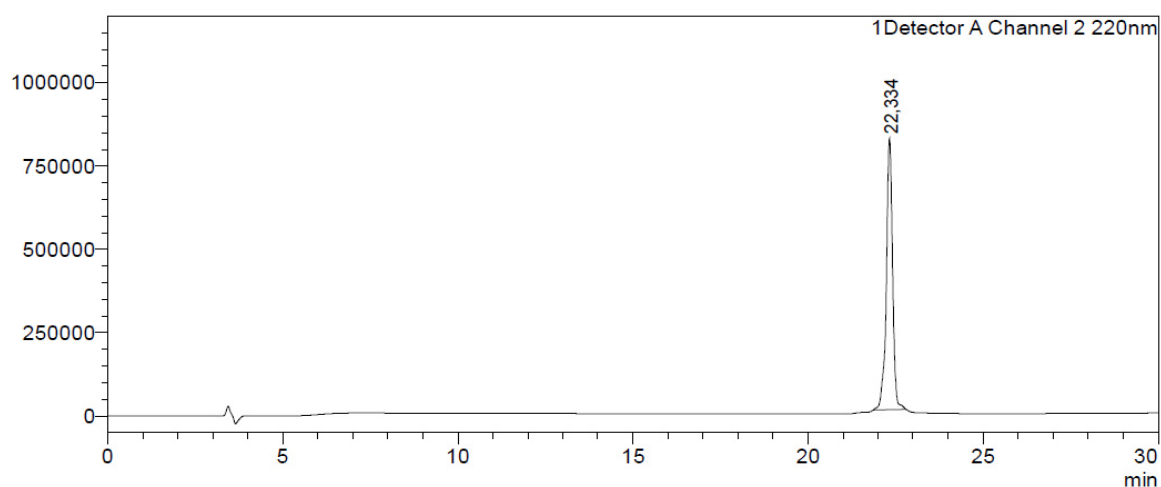
Peptide **72** was synthesized on solid phase and under microwave irradiation at a 0.1 mmol scale with NovaSyn® TGR resin. Coupling reactions were performed using N^α-Fmoc amino acids (5 eq. related to the resin) activated with DIC (4.9 eq.) and OxymaPure (10 eq.). After each coupling step, Fmoc removal was effected by treating the resin with 20% piperidine in DMF. The deprotection and cleavage of the peptide from the resin was done by treatment with 10 mL of TFA/H₂O/EDT/TIPS 94:2.5:2.5:1.0 for 3 h at room temperature. After removal of the resin, the filtrate was concentrated under a stream of argon and precipitated with cold diethyl ether. The precipitate was isolated by centrifugation and washed with diethyl ether. The crude peptide was purified by semi-preparative HPLC using a gradient of 20% to 70% B in 90 min. The product was collected and analyzed by HPLC. Pure fractions were pooled and lyophilized to yield the peptide **72** as a white solid.



MS (MALDI): [M+H]⁺ calculated 1944.94; found 1945.05

HPLC: Rt = 22.33 min (20 - 80 % of solvent B in 30 min)

uV



Monocyclic peptide: General procedure

Procedure A: peptides were synthesized on solid phase and under microwave irradiation at a 0.1 mmol scale with NovaSyn® TGR resin. Coupling reactions were performed using N^α-Fmoc amino acids (5 eq. related to the resin) activated with DIC (4.9 eq.) and Oxyma Pure (10 eq.). After each coupling step, Fmoc removal was effected by treating the resin with 20% piperidine in DMF. The deprotection and cleavage of the peptide from the resin was done by treatment with 10 mL of TFA/H₂O/EDT/TIPS (94:2.5:2.5:1.0) for 3 h at room temperature. After removal of the resin the filtrate was concentrated under a stream of argon and precipitated with cold diethyl ether. The precipitate was isolated by centrifugation and washed with diethyl ether, affording the crude peptide. The cyclization was carried out at 1 mM peptide concentration by addition of a 100 mM solution of NH₄.HCO₃. The reaction was monitored by HPLC and Ellman analysis. After completion of the reaction, the solvent was evaporated and the crude peptides were purified by semi-preparative HPLC using the indicated gradient program. The products were collected and analyzed by HPLC. Pure fractions were pooled and lyophilized to yield the peptides as white solids.

Procedure B: the linear peptide was synthesized on solid support and under microwave activation according to the protocol described in procedure A. The peptide was then acetylated using a mixture of acetic anhydride (0.5 M), DIEA (0.125 M) and DMF (10 mL). The reaction was stirred at room temperature during 15 min. After chloranil analysis showed complete acetylation, the resin was washed with DMF. The last steps of the synthesis (deprotection, cleavage of the peptide from the resin, cyclization and purification) were performed as described on procedure A.

Procedure C: the linear peptide was synthesized on solid support and under microwave activation according to the protocol described in the procedure A. The desired carboxylic acid was then coupled manually to the resin. The coupling reaction was performed in DMF using the suitable acid (10 eq. related to the resin) activated with DIC (10 eq.) and HOBt (10 eq.). This reaction was monitored by chloranil analysis. After completion, the resin was washed with DMF and dichloromethane. The final steps of the synthesis and the purification were performed as described in the procedure A.

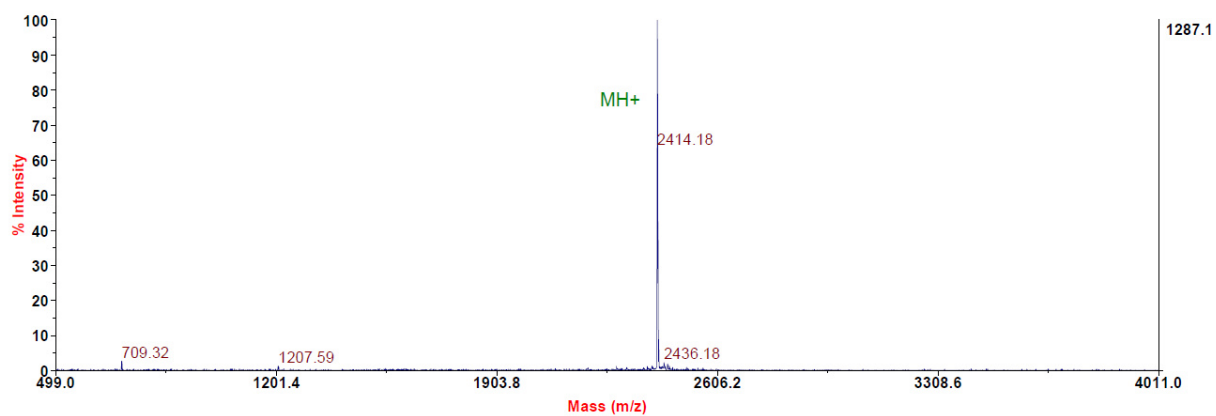
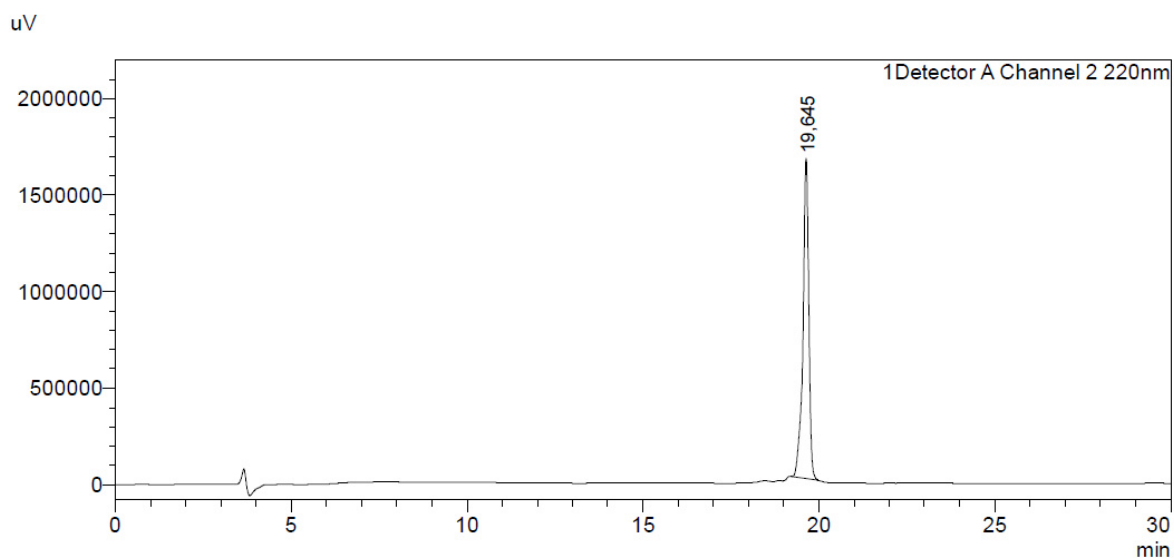
Peptide v114*

The peptide v114* was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure A of monocyclic peptide formation.



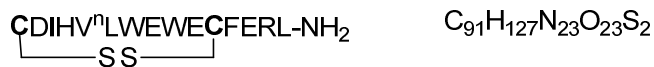
MS (MALDI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated 2414.10; found 2414.18

HPLC: $R_t = 19.64$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



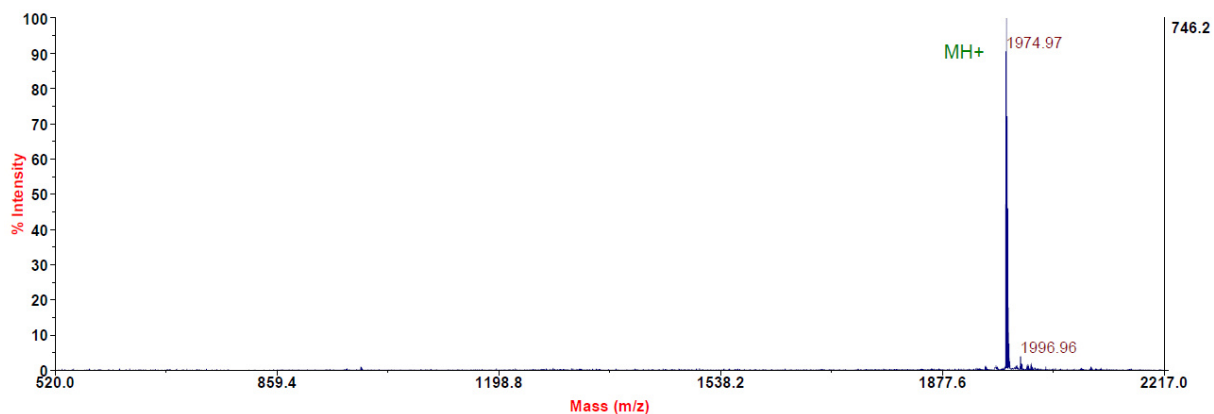
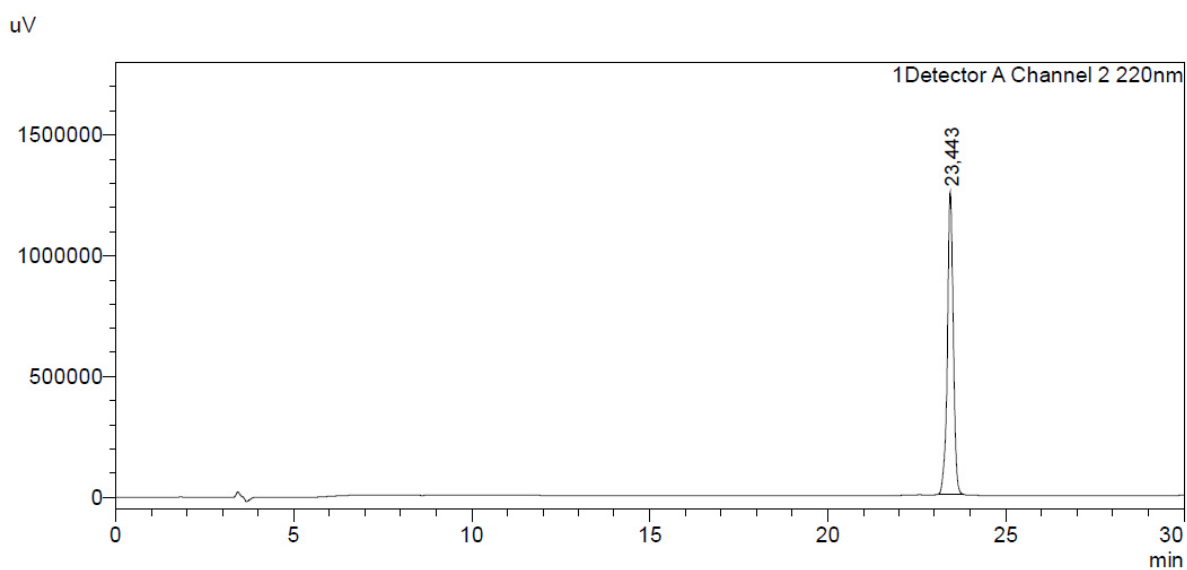
Peptide 63

The peptide **63** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure A of monocyclic peptide formation.



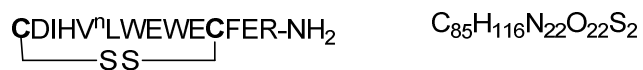
MS (MALDI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated 1974.90; found 1974.97

HPLC: $R_t = 23.44$ min (20 - 80 % of solvent B in 30 min)



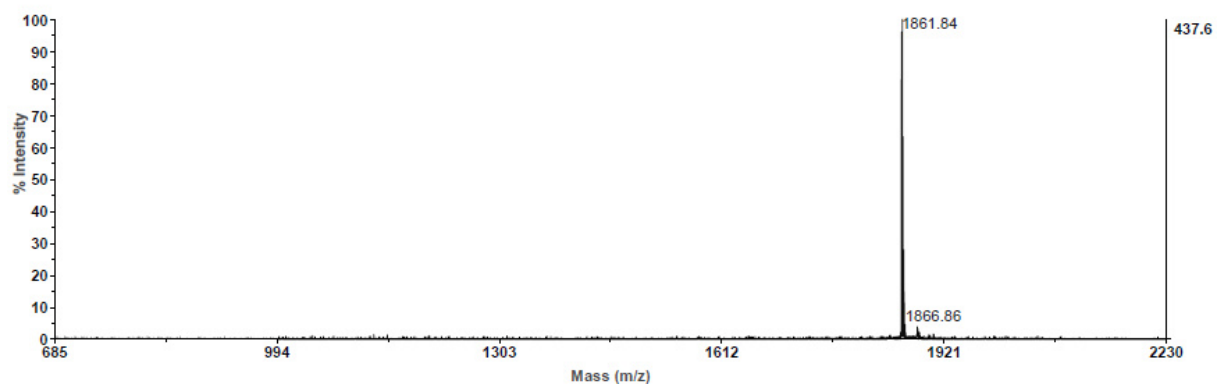
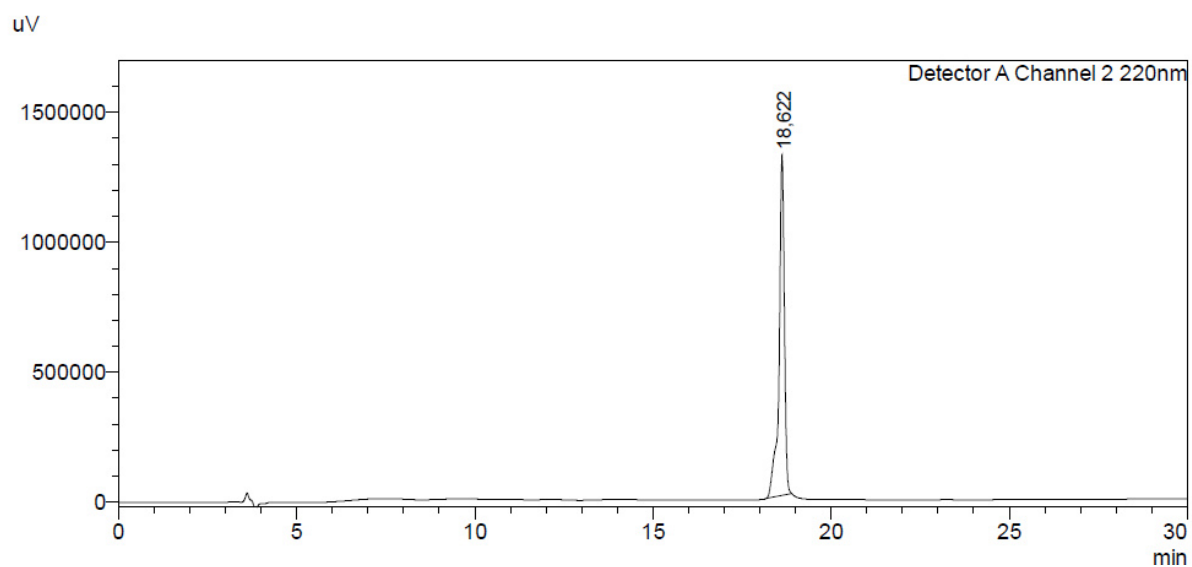
Peptide 64

The peptide **64** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure A of monocyclic peptide formation.



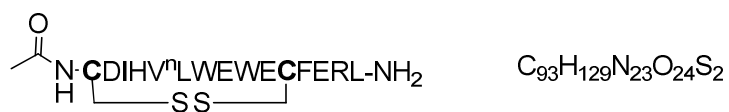
MS (MALDI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated 1861.81; found 1861.84

HPLC: $R_t = 18.62$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



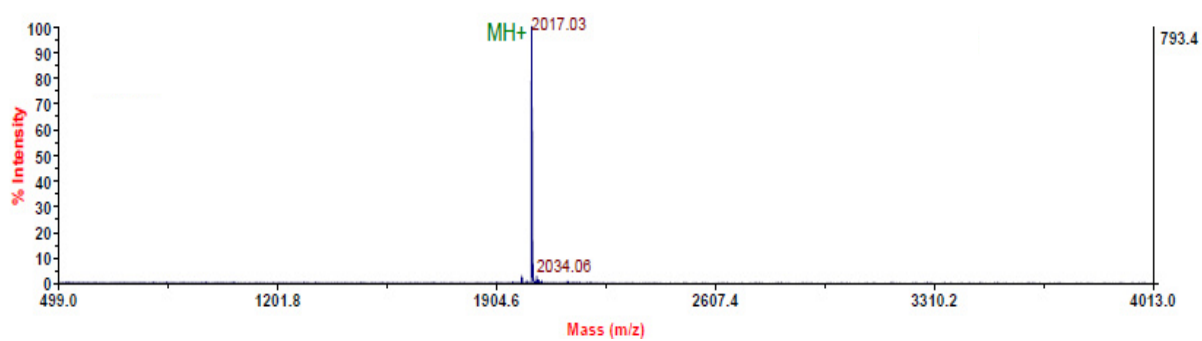
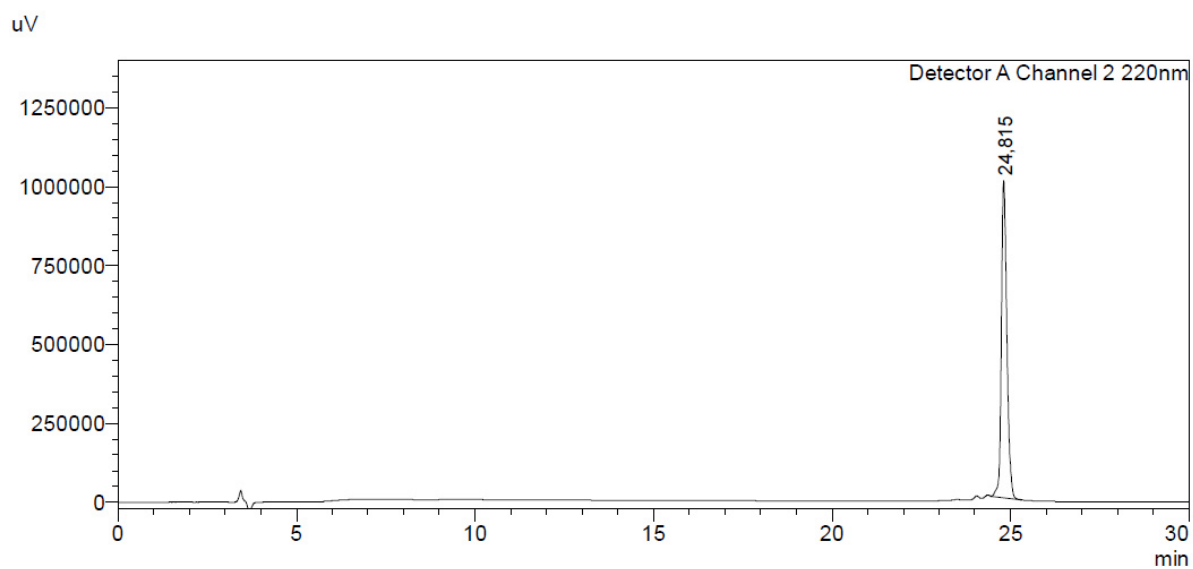
Peptide 65

The peptide **65** was prepared on a 0.025 mmol scale according to the general procedure B of monocyclic peptide formation.



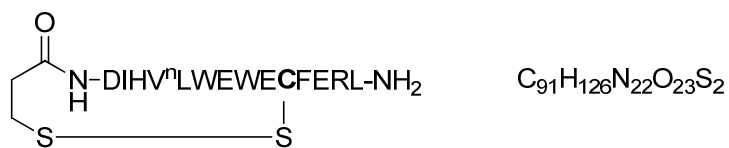
MS (MALDI): $[M+H]^+$ calculated 2016.90; found 2017.03

HPLC: $R_t = 24.81$ min (20 - 80 % of solvent B in 30 min)



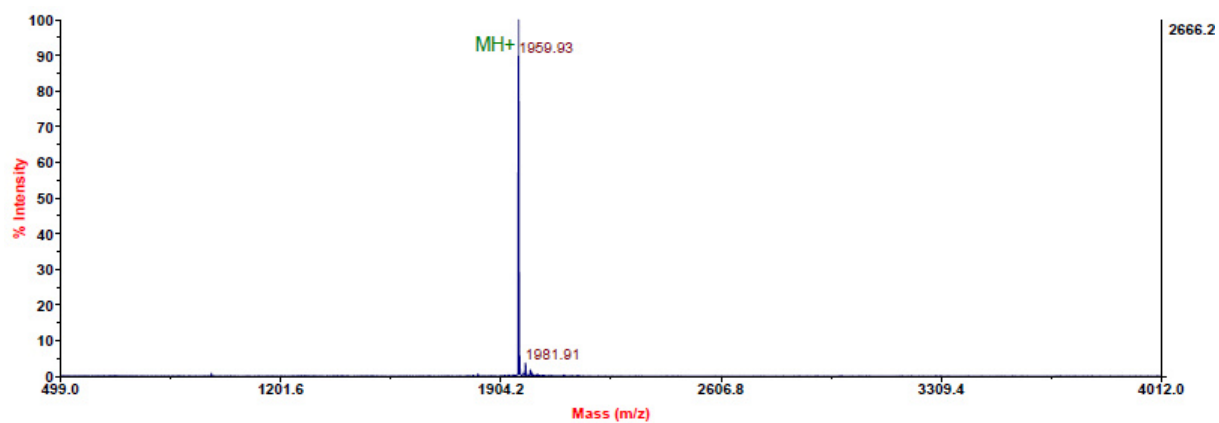
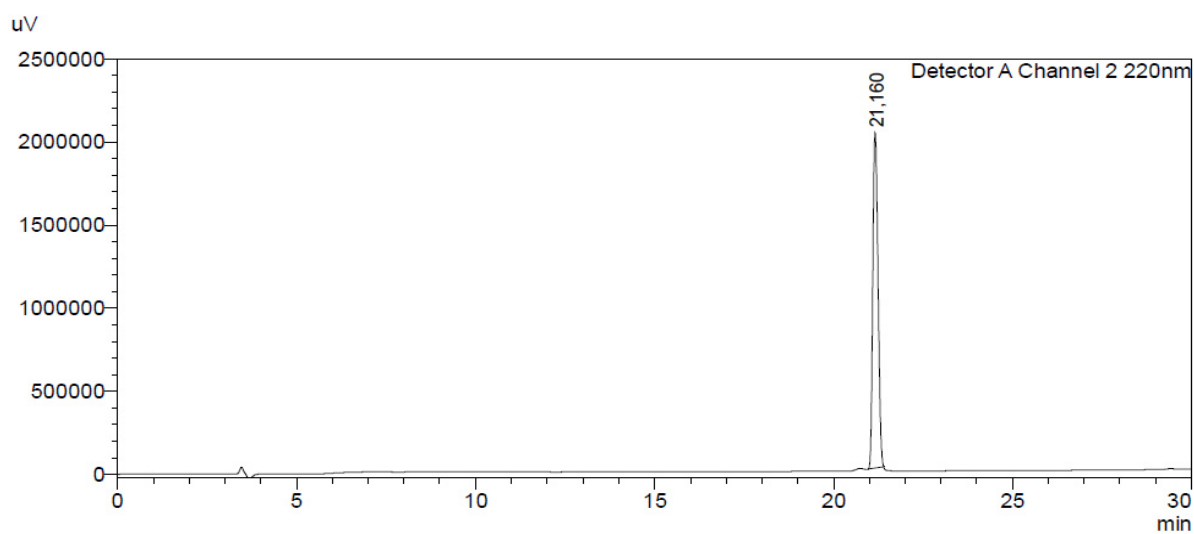
Peptide 66

The peptide **66** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure A of monocyclic peptide formation.



MS (MALDI): $[M+H]^+$ calculated 1959.90; found 1959.93

HPLC: Rt = 21.16 min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



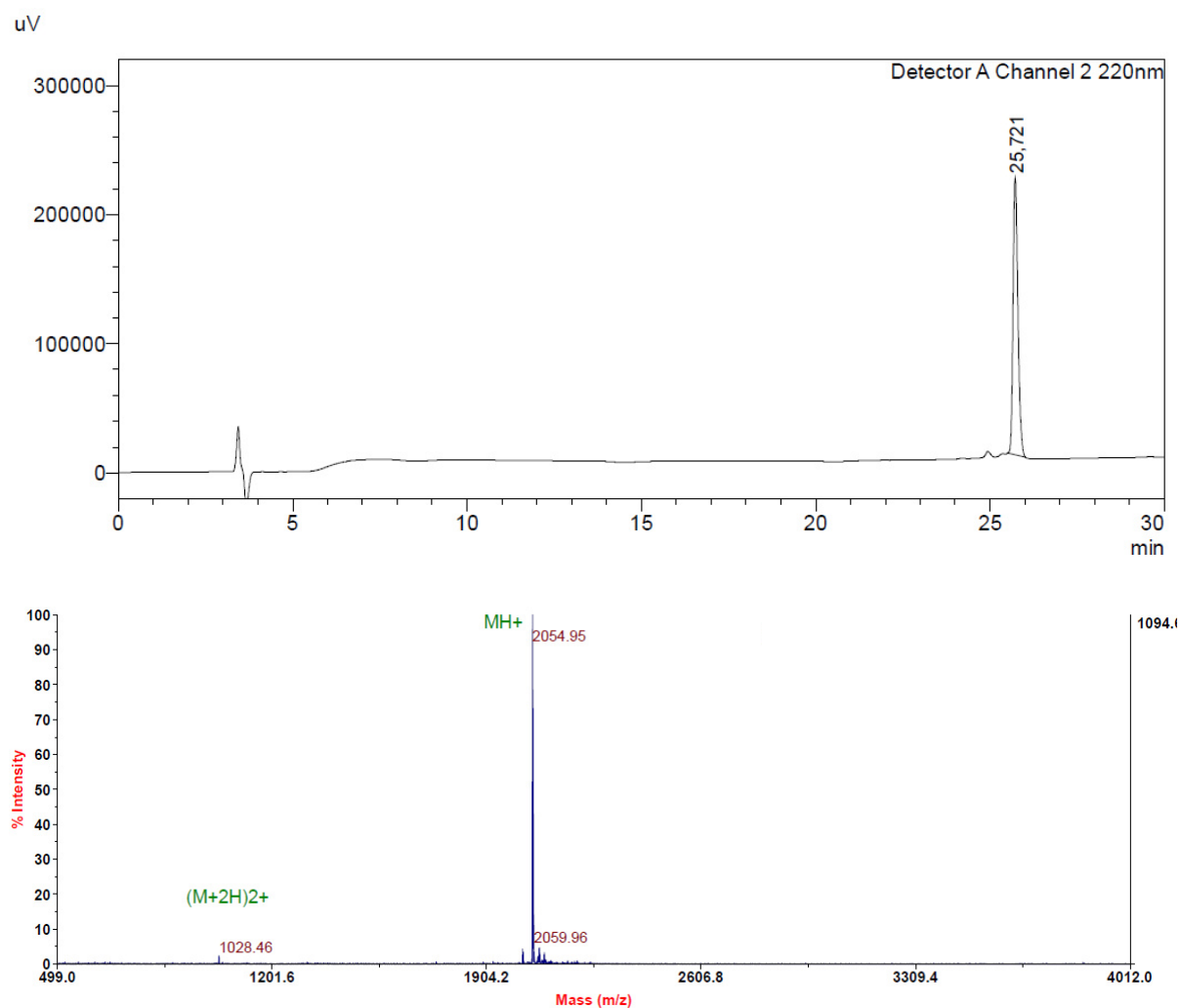
Peptide 67

The peptide **67** was prepared on a 0.025 mmol scale according to the general procedure C of monocyclic peptide formation.



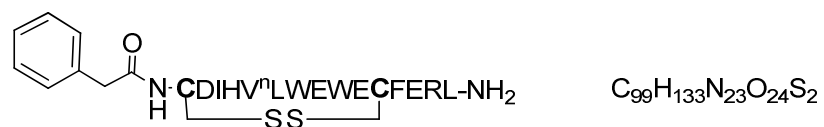
MS (MALDI): [M+H]⁺ calculated 2054.90; found 2054.95

HPLC: Rt = 25.72 min (20 - 80 % of solvent B in 30 min)



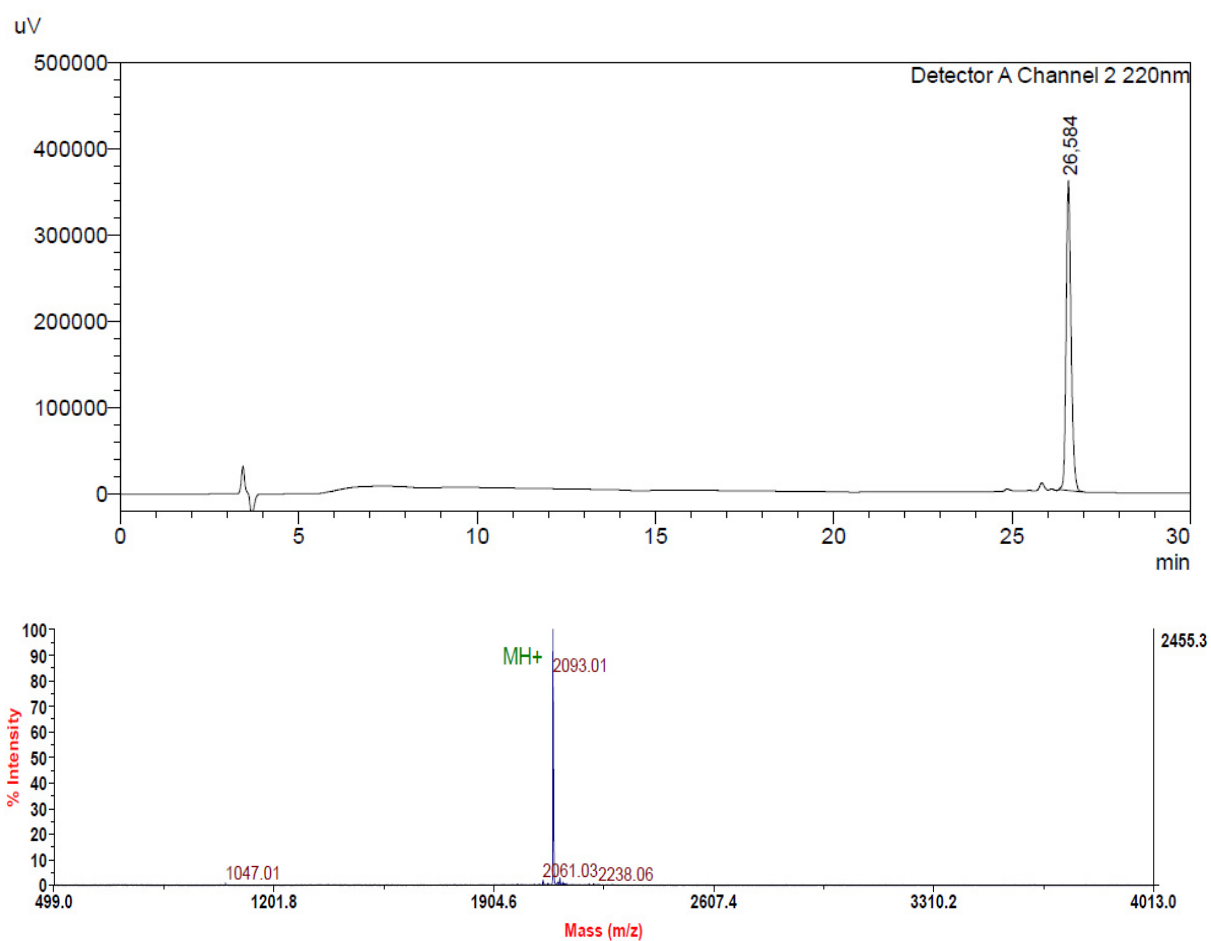
Peptide 68

The peptide **68** was prepared on a 0.025 mmol scale according to the general procedure C of monocyclic peptide formation.



MS (MALDI): [M+H]⁺ calculated 2092.90; found 2093.01

HPLC: Rt = 26.58 min (20 - 80 % of solvent B in 30 min)



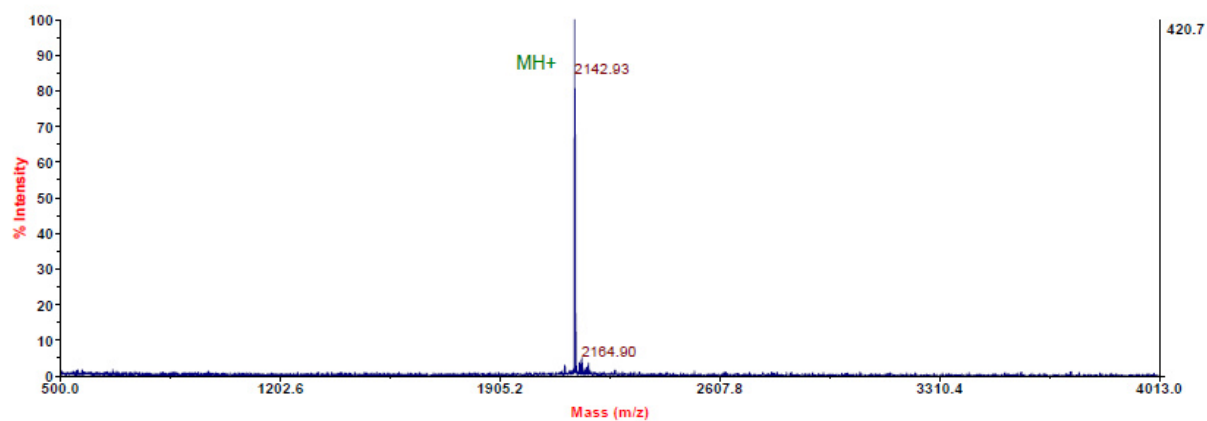
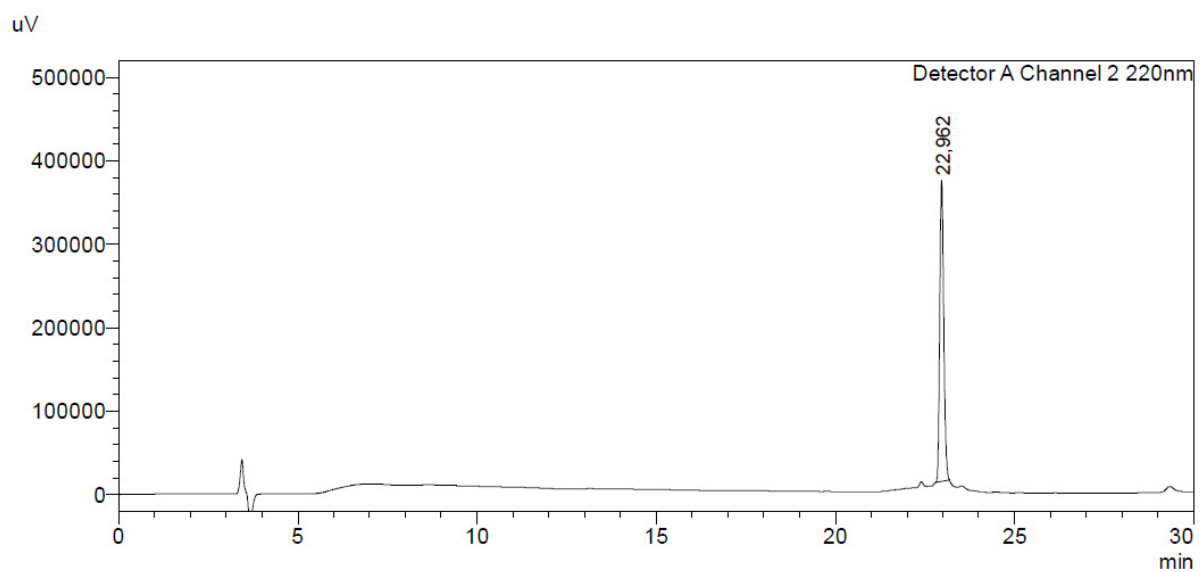
Peptide 69

The peptide **69** was prepared on a 0.025 mmol scale according to the general procedure C of monocyclic peptide formation.



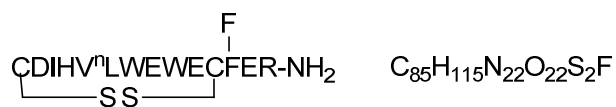
MS (MALDI): [M+H]⁺ calculated 2142.90; found 2142.93

HPLC: Rt = 22.96 min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



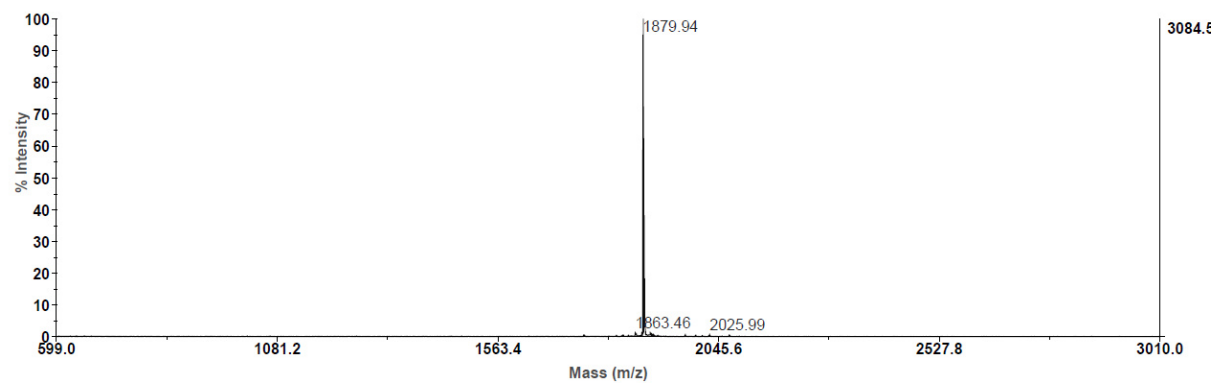
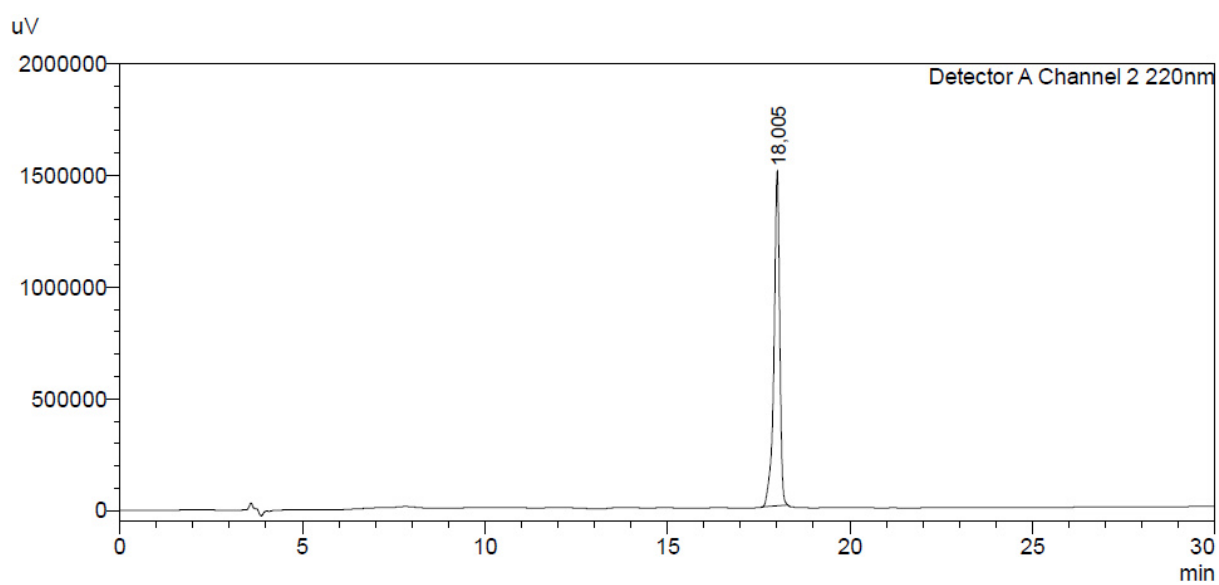
Peptide 70

The peptide **70** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure A of monocyclic peptide formation.



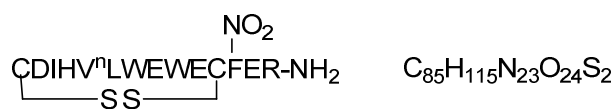
MS (MALDI): $[M+H]^+$ calculated 1879.81; found 1879.94

HPLC: Rt = 18.01 min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



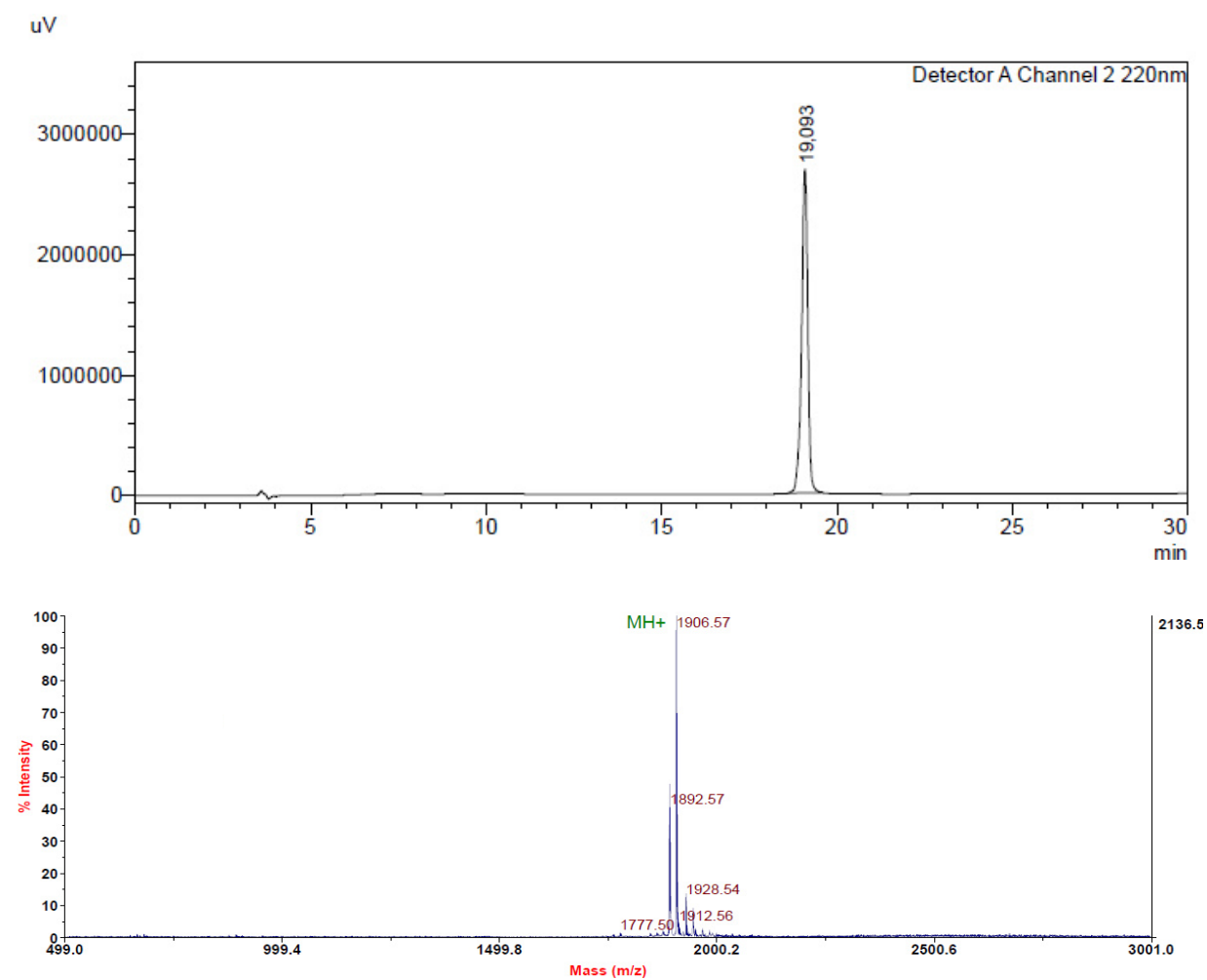
Peptide 71

The peptide **71** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure A of monocyclic peptide formation.



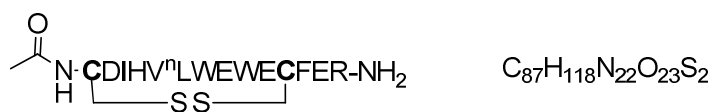
MS (MALDI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated 1906.81; found 1906.57

HPLC: $R_t = 19.09$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



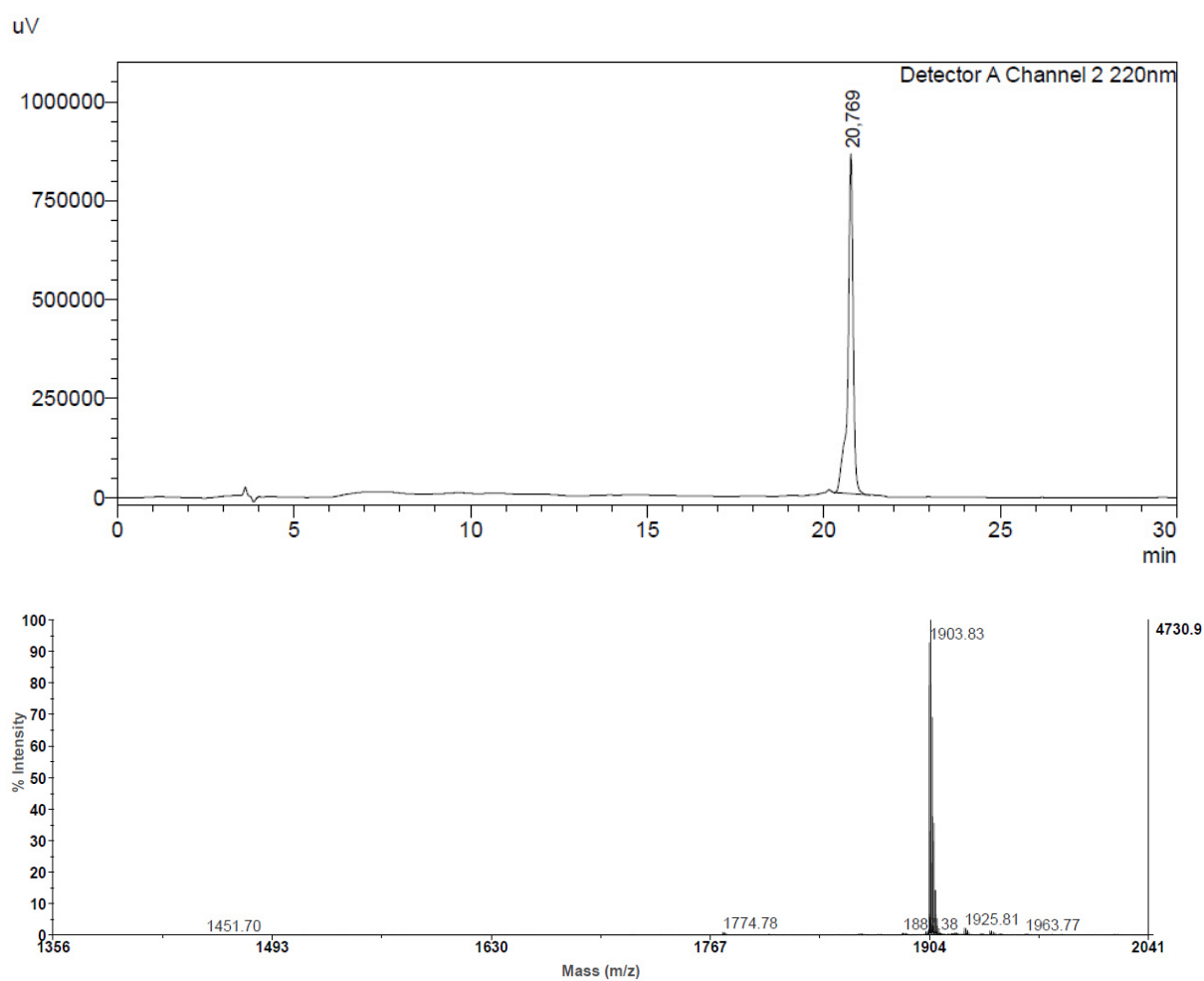
Peptide 73

The peptide **73** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure B of monocyclic peptide formation.



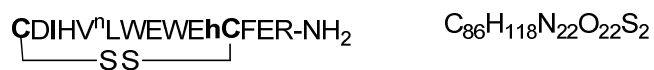
MS (MALDI): $[M+H]^+$ calculated 1903.81; found 1903.83

HPLC: $R_t = 20.77$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



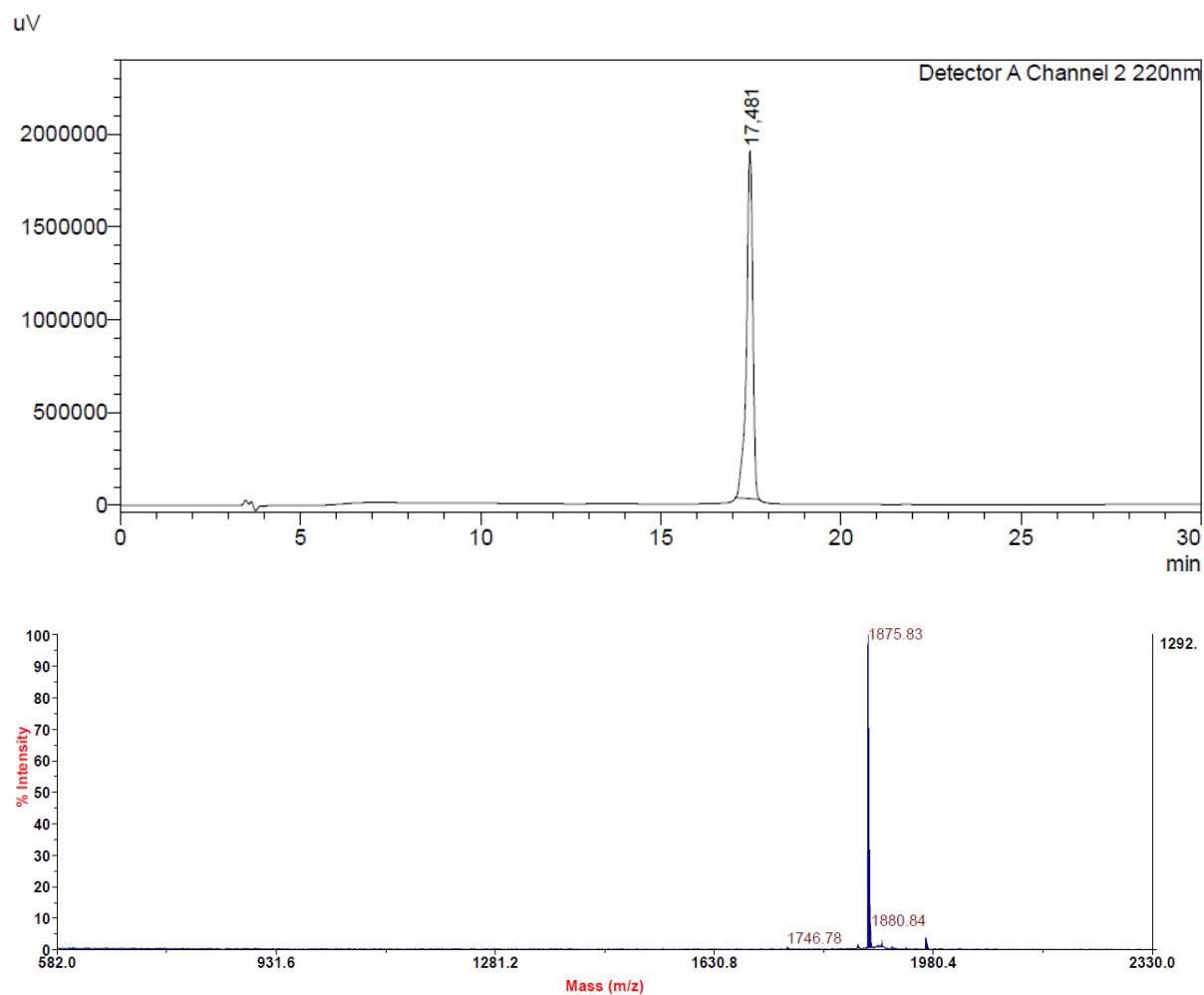
Peptide 76

The peptide **76** was prepared on a 0.05 mmol scale according to the general procedure A of monocyclic peptide formation.



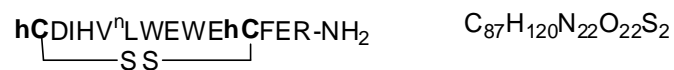
MS (MALDI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated 1875.81; found 1875.83

HPLC: $R_t = 17.48$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



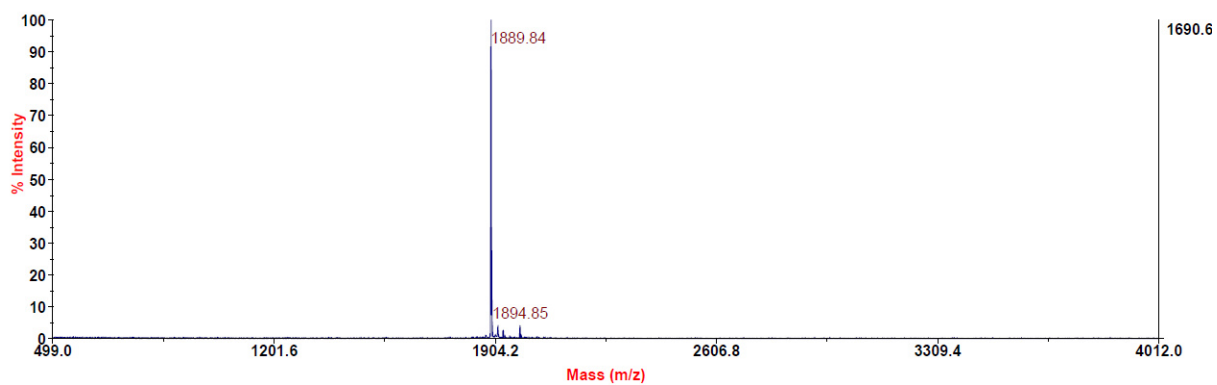
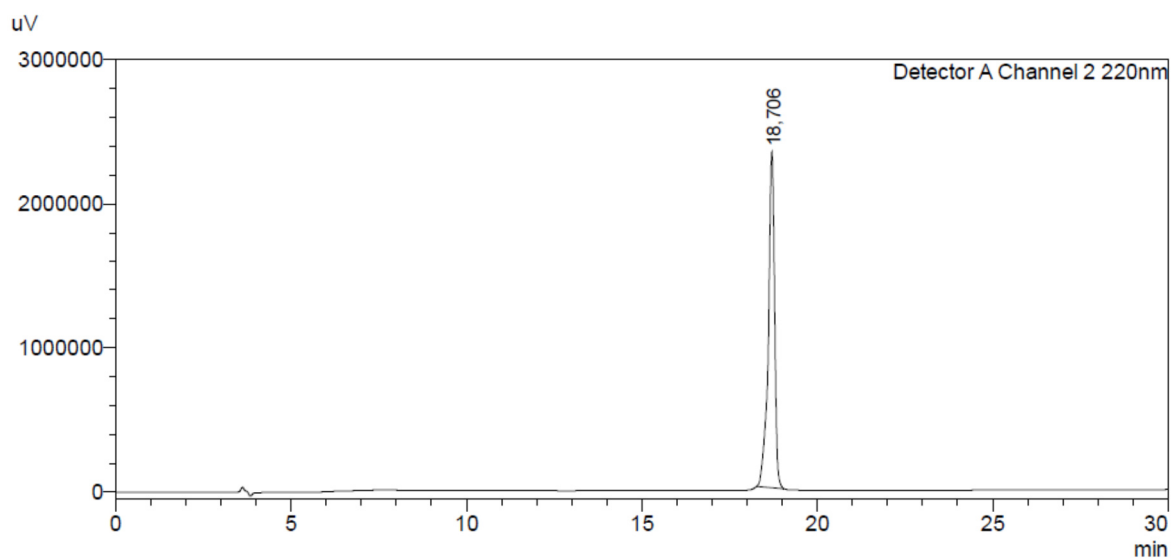
Peptide 77

The peptide **77** was prepared on a 0.05 mmol scale according to the general procedure A of monocyclic peptide formation.



MS (MALDI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated 1889.81; found 1989.84

HPLC: $R_t = 18.71$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



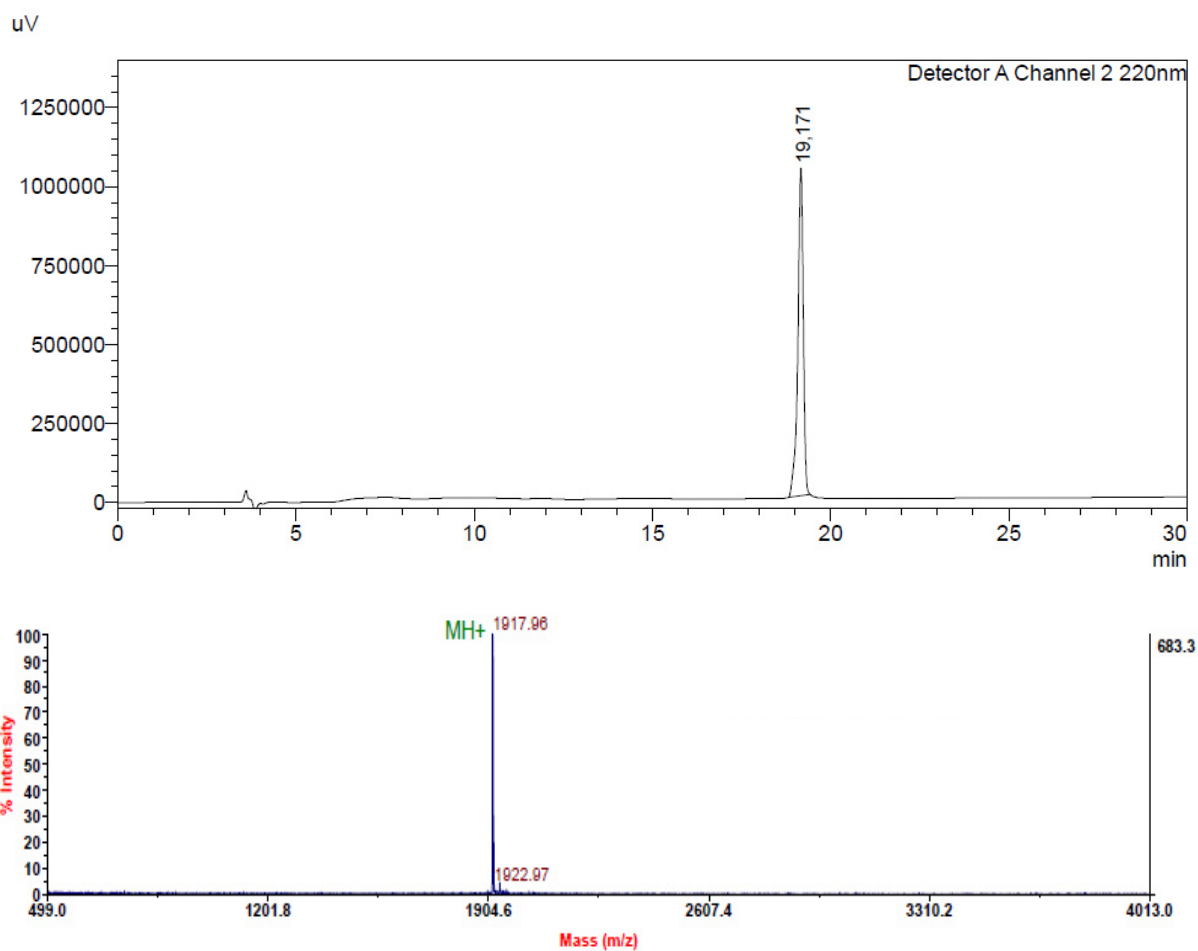
Peptide 74

The peptide **74** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure B of monocyclic peptide formation.



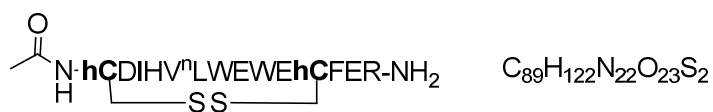
MS (MALDI): $[M+H]^+$ calculated 1917.82; found 1917.96

HPLC: $R_t = 19.17$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



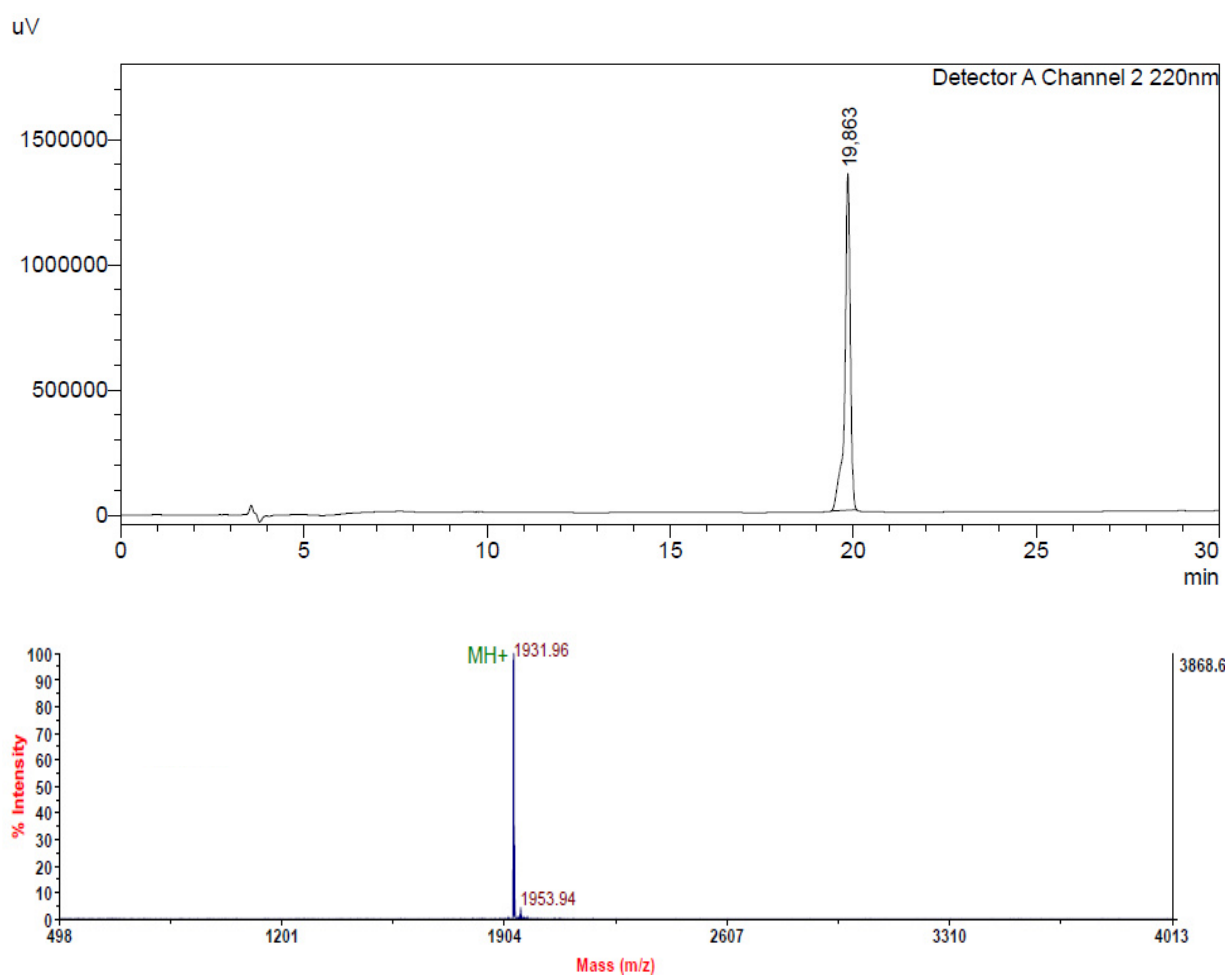
Peptide 75

The peptide **75** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure B of monocyclic peptide formation.



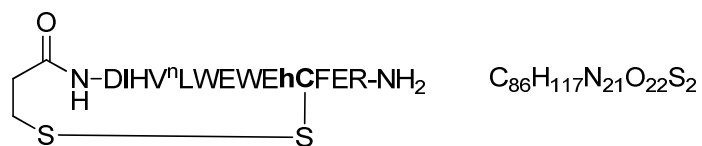
MS (MALDI): $[M+H]^+$ calculated 1931.82; found 1931.96

HPLC: $R_t = 19.86$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



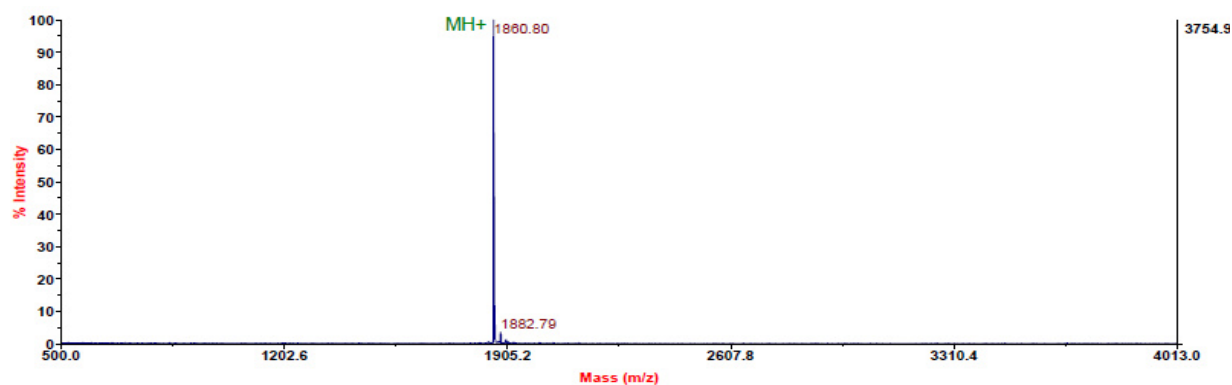
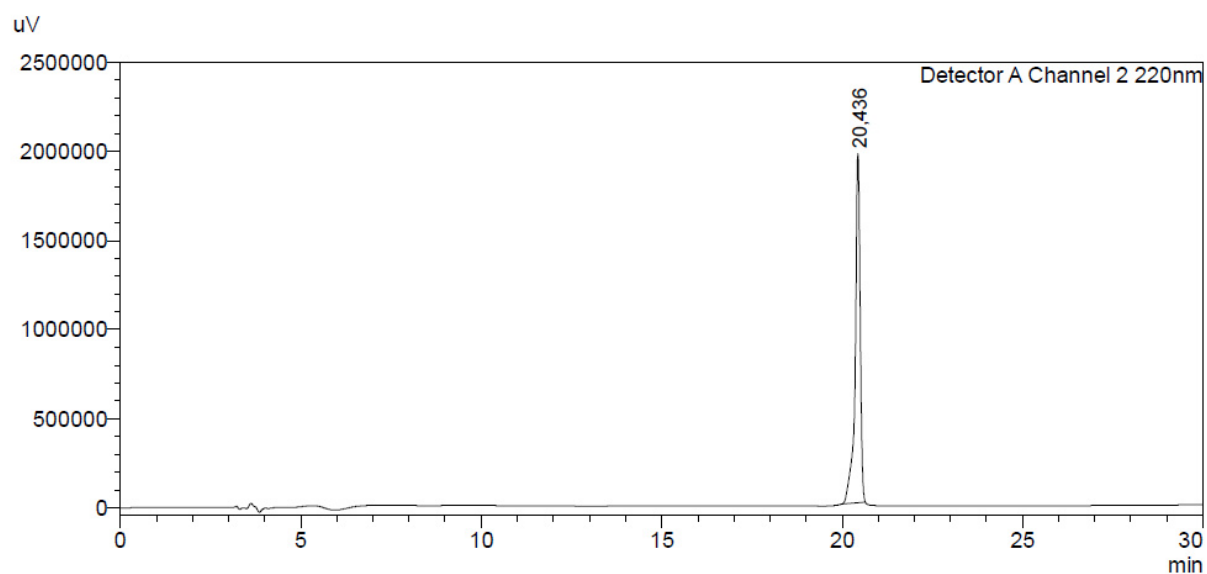
Peptide 86

The peptide **86** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure A of monocyclic peptide formation.



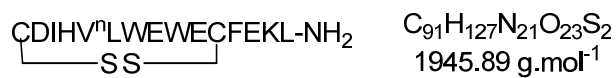
MS (MALDI): $[M+H]^+$ calculated 1860.81; found 1860.80

HPLC: $R_t = 20.44$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



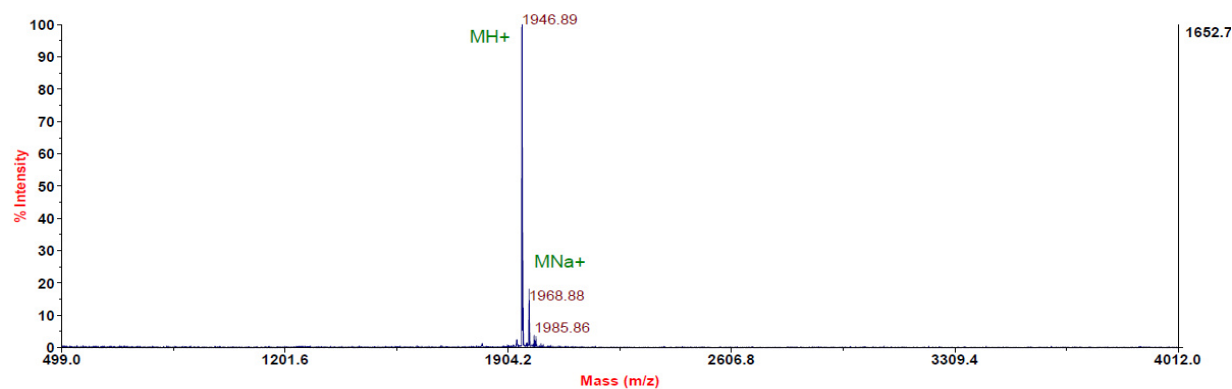
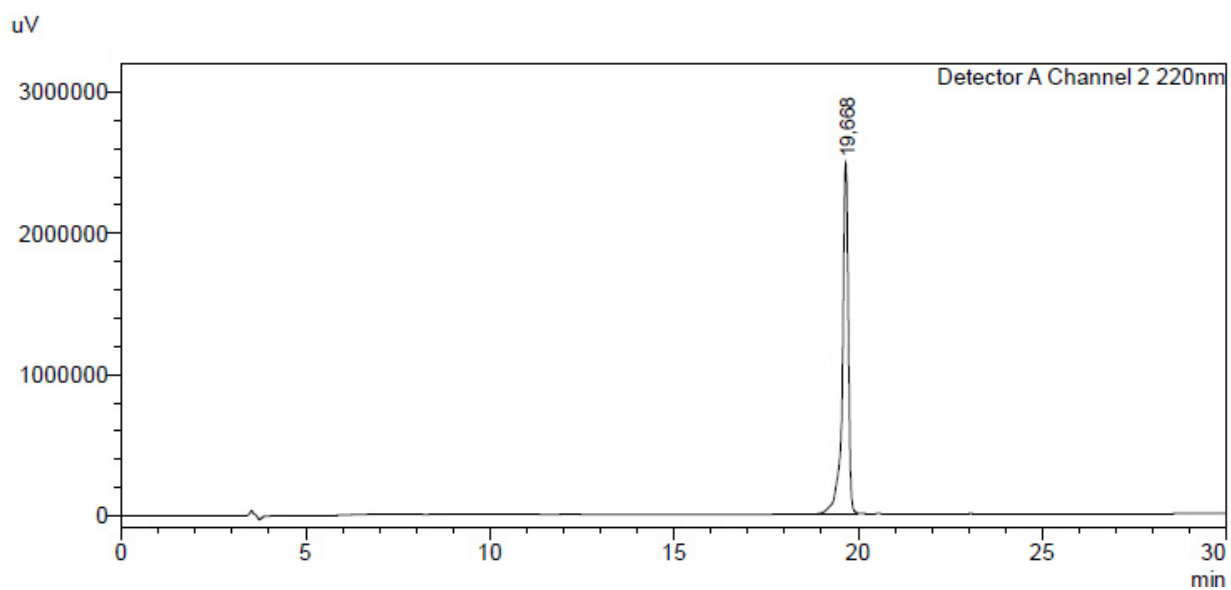
Peptide 87

The peptide **87** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure A of monocyclic peptide formation.



MS (MALDI): [M+H]⁺ calculated 1946.89; found 1946.89

HPLC: Rt = 19.67 min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)

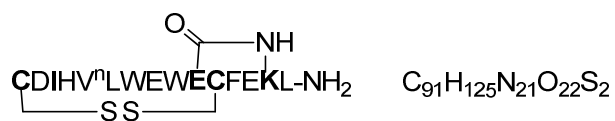


Bicyclic peptide: General procedure

Peptides comprising the first six aminoacids at the C-terminal extremity were synthesized on solid phase and under microwave irradiation at a 0.1 mmol scale with NovaSyn® TGR resin. Coupling reactions were performed using N^α-Fmoc amino acids (5 eq. related to the resin) activated with DIC (4.9 eq.) and Oxyma Pure (10 eq.). Excepted for the last N-terminal amino acid, the Fmoc groups were removed under standard conditions after each coupling reaction. Orthogonal protecting groups (phenylisopropyl ester of the aspartic or glutamic acid and the methyltrityl of the lysine) were removed by treating the peptide resin with 3% TFA in DCM (5 × 2 min). Then, the resin was washed with DMF (2 × 2 min) and DCM (2 × 2 min). The resin was neutralized by washing with 5% DIPEA in DMF (2 × 3 min), and washed again with DMF (2 × 2 min) and DCM (2 × 2 min). The cyclization was effected on-resin using 4 eq. of PyBOP and 10 eq. of DIEA in DMF. The reaction mixture was stirred at room temperature during 14 hours and was monitored by cleavage of 10 mg resin and HPLC analysis of the peptide. After complete disappearance of starting material, the resin was washed with DMF and the cyclic peptide was elongated under standard conditions. After elongation, the peptide was simultaneously deprotected and cleaved from the resin by treatment with TFA/H₂O/EDT/TIPS (94:2.5:2.5:1.0) during 2 hours. The solution was then filtered and concentrated under a stream of argon, and the crude peptide was precipitated with cold diethyl ether. The precipitate was isolated by centrifugation and washed with diethyl ether. The crude peptide was then engaged in the formation of the disulfide bridge. The cyclization reaction was carried out at 100 μM peptide concentration in a solution mixture of H₂O/MeCN/NH₄HCO₃ (200 mM) (25%:25%:50 %). The reaction was monitored by HPLC and Ellman analysis. After completion, the solvent was evaporated and the crude peptide was purified by semi-preparative HPLC using the indicated gradient. The products were collected and analyzed by HPLC. Pure fractions were pooled and lyophilized to obtain the desired bicyclic peptide as a white solid.

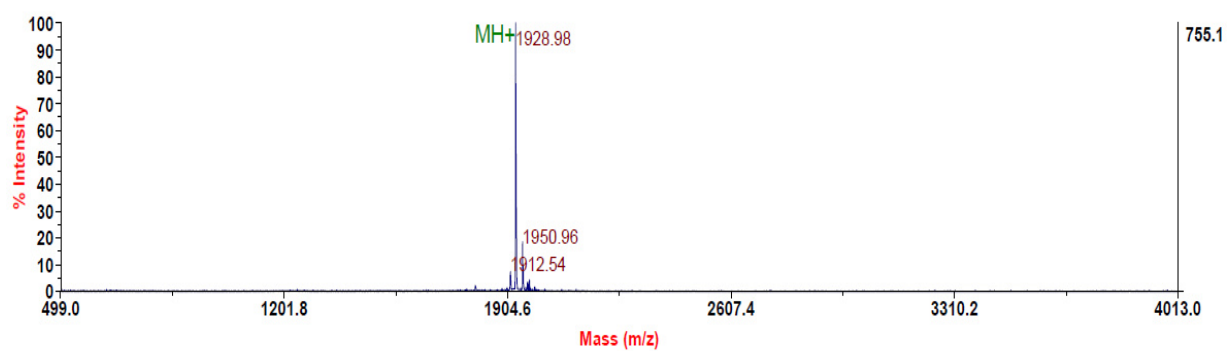
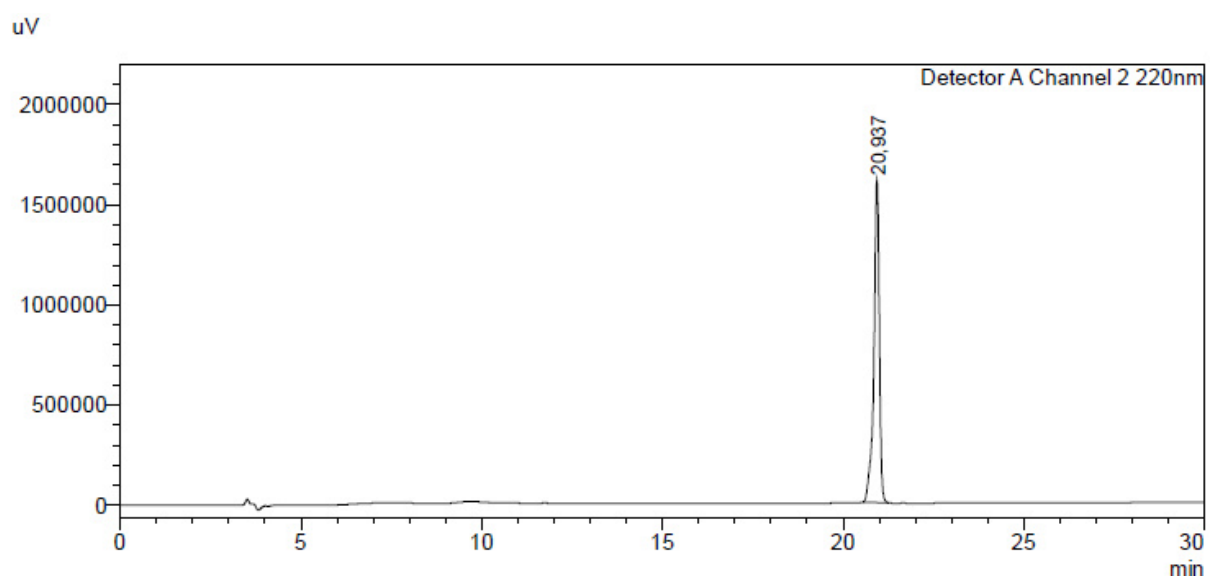
Peptide 88

The peptide **88** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure of bicyclic peptide formation.



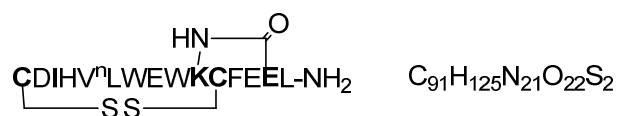
MS (MALDI): $[M+H]^+$ calculated 1928.89; found 1928.98

HPLC: $R_t = 20.94$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



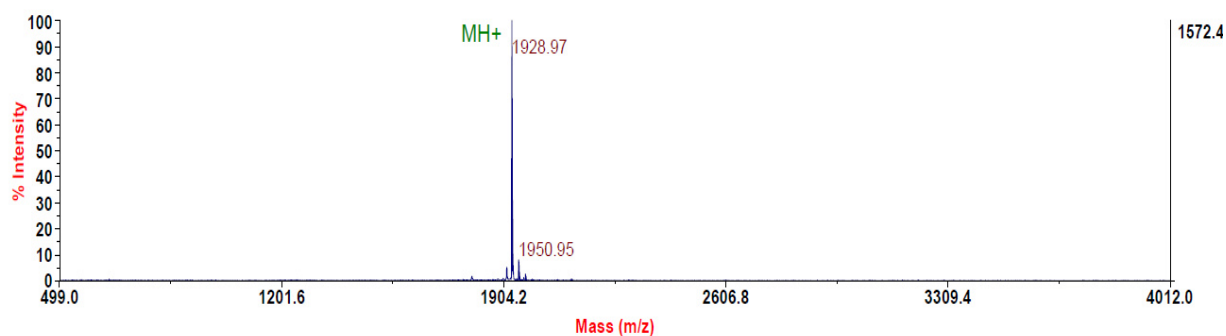
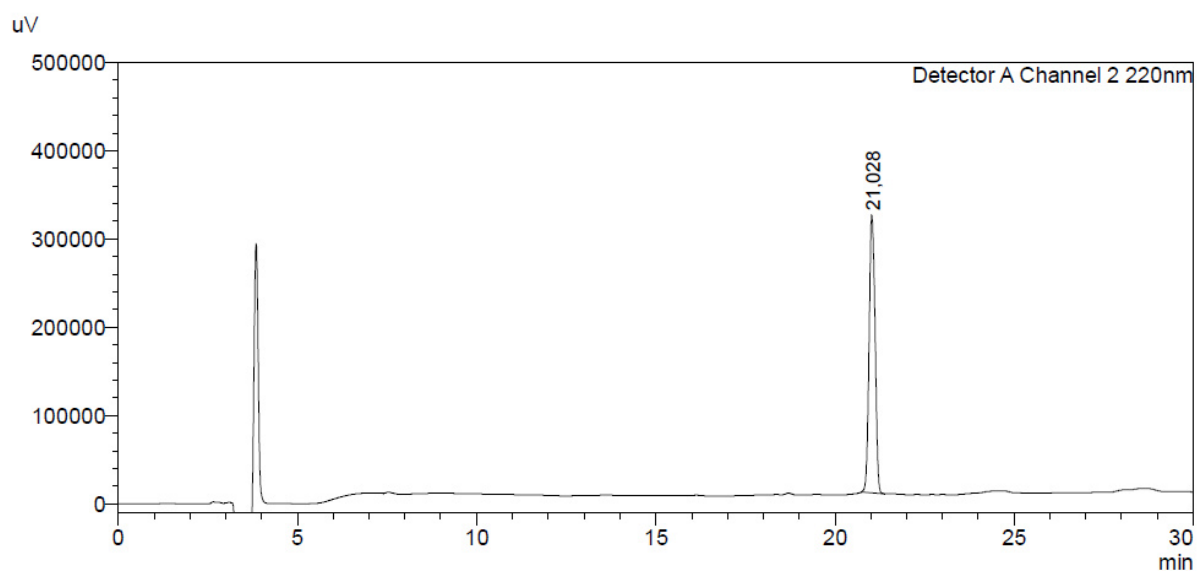
Peptide 89

The peptide **89** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure of bicyclic peptide formation.



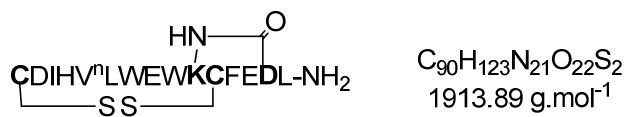
MS (MALDI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculated 1928.89; found 1928.97

HPLC: $R_t = 21.03$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



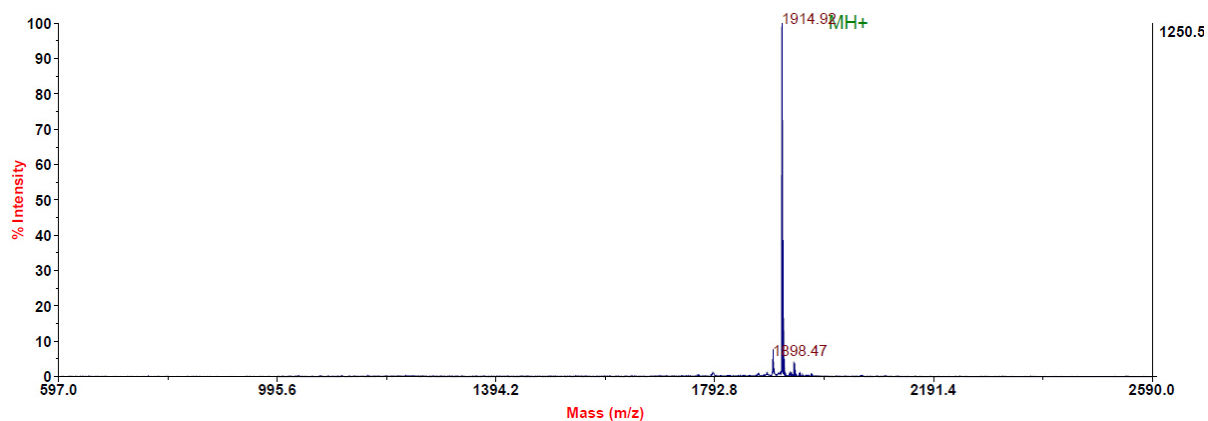
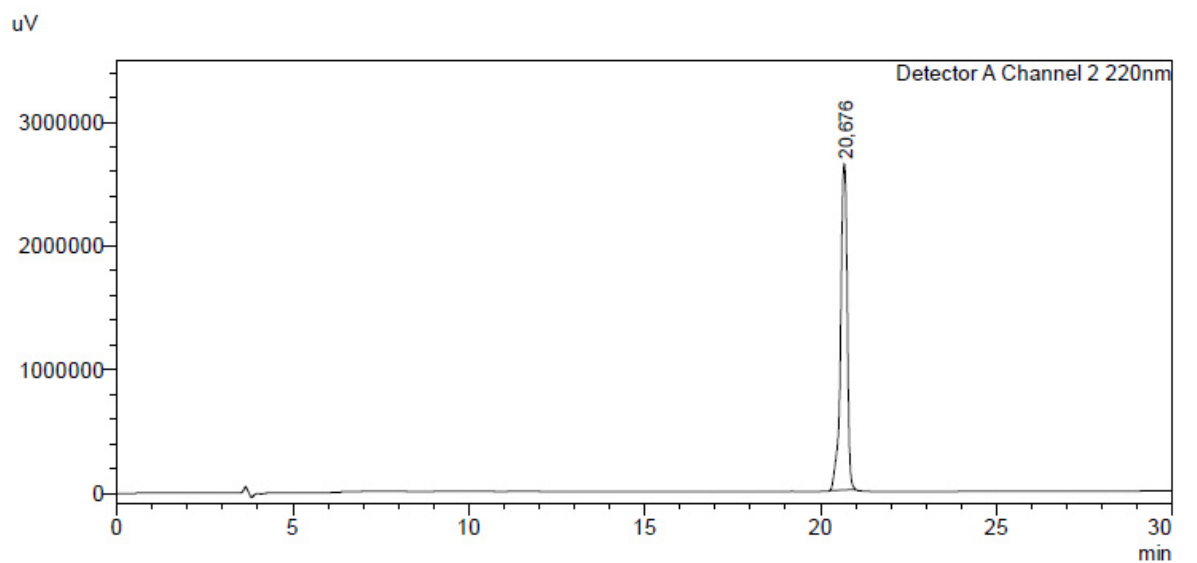
Peptide 90

The peptide **90** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure of bicyclic peptide formation.



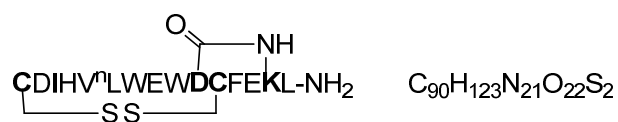
MS (MALDI): [M+H]⁺ calculated 1914.89; found 1914.92

HPLC: Rt = 20.68 min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



Peptide 91

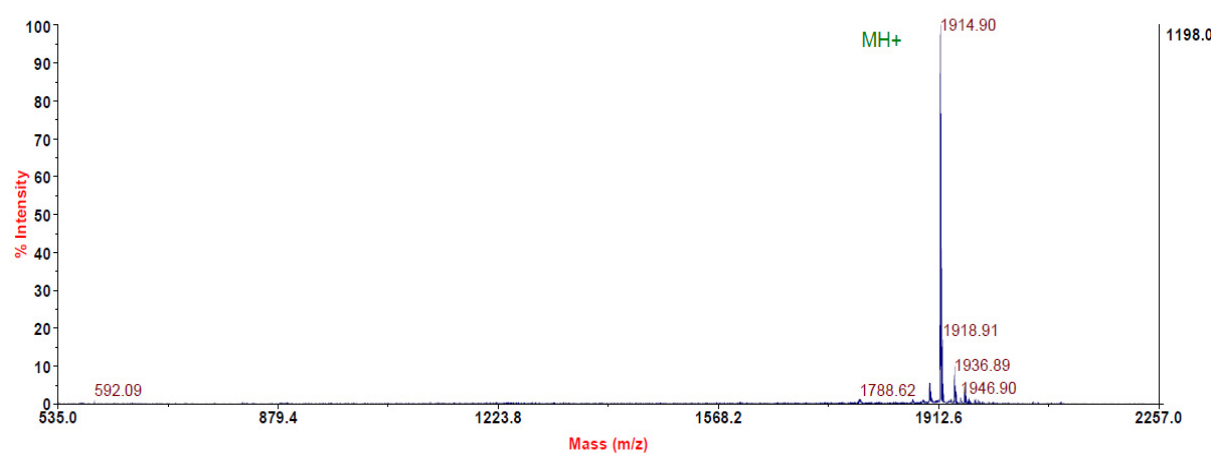
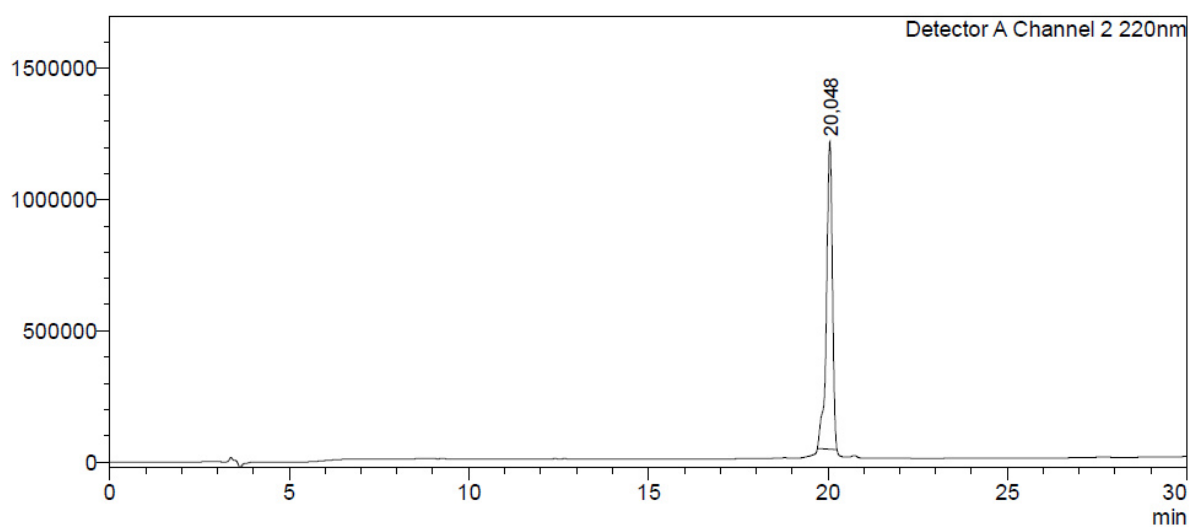
The peptide **91** was prepared on a 0.1 mmol scale according to the general procedure of bicyclic peptide formation.



MS (MALDI): $[M+H]^+$ calculated 1914.89; found 1914.90

HPLC: Rt = 20.05 min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)

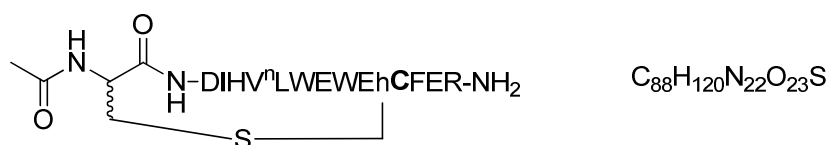
uV



Thioether peptide formation

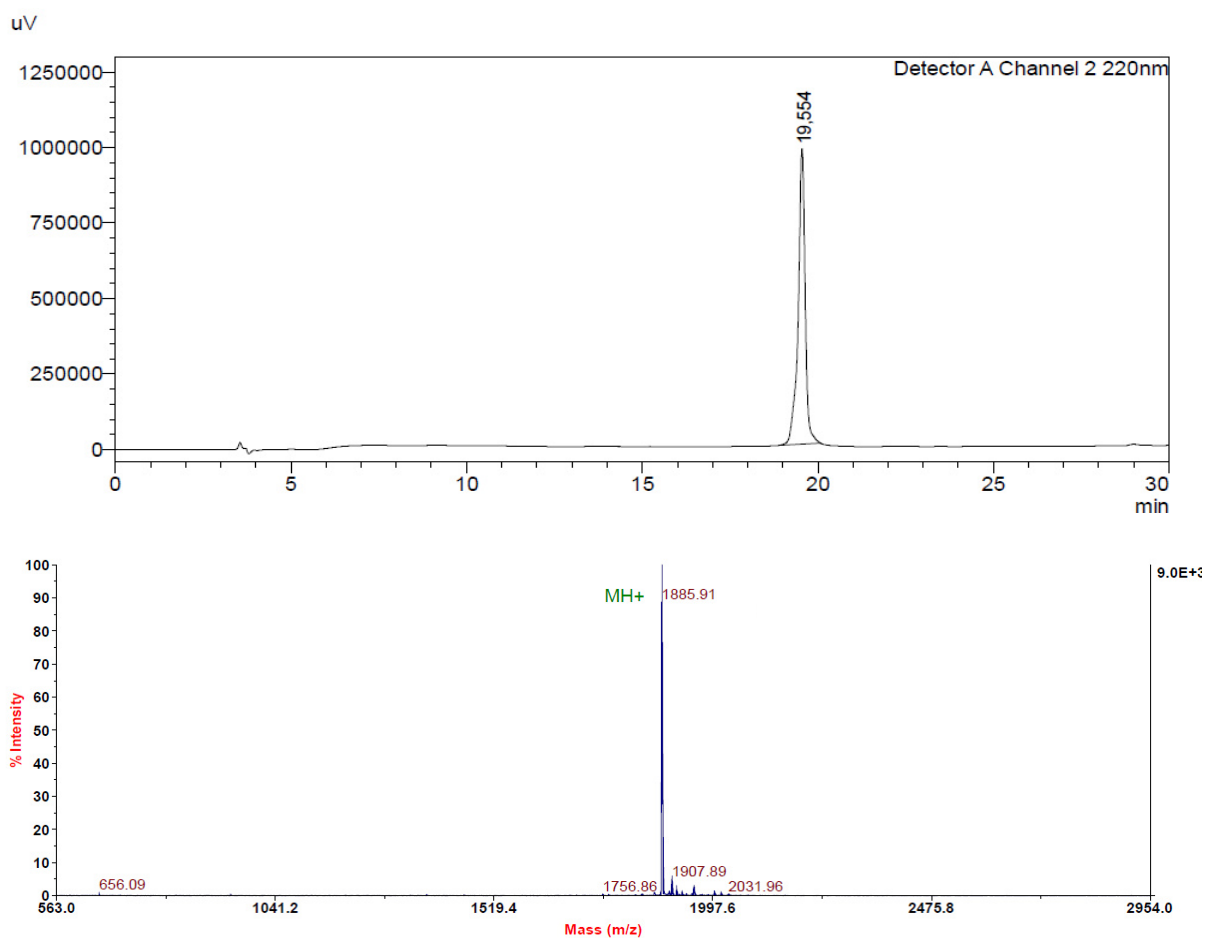
Peptide 85

The thioether peptide **85** was synthesized from the purified peptide **74**. The peptide **74** (20 mg) was dissolved in 50 mL of a solution of water/triethylamine (9:1). The reaction was stirred at room temperature. The reaction was monitored by HPLC and Ellman analysis until complete conversion (7 days). Then, the triethylamine was evaporated under vacuum and the peptide was lyophilized. The crude peptide was purified by semi-preparative HPLC using a gradient 20% - 100% B in 60 min (with a gentle slope between 65 and 75 % of B). The product was collected and analyzed by HPLC. Pure fractions were pooled and lyophilized to obtain the desired thioether peptide **85** as a white solid.



MS (MALDI): [M+H]⁺ calculated 1884.82; found 1885.91

HPLC: Rt = 19.55 min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)

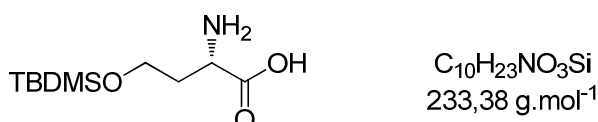


Attempt to synthesize the thioether peptide using a modified homoserine

The synthesis pathway is adapted from the procedure described by Dekan et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 15866-15869).

(S)-2-amino-4-((2-(trimethylsilyl)propan-2-yl)oxy)butanoic acid **79**

L-Homoserine (370 mg, 3.11 mmol) was dissolved in MeCN (7.4 mL). DBU (491.6 μ L, 3.26 mmol) was added dropwise to the solution at 0°C. A solution of tertbutyldimethylsilyl chloride (491.6 mg, 3.26 mmol) in MeCN (7.4 mL) was added dropwise over 5 min. The reaction mixture was allowed to warm to RT and stirred under inert atmosphere for 16 h. A white precipitate was formed. This precipitate was washed with MeCN and dried under vacuum. The white solid was then washed with cold H₂O and Et₂O and dried under vacuum to give the desired product **79** as a shiny white powder (360 mg, 50 %).



¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ (ppm) 0.14 (s, 6H, 2 \times CH₃), 0.95 (s, 9H, 3 \times CH₃), 1.94-2.22 (m, 2H, CH_{2 β}), 3.69-3.72 (m, 1H, CH_{2 α}), 3.89 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH_{2 γ})

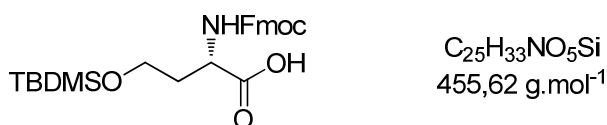
¹³C-NMR (75 MHz, MeOD): δ (ppm) -5.4 (2 \times CH₃), 19.1 (C⁴), 26.4 (3 \times CH₃), 34.4 (CH₂), 54.9 (CH), 62.1 (CH₂), 173.9 (C⁴).

MS (ESI+): m/z = 234 [M+H]⁺

Spectroscopic data were in agreement with those presented in the literature.

(S)-2-((((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-4-((2-(trimethylsilyl)propan-2-yl)oxy)butanoic acid **80**

To a solution of *O*-tertbutyldimethylsilyl homoserine **79** (350 mg, 1.5 mmol) in 25 mL of 5% NaHCO₃ (w/v) in 50% MeCN / H₂O was added a solution of Fmoc-O-succinimide (556.5 g, 1.65 mmol) in 15 mL MeCN. The reaction mixture was stirred at room temperature until total consumption of the starting material. The MeCN was removed under vacuum. The remaining suspension was acidified with a solution of citric acid (10 %) and extracted with EtOAc (3x). The organic phase was washed with 10% aqueous citric acid and brine. Purification by column chromatography on silica gel using 1% AcOH in EtOAc / cyclohexane : (1:1) afforded the desired product **80** as a clear oil (624 mg, 91 %).



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.11 (s, 6H, 2 × CH₃), 0.95 (s, 9H, 3 × CH₃), 2.12-2.16 (m, 2H, CH_{2β}), 3.85 (m, 2H, CH_{2γ}), 4.27 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CH_α), 4.37-4.52 (m, 3H, CH and CH₂), 6.14 (m, 1H, NH), 7.28-7.63 (m, 8H, 8 × CH_{AR}).

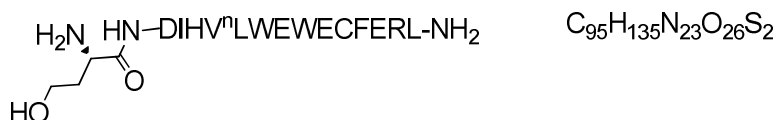
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) -5.4 (2 × CH₃), 18.4 (C⁴), 25.8 (3 × CH₃), 29.7 (CH₂), 33.5 (CH₂), 47.2 (CH), 53.0 (CH), 60.8 (CH₂), 67.1 (2 × C⁴), 120.2 (2 × CH_{AR}), 125.1 (2 × CH_{AR}), 127.1 (2 × CH_{AR}), 128.2 (2 × CH_{AR}), 141.3 (C⁴), 143.8 (C⁴), 156.3 (C⁴), 174.9 (C⁴).

MS (ESI⁺): *m/z* = 478 [M+Na]⁺

Spectroscopic data were in agreement with those presented in the literature.

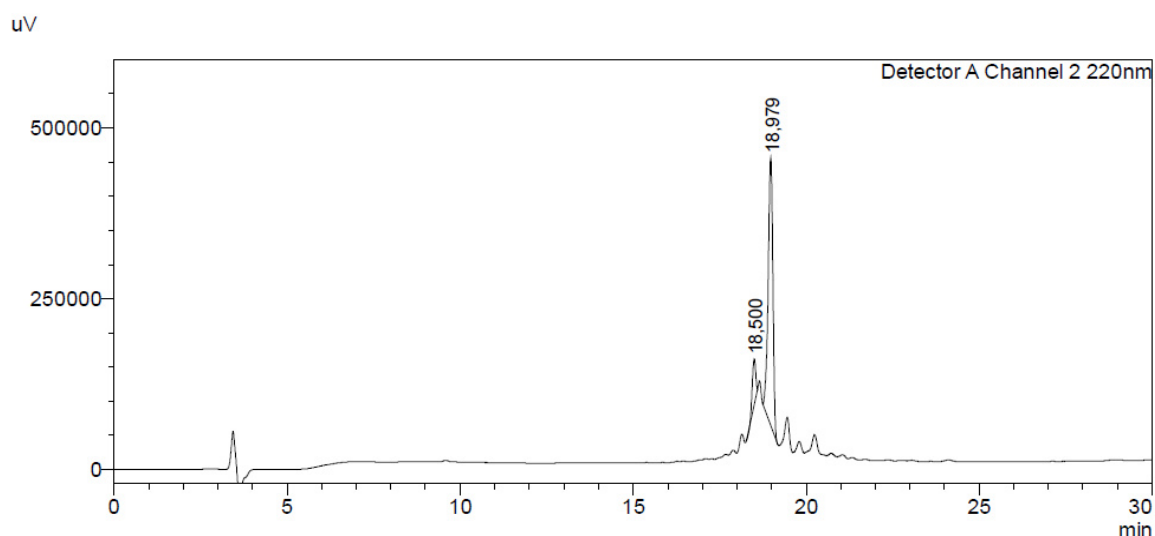
Peptide 82 (Fmoc and TBDMS groups are deprotected for the analysis)

The linear peptide of 14 amino acids **81** was synthesized on solid phase and under microwave irradiation at a 0.1 mmol scale with NovaSyn[®] TGR resin following the procedure described previously. The modified homoserine **80** was coupled to the peptide **81** resin. This coupling reaction was performed in DMF using the homoserine modified **80** (5 eq. related to the resin) activated with HBTU (4 eq.) and DIEA (4 eq.). The reaction was monitored by chloranil analysis. Then, a sample of peptide-resin was cleaved to confirm the completion of the reaction by analytical HPLC and ESI-MS. Fmoc deprotection was carried out using 2 x 2 min treatments with 25% piperidine in DMF. Cleavage and side-chain deprotection were accomplished with 95% TFA, 2.5% TIPS and 2.5% H₂O for 3 h at room temperature. This peptide **82** was analyzed without purification.



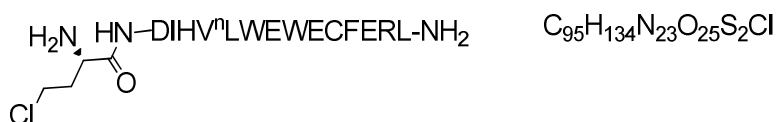
MS (ESI⁺): *m/z* = 988 [(M+2H)/2]²⁺

HPLC: *Rt* = 18.98 min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)



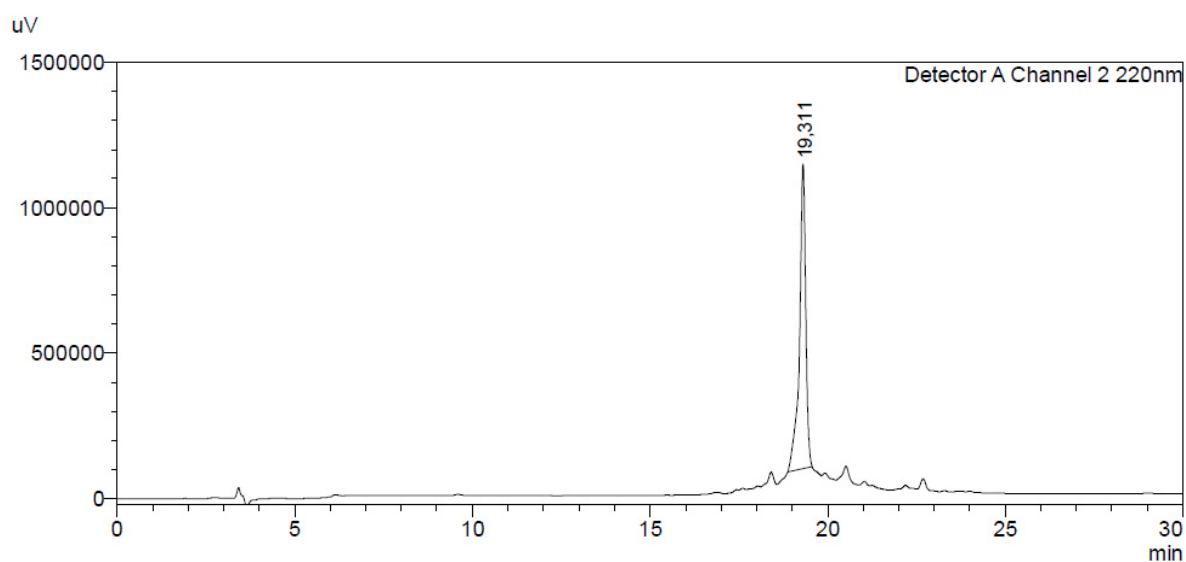
Peptide 83 (Fmoc group is deprotected for the analysis)

The homoserine O-TBDMS group of the peptide **82** was removed with concomitant conversion to γ -chlorohomoalanine using 10 eq of Ph_3PCl_2 in DCM for 6 h. After washing steps with DMF, a sample of peptide-resin was cleaved to confirm the completion of the reaction by analytical HPLC and ESI-MS. Fmoc deprotection was carried out using 2 x 2 min treatments with 25% piperidine in DMF. Cleavage and side-chain deprotection was accomplished with 10 mL of TFA/ H_2O /EDT/TIPS (94:2.5:2.5:1.0) for 3 h at room temperature. The peptide **83** was analyzed without purification.



MS (ESI+): $m/z = 997 [(M+2H)/2]^{2+}$

HPLC: $R_t = 19.31$ min (20 - 100 % of solvent B in 30 min)

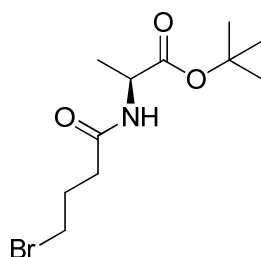


Coupling of 4-bromobutanoic acid with L-*t*Bu-alanine

The synthesis pathway is adapted from the procedure described by Alberto et al. (*Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *25*, 4211-4214).

(S)-tert-butyl 2-(4-bromobutanamido)propanoate **78**

Under an argon atmosphere, N-methylmorpholine (66 μ L, 0.6 mmol) was added to a solution of 4-bromobutanoic acid (100 mg, 0.6 mmol) in chloroform (4 mL) at 0 $^{\circ}$ C. After stirring for 15 minutes at this temperature, ethyl chloroformate (57.4 μ L, 0.6 mmol) was added. The stirring was prolonged for additional 45 minutes at 0 $^{\circ}$ C before addition of L-*t*Bu-alanine (109 mg, 0.6 mmol) and N-methylmorpholine (66 μ L, 0.6 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at 0 $^{\circ}$ C for 1 h and then at room temperature for 20 h. After this time it was diluted with chloroform and washed with 1M NaOH (x 2), brine, 1.2M HCl (x 2) and brine. The combined organic layers were dried with MgSO₄, filtered and concentrated. The crude product was purified by column chromatography (cyclohexane / ethyl acetate 80:20). The product was then purified by semi-preparative HPLC using a gradient 20% - 100% B in 75 min. The product was collected and lyophilized to obtain the desired compound **78** as a white solid (22 mg, 13 %).



C₁₁H₂₀BrNO₃
294,19 g.mol⁻¹

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 1.40 (d, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 1.50 (s, 9H, 3 \times CH₃), 2.16 (m, 2H, CH₂), 2.42 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 3.63 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 4.49 (q, J = 7.0 Hz, 1H, CH), 6.20 (s, 1H, NH).

MS (ESI+): m/z = 316 [M+Na]⁺

Part 3: Biochemical and Biological assays

General remarks

For the biochemical assays, the purified proteins (VEGF, btVEGF, VEGFR-ECD, VEGFR1-d1-d3) were purchased from R&D. The SuperSignal West Pico Substrate (HRP substrate) was purchased from Pierce. The bovine serum albumin fraction IV (BSA), Tween 20 and proteinase K were obtained from Aldrich and the AMDEX streptavidin–horseradish peroxidase from Amersham Biosciences. The white high-binding 96-well plates were purchased from Costar.

For the cell culture, HUVECs, the endothelial growth media (EGM-2) and the SingleQuot Kit for the media CC-4176 (FBS, hydrocortisone, human EGF, gentamicin/amphotericin B, human VEGF, human FGF-B, R³-IGF-1, ascorbic acid and heparin) were purchased from Lonza.

VEGFR1-d2-HRP assay

A white high-binding 96-well plate was coated overnight at 4°C with (VEGF95)₂ (40 ng in 100 µL PBS per well). The plate was washed 3 times with PBS containing 0.1% Tween 20 (v/v, buffer A) and 200 µL of 3% BSA in PBS (w/v) were added. After 2 h at 37°C, the plate was washed 3 times with buffer A, and the compounds were added at twice the desired final concentration in 50 µL of PBS with or without 2% DMSO. If desired, a pre-incubation period could be inserted at this point. A solution of VEGFR1d2-HRP at twice the desired final concentration (typically 2 nM) in 50 µL PBS was added to each well and the resulting solutions were mixed with 2 micropipette actions. After 45 minutes incubation at 37°C, the plate was washed 4 times with buffer A and 100 µL SuperSignal West Pico Substrate were added. The plate chemiluminescence (as relative lights units, RLU) was rapidly read on a Perkin Elmer Victor 2 spectrophotometer. The percentages of displacement were calculated using the formula: % displacement = 100 x [1 – (S – NS) / (MS – NS)], where S is the measured signal, NS and MS are non-specific (no VEGF95 coated) and maximum (no inhibitor) signals, respectively. Data were analyzed with the software Graphpad Prism using a “log [inhibitor] vs. response” non-linear regression.

VEGFR1-ECD and VEGFR1-d1-d3 assay

A white high-binding 96-well plate was coated overnight at 4°C with receptor (VEGFR1-ECD: 20 ng in 100 µL PBS per well and VEGFR1-d1-d3: 15 ng in 100 µL PBS per well). The plate was washed 3 times with PBS containing 0.1% Tween 20 (v/v, buffer A) and 200 µL of 3% BSA in PBS (w/v) were added. After 2 h at 37°C, the plate was washed 3 times with buffer A, and the compounds were added at twice the desired final concentration in 50 µL of PBS with or without 2% DMSO. If desired, a pre-incubation period could be inserted at this point. A solution of btVEGF₁₆₅ at twice the desired final concentration in 50 µL PBS was added to each well and the resulting solutions were mixed with 2

micropipette actions. After 2 hours incubation at 37°C, the plate was washed 4 times with buffer A. 100 µL of AMDEX streptavidine-horseradish peroxidase diluted at 1:8000 in PBS containing 0.5% (v/v) Tween 20 and 0.3% (w/v) BSA were added to each well. After 45 min incubation at 37 °C in the dark, the plate was washed 5 times with buffer A and 100 µL of SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate were added. The plate chemiluminescence (as relative lights units, RLU) was rapidly read on a Perkin Elmer Victor 2 spectrophotometer. The percentages of displacement were calculated using the formula: % displacement = 100 x [1 – (S – NS) / (MS – NS)], where S is the measured signal, NS and MS are non-specific (no VEGF95 coated) and maximum (no inhibitor) signals, respectively. Data were analyzed with the software Graphpad Prism using a “log [inhibitor] vs. response” non-linear regression.

Proteinase K susceptibility assay

Stock solutions of each peptide (200 µM) were prepared in a TBS solution with 2% DMSO (for solubility reasons). A 10 µg/mL stock solution of proteinase K was prepared in TBS. For each proteolysis reaction, 25 µL of peptide stock solution was mixed with 15 µL TBS. Then, a 10 µL aliquot of proteinase K was added to the solution. The reaction was performed at room temperature. 100 µL of 1% TFA in a solution of water and acetonitrile (1/1) was added to quench the reaction at the desired time. The resulting solutions were analyzed by HPLC using a gradient 25% B to 80% B in 15 min. The amount of remaining full-length peptide was quantified using the absorbance at 220 nm. Half-life values were determined by plotting the percent remaining peptide versus time and fitting the data to an exponential decay using GraphPad Prism.

Measurement of cell viability using an MTT assay

HUVECs were maintained in endothelial growth media containing 2% FBS, hydrocortisone, human EGF, gentamicin/amphotericin B, human VEGF, human FGF-B, R³-IGF-1, ascorbic acid and heparin. Cells were routinely cultured at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator and were used between passages 2 and 4.

For 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (MTT), HUVECs were seeded onto 96-well plates at 7000 cells/well in 200 µL of EGM-2 complete media. After 18 hours at 37°C under 5% CO₂, freshly prepared metal ion solutions were added to the wells at different concentrations in EGM-2 with 1% DMSO. After 48 hours, cell viability was detected using a colorimetric MTT assay by measuring the absorbance at 405 nm using a microplate reader. Data were normalized to the MTT activity of the 1% DMSO control cells, which were arbitrarily fixed at 100%.

The data were expressed as the means ± standard deviation (SD). The significance of the difference between the control and metal ion-treated cell populations was determined using one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's test. A *P*-value < 0.05 was considered significant.

Part 4: Circular Dichroism Spectroscopy

CD experiments were performed on a Jasco Model spectropolarimeter (Team Dr. S. Bouaziz, UMR 8015, Université Paris Descartes). Spectra were recorded in a 0.1 cm cell between 190 and 260 nm with a bandwidth of 2.0 nm, response time of 2 seconds and resolution step width of 0.5 nm. Each spectrum represents the average of five scans. Peptide samples for CD spectroscopy were dissolved in distilled water (stock solution: 500 μ M). Each stock solution was then diluted 5 times with phosphate buffer pH 7.4 to obtain a final concentration of 100 μ M. The accurate concentration was determined by UV using an extinction coefficient reported in the literature (*Protein Science*, **1995**, *4*, 2411-2423). The spectra were then analyzed and deconvoluted with the DICHROWEB server to determine the percentages of helicity.

Bibliographie

- ¹ K. Strebhardt and A. Ullrich, *Nature Reviews Cancer*, **2008**, *8*, 473-480
- ² E. E. Takeuchi and D. L. Alison, *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, **2008**, *8*, 37-38
- ³ C. Sayers, *Nature*, **2004**, *432*, 294-297
- ⁴ D. Hanahan and R. A. Weinberg, *Cell*, **2011**, *144*, 646-674
- ⁵ M. R. Swift and B. M. Weinstein, *Circ. Res.* **2009**, *104*, 576-588
- ⁶ P. Carmeliet, *Nature medicine*, **2000**, *6*, 389-395
- ⁷ C. D. Curtis, R. B. Davis, K. G. Ingram and C. T. Griffin, *Cell Mol Life Sci.* **2013**, 1-20
- ⁸ N. Otani, S. Minami, M. Yamoto, T. Shikone, H. Otani, R. Nishiyama, T. Otani and R. Nakano, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 3845-3851
- ⁹ M. G. Tonnesen, X. Feng and R. A. F. Clark, *J Investigative Dermatology*, **2000**, *5*, 40-46
- ¹⁰ T. Gustafsson, A. Puntschart, L. Kaijser, E. Jansson and C. J. Sundberg, *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 45)*, **1999**, *276*, 679-685
- ¹¹ P. Carmeliet and R. K. Jain, *Nature*, **2000**, *407*, 249-257
- ¹² E. Goldmann, *Proc. Royal Acad. Med. (Surg. Section)*, **1908**, *1*, 1-13
- ¹³ H. Algire and W. Chalkley, *J. Natl. Cancer Inst. USA*, **1945**, *6*, 73-85
- ¹⁴ M. Greenblatt and P. Shubik, *J. Natl. Cancer Inst.* **1968**, *41*, 111-124
- ¹⁵ R. L. Ehrmann and M. Knoth, *J. Natl. Cancer Inst.* **1968**, *41*, 1329-1341
- ¹⁶ J. Folkman, *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186
- ¹⁷ G. Bergers and L. E. Benjamin, *Nature Reviews Cancer*, **2003**, *3*, 401-410
- ¹⁸ W. C. Black and H. G. Welch, *N. Engl. J. Med.* **1993**, *328*, 1237-1243
- ¹⁹ P.M. Gullino, *J. Natl. Cancer Inst.* **1978**, *61*, 639-43
- ²⁰ D. Hanahan, J. Folkman, *Cell*, **1996**, *86*, 353-64
- ²¹ R. S. Kerbel, *Carcinogenesis*, **2000**, *21*, 505-515
- ²² P. Carmeliet, *Nature*, **1999**, *401*, 657-658
- ²³ J.W. Baish and R.K. Jain, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3683-3688
- ²⁴ R. K. Jain, *Science*, **2005**, *307*, 58-62
- ²⁵ G. Helmlinger, F. Yuan, M. Dellian and R.K. Jain, *Nature Med.* **1997**, *3*, 177-182
- ²⁶ R. N. Gacche, R. J. Meshram, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2014**, *1846*, 161-179
- ²⁷ D. Ribatti, *Leukemia Research*, **2009**, *33*, 638-644
- ²⁸ V. Baeriswyl and G. Christofori, *Semin. Cancer Biol.* **2009**, *19*, 329-337
- ²⁹ D. R. Senger, S. J. Galli, A. M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V. S. Harvey and H. F. Dvorak, *Science*, **1983**, *219*, 983-985
- ³⁰ N. Ferrara and W. J. Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *161*, 851-858
- ³¹ H. Takahashi and M. Shibuya, *Clinical Science*, **2005**, *109*, 227-241
- ³² Y. A. Muller, H. W. Christinger, B. A. Keyt and A. M. de Vos, *Structure*, **1997**, *5*, 1325-1338
- ³³ P. Carmeliet, V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau and A. Nagy, *Nature*, **1996**, *380*, 435-439
- ³⁴ N. Ferrara, K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan and M.W. Moore, *Nature*, **1996**, *380*, 439-442
- ³⁵ N. Ferrara, *The Oncologist*, **2004**, *9*, 2-10
- ³⁶ R. S. Kerbel, *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 2039-2049.
- ³⁷ N. Ferrara and T. Davis-Smyth, *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 4-25
- ³⁸ S. Lee, S. M. Jilani, G. V. Nikolova, D. Carpizo and M. L. Iruela-Arispe, *J. Cell. Biol.* **2005**, *169*, 681-691

- ³⁹ D. J. Hicklin and L. M. Ellis, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 1011-1027
- ⁴⁰ S. Koch, S. Tugues, X. Li, L. Gualandi and L. Claesson-Welsh, *Biochem. J.* **2011**, *437*, 169–183
- ⁴¹ S. Koch and L. Claesson-Welsh, *Cold Spring Harb Perspect. Med.* **2012**, *2*:a006502
- ⁴² M. Shibuya, *Biomol. Ther.* **2014**, *22*, 1-9
- ⁴³ A. Kaipainen, J. Korhonen, T. Mustonen, V. W. M. Van Hinsbergh, G. H. Fang, D. Dumont, M. Breitman and K. Alitalo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, *92*, 3566-3570
- ⁴⁴ S. Soker, S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld and M. Klagsbrun, *Cell*, **1998**, *92*, 735-745
- ⁴⁵ S. Soker, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2001**, *33*, 433-437
- ⁴⁶ Q. Tao, M. V. Backer, J. M. Backer and B.I. Terman, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21916-21923
- ⁴⁷ E. Stuttfeld and K. Ballmer-Hofer, *IUBMB Life*, **2009**, *61*, 915-922
- ⁴⁸ F. Mac Gabhann and A. S. Popel, *Biophysical Chemistry*, **2007**, *128*, 125-139
- ⁴⁹ C. Ruch, G. Skiniotis, M. O. Steinmetz, T. Walz and K. Ballmer-Hofer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 249-250.
- ⁵⁰ C. A. C. Hyde, A. Giese, E. Stuttfeld, J. A. Saliba, D. Villemagne, T. Schleier, H. K. Binz and K. Ballmer-Hofer, *Molecular and Cellular Biology*, **2012**, *32*, 3802-3813
- ⁵¹ A. Shinkai, M. Ito, H. Anazawa, S. Yamaguchi, K. Shitara and M. Shibuya, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31283-31288
- ⁵² D. D. Dosch and K. Ballmer-Hofer, *FASEB journal*, **2010**, *24*, 32-38
- ⁵³ X. Zhang, K. A. Pickin, R. Bose, N. Jura, P. A. Cole and J. Kuriyan, *Nature*, **2007**, *450*, 741-744
- ⁵⁴ X. Zhang, J. Gureasko, K. Shen, P.A. Cole and J. Kuriyan, *Cell*, **2006**, *125*, 1137-1149
- ⁵⁵ F. Shalaby, J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.F. Wu, M.L. Breitman and A.C. Schuh, *Nature*, **1995**, *376*, 62–66
- ⁵⁶ K.H Plate, G. Breier, H.A. Weich, H.D. Mennel and W. Risau, *Int. J. Cancer*, **1994**, *59*, 520-529
- ⁵⁷ H. Yousoufian, D.J. Hicklin and E.K. Rowinsky, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 5544-5548
- ⁵⁸ H. Gille, J. Kowalski, L. Yu, H. Chen, M.T Pisabarro, S.T. Davis and N. Ferrara, *EMBO J.* **2000**, *19*, 4064-4073
- ⁵⁹ H. Gille, J. Kowalski, B. Li, J. LeCouter, B. Moffat, T.F Zioncheck, N. Pelletier and N. Ferrara, *J. Biol. Chem.* **2001** *276*, 3222-3230
- ⁶⁰ N. Rahimi, V. Dayanir and K. Lashkari, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16986–16992
- ⁶¹ J. Waltenberger, L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya and C.H. Heldin, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 26988-26995
- ⁶² S. Kanno, N. Oda, M. Abe, Y. Terai, M. Ito, K. Shitara, K. Tabayashi, M. Shibuya and Y. Sato, *Oncogene*, **2000**, *19*, 2138–2146
- ⁶³ S. Hiratsuka, O. Minowa, J. Kuno, T. Noda and M. Shibuya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 9349-9354
- ⁶⁴ M. Autiero, J. Waltenberger, D. Communi, A. Kranz, L. Moons, D. Lambrechts, J. Kroll, S. Plaisance, M. De Mol, F. Bono, S. Kliche, G. Fellbrich, K. Ballmer-Hofer, D. Maglione, U. Mayr-Beyrle, M. Dewerchin, S. Dombrowski, D. Stanimirovic, P. Van Hummelen, C. Dehio, D. J. Hicklin, G. Persico, J.-M. Herbert, D. Communi, M. Shibuya, D. Collen, E. M. Conway and P. Carmeliet, *Nature medicine*, **2003**, *9*, 936-943
- ⁶⁵ K. Huang, C. Andersson, G. M. Roomans, N. Ito, L. Claesson-Welsh, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2001**, *33*, 315-324
- ⁶⁶ M.J. Cudmore, P.W. Hewett, S. Ahmad, K.-Q. Wang, M. Cai, B. Al-Ani, T. Fujisawa, B. Ma, S. Sissaoui, W. Ramma, M.R. Miller, D.E. Newby, Y. Gu, B. Barleon, H. Weich and A. Ahmed, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1-12
- ⁶⁷ R. L. Kendall, G. Wang, J. DiSalvo and K.A. Thomas, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *201*, 326-330
- ⁶⁸ R. Kou, S. SenBanerjee, M.K. Jain and T. Michel, *Biochemistry*, **2005**, *44*, 15064-15073
- ⁶⁹ G. H. Fong, J. Rossant, M. Gertsenstein and M.L. Breitman, *Nature*, **1995**, *376*, 66-70
- ⁷⁰ S. Hiratsuka, Y. Maru, A. Okada, M. Seiki, T. Noda and M. Shibuya, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1207-1213

- ⁷¹ F. Fan, J.S. Wey, M.F. McCarty, A. Belcheva, W. Liu, T.W. Bauer, R.J. Somcio, Y. Wu, A. Hooper, D. J. Hicklin and L. M. Ellis, *Oncogene*, **2005**, *24*, 2647-2653
- ⁷² S. Hiratsuka, K. Nakamura, S. Iwai, M. Murakami, T. Itoh, H. Kijima, J.M. Shipley, R.M. Senior and M. Shibuya, *Cancer Cell*, **2002**, *2*, 289-300
- ⁷³ D.F. Stefanik, W.K. Fellows, L.R. Rizkalla, W.M. Rizkalla, P.P. Stefanik, A.B. Deleo, W.C. Welch, *J Neurooncol.* **2001**, *55*, 91-100
- ⁷⁴ A. Luttun, M. Tjwa, L. Moons, Y. Wu, A. Angelillo-Scherrer, F. Liao, J.A. Nagy, A. Hooper, J. Priller, B. De Klerck, V. Compernelle, E. Daci, P. Bohlen, M. Dewerchin, J.M. Herbert, R. Fava, P. Matthys, G. Carmeliet, D. Collen, H.F. Dvorak, D.J. Hicklin, P. Carmeliet, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 831-840
- ⁷⁵ N. Ferrara and R.S. Kerbel, *Nature*, **2005**, *438*, 967-974
- ⁷⁶ Site internet de la fondation de l'angiogenèse (www.angio.org)
- ⁷⁷ F. Fan, A. Schimming, D. Jaeger and K. Podar, *J Oncol.* **2012**, *2012*, ID281261
- ⁷⁸ X. Yang, X.F. Zhang, X. Lu, H.L. Jia, L. Liang, Q.Z. Dong, Q.H. Ye and L.X. Qin, *Hepatology*, **2014**, *59*, 1874-1885
- ⁷⁹ G. Bergers and D. Hanahan, *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, *8*, 592-603
- ⁸⁰ M. Wehland, J. Bauer, M. Infanger and D. Grimm, *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 4244-4257
- ⁸¹ H. Yin and A.D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4130-4163
- ⁸² W. Guo, J.A. Wisniewski and H. Ji, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2546-2554
- ⁸³ O. Keskin, B. Ma and R. Nussinov, *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 1281-1294
- ⁸⁴ A. J. Wilson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3289-3300
- ⁸⁵ C. Wiesmann, G. Fuh, H.W. Christinger, C. Eigenbrot, J. A. Wells and A. M. de Vos, *Cell*, **1997**, *91*, 695-704
- ⁸⁶ Y. A. Muller, B. Li, H.W. Christinger, J. A. Wells, B.C. Cunningham and A.M. De Vos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 7192-7197
- ⁸⁷ B.A. Keyt, H.V. Nguyen, L.T. Berleau, C.M. Duarte, J. Park, H. Chen, N. Ferrara, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5638-5646
- ⁸⁸ B. Li, G. Fuh, G. Meng, X. Xin, M.E. Gerritsen, B. Cunningham, A.M. de Vos, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29823-29828
- ⁸⁹ L. Zilberberg, S. Shinkaruk, O. Lequin, B. Rousseau, M. Hagedorn, F. Costa, D. Caronzolo, M. Balke, X. Canron, O. Convert, G. Laïn, K. Gionnet, M. Goncalvès, M. Bayle, L. Bello, G. Chassaing, G. Deleris and A. Bikfalvi, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35564-35573
- ⁹⁰ A. Basile, A. Del Gatto, D. Diana, R. Di Stasi, A. Falco, M. Festa, A. Rosati, A. Barbieri, R. Franco, C. Arra, C. Pedone, R. Fattorusso, M.C. Turco and L.D. D'Andrea, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1391-1400
- ⁹¹ L. De Rosa, D. Diana, A. Basile, A. Russomanno, C. Isernia, M.C. Turco, R. Fattorusso, L.D. D'Andrea, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *73*, 210-216
- ⁹² V. Goncalves, B. Gautier, P. Coric, S. Bouaziz, C. Lenoir, C. Garbay, M. Vidal and N. Inguibert, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5135-5146
- ⁹³ V. Goncalves, B. Gautier, C. Garbay, M. Vidal and N. Inguibert, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 767-772
- ⁹⁴ M. García-Aranda, S. González-López, C. Santiveri, N. Eilstein, M. Reille-Seroussi, M. Martín-Martínez, N. Inguibert, M. Vidal, M. García-López, M. Angeles Jiménez, R. González-Muñiz and M.J. Pérez de Vega, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1896-1905
- ⁹⁵ M. Isabel García-Aranda, Y. Mirassou, B. Gautier, M. Martín-Martínez, N. Inguibert, M. Vidal, M.T. García-López, M. A. Jiménez, R. González-Muñiz, M. J. Pérez de Vega, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7526-7533
- ⁹⁶ L. Hetian, A. Ping, S. Shumei, L. Xiaoying, H. Luowen, W. Jian, M. Lin, L. Meisheng, Y. Junshan and S. Chengchao, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 43137-43142
- ⁹⁷ A. Shrivastava, M.A. von Wronski, A.K. Sato, D.T. Dransfield, D. Sexton, N. Bogdan, R. Pillai, P. Nanjappan, B. Song, E. Marinelli, D. De Oliveira, C. Luneau, M. Devlin, A. Muruganandam, A. Abujoub, G. Connelly, Q.L. Wu, G. Conley, Q. Chang, M.F. Tweedle, R.C. Ladner, R.E. Swenson and A.D. Nunn, *Protein Eng. Des. Sel.* **2005**, *18*, 417-424

- ⁹⁸ R. Binetruy-Tournaire, C. Demangel, B. Malavaud, R. Vassy, S. Rouyre and M. Kraemer, *EMBO J.* **2000**, *19*, 1525-1533
- ⁹⁹ D.G. Udugamasooriya, S.P. Dineen, R.A. Brekken, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5744-5752
- ¹⁰⁰ H. Jia, S. Jezequel, M. Lohr, S. Shaikh, D. Davis, S. Soker, D. Selwood and I. Zachary, *Biochem. Biophys Res Commun.* **2001**, *283*, 164-173
- ¹⁰¹ D. Vicari, K.C. Foy, E.M. Liotta and P.T.P. Kaumaya, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 13612-13625
- ¹⁰² M. El-Mousawi, L. Tchistiakova, L. Yurchenko, G. Pietrzynski, M. Moreno, D. Stanimirovic, D. Ahmad and V. Alakhov, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46681-46691
- ¹⁰³ P. An, H. Lei, J. Zhang, S. Song, L. He, G. Jin, X. Liu, J. Wu, L. Meng, M. Liu and C. Shou, *Int. J. Cancer*, **2004**, *111*, 165-173
- ¹⁰⁴ R.J. Giordano, M. Cardo-Vila, J. Lahdenranta, R. Pasqualini and W. Arap, *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1249-1253
- ¹⁰⁵ A.P. Taylor and D.M. Goldenberg, *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 524-531
- ¹⁰⁶ D.G. Bae, T.D. Kim, G. Li, W.H. Yoon and C.B. Chae, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 2651-2661
- ¹⁰⁷ S. Ponticelli, D. Marasco, V. Tarallo, R.J.C. Albuquerque, S. Mitolai, A. Takeda, J.M. Stassen, M. Prestai, J. Ambati, M. Ruvo and S. De Falco, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34250-34259
- ¹⁰⁸ Y. Ueda, T. Yamagishi, K. Samata, H. Ikeya, N. Hirayama, H. Takashima, S. Nakaike, M. Tanaka and I. Saiki, *Mol. Canc. Ther.* **2003**, *2*, 1105-1111
- ¹⁰⁹ Y. Ueda, T. Yamagishi, H. Ikeya, N. Hirayama, T. Itokawa, Y. Aozuka, K. Samata, S. Nakaike, M. Tanaka, M. Ono and I. Saiki, *Anticancer Research*, **2004**, *24*, 3009-3018
- ¹¹⁰ Y. Ueda, T. Yamagishi, K. Samata, H. Ikeya, N. Hirayama, T. Okasaki, S. Nishihara, K. Arai, S. Yamaguchi, M. Shibuya, S. Nakaike and M. Tanaka, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2004**, *54*, 16-24
- ¹¹¹ J. Koyama, S. Miyake, T. Sasayama, T. Kondoh and E. Kohmura, *Kobe J. Med. Sci.* **2007**, *53*, 199-207
- ¹¹² Y. Chiba, T. Sasayama, S. Miyake, J. Koyama, T. Kondoh, K. Hosoda and E. Kohmura, *Kobe J. Med. Sci.* **2008**, *54*, E136-E146
- ¹¹³ J. Koyama, S. Miyake, T. Sasayama, Y. Chiba, T. Kondoh and E. Kohmura, *Kobe J. Med. Sci.* **2010**, *56*, E1-E11
- ¹¹⁴ F. Tian, C. Zhu, X. Zhang, X. Xie, X. Xin, Y. Yi, L. Lin, M. Geng and J. Ding, *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72*, 545-552
- ¹¹⁵ F. Tian, X. Zhang, Y. Tong, Y. Yi, S. Zhang, L. Li, P. Sun, L. Lin and J. Ding, *Cancer Biology & Therapy*, **2005**, *4*, 874-882
- ¹¹⁶ C. Piossek, J. Schneider-Mergener, M. Schirner, E. Vakalopoulou, L. Germeroth and K.H. Thierauch, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5612-5619
- ¹¹⁷ D.G. Bae, Y.S. Gho, W.H. Yoon and C.B. Chae, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13588-13596
- ¹¹⁸ J.P. Landry, Y. Fei, X. Zhu, Y. Ke, G. Yu and P. Lee, *ASSAY and Drug Development Technologies*, **2013**, *11*, 326-332
- ¹¹⁹ B. Barleon, F. Totzke, C. Herzog, S. Blanke, E. Kremmer, G. Siemeister, D. Marmé and G. Martiny-Baron, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 10382-10388
- ¹²⁰ D.G. Bae, T.D. Kim, G. Li, W.H. Yoon and C.B. Chae, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 2651-2661
- ¹²¹ L.D. D'Andrea, G. Iaccarino, R. Fattorusso, D. Sorriento, C. Carannante, D. Capasso, B. Trimarco, and C. Pedone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 14215-14220
- ¹²² C. Wiesmann, H.W. Christinger, A.G. Cochran, B.C. Cunningham, W.J. Fairbrother, C.J. Keenan, G. Meng and A.M. de Vos, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 17765-17772
- ¹²³ S.J. Lee, H.M. Lee, S.T. Ji, S.R. Lee, W. Mar and Y.S. Gho, *Cancer Lett.* **2004**, *208*, 89-94
- ¹²⁴ V. Goncalves, B. Gautier, C. Garbay, M. Vidal and N. Inguibert, *Anal. Biochem.* **2007**, *366*, 108-110
- ¹²⁵ B. Gautier, V. Goncalves, D. Diana, R. Di Stasi, F. Teillet, C. Lenoir, F. Huguenot, C. Garbay, R. Fattorusso, L.D. D'Andrea, M. Vidal and N. Inguibert, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4428-4440

- ¹²⁶ R. Di Stasi, D. Diana, D. Capasso, R. Palumbo, A. Romanelli, C. Pedone, R. Fattorusso and L.D. D'Andrea, *Biopolymers (Peptides Science)*, **2010**, *94*, 800-809
- ¹²⁷ J.E. Stefano, J. Bird, J. Kyazike, A.W.M. Cheng, E. Boudanova, M. Dwyer, L. Hou, H. Qiu, G. Matthews, M. O'Callaghan and C.Q. Pan, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2354-2364
- ¹²⁸ J. A. Wells and C. L. McClendon, *Nature*, **2007**, *450*, 1001-1009
- ¹²⁹ M. R. Arkin and J. A. Wells, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301-317
- ¹³⁰ B. Gautier, M. A. Miteva, V. Goncalves, F. Huguenot, P. Coric, S. Bouaziz, B. Seijo, J. F. Gaucher, I. Broutin, C. Garbay, A. Lesnard, S. Rault, N. Inguibert, B. O. Villoutreix and M. Vidal, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1631-1639
- ¹³¹ B. K. Shoichet, *Nature*, **2004**, *432*, 862-865
- ¹³² S. Ekins, J. Mestres and B. Testa, *British Journal of Pharmacology*, **2007**, *152*, 9–20
- ¹³³ K. Holmes, O. L. Roberts, A. M. Thomas and M. J. Cross, *Cellular Signaling*, **2007**, *19*, 2003–2012
- ¹³⁴ B. R. Baker, J. P. Joseph, R. E. Schaub, F. J. Mc Evoy, J. H. Williams, *J. Org. Chem.* **1953**, *18*, 138-152
- ¹³⁵ J. M. Barker, P. R. Huddleston, D. J. Holmes, *Chem. Research (M)*, **1986**, 1455-1463
- ¹³⁶ F. Fabis, S. Jolivet-Fouchet, M. Robba, H. Landelle and S. Rault, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 10789-10800
- ¹³⁷ F. X. Le Foulon, E. Braud, F. Fabis, J. C. Lancelot and S. Rault, *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 10051–10057
- ¹³⁸ Y. Brouillette, J. Martinez and V. Lisowski, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3487–3503
- ¹³⁹ Y. Brouillette, V. Lisowski, P. Fulcrand and J. Martinez, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2662-2665
- ¹⁴⁰ Y. Brouillette, P. Verdié, J. Martinez, V. Lisowski, *Synlett*, **2008**, *15*, 2360–2364
- ¹⁴¹ F. X. Le Foulon, E. Braud, F. Fabis, J. C. Lancelot and S. Rault, *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 253-257
- ¹⁴² S. D. Guile, J. R. Bantick, M. E. Cooper, D. K. Donald, C. Eyssade, A. H. Ingall, R. J. Lewis, B. P. Martin, R. T. Mohammed, T. J. Potter, R. H. Reynolds, S. A. St-Gallay and A. D. Wright, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 254-263
- ¹⁴³ K. Miwa, T. Hitaka, T. Imada, S. Sasaki, M. Yoshimatsu, M. Kusaka, A. Tanaka, D. Nakata, S. Furuya, S. Endo, K. Hamamura and T. Kitazaki, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4998–5012
- ¹⁴⁴ R. Venskutonyte, S. Butini, S. S. Coccone, S. Gemma, M. Brindisi, V. Kumar, E. Guarino, S. Maramai, S. Valenti, A. Amir, E. Anton Valades, K. Frydenvang, J. S. Kastrup, E. Novellino, G. Campiani and D. S. Pickering, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4793–4805
- ¹⁴⁵ Y. Nagao, T. Hirata, S. Goto, S. Sano, A. Kakehi, K. Iizuka and M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3104-3110
- ¹⁴⁶ M. Iwaoka, S. Takemoto and S. Tomoda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10613-10620
- ¹⁴⁷ H. Huang, Z. Chen, R. P. Ortiz, C. Newman, H. Usta, S. Lou, J. Youn, Y.-Y. Noh, K.-J. Baeg, L. X. Chen, A. Facchetti and T. Marks, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10966–10973
- ¹⁴⁸ F. T. Burling and B. M. Goldstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2313-2320
- ¹⁴⁹ R. Tanaka, Y. Oyama, S. Imajo, S. Matsuki and M. Ishiguro, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 1389-1399
- ¹⁵⁰ C. Dalvit, G. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesia and B. Stockman, *Journal of Biomolecular NMR*, **2001**, *21*, 349–359
- ¹⁵¹ C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tato, M. Veronesi, A. Vulpetti and M. Sundström, *Journal of Biomolecular NMR*, **2000**, *18*, 65-68
- ¹⁵² C. Dalvit, M. Fasolini, M. Flocco, S. Knapp, P. Pevarello and M. Veronesi, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2610-2614
- ¹⁵³ Y. Huang, A. Dömling, *Mol. Divers.* **2011**, *15*, 3–33
- ¹⁵⁴ H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004 - 2021
- ¹⁵⁵ R. Huisgen, **1984**, Padwa, A., Ed. Wiley: New York
- ¹⁵⁶ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057 - 3064
- ¹⁵⁷ V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596-2599

- ¹⁵⁸ L. Zhang, X. G. Chen, P. Xue, H. H. Y. Sun, I. D. Williams, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, G. C. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998-15999
- ¹⁵⁹ M. M. Majireck, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8680-8683
- ¹⁶⁰ P. B. Alper, S. C. Hung, C. H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6029-6032
- ¹⁶¹ E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3797-3800
- ¹⁶² M. A. Marques, R. M. Doss, A. R. Urbach and P. B. Dervan, *Helvetica Chimica Acta*, **2002**, *85*, 4485-4517
- ¹⁶³ A. Mahmoudi, K. Nazari, N. Mohammadian, and A.A. Moosavi-Movahedi, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2003**, *104*, 81-94
- ¹⁶⁴ L. D. D'Andrea, A. Romanelli, R. Di Stasia and C. Pedone, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 7625-7636
- ¹⁶⁵ D. Zhang, Y. Li, T. Zhu, F. Hang, Z. Yang and D. Miao, *Cytotherapy*, **2011**, *13*, 156-164
- ¹⁶⁶ W. Ouyang, J. Li, X. Shi, M. Costa and C. Huang, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2005**, *279*, 35-43
- ¹⁶⁷ J. Kim, W. Lim, Y. Ko, H. Kwon, S. Kim, O. Kim, G. Park, H. Choia and O. Kima, *J. Appl. Toxicol.* **2012**, *32*, 342-349
- ¹⁶⁸ A. Cesbron, E. Sausseureau, L. Mahieu, I. Couland, M. Guerbet and J.-P. Gouille, *Journal of Analytical Toxicology*, **2013**, *37*, 401-405
- ¹⁶⁹ W.T. Buckley and R.A. Vanderpool, *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, **2008**, *21*, 601-612
- ¹⁷⁰ H. Ungar-Waron, A. Gluckman, E. Spira, M. Waron, Z. Trainin, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 1296-1299
- ¹⁷¹ B. R. McAuslan, W. Reilly, *Exp. Cell Res.* **1980**, *130*, 147-157
- ¹⁷² M. Ziche, J. Jones, P. M. Gullino, *J. Natl Cancer Inst.* **1982**, *69*, 475-482
- ¹⁷³ B. R. McAuslan, W. G. Reilly, G. N. Hannan, G. A. Gole, *Microvasc. Res.* **1983**, *26*, 323-338
- ¹⁷⁴ G. Alessandri, K. Raju, P. M. Gullino, *Microcirc. Endothelium Lymphatics*, **1984**, *1*, 329-346
- ¹⁷⁵ P. M. Gullino, *Anticancer Res.* **1986**, *6*, 153-158
- ¹⁷⁶ G.-F. Hu, *Journal of Cellular Biochemistry*, **1998**, *69*, 326-335
- ¹⁷⁷ S. Apelgot, J. Coppey, A. Fromentin, E. Guille, M.F. Poupon and A. Roussel, *Anticancer Res.* **1986**, *6*, 159-164
- ¹⁷⁸ E.J. Margalioth, J.G. Schenker and M. Chevion, *Cancer*, **1883**, *52*, 868-872
- ¹⁷⁹ S.K. Gupta, V.K. Shukla, M.P. Vaidya, S.K. Roy and S. Gupta, *J. Surg. Oncol.* **1991**, *46*, 178-181
- ¹⁸⁰ S. A. Lowndes and A. L. Harris, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **2005**, *10*, 299-310
- ¹⁸¹ T. Matsubara, R. Saura, K. Hirohata, M. Ziff, *J Clin Invest*, **1989**, *83*, (1), 158-167
- ¹⁸² S. Brem, A. M. Tsanaclis, D. Zagzag, *Neurosurgery*, **1990**, *26*, 391-396
- ¹⁸³ L. Finney, S. Vogt, T. Fukai and D. Glesne, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **2009**, *36*, 88-94
- ¹⁸⁴ G. J. Brewer, R. D. Dick, D. K. Grover, V. LeClaire, M. Tseng, M. Wicha, K. Pienta, B. G. Redman, T. Jahan, V. K. Sondak, M. Strawderman, G. LeCarpentier and S. D. Merajver, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 1-10.
- ¹⁸⁵ B. G. Redman, P. Esper, Q. Pan, R. L. Dunn, H. K. Hussain, T. Chenevert, G. J. Brewer and S. D. Merajver, *Clin. Cancer Res.*, **2003**, *9*, 1666-1672
- ¹⁸⁶ Y. Jiang, C. Reynolds, C. Xiao, W. Feng, Z. Zhou, W. Rodriguez, S. C. Tyagi, J. W. Eaton, J. T. Saari and Y. J. Kang, *J Exp Med*, **2007**, *204*, 657-666
- ¹⁸⁷ L. Elsherif, Y. Jiang, J. T. Saari and Y. J. Kang, *Exp Biol Med (Maywood)*, **2004**, *229*, 616-622
- ¹⁸⁸ C. K. Sen, S. Khanna, M. Venojarvi, P. Trikha, E. C. Ellison, T. K. Hunt and S. Roy, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2002**, *282*, 1821-1827
- ¹⁸⁹ W. Feng, F. Ye, W. Xue, Z. Zhou and Y. J. Kang, *Mol Pharmacol*, **2009**, *75*, 174-182
- ¹⁹⁰ F. Martin, T. Linden, D. M. Katschinski, F. Oehme, I. Flamme, C. K. Mukhopadhyay, K. Eckhardt, J. Tröger, S. Barth, G. Camenisch and R. H. Wenger, *Blood*, **2005**, *105*, 4613-4619
- ¹⁹¹ S. Li, H. Xie, S. Li and Y. J. Kang, *Experimental Biology and Medicine*, **2012**, *237*, 77-82
- ¹⁹² Q.-F. Li, X.-Q. Ding, Y. J. Kang, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2014**, *25*, 44-49

- ¹⁹³ Y. Zhou, Y. Jiang, Y. J. Kang, *J Mol Cell Cardiol*, **2008**, 45, 106-117
- ¹⁹⁴ Y. Zhou, K. Bourcy and Y. J. Kang, *Cardiovascular Research*, **2009**, 84, 54-63
- ¹⁹⁵ L. Finney, S. Mandava, L. Ursos, W. Zhang, D. Rodi, S. Vogt, D. Legnini, J. Maser, F. Ikpatt, O. I. Olopade and D. Glesne, *PNAS*, **2007**, 104, 2247–2252
- ¹⁹⁶ V.-M. Leppänen, A. E. Prota, M. Jeltsch, A. Anisimov, N. Kalkkinen, T. Strandin, H. Lankinen, A. Goldman, K. Ballmer-Hofer and K. Alitalo, *PNAS*, **2010**, 107, 2425–2430
- ¹⁹⁷ Z. Ahmadova, V. Yagublu, T. Forg, Y. Hajiyeva, R. Jesenofsky, M. Hafner and M. Keese, *Anticancer Research*, **2014**, 34, 2123-2134
- ¹⁹⁸ N. Ferrara, *Oncology*, **2005**, 69 (suppl.3), 11-16
- ¹⁹⁹ G. P. Smith and V. A. Petrenko, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 391-410
- ²⁰⁰ S. S. Sidhu, W. J. Fairbrother and K. Deshayes, *Chem. Bio. Chem.* **2003**, 4, 14-25
- ²⁰¹ G. Castel, B. Heyd and N. Tordo, *Virologie*, **2009**, 13, 93-102
- ²⁰² W. J. Fairbrother, H. W. Christinger, A. G. Cochran, G. Fuh, C. J. Keenan, C. Quan, S. K. Shriver, J. Y. K. Tom, J. A. Wells and B. C. Cunningham, *Biochemistry*, **1998**, 37, 17754-17764
- ^{202bis} C. Wiesmann, H. W. Christinger, A. G. Cochran, B. C. Cunningham, W. J. Fairbrother, C. J. Keenan, G. Meng and A. M. de Vos, *Biochemistry*, **1998**, 37, 17765-17772
- ²⁰³ B. Pan, B. Li, S. J. Russell, J. Y. K. Tom, A. G. Cochran and W. J. Fairbrother, *J. Mol. Biol.*, **2002**, 316, 769-787
- ²⁰⁴ Y. Suzuki and K. Yokoyama, *Chem. Bio. Chem.* **2009**, 10, 1793-1795
- ²⁰⁵ S. A. Kenrick and P. S. Daugherty, *Protein Engineering, Design & Selection*, **2010**, 23, 9-17
- ²⁰⁶ P. S. Daugherty and S. Kenrick, US2009/0035317A1, **2009**
- ²⁰⁷ A. Dyachenko, M. Goldflam, M. Vilaseca and E. Giralt, *Biopolymers (Peptide Science)*, **2010**, 94, 689-700
- ²⁰⁸ K. J. Peterson, J. D. Sadowsky, E. A. Scheef, S. Pal, K. D. Kourentzi, R. C. Willson, E. H. Bresnick, N. Sheibani and S. H. Gellman, *Analytical Biochemistry*, **2008**, 378, 8-14
- ²⁰⁹ H. S. Haase, K. J. Peterson-Kaufman, S. K. Lan Levensgood, J. W. Checco, W. Murphy and S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 7652-7655
- ²¹⁰ R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154
- ²¹¹ R. Subiros-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, A. El-Faham and F. Albericio, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 9394-9403
- ²¹² S. Leavitt and E. Freire, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11, 560-566
- ²¹³ G. A. Holdgate and W. H. J. Ward, *Drug Discovery Today*, **2005**, 10, 1543-1550
- ²¹⁴ A. K. Bronowska **2011**. Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design, Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases, Dr. Juan Carlos Moreno Piraján(Ed.), ISBN: 978-953-307-563-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/thermodynamicsinteraction-studies-solids-liquids-andgases/thermodynamics-of-ligand-protein-interactions-implications-for-molecular-design>
- ²¹⁵ F.E. Torres, M.I. Recht, J.E. Coyle, R.H. Bruce and G. Williams, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, 20, 598-605
- ²¹⁶ V.M. Krishnamurthy, B.R. Bohall, V. Semetey and G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5802-5812
- ²¹⁷ S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2005**, 1751, 119 - 139
- ²¹⁸ C. N. F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley and T. Gray, *Protein Science*, **1995**, 4, 2411-2423
- ²¹⁹ L. Whitmore and B. A. Wallace, *Biopolymers*, **2008**, 89, 392-400
- ²²⁰ P. W. Riddles, R. L. Blakeley and B. Zerner, *Anal. Biochem.* **1979**, 94, 75-81
- ²²¹ G. L. Ellman, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1959**, 82, 70-77
- ²²² A. G. Cochran, N. J. Skelton and M. A. Starovasnik, *PNAS*, **2001**, 98, 5578-5583
- ²²³ L. Wu, D. McElheny, R. Huang and T. A. Keiderling, *Biochemistry*, **2009**, 48, 10362-10371
- ²²⁴ C. Dalvit, M. Flocco, M. Veronesi, B. J. Stockman, *Comb. Chem., High Throughput Screening*, **2002**, 5, 605-611.

- ²²⁵ C. Dalvit, P. E. Fagerness, D. T. A. Hadden, R. W. Sarver and B. J. Stockman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 7696-7703
- ²²⁶ E. L. Vodovozova, *Biochemistry (Moscow)*, **2007**, *72*, 1-20.
- ²²⁷ J. Sumranjit and S. J. Chung, *Molecules*, **2013**, *18*, 10425-10451
- ²²⁸ K. T. O'Neil, S. Erickson-Viitanen and W. F. DeGrado, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 14571-14578
- ²²⁹ B. V. Marquez, H. E. Beck, T. A. Aweda, B. Phinney, C. Holsclaw, W. Jewell, D. Tran, J. J. Day, M. N. Peiris, C. Nwosu, C. Lebrilla and C. F. Meares, *Bioconjugate Chem.*, **2012**, *23*, 1080-1089
- ²³⁰ M. Paul and W.A. van der Donk *Mini-Review in Organic Chemistry*, **2005**, *2*, 23-27
- ²³¹ A. B. Tabor, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7606-7628
- ²³² P. J. Knerr, A. Tzekou, D. Ricklin, H. Qu, H. Chen, W. A. van der Donk and J. D. Lambris, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 753-760
- ²³³ A. K. Galande, K. S. Bramlett, T. P. Burris, J. L. Wittliff, A. F. Spatola, *J. Peptide Res.* **2004**, *63*, 297-302
- ²³⁴ E. E. Alberto, L. C. Soares, J. H. Sudati, A. C. A. Borges, J. B. T. Rocha and A. L. Braga, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *25*, 4211-4214
- ²³⁵ A. L. Braga, E. E. Alberto, L. C. Soares, J. B. T. Rocha, J. H. Sudati and D. H. Roos, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 43-45
- ²³⁶ K. A. Evans, C. T. Kane and C. M. Tice, *Pest. Manag. Sci.* **2002**, *58*, 392-396
- ²³⁷ L. Yu, Y. Lai, J. V. Wade and S. M. Coutts, *Tetrahedron Letters*, **1998**, *39*, 6633-6636
- ²³⁸ Z. Dekan, I. Vetter, N. L. Daly, D. J. Craik, R. J. Lewis and P. F. Alewood, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15866-15869
- ²³⁹ J. P. Badyal, A. M. Cameron, N. R. Cameron, D. M. Coe, R. Cox, B. G. Davis, L. J. Oates, G. Oyea and P. G. Steela, *Tetrahedron Letters*, **2001**, *42*, 8531-8533
- ²⁴⁰ D. N. Harpp and J. G. Gleason, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 73-80
- ²⁴¹ D. N. Harpp and J. G. Gleason, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2437-2445
- ²⁴² A. K. Galande, J. O. Trent, A. F. Spatola, *Biopolymers*, **2003**, *71*, 534-551
- ²⁴³ H. Yin, G. I. Le, A. D. Hamilton, *Alpha-helix Mimetics in Drug Discovery in Drug Discovery Research: new Frontiers in the Post-Genomic Era In Huang, Z.* **2007**, Ed. Wiley: Hoboken, 281-299
- ²⁴⁴ V. Azzarito, K. Long, N. S. Murphy and A. J. Wilson, *Nature Chemistry*, **2013**, *5*, 161-173
- ²⁴⁵ M. W. Pecuh and A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479-2494
- ²⁴⁶ J. Garner and M. M. Harding, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3577-3585
- ²⁴⁷ R. N. Chapman, G. Dimartino and P. S. Arora, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12252-12253
- ²⁴⁸ L. Frankiewicz, C. Betti, K. Guillemyn, D. Tourwé, Y. Jacquot and S. Ballea, *J. Pept. Sci.* **2013**, *19*, 423-432
- ²⁴⁹ A. D. de Araujo, H. N. Hoang, W. M. Kok, F. Diness, P. Gupta, T. A. Hill, R. W. Driver, D. Price, S. Liras and D. P. Fairlie, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6965-6969
- ²⁵⁰ S. Kneissl, E. J. Loveridge, C. Williams, M. P. Crump and R. K. Allemann, *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 3046-3054
- ²⁵¹ J. W. Taylor, *Biopolymers*, **2002**, *66*, 49-75
- ²⁵² R.S. Harrison, N. E. Shepherd, H. N. Hoang, G. Ruiz-Gómez, T. A. Hill, R. W. Driver, V. S. Desai, P. R. Young, G. Abbenante and D. P. Fairlie, *PNAS*, **2010**, *107*, 11686-11691
- ²⁵³ N. E. Shepherd, H. N. Hoang, G. Abbenante and D. P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2974-2983
- ²⁵⁴ T. Rao, G. Ruiz-Gómez, T. A. Hill, H. N. Hoang, D. P. Fairlie, J. M. Mason, *Pos One*, **2013**, *8*, 59415-59427
- ²⁵⁵ T. Okamoto, K. Zobel, A. Fedorova, C. Quan, H. Yang, W. J. Fairbrother, D. C. S. Huang, B. J. Smith, K. Deshayes and P. E. Czabotar, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 297-302
- ²⁵⁶ C. Bissantz, B. Kuhn and M. Stahl, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061-5084
- ²⁵⁷ M.A. Camerino, D.C.M. Kong, D.K. Chalmers, P.E. Thompson, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2008**, *14*, 323-331

²⁵⁸ G.H. Bird, E. Gavathiotis, J.L. LaBelle, S.G. Katz and L.D. Walensky, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 831-837

²⁵⁹ N.E. Shepherd, H.N. Hoang, G. Abbenante and D.P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15877-15886

²⁶⁰ M.L. Stewart, E. Fire, A.E. Keating and L.D. Walensky, *Nat Chem Biol.* **2010**, *6*, 595-601

²⁶¹ C. Phillips, L.R. Roberts, M. Schade, R. Bazin, A. Bent, N.L. Davies, R. Moore, A.D. Pannifer, A.R. Pickford, S.H. Prior, C.M. Read, A. Scott, D.G. Brown, B. Xu and S.L. Irving, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9696-9699

²⁶² Site internet : <https://www.pamgene.com/>

²⁶³ A. Eriksson, A. Kalushkova, M. Jarvius, R. Hilhorst, L. Rickardson, H. G. Kultima, R. de Wijn, L. Hovestad, M. Fryknäs, F. Oberg, R. Larsson, V. Parrow and M. Höglund, *Biochemical Pharmacology*, **2014**, *87*, 284-291

²⁶⁴ I. Kawada, R. Hasina, Q. Arif, J. Mueller, E. Smithberger, A. N. Husain, E. E. Vokes and R. Salgia, *Cancer Res.* **2014**, *74*, 884-895

Système VEGF/VEGFR : conception et évaluation de molécules ciblées et régulation potentielle par les métaux

Résumé : dans les thérapies anticancéreuses, les traitements anti-angiogéniques agissant sur l'axe VEGF/VEGFR ont une place importante en clinique. Dans ce contexte, nous avons conçu et évalué l'activité de nouveaux inhibiteurs de l'interaction VEGF/VEGFR. Une première approche a été la conception de molécules antagonistes du VEGFR1. Différents analogues hétérocycliques dérivant d'un composé de type (3-carboxy-2-ureido) thiophène ont été synthétisés. Des réactivités chimiques intéressantes ont été mises en évidence, mais l'activité biochimique de ces molécules ne s'est pas révélée concluante. Une seconde approche reposant sur la conception de peptides ciblant le VEGF a alors été initiée. A partir d'un peptide cyclique connu de 19 résidus ayant une affinité sub-micromolaire pour le VEGF, de nouveaux peptides et peptidomimétiques ont été développés. L'objectif a été de concevoir des composés de structures chimiques potentiellement plus simples et plus stables en milieu biologique, tout en optimisant l'affinité pour le VEGF. L'interaction de ces peptides avec le VEGF a été étudiée *in vitro* par ELISA et ITC, ainsi que par cristallographie pour le composé le plus affin. En parallèle, nous avons étudié l'effet du cuivre et d'autres métaux divalents sur l'interaction VEGF/VEGFR1. Au travers d'expériences réalisées au laboratoire ainsi qu'en collaboration, nous avons montré que certains métaux étaient capables non seulement d'inhiber l'interaction VEGF/VEGFR1 mais également d'induire une dimérisation non classique du domaine 2 du récepteur. Sachant que les métaux, et en particulier le cuivre, sont connus pour jouer un rôle important dans l'angiogenèse, cette découverte apporte de nouveaux éléments de réponse sur leur mécanisme d'action. Ce travail de thèse s'inscrit donc non seulement dans une démarche de développement de nouveaux composés anti-angiogéniques mais également de compréhension du mécanisme de régulation de l'angiogenèse.

Mots clés : Angiogenèse, VEGF, VEGFR, Relation Structure-Activité, Hétérocycles, Peptides, Peptidomimétiques, Interaction protéine-protéine, Métaux divalents et VEGFR

VEGF/VEGFR system: design and evaluation of targeted compounds and possible regulation by transition metals

Summary: inhibiting angiogenesis is an effective strategy of targeting therapy against cancer. In this context, we develop an antiangiogenic strategy consisting in the design and evaluation of compounds blocking the VEGF/VEGFR interaction. The first approach was the conception of antagonists of the VEGFR1. Starting from a (3-carboxy-2-ureido) thiophene hit, a variety of heterocyclic analogs was developed. Interesting chemical observations were made during the synthesis, but no optimization of the biochemical activity was achieved. The second approach was the design of peptides that bind to the receptor-recognition surface of the VEGF. Starting from a cyclic peptide known to bind to the VEGF with a sub-micromolar affinity, new peptides and peptidomimetics were developed. The strategy was to design simplified and potentially more stable compounds, and to improve at the same time the VEGF affinity. The interaction of VEGF with these ligands was studied *in vitro* by ELISA and ITC experiments, as well as X-ray diffraction for the best compound. Moreover, the investigation of the effects of copper and other divalent metals on the VEGF/VEGFR1 interaction was undertaken. Experiments realized in the laboratory and in collaboration showed that metals were able to displace the VEGF/VEGFR1 interaction and to induce the dimerisation of the domain 2 of the receptor. Metals are well known to play an important role in angiogenic phenomena, but their specific targets are still a matter of debate. In this context, this discovery brings new response elements regarding their mechanisms of action. Therefore, the objectives of this PhD thesis were the development of new antiangiogenic compounds, as well as the understanding of some aspects of the regulation of angiogenesis.

Key words: Angiogenesis, VEGF, VEGFR, Structure-Activity Relationship, Heterocycle, Peptides, Peptidomimetics, Protein-protein interaction, Divalent metals and VEGFR