



HAL
open science

Développement de vecteurs de pénétration intracellulaire pour un adressage d'inhibiteurs de la cathepsine D

Clément Sanchez

► **To cite this version:**

Clément Sanchez. Développement de vecteurs de pénétration intracellulaire pour un adressage d'inhibiteurs de la cathepsine D. Ingénierie biomédicale. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONT001 . tel-01489990

HAL Id: tel-01489990

<https://theses.hal.science/tel-01489990v1>

Submitted on 14 Mar 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale ED 459,
Sciences Chimiques Balard

Et de l'unité de recherche CNRS - UMR 5247
(Institut des Biomolécules Max Mousseron)

Spécialité : **Ingénierie Moléculaire**

Présentée par **Clément SANCHEZ**

**DEVELOPPEMENT DE VECTEURS DE
PENETRATION INTRACELLULAIRE POUR
UN ADRESSAGE D'INHIBITEURS DE LA
CATHEPSINE D**

Soutenue le 26 Mai 2016 devant le jury composé de

Mr Jean GUILLON Professeur, CNRS – INSERM, Laboratoire ARNA, Université de Bordeaux	Rapporteur
Mr Sébastien PAPOT Professeur, CNRS - Institut de Chimie des Milieux et des Matériaux de Poitiers, Université de Poitiers	Rapporteur
Mr Pascal RATHELOT Professeur, CNRS – Institut de Chimie Radicalaire, Université d'Aix-Marseille	Examinateur
Mr Jean MARTINEZ Professeur, CNRS – Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier	Examinateur
Mr Vincent LISOWSKI Professeur, CNRS – Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier	Directeur de Thèse
Mr Jean-François HERNANDEZ Directeur de Recherche, CNRS – Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université de Montpellier	Co-directeur de Thèse



THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'**UNIVERSITE DE MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale ED 459,
Sciences Chimiques Balard

Et de l'unité de recherche CNRS - UMR 5247
(Institut des Biomolécules Max Mousseron)

Spécialité : **Ingénierie Moléculaire**

Présentée par **Clément SANCHEZ**

**DEVELOPPEMENT DE VECTEURS DE
PENETRATION INTRACELLULAIRE POUR
UN ADRESSAGE D'INHIBITEURS DE LA
CATHEPSINE D**

Soutenue le 26 Mai 2016 devant le jury composé de

Mr Jean GUILLON

Professeur, CNRS – INSERM, Laboratoire ARNA, Université de
Bordeaux

Rapporteur

Mr Sébastien PAPOT

Professeur, CNRS - Institut de Chimie des Milieux et des
Matériaux de Poitiers, Université de Poitiers

Rapporteur

Mr Pascal RATHELOT

Professeur, CNRS – Institut de Chimie Radicalaire, Université
d'Aix-Marseille

Examinateur

Mr Jean MARTINEZ

Professeur, CNRS – Institut des Biomolécules Max Mousseron,
Université de Montpellier

Examinateur

Mr Vincent LISOWSKI

Professeur, CNRS – Institut des Biomolécules Max Mousseron,
Université de Montpellier

Directeur de Thèse

Mr Jean-François HERNANDEZ

Directeur de Recherche, CNRS – Institut des Biomolécules Max
Mousseron, Université de Montpellier

Co-directeur de
Thèse



*A ma grand-mère décédée
Tata Carmen*

A mes parents

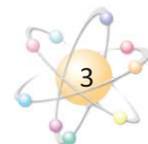
A Fady

*A mes frères
Jean-Baptiste, Simon et Antoine-Gabriel*

A Papi et Mamie

A Magali Postollec

*A mon grand père que je n'ai pas connu
Dr Antoine Sanchez*



Remerciements

Me voici arrivé au terme d'un chapitre de ma vie, à l'aboutissement de mes études, à la concrétisation de trois années passées à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), dans l'équipe « Chimie des Acides Aminés, Peptides, Hétérocycles et Chimie Supportée » dirigée par Muriel Amblard où j'ai travaillé pour obtenir le grade de Docteur.

Tout d'abord je tiens à remercier très sincèrement Monsieur le Professeur Jean Martinez de m'avoir accepté au sein de son institut afin de mener les recherches que je présente ici.

Je souhaite bien évidemment remercier les professeurs Pascal Rathelot et Jean Guillon d'avoir accepté de venir juger mon travail. Je remercie particulièrement le professeur Sébastien Papot, non seulement pour être venu également juger mes travaux, mais aussi pour m'avoir transmis sa passion il y a quelques années lors de mes stages à Poitiers dans son équipe.

Je remercie également la région Languedoc Roussillon et l'Université de Montpellier pour le financement de ce projet de thèse.

Je ne saurais passer à la page suivante sans prendre le temps de remercier correctement mes deux directeurs de thèse que sont le Professeur Vincent Lisowski et le Dr Jean-François Hernandez, grâce à qui j'en suis là aujourd'hui. Ils ont toujours su m'épauler et m'encourager durant ces années, être présents quand j'en avais besoin, et toujours disponibles. Encore merci à vous.

Je voudrais remercier chaleureusement l'équipe du Dr Marcel Garcia, avec en particulier Marie Maynadier et Virginie Bellé, qui ont mené toutes les études biologiques faites sur mes composés. J'ai particulièrement apprécié leur bonne humeur et leur disponibilité.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire avec qui j'ai pu travailler durant ma thèse, Ludovic Maillard, Nicolas Masurier, Gilles Subra, Baptiste Legrand, Muriel Amblard, Jean-Alain Fehrentz, Pascal Verdié, Luc Brunel, et Youssef. Je me souviendrai pendant très longtemps des soirées jeux faites au labo avec certains d'entre eux, mais aussi des concours inter-IBMM de pétanque !



Je tiens à remercier Pierre Sanchez, déjà parce qu'il porte un nom extraordinaire, et plus sérieusement pour toutes les analyses de masse qu'il a pu faire durant ces trois ans. J'en profite pour remercier ici Aurélien Lebrun et Karine Parra de l'UM2 pour les analyses structurales (RMN), ainsi que Guillaume Cazals pour les analyses HRMS.

Un grand merci à Elodie Mauchauffée et Loïc Mathieu, maintenant docteurs tous deux, de m'avoir si bien accueilli dans le bureau et de m'avoir accompagné lors de mes premiers pas de doctorant. Merci Elo de m'avoir fait découvrir un nouvel état d'esprit capillaire : le blousse ! Mais mon plus beau souvenir avec toi sera sûrement ce concert époustouflant d'un excellent groupe allemand auquel nous avons assisté que je n'oserai point nommer ici. Après leur départ, les bureaux ont été repris par mes nouveaux « colocataires » Clément Bonnel et Thibault Tintillier, que je tiens à remercier pour leur soutien quotidien. Merci Clem de m'avoir permis de rentabiliser mon abonnement au cinéma ! Merci aussi pour ces quelques périodes où on savait qu'on ne risquait pas de mourir de faim en venant travailler (galettes, gateaux, chocolats...). Et ce n'est jamais passé inaperçu aux yeux du Dr Laurent Gavara qui, se doutant bien qu'il y avait baleine sous gravillon dans ce bureau, venait régulièrement nous rendre visite ! Un grand merci à lui, pour son humour, mais surtout pour son soutien et... son « humanisme »... Nan je déconne!

Je voudrais également remercier Cindy Patinote qui a été assez présente pour moi, une fois intégré dans sa « royauté », et merci pour tes délicieuses pâtisseries. Mais j'attends toujours mon gâteau circulaire en damier ! Je remercie bien sûr les autres doctorants et post-doc que j'ai côtoyé, Vincent Martin, Elise Bouffard, Jeremy Cicione, Lubomir Vezekov, mon compère poitevin Laurent Sevaillé, Krishna Samanta, Priyanka Singh et bien d'autres, sans oublier Magali Postollec, avec qui j'étais devenu proche avant qu'elle ne nous quitte.

Bien sûr ces années ne se seraient pas écoulées si « paisiblement » sans une personne pour me soutenir dans un contexte plus privé. C'est pourquoi je tiens à remercier Fady Badr, mon compagnon de vie, qui m'a toujours soutenu durant tout ce temps, aussi bien pendant les bons jours que les mauvais. Je sais que ce sont son indéfectible soutien quotidien et son énergie qui m'ont notamment permis d'avancer jusqu'ici, ainsi que ses backlawas et... sa belle voiture ! Tu m'as suivi de Poitiers jusqu'ici, puis tu as suivi ton chemin qui t'a mené bien loin. Mais c'est reparti pour une nouvelle aventure, où je l'espère on ne sera plus à 1200 km, donc RDV en Angleterre ?



Durant ces trois ans, j'ai pu encadrer des stagiaires venus de la fac de pharma, de licence, ou encore d'Allemagne : Emma Gutknecht, Sandy Praud, Vincent Jean-Pierre, Coralie Sudre et Lena Sangermann. Je tiens à tous les remercier pour leur travail, leur bonne humeur et leur investissement.

Je remercie mes amis, même si la distance a fait que nous nous sommes peu vus, vous gardez une place importante dans ma vie. Merci à mon petit Mika, resté à Poitiers pour faire de la catalyse son sujet de thèse; Juju qui s'est expatrié là-bas dans le Nord à Dunkerque pour devenir docteur aussi; Marion qui est toujours contente (je te renvoie l'ascenseur !) à Lille ; ma Flomouth et Mélanie, qui suivent leur chemin à Poitiers ; Manue, déjà 20 ans qu'on se connaît ; Jo, qui est revenu de son tour du monde ; et Alexandrine, mon double, nous étions les « inséparables » au lycée d'après les profs... Un immense merci à vous tous d'avoir été là.

Enfin, tout ceci ne serait jamais arrivé sans la présence de mes proches : mes parents ; mes frères Jean-Baptiste, Simon et Antoine-Gabriel ; Tati Clocló (je crois que mes oreilles vont chauffer) ; ainsi que mes belles-sœurs et mes neveux et nièces qui m'ont beaucoup manqué durant ces trois ans à cause de la distance, et que je remercie profondément pour leur soutien et leur amour. Merci maman d'être venue me voir quelques semaines durant la dernière année, merci papa de toujours être ce solide roc sur lequel je peux m'appuyer et merci à tous de m'écouter parler gentiment de ce que je fais bien que le domaine reste quelque peu nébuleux à vos yeux.





Abréviations

ADC : Antibody Drug Conjugate

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AMBA : Acide 2-(AminoMéthyl)Benzoïque

AMCA : Acide 2-(1-(AminoMéthyl)Cyclohexyl)Acétique

AMIA : Acide 2-(2-(AminoMéthyl)-1*H*-Indol-1-yl)Acétique

AMPA : Acide 2-(2-(AminoMéthyl)Phényl)Acétique

AMPyRA : Acide 2-(2-(AminoMéthyl)-1*H*-Pyrrol-1-yl)Acétique

apoE : Apolipoprotein E

APP : Amyloid Precursor Protein

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

BOP : Hexafluorophosphate de (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)-phosphonium

Br-AMPA : Acide 2-(2-(AminoMéthyl)-4-BromoPhényl)Acétique

BVZ : Bévacicumab

CathD : Cathepsine D

CBNPC : Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules

CF : CarboxyFluorescéine

ChaSta : CyclohexylalanineStatine

CN2 / CN3 : Contrôle Négatif 2 /3

CPNP : Cell Penetrating Non Peptide

CPP : Cell Penetrating Peptide

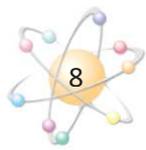
D/LBT : D/L BenzoThiazépine

DCM : DiChloroMéthane

DEA : DiEthylAmine

DIEA : DilsopropylEthylAmine

diMeO-AMPA : Acide 2-(2-(AminoMéthyl)-4,5-diMéthoxyPhényl)Acétique



diOH-AMPA : Acide 2-(2-(AminoMéthyl)-4,5-diHydroxyPhényl)Acétique

DBT : Acide (S)-2-(3-amino-4-oxo-3,4-dihydrobenzo[b][1,4]thiazépin-5(2H)-yl)acétique

DMF : DiMéthylFormamide

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

dTMP : DésoxyThymidine MonoPhosphate

dUMP : DésoxyUridine MonoPhosphate

EDT : 1,2-ethanedithiol

Eq : Equivalent

FDA : Food Drug Administration

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2

FH4 : Tétrahydrofolate

Fl : Fluorescéine

FITC : IsoThioCyanate de Fluorescéine

GAG : GlycosAminoGlycanes

HBTU : Hexafluorophosphate de N-[(1*H*-benzotriazol-1-yl)(diméthylamino)méthylène]-N-méthylméthanaminium N-oxide

HCT116 : Lignée cellulaire du cancer du côlon

HER 1/2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor

Hm : Hydrophilic Moiety

HMBC : Heteronuclear multiple-bond correlation

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HRMS : High Resolution Mass Spectroscopy

IC₅₀ : Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition

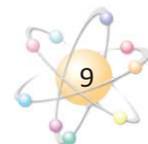
IGF1 : Insulin Growth Factor de type 1

IL6 : InterLeukine 6

Iva : Isovaléryle

LBD : Acide (S)-2-(3-amino-2-oxo-2,3,4,5-tétrahydro-1*H*-benzo[b][1,4]diazépin-1-yl)acétique

LC-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse



LiHMDS : Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium

LNCaP : Lignée cellulaire du cancer de la prostate

m/p-AMPA : Acide méta-para AminoMéthylPhénylAcétique

M6P : Mannose-6-Phosphate

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCF7 : Lignée cellulaire du cancer du sein

MDA-MB231 : Lignée cellulaire du cancer du sein

MEC : Matrice ExtraCellulaire

mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin

MTX : MéthoTreXate

NLS : Nuclear Localization Sequences

NMP : N-Méthyl-2-Pyrrolidone

PDT : Thérapie PhotoDynamique

PLGF : Placental Growth Factor

PPA : PolyPhosphoric Acid

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SaOs : lignée cellulaire de l'ostéosarcome

SG : Survie Globale

SNAr : Substitution Nucléophile Aromatique

SPPS : Synthèse Peptidique en Phase Solide

SSP : Survie Sans Progression

Sta : Statine

TA : Température Ambiante

TFA : Acide TriFluoroAcétique

THF : TétraHydroFurane

TNBS : Acide 2,4,6-Trinitrobenzènesulfonique

Topo I/II : Topoisomérase de type I/II

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor





SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
ABREVIATIONS	7
SOMMAIRE	11
TABLE DES ILLUSTRATIONS	16
INTRODUCTION	21
PREAMBULE.....	23
CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	27
I) LE CANCER : CHIFFRES, DEFINITION, CANCEROGENESE	29
a. <i>Le cancer : épidémiologie</i>	29
b. <i>Définition du cancer</i>	31
c. <i>La cancérogénèse</i>	33
II) LES PRINCIPALES THERAPIES ANTICANCEREUSES ET LEURS CIBLES	37
a. <i>Chirurgie</i>	37
b. <i>Radiothérapie</i>	38
c. <i>Immunothérapie</i>	39
d. <i>Chimiothérapie</i>	41
i. Les inhibiteurs de topoisomérase I.	41
ii. Les inhibiteurs de topoisomérase II.	43
iii. Les agents alkylants.....	45
iv. Les antimétabolites.	46
v. Les poisons du fuseau mitotique.....	48
vi. Les sels de platine	49
vii. Les inhibiteurs de protéasome.....	50
e. <i>Les conjugués anticorps-médicament</i>	51
f. <i>Les inhibiteurs d'angiogénèse</i>	53
i. Inhibiteurs de VEGF	54
ii. Les peptides RGD	56
iii. Inhiber l'activité tyrosine kinase	57
g. <i>Les inhibiteurs de protéines kinases</i>	59
h. <i>L'hormonothérapie</i>	61
i. <i>La thérapie photodynamique (PDT)</i>	64
j. <i>Thérapie génique</i>	67
III) LA CATHEPSINE D COMME CIBLE THERAPEUTIQUE	69
a. <i>Structure</i>	69
b. <i>Rôles</i>	72
i. Dans les cellules saines	72
ii. Dans les pathologies.....	73



c.	<i>Inhibiteurs de la cathepsine D</i>	77
IV)	DES VECTEURS POUR FRANCHIR LES MEMBRANES CELLULAIRES.....	87
a.	<i>La membrane cellulaire</i>	87
b.	<i>Les CPP</i>	94
i.	Un peu d'histoire.....	95
ii.	Structures et classification	96
1.	Les CPP cationiques	96
2.	Les CPP amphipathiques	97
3.	Les CPP hydrophobes	101
iii.	Mécanismes d'internalisation	102
1.	L'endocytose :	103
2.	Translocation directe à travers la membrane plasmique	105
iv.	Les CPP dans les thérapies anticancéreuses.....	107
v.	Conclusion	111
V)	TRAVAUX ANTERIEURS.....	113
a.	<i>Le DBT</i>	113
i.	Synthèse.....	114
ii.	Tests de pénétration cellulaire.....	116
b.	<i>L'AMPA</i>	119
i.	Synthèse.....	119
i.	Tests biologiques.....	120

CHAPITRE II : DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX VECTEURS DE PENETRATION CELLULAIRE ET ETUDE DU

CONJUGUE JMV4463..... 123

INTRODUCTION	125	
I) SYNTHESSES DE PLATEFORMES PRECURSEURS DE NOUVEAUX VECTEURS	128	
a.	<i>Synthèse d'un analogue de l'AMPA en série pyrrole</i>	128
b.	<i>Synthèse d'un analogue de l'AMPA en série indole</i>	147
c.	<i>Synthèses de dérivés de l'AMPA substitués</i>	153
i.	Synthèse d'un dérivé mono-méthoxylé en position 4.....	153
ii.	Synthèse de dérivés di-méthoxylé en positions 3,4 et bromé en position 4.....	155
d.	<i>Autres dérivés de l'AMPA</i>	159
e.	<i>Synthèse du dérivé du DBT en série benzodiazépine (LBD)</i>	160
f.	<i>Conclusion</i>	164
II) SYNTHESE PEPTIDIQUE	164	
a.	<i>Types de synthèse</i>	165
b.	<i>Sens de synthèse (SPPS)</i>	168
c.	<i>Stratégies de synthèse et groupements protecteurs</i>	169
d.	<i>Résines</i>	170
e.	<i>Agents de couplage</i>	172



i.	Les carbodiimides.....	172
ii.	Les sels de phosphonium	175
iii.	Les sels d'uronium / aminium	177
f.	<i>Clivage et purification du peptide</i>	179
g.	<i>Suivi de la synthèse peptidique sur support</i>	180
i.	Les tests colorimétriques	180
ii.	Le dosage du Fmoc.....	181
III)	ETUDE DE CONJUGUES ANALOGUES DU JMV4463	182
a.	<i>Synthèse des conjugués</i>	183
b.	<i>Tests biologiques</i>	188
c.	<i>Etude des relations structure-activité</i>	190
i.	Modification du vecteur.....	190
ii.	Modification de la pepstatine	193
i.	Modification de l'agencement des trois éléments constitutifs du JMV4463	197
IV)	ETUDE <i>IN VIVO</i> DU JMV4463.....	199
a.	<i>Evolution du volume tumoral</i>	199
b.	<i>Impact des traitements sur les souris</i>	200
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	202
	PARTIE EXPERIMENTALE	207
I)	GENERALITES	209
a.	<i>RMN</i>	209
b.	<i>HPLC analytique</i>	209
c.	<i>HPLC préparative</i>	210
d.	<i>LC-MS</i>	210
e.	<i>LC-MS préparative</i>	210
f.	<i>Chromatographie flash automatique</i>	211
II)	SYNTHESE DU DERIVE DE L'AMPA EN SERIE PYRROLE	211
a.	<i>Synthèse du 2-(1H-pyrrol-1-yl)propanoate de benzyle 6</i>	211
b.	<i>Synthèse du 2-(2-formyl-1H-pyrrol-1-yl)propanoate de benzyle 5</i>	212
c.	<i>Synthèse du 2-(3-formyl-1H-pyrrol-1-yl)propanoate de benzyle 10</i>	213
d.	<i>Synthèse du 2-(2-((hydroxyimino)méthyl)-1H-pyrrol-1-yl)propanoate de benzyle 12</i>	214
e.	<i>Synthèse du 2-(1H-pyrrol-1-yl)propanoate de tert-butyle 16</i>	214
f.	<i>Synthèse du 2-(2-formyl-1H-pyrrol-1-yl)propanoate de tert-butyle 17</i>	215
g.	<i>Synthèse du 2-(3-formyl-1H-pyrrol-1-yl)propanoate de tert-butyle 17-β</i>	216
h.	<i>Synthèse du 2-(2-((hydroxyimino)méthyl)-1H-pyrrol-1-yl)propanoate de tert-butyle 18</i>	216
i.	<i>Synthèse du 2-(2-formyl-1H-pyrrol-1-yl)acétate de tert-butyle 22</i>	217
j.	<i>Synthèse du 2-(2-((hydroxyimino)méthyl)-1H-pyrrol-1-yl)acétate de tert-butyle 23</i>	218
a.	<i>Synthèse du 2-(2-(aminométhyl)-1H-pyrrol-1-yl)acétate de tert-butyle 24</i>	219



b.	Synthèse du 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl) amino)méthyl)-1H-pyrrol-1-yl)acétate de tert-butyl 25.....	219
c.	Synthèse du 1H-pyrrole-2-carbaldéhyde oxime 27.....	220
d.	Synthèse du chlorure de (1H-pyrrol-2-yl)méthanaminium 28.....	221
e.	Synthèse du (9H-fluoren-9-yl)méthyl((1H-pyrrol-2-yl)méthyl) carbamate 26.....	222
f.	Synthèse du 2-(1H-pyrrol-1-yl)acétate de benzyle 82.....	223
g.	Synthèse du 2-(2-formyl-1H-pyrrol-1-yl)acétate de benzyle 29.....	223
h.	Synthèse du 2-(2-((hydroxyimino)méthyl)-1H-pyrrol-1-yl)acétate de benzyle 30.....	224
i.	Synthèse du chlorure de (1-(carboxyméthyl)-1H-pyrrol-2-yl)méthanaminium 31.....	225
j.	Synthèse de l'acide 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl) amino)méthyl)-1H-pyrrol-1-yl)acétique 32.....	226
k.	Synthèse du 2-(2-(hexanamidométhyl)-1H-pyrrol-1-yl)acétate de tert-butyle 34.....	227
III)	SYNTHÈSE DU DERIVÉ DE L'AMPA EN SÉRIE INDOLE.....	227
a.	Synthèse du 1H-indole-2-carboxamide 43.....	227
b.	Synthèse du (1H-indol-2-yl)méthanamine 42.....	228
c.	Synthèse du ((1H-indol-2-yl)méthyl)carbamate de tert-butyle 45.....	229
d.	Synthèse du 2-(2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-1H-indol-1-yl)acétate de tert-butyle 46....	230
e.	Synthèse du ((1H-indol-2-yl)méthyl) carbamate de (9H-fluorén-9-yl)méthyle 47.....	231
f.	Synthèse du ((1H-indol-2-yl)méthyl)carbamate de benzyle 49.....	232
g.	Synthèse du 2-(2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)méthyl)-1H-indol-1-yl)acétate de méthyle 50.....	233
h.	Synthèse de l'acide 2-(2-(((benzyloxy)carbonyl)amino) méthyl)-1H-indol-1-yl)acétique 51.....	234
i.	Synthèse du 2-(2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)méthyl)-1H-indol-1-yl)acétate de benzyle 52.....	235
j.	Synthèse de l'acide 2-(2-(aminométhyl)-1H-indol-1-yl)acétique 38.....	236
k.	Synthèse de l'acide 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)méthoxy) carbonyl)amino)méthyl)-1H-indol-1-yl)acétique 37.....	237
IV)	DERIVÉS DE L'AMPA SUBSTITUÉS.....	239
a.	Synthèse du 2-(2-bromo-4-méthoxyphényl)acétate de méthyle 56.....	239
b.	Synthèse du 7-bromo-1,2-dihydroisoquinolin-3(4H)-one 59.....	240
c.	Synthèse du chlorhydrate de l'acide 2-(2-(aminométhyl)-4-bromophényl) acétique 58.....	241
d.	Synthèse de l'acide 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)méthyl)amino) méthyl)-4-bromophényl)acétique 62 .	242
e.	Synthèse de la 1,1-diméthyl-1,2-dihydroisoquinolin-3(4H)-one 64.....	243
f.	Synthèse du chlorhydrate de l'acide 2-(2-(aminométhyl)-4,5-diméthoxyphényl) acétique 66.....	244
g.	Synthèse de l'acide 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)méthoxy) carbonyl)amino)méthyl)-4,5-diméthoxyphényl)acétique 67.....	245
h.	Synthèse de l'acide 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)méthoxy) carbonyl)amino)méthyl)-4,5-dihydroxyphényl)acétique 68.....	246
i.	Synthèse de l'acide 2-(1-((((9H-fluoren-9-yl)méthoxy) carbonyl)amino)méthyl)cyclohexyl)acétique 73	247



V)	SYNTHESE DU DERIVE DU DBT EN SERIE BENZODIAZEPINE	248
a.	<i>Synthèse de l'acide (S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-((2-nitrophényl)amino)propanoïque 78..</i>	248
b.	<i>Synthèse de l'acide (S)-3-((2-aminophényl)amino)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino) propanoïque 77.....</i>	249
c.	<i>Synthèse du (S)-(2-oxo-2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzo[b][1,4] diazépín-3-yl)carbamate de tert-butyle 76.....</i>	250
d.	<i>Synthèse du (S)-2-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-oxo-2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzo[b][1,4]diazépín-1-yl)acétate de tert-butyle 75.....</i>	251
e.	<i>Synthèse du trifluoroacétate de (S)-1-(carboxyméthyl)-2-oxo-2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzo[b][1,4]diazépín-3-aminium 74</i>	252
f.	<i>Synthèse de l'acide (S)-2-(3-(((9H-fluoren-9-yl)méthoxy) carbonyl)amino)-2-oxo-2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzo[b] [1,4]diazépín-1-yl) acétique 81</i>	253
VI)	SYNTHESE PEPTIDIQUE SUR SUPPORT SOLIDE	254
a.	<i>Protocoles</i>	254
i.	<i>Réacteurs et préparation du support solide</i>	255
ii.	<i>Etapas de lavage.....</i>	255
iii.	<i>Etapas de déprotection</i>	255
iv.	<i>Couplages peptidiques</i>	255
v.	<i>Test TNBS</i>	256
vi.	<i>Microclivage</i>	256
vii.	<i>Dosage du Fmoc</i>	256
viii.	<i>Clivage de la résine Rink amide (AM-PS)</i>	257
b.	<i>Caractéristiques des bioconjugués 1 à 26.....</i>	257
VII)	TESTS BIOLOGIQUES	259
a.	<i>Généralités.....</i>	259
b.	<i>Tests d'inhibition de la CathD</i>	259
c.	<i>Tests de cytotoxicité</i>	260
d.	<i>Culture cellulaire pour injection de cellules cancéreuses chez la souris.....</i>	260
e.	<i>Croissance tumorale chez la souris athymique</i>	261
	ANNEXES.....	262

Table des illustrations

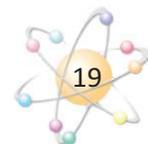
FIGURE 1 : STRUCTURES DES MIMES CONTRAINTS DE DIPEPTIDE ETUDIES	24
FIGURE 2 : INCIDENCE DU CANCER DANS LE MONDE EN 2012	29
FIGURE 3 : MORTALITE DU CANCER DANS LE MONDE EN 2012	30
FIGURE 4 : INCIDENCE ET MORTALITE MONDIALE EN 2012 POUR DIFFERENTS CANCERS	31
FIGURE 5 : CARACTERISTIQUES DES CELLULES TUMORALES ³⁸	32
FIGURE 6 : PROCESSUS POUVANT MENER A L'APPARITION DE CELLULES CANCEREUSES	36
FIGURE 7 : PRINCIPE DE LA RADIOTHERAPIE	39
FIGURE 8 : MECANISME DES TOPOISOMERASES 1	42
FIGURE 9 : STRUCURE DE L'IRINOTECAN ET DU TOPOTECAN	42
FIGURE 10 : FONCTIONNEMENT DES INHIBITEURS DE TOPO1	43
FIGURE 11 : FONCTIONNEMENT DES TOPOISOMERASES II	44
FIGURE 12 : FONCTIONNEMENT DES INHIBITEURS DE TOPO II	44
FIGURE 13 : STRUCTURE DE LA DOXORUBICINE, DE LA DAUNORUBICINE ET DE L'ETOPOSIDE	45
FIGURE 14 : FONCTIONNEMENT DES AGENTS ALKYLANTS MONOFONCTIONNELS	45
FIGURE 15 : FONCTIONNEMENT DES AGENTS ALKYLANTS BIFONCTIONNELS	46
FIGURE 16 : PRINCIPE DE L'ACTION DES ANTIFOLATES	47
FIGURE 17 : MECANISME D'ACTION DES LEURRES	47
FIGURE 18 : CYCLE DE LA MITOSE	48
FIGURE 19 : ACTIONS DES VINCA ALCALOÏDES ET DES TAXANES SUR LES MICROTUBULES	49
FIGURE 20 : QUELQUES SELS DE PLATINE	49
FIGURE 21 : FORMATION DES PONTS AVES LES SELS DE PLATINE	50
FIGURE 22 : STRUCTURE DU BORTEZOMIB	51
FIGURE 23 : PRINCIPE D'ACTION DES ADCS	52
FIGURE 24 : STRUCTURE DU BRENTIXUMAB	52
FIGURE 25 : STRUCTURE DE L'ŒSTRADIOL (ŒSTROGENE) ET DU TAMOXIFENE	62
FIGURE 26 : STRUCTURE DE LA CYPROTÉRONE	64
FIGURE 27 : EXEMPLES DE PHOTOSENSIBILISATEURS	66
FIGURE 28 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES PEPSTATINES	80
FIGURE 29 : STRUCTURE DU COMPLEXE PEPSTATINE – CATHD ⁸¹	81
FIGURE 30 : INTERACTIONS ENTRE LA PEPSTATINE A ET LA CATHD. LE OH DU RESIDU STATINE EN ROUGE EST EN INTERACTION AVEC LES DEUX ACIDES ASPARTIQUE DU SITE CATALYTIQUE	81
FIGURE 31 : POSITION DES RESIDUS DE LA PEPSTATINE	82
FIGURE 32 : STRUCTURE D'INHIBITEURS TRIPEPTIDIQUES DE CATHD SOUS FORME DE TRIPEPTIDES ET COMPORTANT DES ISOSTERES DE TYPE HYDROXYETHYLE	86
FIGURE 33 : STRUCTURE DES LIPIDES ET DE LA BICOUCHE LIPIDIQUE	88
FIGURE 34 : LISTE DES DIFFERENTES PROTEINES MEMBRANAIRES	89
FIGURE 35 : TYPES DE FIXATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES A LA MEMBRANE CELLULAIRE ⁸⁹	89



FIGURE 36 : LES DIFFERENTS TYPES D'ENDOCYTOSE.....	92
FIGURE 37 : REPRESENTATION DE LA PENETRATINE	97
FIGURE 38 : REPRESENTATION EN ROUE HELICOÏDALE DES CPP MAP, MAP 17 ET MAP 12	99
FIGURE 39 : STRUCTURES 3D DES POLYPROLINES II	100
FIGURE 40 : MECANISMES PROPOSES POUR LA TRANSLOCATION DIRECTE DES CPP ¹³⁰	106
FIGURE 41 : APPLICATIONS DES CPP	108
FIGURE 42 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES CIBLES ET APPLICATIONS DES CPP ¹⁵⁸	112
FIGURE 43 : STRUCTURE DU FMOC-DBT-OH.....	114
FIGURE 44 : STRUCTURE DE LA FLUORESCINE (FI) SOUS SA FORME FITC APRES ATTACHEMENT A L'AMINE	116
FIGURE 45 : TESTS DE PENETRATION CELLULAIRE DES DIFFERENTS OLIGOMERES DU DBT ET DU LBT ¹⁶⁰	117
FIGURE 46 : ETUDE CINETIQUE COMPARANT LE JMV 3229 A L'OCTA-ARGININE ¹⁶⁰	118
FIGURE 47 : LOCALISATION DU JMV 3229 ETUDIEE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE ¹⁶⁰	118
FIGURE 48 : REPRESENTATION DU CONJUGUE JMV 4463	120
FIGURE 49 : TESTS DE CYTOTOXICITE DU JMV 4463 ET DE CONTROLES SUR DIFFERENTES LIGNEES DE CELLULES CANCEREUSES ¹⁶¹ ...	122
FIGURE 50 : ANALOGUES DE L'AMPA VARIANT PAR LE NOYAU CYCLIQUE.....	125
FIGURE 51 : ANALOGUES DE L'AMPA SUBSTITUES	126
FIGURE 52 : ANALOGUES ISOMERES DE POSITION DE L'AMPA.....	126
FIGURE 53 : STRUCTURES DE L'AMPA ET DE L'AMBA.....	126
FIGURE 54 : STRUCTURES DU DBT ET DU LBD.....	127
FIGURE 55 : STRUCTURES DE L'AMPA ET DE L'AMPYRA.....	128
FIGURE 56 : PRODUITS FORMES LORS DE LA REACTION DE VILSMERER	133
FIGURE 57 : PRODUIT FORME PAR CYCLISATION LORS DE LA REDUCTION PALLADOCATALYSEE.....	139
FIGURE 58 : LC-MS OBTENUE APRES REDUCTION DE L'OXIME EN SERIE ESTER TERT-BUTYLIQUE	140
FIGURE 59 : STRUCTURE DE L'AMPA ET DE L'AMIA.....	147
FIGURE 60 : SPECTRE RMN ¹ H DU COMPOSE 46.....	150
FIGURE 61 : STRUCTURE DE L'AMPA ET DU COMPOSE 53	153
FIGURE 62 : STRUCTURES DES COMPOSES 69, 70 ET 71	160
FIGURE 63 : STRUCTURES DU DBT ET DU LBD.....	161
FIGURE 64 : CORRELATIONS HMBC DU COMPOSE 75.....	163
FIGURE 65: STRUCTURE DE L'ARGININE PROTEGEE PAR LE GROUPEMENT PBF.....	170
FIGURE 66 : STRUCTURE DE LA RESINE RINK AMIDE AM-PS.....	172
FIGURE 67 : STRUCTURES DE LA STATINE, DE LA γ LEU, DE LA γ ALA ET DE LA CHASTA	187
FIGURE 68 : STRUCTURES DE L'O ₂ OC, DE L'O ₁₂ OC ET DE LA BETAÏNE.....	188
FIGURE 69 : INHIBITION DE LA CATHD ISOLEE (BARRES BLEUES) ET INTRACELLULAIRE (BARRES ROUGE) PAR LES CONJUGUES DIFFERANT PAR LA NATURE DU VECTEUR A 10 ⁻⁵ M	191
FIGURE 70 : CYTOTOXICITE DES CONJUGUES DIFFERANT PAR LEUR VECTEUR A 10 ⁻⁵ M SUR DES CELLULES MDA-MB-231.....	192
FIGURE 71 : INHIBITION DE LA CATHD ISOLEE ET INTRACELLULAIRE POUR LES CONJUGUES DIFFERANT PAR LEUR COMPOSANTE PEPSTATINE A 10 ⁻⁵ M	194



FIGURE 72 : INHIBITION DE LA CATHD ISOLEE ET INTRACELLULAIRE PAR LES CONJUGUES DIFFERANT PAR LEUR COMPOSANTE PEPSTATINE A 10^{-8} M.....	195
FIGURE 73 : CYTOTOXICITE DES CONJUGUES DIFFERANT PAR LA COMPOSANTE PEPSTATINE A 10^{-5} M SUR DES CELLULES MDA-MB-231	196
FIGURE 74 : TEST DE CYTOTOXICITE DES CONJUGUES 1 (JMV4463), 16 ET 17 A DIFFERENTES CONCENTRATIONS SUR DES CELLULES MDA-MB-231.....	196
FIGURE 75 : INHIBITION DE LA CATHD ISOLEE ET INTRACELLULAIRE PAR LES CONJUGUES DIFFERANT PAR L'ORDRE DES COMPOSANTES OU LEUR PARTIE HYDROPHILE A 10^{-5} M	197
FIGURE 76 : CYTOTOXICITE DES CONJUGUES DIFFERANT PAR L'ORDRE DES COMPOSANTES OU LEUR PARTIE HYDROPHILE A 10^{-5} M SUR DES CELLULES MDA-MB-231	198
FIGURE 77 : EVOLUTION DU VOLUME TUMORAL EN FONCTION DU TEMPS ET DU TRAITEMENT	200
FIGURE 78 : ASPECT DE LA MASSE TUMORALE ET DU CORPS GRAISSEUX OBTENUS RESPECTIVEMENT APRES TRAITEMENTS PAR DU DMSO OU 36 MG/KG DE JMV4463	201
FIGURE 79 : BILAN DES SYNTHESES ORGANIQUES.....	202
SCHEMA 1 : MODIFICATIONS APPORTEES DANS LE CADRE DE L'ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE / ACTIVITE DU BIOCONJUGUE JMV4463.....	25
SCHEMA 2 : FORMATION D'UNE CELLULE CANCEREUSE	35
SCHEMA 3 : MECANISME D'ACTION D'UNE MOUTARDE AZOTEE	46
SCHEMA 4 : MECANISME D'ACTION DES SELS DE PLATINE.....	50
SCHEMA 5: PRINCIPE DE L'HORMONOTHERAPIE	62
SCHEMA 6 : L'AROMATASE : ACTION ET INHIBITEURS.....	63
SCHEMA 7 : PROCESSUS D'EXCITATION DE L'OXYGENE DANS LA PDT	65
SCHEMA 8 : PRINCIPE DE LA THERAPIE GENIQUE.....	67
SCHEMA 9 : STRUCTURE DE LA CATHEPSINE D	70
SCHEMA 10 : MATURATION DE LA CATHD	71
SCHEMA 11 : ROLES DE LA CATHD DANS LA CELLULE TUMORALE	76
SCHEMA 12 : MECANISME DU CLIVAGE PEPTIDIQUE PAR LA CATHD	82
SCHEMA 13 : MECANISME DES DIFFERENTS MODES DE TRANSPORT MEMBRANAIRE.....	91
SCHEMA 14 : FONCTIONNEMENT DES DIFFERENTS MODES DE TRANSPORT ACTIF	91
SCHEMA 15 : INTERNALISATION AVEC LA CLATHRINE	93
SCHEMA 16 : DIFFERENTES VOIES D'INTERNALISATION DES CPPS	103
SCHEMA 17 : MECANISME DE LA MACROPINOCYTOSE	104
SCHEMA 18 : PRINCIPE DES CPP ACTIVABLES	110
SCHEMA 19 : LES CPP ET LEURS CARGOS ¹³⁰	111
SCHEMA 20 : SYNTHÈSE DU DBT	115
SCHEMA 21 : SYNTHÈSE DES DERIVES PYRROLIQUES PAR ABELL ET AL. ¹⁶⁴	129
SCHEMA 22 : SCHEMA RETROSYNTHETIQUE DE LA SYNTHÈSE ENVISAGEE POUR OBTENIR LE FMOC-AMPYRA 2.....	130



SCHEMA 23 : REACTION DE CLAUSON-KAAS.....	131
SCHEMA 24 : MECANISME DE LA REACTION DE CLAUSON-KAAS	131
SCHEMA 25 : REACTIONS A PARTIR DU 2-PYRROL-1-YL-PROPANOATE DE BENZYLE 6.....	132
SCHEMA 26 : MECANISME DE LA REACTION DE VILSMEIER	133
SCHEMA 27 : ESSAIS DE FORMATION DE L'AMINE A PARTIR DE L'ALDEHYDE	137
SCHEMA 28 : SYNTHÈSE ENVISAGÉE POUR OBTENIR L'AMPYRA	138
SCHEMA 29 : POLYMERISATION DE L'AMINOMETHYLPYRROLE	139
SCHEMA 30 : ESSAIS DE FORMATION DE L'AMINOMETHYLE PROTEGE SANS PASSER PAR UN AMINOMETHYLE LIBRE	141
SCHEMA 31 : REACTIONS DECRITES PAR GOPAL DAS ET GHORAI ¹⁷⁷	142
SCHEMA 32 : ESSAIS DE SYNTHÈSE DU COMPOSE 25	143
SCHEMA 33 : SYNTHÈSES ENVISAGÉES PASSANT PAR UN CHLORHYDRATE AFIN D'OBTENIR LE FMOC-AMPYRA.....	144
SCHEMA 34 : TESTS DE STABILITE DU PYRROLE 25 DANS LES CONDITIONS DE SYNTHÈSE PEPTIDIQUE SUR SUPPORT	145
SCHEMA 35 : TESTS DE STABILITE D'UN COMPOSE AMINOMETHYLPYRROLE N-ACYLE EN PRESENCE DE TFA	146
SCHEMA 36 : RETROSYNTHÈSE ENVISAGÉE POUR L'OBTENTION DE L'AMIA	148
SCHEMA 37 : SYNTHÈSE DE L'AMINOMETHYLINDOLE 42	148
SCHEMA 38 : VOIE DE SYNTHÈSE DE L'AMIA EN UTILISANT UN BOC.....	149
SCHEMA 39 : VOIE DE SYNTHÈSE DE L'AMIA EN UTILISANT UNE PROTECTION FMOC.....	150
SCHEMA 40 : VOIE DE SYNTHÈSE DE L'AMIA EN UTILISANT UN GROUPEMENT PROTECTEUR Z.....	152
SCHEMA 41 : RETROSYNTHÈSE CONDUISANT A LA FORMATION DU COMPOSE 53	153
SCHEMA 42 : SYNTHÈSE DU COMPOSE NITRILE 57	154
SCHEMA 43 : RETROSYNTHÈSE PERMETTANT L'OBTENTION DU DERIVE BROME EN POSITION 4 DE L'AMPA.....	155
SCHEMA 44 : SYNTHÈSE DU DERIVE BROME EN POSITION 4 DE L'AMPA	156
SCHEMA 45 : ESSAIS DE FORMATION DE L'ISOQUINOLINONE AVEC DIFFERENTES SUBSTITUTIONS	157
SCHEMA 46 : RETROSYNTHÈSE PERMETTANT LA FORMATION DU COMPOSE 63.....	157
SCHEMA 47 : SYNTHÈSE DU DERIVE 63.....	157
SCHEMA 48 : SYNTHÈSE DES DERIVES DIMETHOXYLE 67 ET DIHYDROXYLE 68.	159
SCHEMA 49 : SYNTHÈSE DU COMPOSE AMCA 73	160
SCHEMA 50 : RETROSYNTHÈSE ENVISAGÉE POUR ACCEDER AU LBD 74.....	161
SCHEMA 51 : SYNTHÈSE DU LBD	162
SCHEMA 52 : CHELATION DU LIHMDS PAR LE COMPOSE 76.....	163
SCHEMA 53 : TYPES DE SYNTHÈSE PEPTIDIQUE	165
SCHEMA 54 : PRINCIPE DE LA SPPS (SYNTHÈSE PEPTIDIQUE EN PHASE SOLIDE)	166
SCHEMA 55 : PRINCIPE DE L'ÉLONGATION PEPTIDIQUE EN SPPS.....	167
SCHEMA 56 : FORMATION DE L'OXAZOLONE MENANT A L'ÉPIMERISATION	168
SCHEMA 57 : FORMATION DE L'O-ACYLISOURÉE AVEC UN CARBODIIMIDE.....	172
SCHEMA 58 : MECANISMES PROPOSÉS POUR LA FORMATION DE LA LIAISON AMIDIQUE PAR LES CARBODIIMIDES ET REACTIONS SECONDAIRES.....	174
SCHEMA 59 : MECANISME DE FORMATION DE LA LIAISON AMIDIQUE EN UTILISANT DES SELS DE PHOSPHONIUM (ICI LE BOP)	176



SCHEMA 60 : MECANISME DE FORMATION DE LA LIAISON PEPTIDIQUE EN UTILISANT LES SELS D'URONIUM / AMINIUM.....	179
SCHEMA 61 : REACTION SECONDAIRE LIEE AUX SELS D'URONIUM / AMINIUM.....	179
SCHEMA 62 : MECANISME DU TEST DE KAISER.....	181
SCHEMA 63 : REACTION DU TEST TNBS	181
SCHEMA 64 : REACTION DE DEPROTECTION DU FMOC.....	182
SCHEMA 65 : PRESENTATION DES MODIFICATIONS APORTEES AU CONJUGUE DE REFERENCE, LE JMV4463	183
SCHEMA 66 : METHODE DE SYNTHESE GENERALE POUR TOUS LES CONJUGUES	183
SCHEMA 67 : REACTION DE TRANSFERT N-O ACYLIQUE	184
SCHEMA 68 : CLIVAGE DU PEPTIDE CONTENANT UNE METHIONINE.....	186
SCHEMA 69 : PRINCIPE DES TESTS FRET.....	189
SCHEMA 70 : PERSPECTIVES DE SYNTHESE POUR LES DERIVES PYRROLIQUES	203
SCHEMA 71 : REACTION DE SUZUKI-MYARA SUR LE BR-AMPA	204
SCHEMA 72 : RESUME DES RESULTATS OBTENUS LORS DE L'ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE / ACTIVITE DU CONJUGUE JMV4463	205
TABLEAU 1 : TYPES DE CANCER CIBLES SELON LE TYPE D'ACTIVATEUR EN IMMUNOTHERAPIE	40
TABLEAU 2 : HYDROLYSE ET INHIBITION DE LA CATHD POUR QUELQUES ANALOGUES DE SUBSTRAT	78
TABLEAU 3 : CONSTANTES D'INHIBITION DE PLUSIEURS ANALOGUES DE SUBSTRAT	79
TABLEAU 4 : IC ₅₀ DE PLUSIEURS PEPSTATINES VIS-A-VIS DE LA CATHD.....	80
TABLEAU 5 : INHIBITION DE LA CATHD PAR DES ANALOGUES DE LA PEPSTATINE A	83
TABLEAU 6 : INHIBITION DE LA CATHD PAR DES ANALOGUES DE SUBSTRAT CONTENANT UNE STATINE.....	84
TABLEAU 7 : STRUCTURES ET IC ₅₀ DES COMPOSES DE DUMAS ET AL. ⁸⁵	85
TABLEAU 8 : LISTE DES OLIGOMERES DE L/DBT SYNTHETISES	116
TABLEAU 9 : NOMS ET STRUCTURES DES CONTROLES NEGATIFS	120
TABLEAU 10 : INHIBITION DE LA CATHD EN EXTRA- ET EN INTRA-CELLULAIRE	121
TABLEAU 11 : OPTIMISATION DE LA REACTION DE VILSMEIER.....	135
TABLEAU 12 : ESSAIS DE SUBSTITUTION SUR LE COMPOSE 56.....	155
TABLEAU 13 : TENTATIVES D'OUVERTURE DE L'ISOQUINOLINONE 64	158
TABLEAU 14 : STRATEGIES DE SYNTHESE UTILISEES EN SPPS	169
TABLEAU 15: EXEMPLES DE TYPES DE RESINE UTILISES	171
TABLEAU 16: EXEMPLES DE QUELQUES CARBODIIMIDES UTILISES	173
TABLEAU 17: DEUX ADDITIFS TRES UTILISES : HOBt ET HOAt	175
TABLEAU 18 : PLUSIEURS SELS DE PHOSPHONIUM COURAMMENT UTILISES	177
TABLEAU 19 : DEUX SELS D'URONIUM / AMINIUM TRES UTILISES EN SPPS	178
TABLEAU 20 : LISTE DES CONJUGUES SYNTHETISES ET RENDEMENTS OBTENUS	185
TABLEAU 21 : POIDS MOYEN DES ORGANES DES TROIS GROUPES DE SOURIS	200

INTRODUCTION



Préambule

Le Cancer est une maladie qui existe sans doute depuis l'origine de la vie. Les premières descriptions connues du cancer datent d'environ 400 ans avant Jésus-Christ. Bien que ce fléau ait toujours existé, l'Homme n'a pas encore trouvé de remède miracle contre ces cellules malignes.

La recherche sur le cancer connaît une vive accélération depuis quelques années. A la fois passionnante, stimulante, exigeante ou déroutante, cette recherche a tout de même abouti à des avancées qui ont permis d'améliorer la prise en charge des patients. Alors qu'il y a 20 ans, nous ne parvenions à guérir qu'un cancer sur trois, un patient sur deux est en rémission aujourd'hui.

Il existe aujourd'hui une multitude de cibles potentielles permettant d'envisager le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses innovantes. Ce travail de thèse s'inscrit plus particulièrement dans le cadre d'un projet de recherche visant à inhiber la Cathepsine D (CathD). En effet, cette protéase lysosomale est surexprimée et sécrétée par de nombreuses tumeurs solides. De plus, il a été montré que la CathD joue un rôle dans la prolifération des cellules cancéreuses, ainsi que dans le processus métastatique. Aujourd'hui, un très bon inhibiteur de la CathD existe : la pepstatine. Ce pseudo-hexapeptide n'est cependant pas capable de traverser les membranes cellulaires, et ne parvient donc pas à atteindre sa cible dans le système endolysosomal. C'est pourquoi des vecteurs sont développés au sein de notre laboratoire, sous la forme d'oligomères de mimes contraints de dipeptides, aussi appelés CPNP (Cell Penetrating Non Peptide). Un premier conjugué a été synthétisé antérieurement au travail présenté ici (le JMV4463). Il est composé d'un vecteur constitué d'un tétramère du motif AMPA (acide 2-(aminométhyl)phénylacétique), de la pepstatine, et d'une partie hydrophile nécessaire à la solubilisation du conjugué. Ce conjugué capable de franchir efficacement la membrane cellulaire, possède également des effets cytotoxiques sur différentes lignées de cellules cancéreuses. Les travaux présentés dans ce manuscrit s'appuient sur les résultats antérieurs obtenus pour ce conjugué JMV4463 (Schéma 1).

Ce manuscrit est divisé en 3 chapitres. Le premier, consacré à une mise au point bibliographique, permet de mieux comprendre ce qu'est le cancer. Ainsi, les origines et les principaux traitements actuels seront détaillés. De plus, seront citées plusieurs avancées récentes réalisées dans le domaine des traitements anticancéreux. Ensuite la Cathepsine D sera décrite. Nous parlerons de ses rôles, de sa structure ainsi que des inhibiteurs qui existent, et en particulier la pepstatine. Les agents de vectorisation tels que les CPP (Cell Penetrating Peptide) et les CPNP seront également abordés avec une présentation des avancées réalisées dans ce domaine ces dernières années. Pour finir, les travaux antérieurs à mon arrivée menés au sein de notre laboratoire sur cette thématique seront exposés afin d'aborder ensuite le travail entrepris dans le cadre de ce projet.

Le premier point étudié est le développement de nouveaux vecteurs de type CPNP. Le second chapitre de cette thèse sera ainsi consacré à la synthèse des mimes contraints de dipeptides non chargés (Figure 1), analogues de deux motifs développés au laboratoire, l'AMPA et le DBT (acide (S)-2-(3-amino-4-oxo-3,4-dihydrobenzo[b][1,4]thiazépin-5(2H)-yl)acétique). Ainsi, l'accès à des dérivés de l'AMPA en série pyrrole (AMPyrA), indole (AMIA) et cyclohexyle (AMCA) ont été étudiés. D'autres analogues possédant différentes substitutions, tels qu'un atome de brome (BromoAMPA), deux groupements méthoxy (diMeO-AMPA), ou deux groupements hydroxy (diOH-AMPA) ont aussi été synthétisés. Un homologue inférieur a également été considéré (AMBA), ainsi que des isomères

de position (*m*-AMPA et *p*-AMPA). Un analogue du DBT, de type benzodiazépine (LBD), a enfin été considéré.

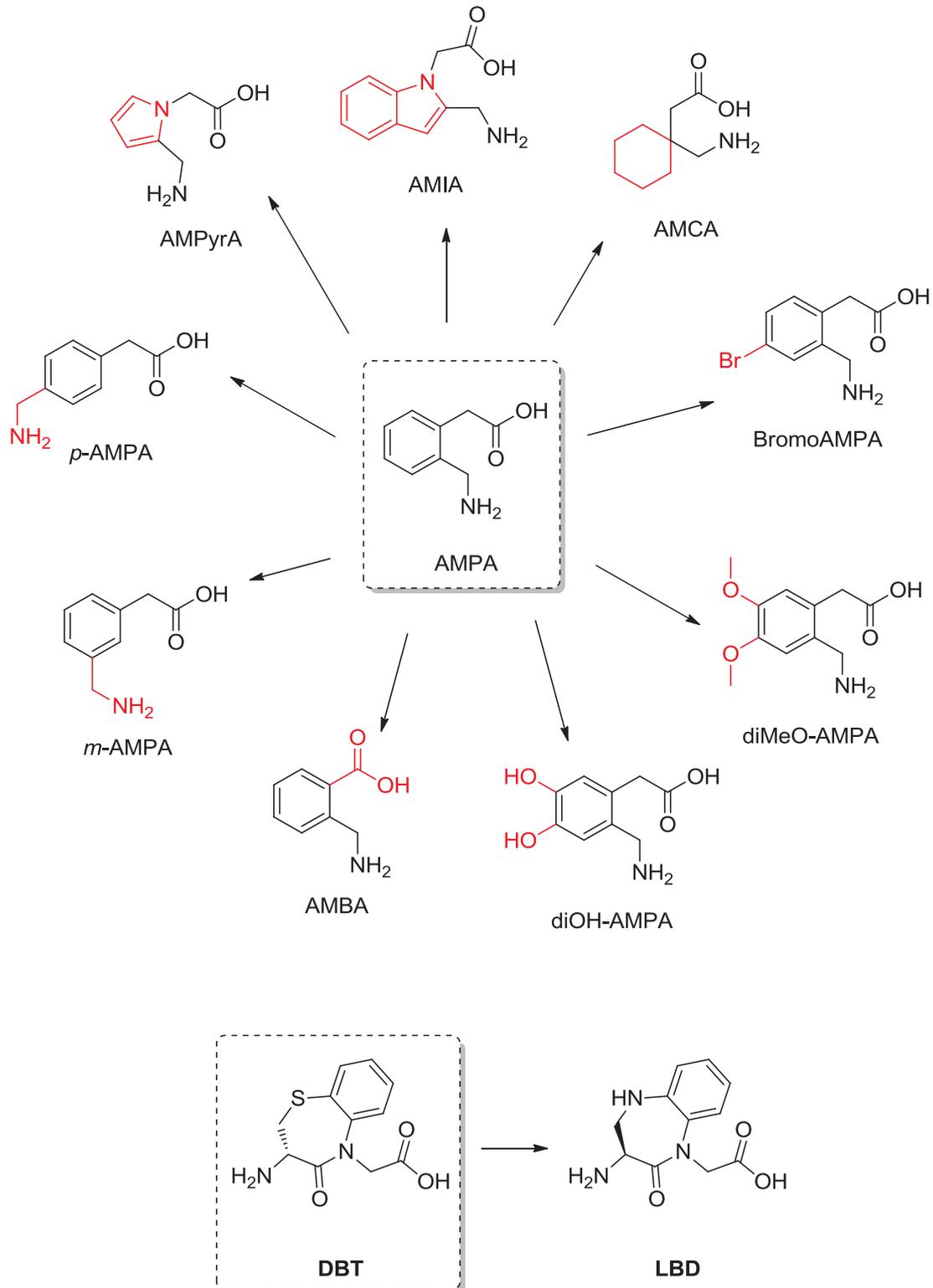


Figure 1 : Structures des mimes contraints de dipeptide étudiés

Le second point présenté dans ce chapitre est une étude des relations structure / activité du bioconjugué de référence (JMV4463). Différents bioconjugués ont été synthétisés en suivant les stratégies établies pour la synthèse peptidique en phase solide. Dans le cadre de cette étude, les

points explorés sont l'importance du vecteur, celle des résidus statine de l'inhibiteur, celle de la position de chaque élément fonctionnel dans le conjugué, ainsi que la nature de la partie hydrophile (Schéma 1).

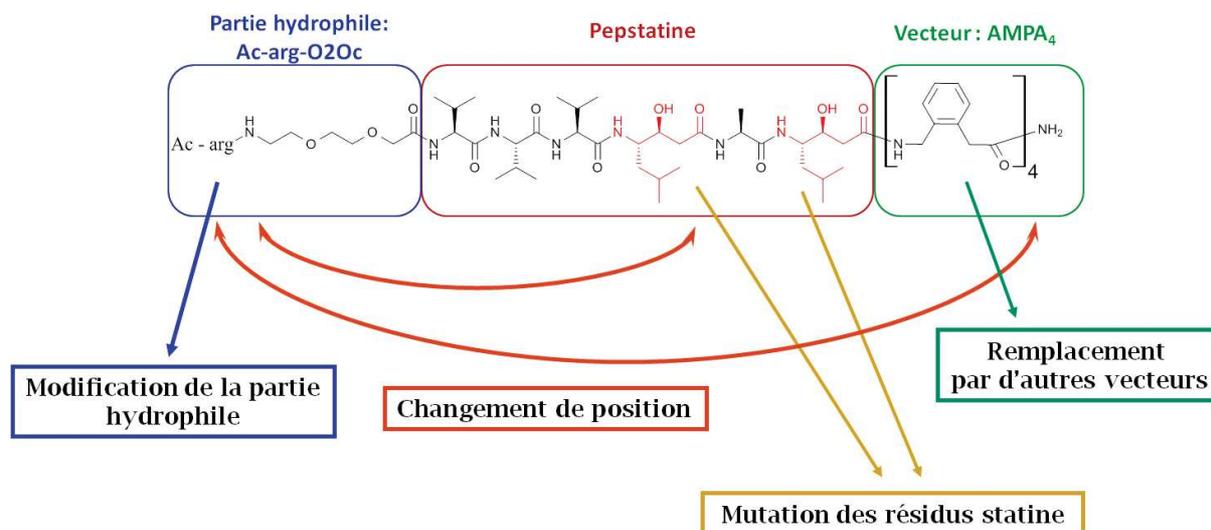


Schéma 1 : Modifications apportées dans le cadre de l'étude des relations structure / activité du bioconjugué JMV4463

Enfin, le troisième chapitre traitera des études biologiques réalisées sur les différents conjugués synthétisés. Ces expériences ont été réalisées afin de déterminer les activités inhibitrices des conjugués sur enzyme isolée, d'établir leur aptitude à franchir la membrane plasmique et enfin leur potentielle activité cytotoxique.



CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I) Le cancer : chiffres, définition, cancérogénèse¹

a. Le cancer : épidémiologie²

De nos jours, le cancer représente la première cause de mortalité dans les pays développés. Cette constatation est d'autant plus importante que l'espérance de vie ne cesse de s'allonger, et que le cancer touche préférentiellement les sujets âgés.

Cette partie va être abordée par quelques chiffres traitant du cancer à l'échelle mondiale.

Tout d'abord, observons la répartition mondiale de l'incidence et de la mortalité du cancer (Figures 2 et 3), que ce soit chez l'homme ou la femme, en 2012. L'incidence représente le nombre de nouveaux cas découverts dans l'année, et la mortalité le nombre de décès dus au cancer.

Le cancer (tous types confondus) est une maladie qui touche principalement les pays développés tels que les Etats-Unis, le Canada, l'Europe et l'Australie. Cependant, les pays avec la plus forte incidence en 2012 ne sont pas nécessairement ceux où le cancer a fait le plus de ravages. En effet, la Russie et le nord de l'Asie sont les plus touchés en termes de mortalité.

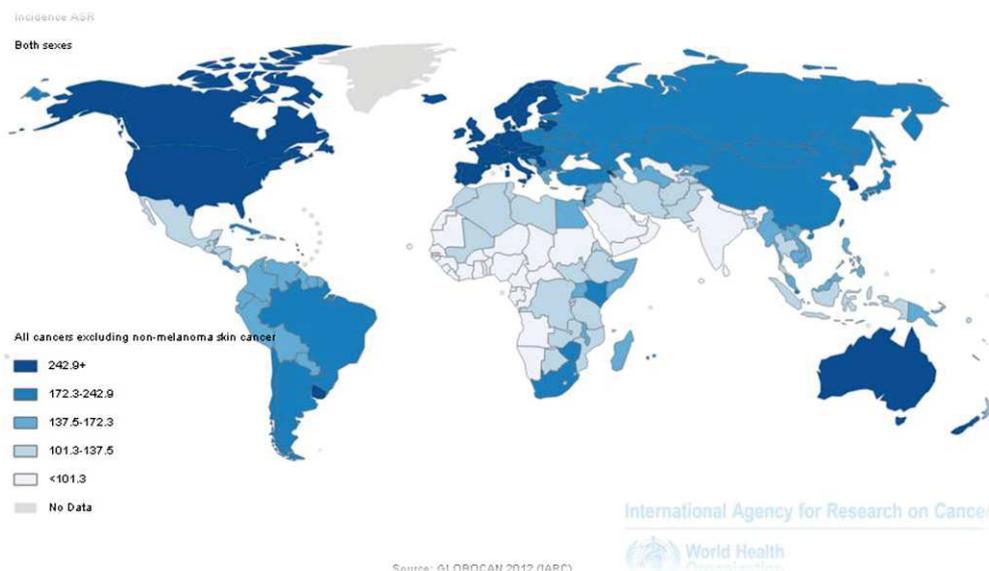


Figure 2 : Incidence du cancer dans le monde en 2012

¹ a) Luc Bodin ; *Cancer, volume 1, Causes physiques et psychiques – Formation et développement* ; éditions ARKHANA VOX, **2005**

b) Luc Bodin ; *Cancer, volume 2, Du diagnostique à l'annonce du cancer – Bilan et suivi du cancer* ; éditions ARKHANA VOX, **2006**

c) Louise Harel ; *Les origine du cancer ; Que sais-je ?* ; édition puf, **2001**

d) Fondation ARC pour la recherche sur le cancer ; *Les révolutions de la recherche sur le cancer* ; **2014**

² <http://globocan.iarc.fr>, consulté en Novembre 2015

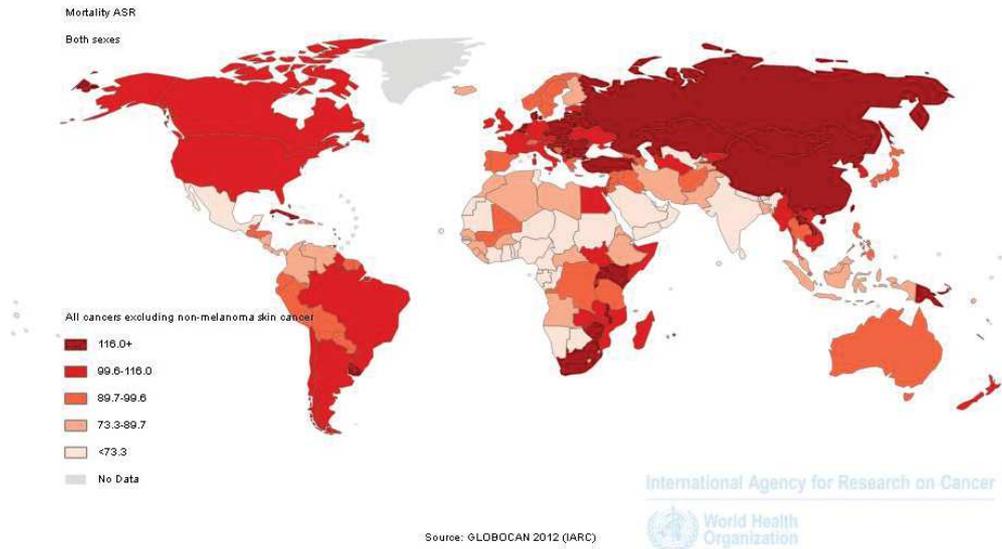


Figure 3 : Mortalité du cancer dans le monde en 2012

A l'échelle mondiale, en 2012, il y a eu 14 090 149 nouveaux cas de cancer répertoriés (Figure 4, A). Comparé à la population mondiale, ce chiffre paraît presque dérisoire (premier disque). Mais il s'agit bien là seulement des nouveaux cas. En effet, cette année là, on comptait déjà plus de 32 000 000 cas de cancer déclarés durant les cinq années précédentes. Les principaux types de cancer détectés sont ceux du poumon, du sein, du colon, de la prostate et enfin de l'estomac. Ils représentent à eux cinq environ 50 % des cancers (Figure 4, D).

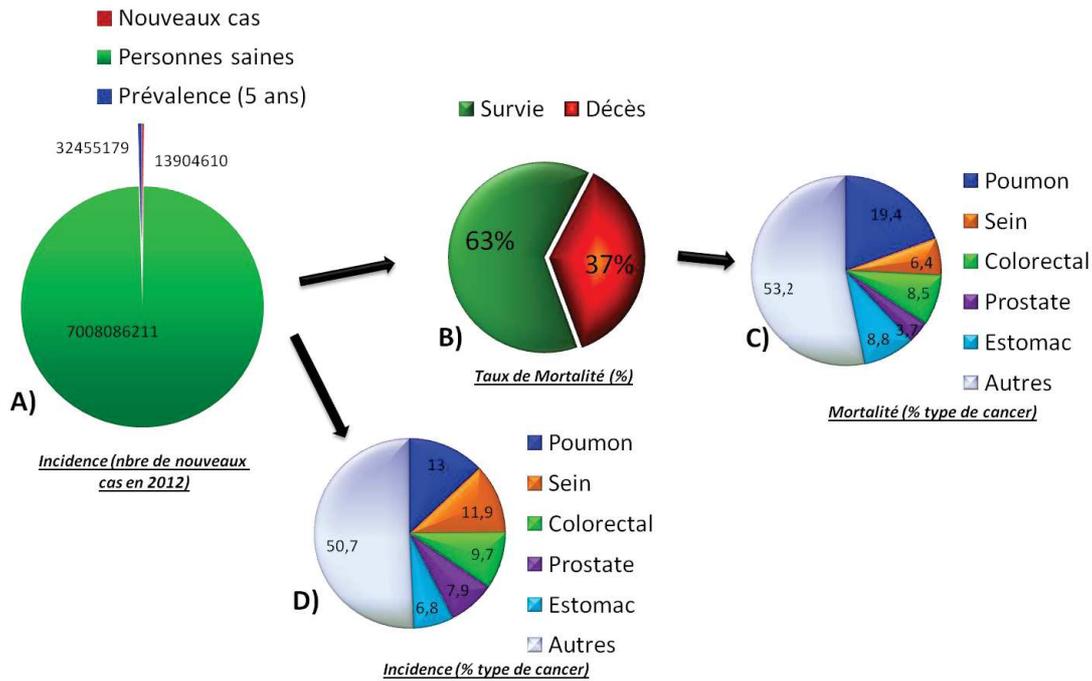


Figure 4 : Incidence et mortalité mondiale en 2012 pour différents cancers

D'autre part, en 2012, le taux de mortalité dû au cancer a été de 37%, chiffre qui est relativement stabilisé aujourd'hui (Figure 4, B). Parmi ces décès, nous pouvons constater que les cancers les plus meurtriers sont les mêmes que cités ci-dessus, représentant presque 50% des cas (Figure 4, C).

Malgré les récents progrès effectués en cancérologie, cette pathologie demeure une priorité en santé publique, tant sur le plan du développement de nouveaux agents de chimiothérapie que sur le plan de l'accès aux soins et de la réduction de l'exposition aux facteurs mutagènes. Mais alors qu'est ce que le cancer ? Quels éléments font que cette maladie reste difficile à combattre ? Comment les tumeurs apparaissent-elles ? Des éléments de réponse vont être apportés dans ce chapitre.

b. Définition du cancer

Etymologiquement, le mot « cancer » est à l'origine un mot latin qui signifie « crabe ». Cela viendrait de la première vision d'une tumeur cancéreuse du sein, avec une forme envahissante qui s'infiltrait et détruisait tout ce qui tombait entre ses « pinces ». Cependant il n'existe pas « un » cancer mais une multitude de cancers. La classification des cancers a été établie suivant le type de cellules, de tissus ou de l'organe affecté au départ.

Quatre grandes familles peuvent être définies :

- Les carcinomes : type de cancer le plus fréquent (85%). Ils concernent les tissus minces (formés d'une ou plusieurs couches de cellules jointives), ou tissus épithéliaux.
- Les sarcomes : type de cancer rare (moins de 1%). Ils concernent les tissus conjonctifs de soutien de la structure de l'organisme, qu'ils soient communs ou spécialisés (par exemple osseux, cartilagineux, musculaire, adipeux...).
- Les lymphomes : ils concernent le tissu hématopoïétique. Ils se développent à partir des cellules du système immunitaire, le plus souvent dans les ganglions lymphatiques.
- Les leucémies : elles concernent les tissus de la moelle osseuse responsable de la production des globules blancs.

Aujourd'hui, d'après le Dr Bodin, la définition du cancer serait : « Prolifération importante, anarchique et indéfinie de cellules anormales d'un tissu ou d'un organe qui ont la capacité d'envahir et de détruire les tissus sains et de se disséminer dans l'organisme et dont l'évolution spontanée est la mort de l'individu porteur »^{1a}.

En effet, la cellule cancéreuse acquiert la capacité de se diviser à l'infini, tout en évitant d'entrer dans le processus d'apoptose. Cela la rend immortelle et engendre une croissance anarchique des tumeurs. Hanahan et Weinberg résumant ainsi les caractéristiques des cellules cancéreuses³ (Figure 5):

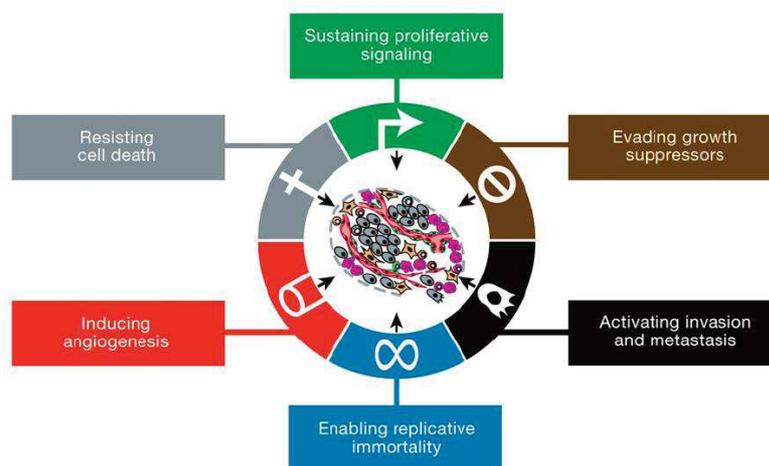


Figure 5 : Caractéristiques des cellules tumorales^{3b}

³ a) Hanahan D, Weinberg RA, *The Hallmarks of Cancer*; *Cell*; **2000**; 100; 57-70

b) Hanahan D, Weinberg RA, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*; *Cell*; **2011**; 144; 646-674

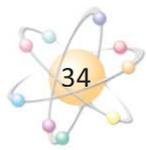


- Indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération. Les cellules normales ne se divisent que lorsqu'elles reçoivent un stimulus particulier. Les cellules tumorales n'ont plus besoin de ce signal.
- Insensibilité aux signaux inhibiteurs
- Abolition de l'apoptose (mort cellulaire programmée). En cas de stress ou d'anomalie ne pouvant être réparée, une cellule saine se « suicide ». Dans le cas des cellules tumorales, tous ces mécanismes sont inactivés.
- Capacité proliférative illimitée. En effet, accrochée au bout de chaque chromosome, se trouve une partie d'ADN appelée télomère. A chaque dédoublement d'ADN (et donc de doublement cellulaire), ce télomère se raccourcit et la multiplication cellulaire s'arrête après un certain nombre de divisions, quand le télomère devient trop court. Toutefois, dans la cellule cancéreuse, une enzyme appelée télomérase est capable de régénérer le télomère, qui reste donc plus long, permettant ainsi une multiplication cellulaire infinie.
- Capacité de susciter l'angiogenèse. Les cellules tumorales ont un besoin important en oxygène et nutriments pour survivre. Elles vont donc stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin de vasculariser la tumeur.
- Acquisition d'un pouvoir invasif via les métastases. Les cellules tumorales ont la capacité de migrer via les vaisseaux sanguins afin d'être transportées dans un autre organe où elles vont générer une seconde tumeur.

La question qui se pose maintenant est de savoir par quels mécanismes une cellule saine en arrive à devenir cancéreuse et à posséder toutes les caractéristiques qui font d'elle une cellule maligne.

c. La cancérogénèse

Comme précisé ci-dessus, le nombre de divisions cellulaires d'une cellule est limité. Cependant, il y a dans notre corps des milliards de divisions cellulaires. Parmi toutes ces divisions, il paraît normal que certaines se déroulent anormalement et donnent naissance à des anomalies. De plus, des facteurs externes peuvent perturber la cellule au moment de sa division, favorisant ainsi la formation de cellules anormales. Pour comprendre que le risque de cancer de chaque individu peut être élevé, nous pouvons faire un petit calcul. Nous sommes formés d'environ 10 000 000 000 000 de cellules. Cela implique que nous aurons 10 000 000 000 000 000 divisions cellulaires au cours de notre vie. Sachant qu'à chaque division, il y a un risque de 1/1 000 000 qu'un gène subisse une



mutation, cela donne 10 000 000 000 risques de mutation au cours de la vie. Devant ce risque assez élevé de mutation, on peut plus aisément comprendre pourquoi le cancer touche un grand nombre de personnes. Cependant, la nature nous a donné la possibilité de remédier à cela puisqu'il existe, au sein de la cellule, des mécanismes permettant la réparation des mutations. Si la mutation est trop grave pour être réparée, la cellule lance son programme de suicide : l'apoptose. Dans le cas où la cellule ne réagit pas au signal d'apoptose, le corps envoie des globules blancs pour l'éliminer : la nécrose. Dans les cas où ces mécanismes de réparation et de destruction ne se mettent pas en route ou bien que la cellule n'y est plus sensible, celle-ci va se dupliquer en présence de sa mutation et possiblement engendrer la naissance d'un cancer.

Nous allons maintenant aborder la formation de la première cellule cancéreuse, ou cellule maligne.

Avant d'expliquer les différentes étapes de cancérisation, voici deux définitions à propos des gènes :

- Les oncogènes : comme leur nom l'indique, ce sont des gènes qui vont favoriser la formation des tumeurs. A l'état normal, ils influent positivement sur la croissance et la division cellulaire. Ils sont alors appelés proto-oncogènes. Lorsqu'ils sont mutés, ils deviennent des oncogènes et c'est une surexpression de ces gènes qui est préjudiciable pour l'organisme.
- Les suppresseurs de tumeur : ce sont des gènes qui contribuent au « non-développement » des cellules cancéreuses. En effet, ces gènes sont impliqués dans le processus d'apoptose de la cellule.

Schématiquement, la cellule saine va suivre ce processus :

- 1- Formation de proto-oncogènes, sous l'influence de facteurs externes mutagènes (sauf si déjà existant dans les cas héréditaires).
- 2- Activation anormale des proto-oncogènes en oncogènes qui vont entraîner la stimulation des processus de cancérisation et de prolifération.
- 3- Inactivation des gènes chargés de réparer les mutations.
- 4- Inactivation des gènes suppresseurs de tumeur, empêchant l'apoptose de la cellule.
- 5- Dysfonctionnement dans la division cellulaire entraînant une mauvaise répartition des chromosomes lors de la mitose conduisant à des anomalies cellulaires supplémentaires de type polyploïdie.

Le schéma suivant reprend les différentes étapes formant les premières cellules cancéreuses (Schéma 2). Il est clairement visible qu'une cellule saine doit subir un certain nombre de mutations avant d'arriver au stade cancéreux, mais qu'une fois le processus initié, il est difficile de le stopper.

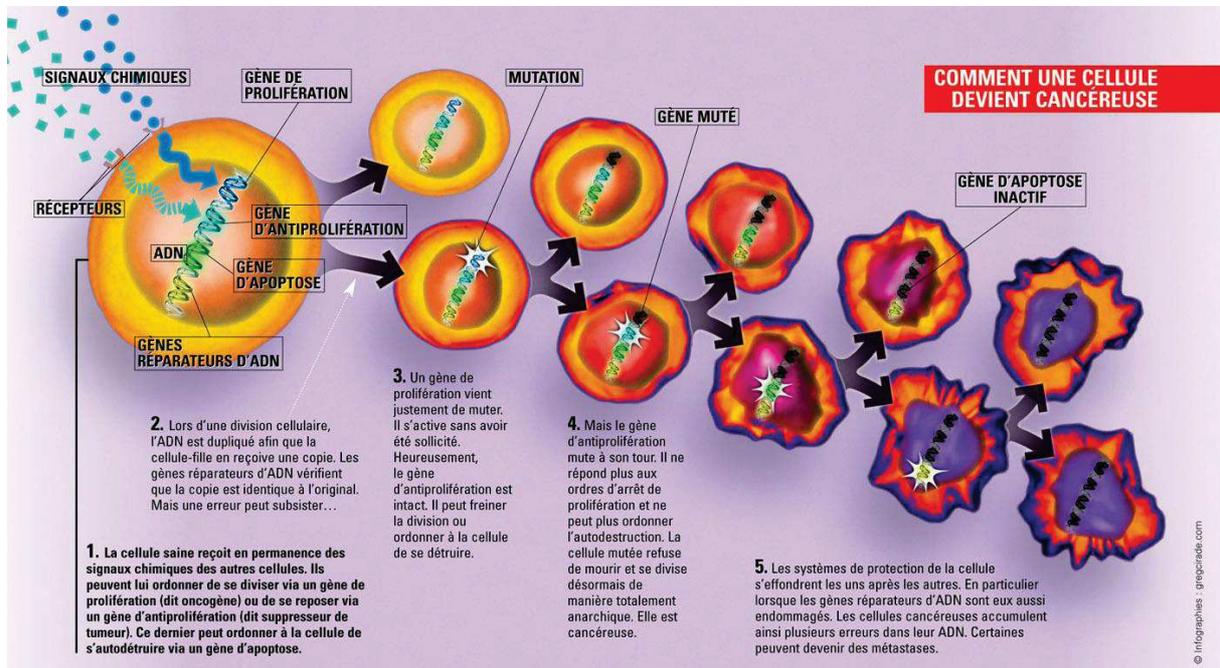


Schéma 2 : Formation d'une cellule cancéreuse⁴

Le danger réside dans la survie de cette cellule maligne qui va se multiplier de manière anarchique en entraînant de nouvelles mutations non réparées et formant par la suite les tumeurs et métastases. Ce processus pourrait s'apparenter à un « cercle vicieux » (Figure 6, A). Il faudrait peut-être une dizaine de mutations successives pour former une cellule cancéreuse, le nombre exact n'est pas connu. Cela explique pourquoi les risques d'avoir un cancer sont plus élevés chez les personnes âgées. En effet, le risque d'accumuler suffisamment de mutations accroît avec l'âge. Ces mutations peuvent être induites par des facteurs externes mutagènes tels que le tabac, l'alimentation, la pollution, des virus, des médicaments, des polluants, etc... Cependant le processus de mutation peut être accéléré par des facteurs héréditaires. Par exemple, s'il faut une dizaine de mutations pour former une cellule cancéreuse, l'hérédité, ayant entraîné déjà trois mutations dans le cas présent, il ne faudra plus que 7 mutations provoquées par des facteurs externes pour induire la formation d'une cellule cancéreuse (Figure 6, B).

⁴ <http://tpe-cancerogenese.blogspot.fr/>; consulté en Janvier 2016

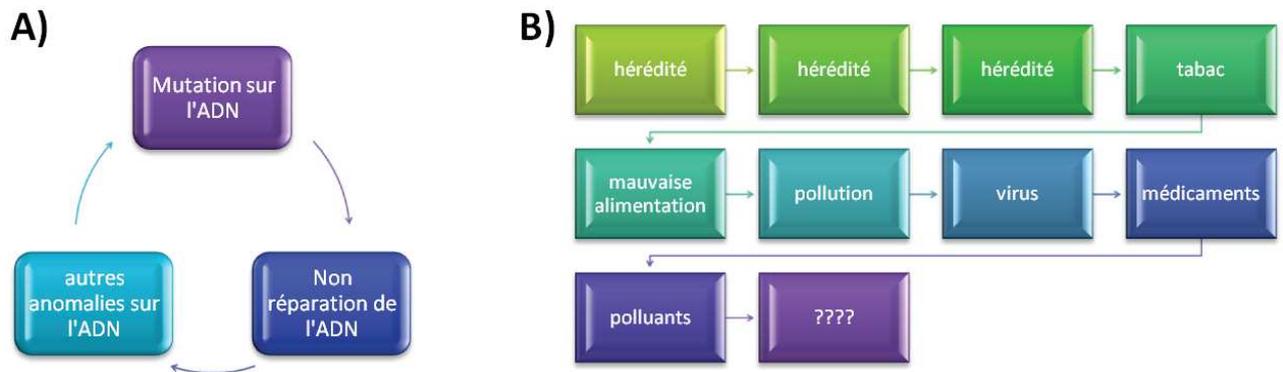


Figure 6 : Processus pouvant mener à l'apparition de cellules cancéreuses

Il faut noter que dans les tumeurs, il n’y a pas que des cellules cancéreuses. En effet, des cellules saines jouent un rôle important dans différents processus cancéreux tels que le développement de la vascularisation de la tumeur (néo-vascularisation) mais aussi la dissémination des cellules cancéreuses (métastase) :

- La néo-vascularisation : les cellules cancéreuses vont sécréter des facteurs « pro-angiogéniques » type VEGF favorisant la vascularisation. Ces facteurs vont stimuler les cellules endothéliales (cellules des vaisseaux sanguins) qui vont construire de nouveaux vaisseaux. Cela va permettre une vascularisation de la tumeur permettant donc l’apport en oxygène et en nutriments.
- La métastase : les fibroblastes (dans le tissu conjonctif entourant les cellules) vont provoquer l’activation d’enzymes protéolytiques (de type MMP pour Matrix MetalloProteinase) qui détruisent les tissus autour de la cellule. Cela va engendrer une perte d’adhésion des cellules cancéreuses. Ces enzymes sont donc nécessaires au processus de métastase, mais aussi pour la migration des cellules endothéliales lors de la néo-vascularisation. Cependant, pour qu’une métastase se forme, il est nécessaire d’avoir un défaut de sécrétion de protéines d’adhésion qui forment les connexions inter-cellulaires.

Pendant que les cellules saines vont participer au développement de la tumeur, les cellules cancéreuses vont évoluer. On pourra notamment voir :

- Une morphologie des cellules plus grosse et plus ronde. Comme précisé plus haut, celles-ci vont posséder un nombre anormal de chromosomes.



- Une polarisation inversée de la membrane cellulaire.
- Une activation de la télomérase, qui va conférer son immortalité à la cellule.
- Une prolifération possible en présence d'une faible quantité de facteur de croissance.
- Une dédifférenciation progressive de la cellule. Elle va perdre ses caractéristiques de l'organe source pour prendre un aspect de cellule totipotente, à l'image des cellules embryonnaires.

Tous les éléments que nous venons de voir vont conduire à la prolifération et la dissémination tumorale. Localement, la tumeur (appelée tumeur primitive) va grossir puis envahir les autres tissus de l'organe, formant ainsi de nouveaux foyers cancéreux (tumeurs secondaires). Il va ensuite pouvoir atteindre la périphérie de l'organe, envahir ceux environnants voire même plus éloignés par le biais des métastases.

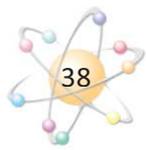
II) Les principales thérapies anticancéreuses et leurs cibles⁵

L'homme dispose aujourd'hui d'un arsenal thérapeutique assez diversifié pour combattre le cancer (chirurgie, cytotoxiques, radiothérapie,...). La prise en charge du patient est de plus en plus personnalisée. Ainsi, les traitements sont adaptés au type de cancer dont le patient est atteint, en prenant notamment en compte les mutations identifiées. La prise en charge d'un cancer fait appel à des protocoles complexes qui peuvent associer ou non différents types de traitements.

a. Chirurgie

La chirurgie a pour objectif de retirer la tumeur ou les métastases si elles sont peu nombreuses. C'est un traitement radical, qui va s'occuper de la tumeur macroscopique, à l'inverse de la chimiothérapie par exemple qui va s'occuper de la tumeur microscopique. De nos jours, la chirurgie a énormément progressé, notamment sur le fait qu'elle est moins mutilante et plus efficace qu'auparavant. Selon les types de tumeur, il peut même y avoir de la chirurgie réparatrice (notamment sur le visage). Souvent la chirurgie s'associe à des traitements de type radiothérapie et/ou chimiothérapie. Si ces traitements complémentaires sont réalisés avant la chirurgie, on parle

⁵ Thomas Tursz ; *La nouvelle médecine du cancer : histoire et espoir* ; édition Odile Jacob médecine ; 2013



de traitement néo-adjuvant. Ils ont pour but de réduire le volume de la tumeur pour faciliter son exérèse et rendre ainsi la chirurgie plus efficace et moins mutilante.

Enfin, la chirurgie peut permettre la pose de chambre pour les chimiothérapies ou encore la pose de matériel pour curiethérapie.

b. Radiothérapie

La radiothérapie est utilisée pour un traitement local du cancer. Le principe est d'irradier les cellules tumorales avec des rayons ionisants. Ces rayons vont entraîner la perte d'un électron ou d'un proton par les molécules touchées. La cible de ce type de traitement est l'ADN des cellules cancéreuses (Figure 7).

D'une part la radiothérapie va engendrer une cassure de la double hélice d'ADN, mais aussi une ionisation de l'eau contenue dans les cellules. L'eau ainsi ionisée va former des radicaux libres qui casseront à leur tour la double hélice de l'ADN. Ces altérations de l'ADN vont entraîner la mort de la cellule. Cependant la cellule cancéreuse, tout comme la cellule saine, possède des systèmes de réparation de l'ADN, ce qui laisse deux possibilités : 1) la cellule est réparée et survit ou 2) la cellule ne peut se réparer et elle mute ou meurt. Néanmoins la cellule cancéreuse possédant déjà beaucoup d'anomalies génétiques, elle sera moins apte à se réparer que les cellules saines. De plus, les cellules cancéreuses se divisent plus souvent que les cellules saines, les réparations des anomalies sur l'ADN n'ont pas le temps d'être réalisées. Cette différence de capacité à se réparer entre les cellules saines et les cellules cancéreuses explique l'intérêt de ce type de traitement.

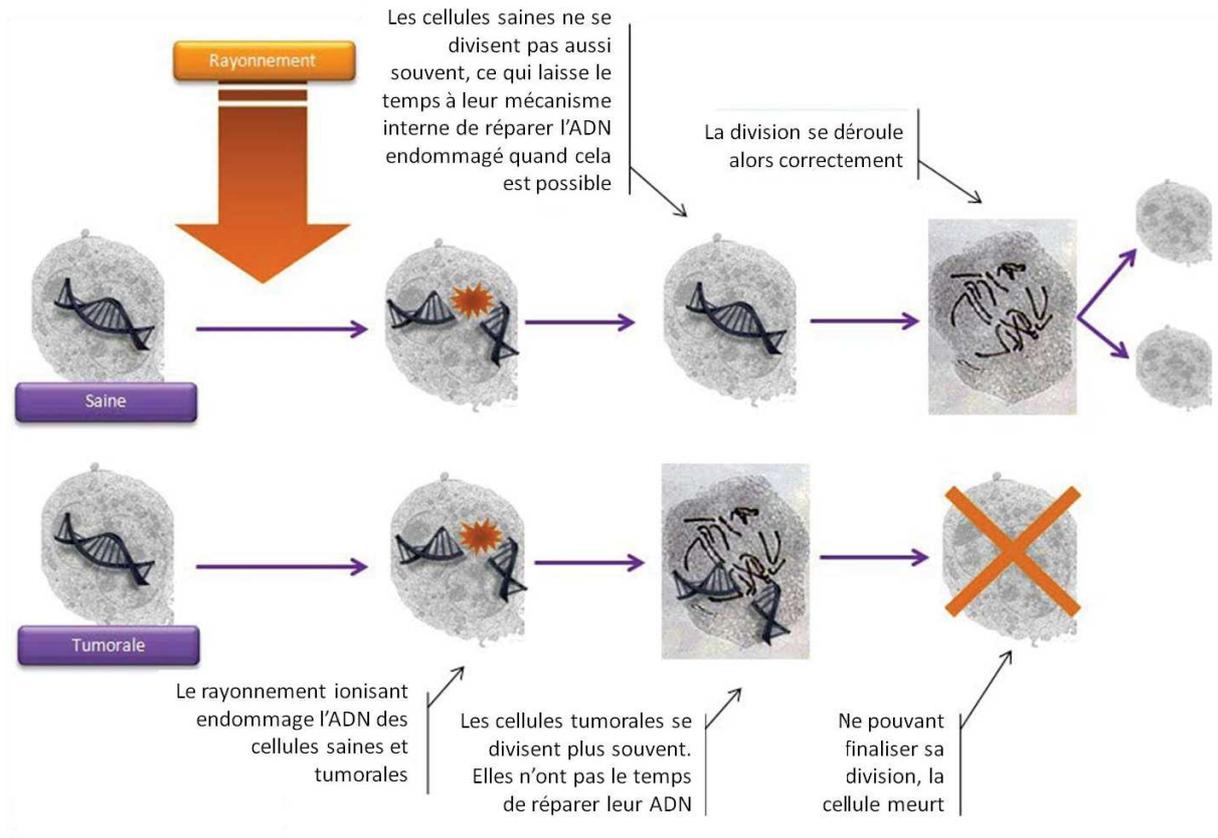


Figure 7 : Principe de la radiothérapie⁶

Il existe deux types de radiothérapie : la radiothérapie externe, et la radiothérapie interne (curiethérapie). La première utilise des irradiations par rayons X. La seconde met en place des sources radioactives directement autour ou à l'intérieur de la tumeur. Elle permet ainsi d'atteindre des doses d'irradiation importantes sans toucher aux organes sains du voisinage.

c. Immunothérapie

L'immunothérapie vise à remplacer, améliorer ou modifier les défenses naturelles du corps humain. Elle est fondée sur l'idée que le système immunitaire voit les cellules cancéreuses comme des corps étrangers et qu'il est donc susceptible de les éliminer. Pour cela plusieurs stratégies sont envisageables :

- L'immunothérapie dite « active ». Il s'agit ici de stimuler, sur le principe du vaccin, les défenses immunitaires du patient. Dans la pratique, le développement de vaccins thérapeutiques du cancer constitue encore une voie de recherche.

⁶ <http://carladrien.mercey.fr/tpe/introduction.html>; consulté en Janvier 2016

- L'immunothérapie dite « adoptive ». Elle consiste à greffer au patient des cellules destinées à agir contre les cellules cancéreuses. Cette stratégie n'a montré son utilité que dans certains cancers hématologiques.
- L'immunothérapie dite « passive ». Elle consiste à injecter dans l'organisme du patient des anticorps dirigés contre les cellules cancéreuses.

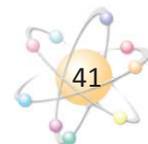
On l'utilise d'un point de vue préventif dans le cadre du cancer de la vessie (et de plus en plus de la plèvre et du col de l'utérus à un stade métastatique) pour réduire les risques de rechutes suite à une ablation par chirurgie. D'un point de vue curatif, l'immunothérapie consiste à injecter des activateurs du système immunitaire (anticorps, cytokines, interleukine-2, interférons produits par génie génétique ou petites molécules de la famille de la thalidomide) dans l'ensemble de l'organisme. Le traitement est général puisque le corps entier va en bénéficier. Le tableau suivant présente les types de cancers qui peuvent être ciblés selon le type d'activateur (Tableau 1)⁷.

Tableau 1 : Types de cancer ciblés selon le type d'activateur en immunothérapie

Type d'activateur	Type de cancer
Interférons	Tumeur du rein et de la peau à un stade avancé Myélomes Certains mélanomes malins Lymphomes Certains cancers de la moelle osseuse Certaines leucémies
Interleukine-2	Carcinomes rénaux Certains mélanomes
Anticorps monoclonaux (ex : trastuzumab)	Lymphomes Certains cancers du sein

L'immunothérapie est une méthode porteuse d'espoir. Néanmoins, de nombreux mécanismes restent inexpliqués. On ne sait pas par exemple pourquoi tous les patients ne réagissent pas positivement à cette technique. De plus, même si elle fonctionne, elle finit par générer des phénomènes de résistance difficiles à éviter. Au final, la durée de vie globale des patients n'est que faiblement augmentée alors que les effets indésirables sont très importants avec notamment :

⁷ <http://cancer.comprendrechoisir.com/comprendre/immunotherapie>; consulté en Janvier 2016



- des syndromes grippaux fréquents
- des nausées et des maux de ventre
- des troubles cutanés
- une importante rétention d'eau (notamment avec l'interleukine-2 qui est pourtant plus efficace que les interférons)
- des dépressions (notamment les interférons)
- une importante fatigue et une perte d'appétit et donc de poids
- des troubles thyroïdiens et hépatiques
- des troubles de la formule sanguine

De plus, une étude qui a été menée à l'Institut Gustave-Roussy indique que chez les 951 patients ayant participé à l'étude du Yervoy (molécule ipilimumab), le traitement a été si mal toléré que plus de 50 % des malades l'ont interrompu en raison d'effets indésirables et que cinq patients sont décédés.

d. Chimiothérapie⁸

La chimiothérapie est une des plus anciennes manières de lutter contre les tumeurs. Comme son nom l'indique, cette thérapie consiste à utiliser des composés chimiques (nommés antinéoplasiques) qui vont avoir pour rôle d'empêcher la prolifération des cellules cancéreuses. Il existe plusieurs types de composés antinéoplasiques :

i. Les inhibiteurs de topoisomérase I.

La topoisomérase I est une protéine nucléaire monomérique qui intervient dans les modifications de structure de l'ADN lors des processus d'élongation, de réparation, de réplication et de transcription. Elle est capable de modifier l'enroulement de l'ADN afin de permettre les processus de réplication en hydrolysant un brin d'ADN et en le reconstruisant après avoir fait le tour de l'autre brin. Durant son travail, la topoisomérase I forme avec l'ADN un complexe (Figure 8).

⁸ JC Soria, S Vignot, C Massard, O Mir ; *Cours de chimiothérapie antitumorale et traitement médical du cancer* ; édition John Libbey EUROTEXT, **2012**

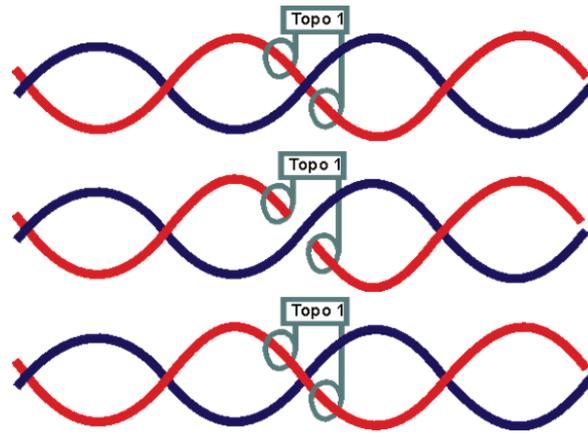


Figure 8 : Mécanisme des topoisomérases 1⁹

Afin d'inhiber cette enzyme, il existe deux principaux agents dérivés de la camptothécine (substance naturelle végétale) et qui possèdent la même base structurale (Figure 9) : l'irinotécan et le topotécan.

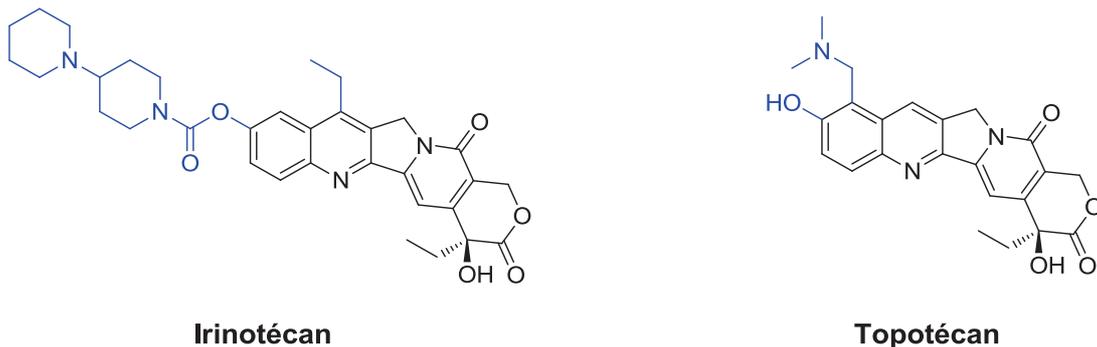


Figure 9 : Structure de l'Irinotécan et du Topotécan

Ces agents permettent le clivage du brin d'ADN, en bloquant le complexe formé par l'enzyme et son substrat, empêchant ainsi la phase de ligation du brin d'ADN. Ceci va donc interrompre la synthèse de l'ADN et entraîner la mort cellulaire (Figure 10).

⁹ http://www.oncoprof.net/Generale2000/g09_Chimiotherapie/g09_ct08.php; consulté en Janvier 2016

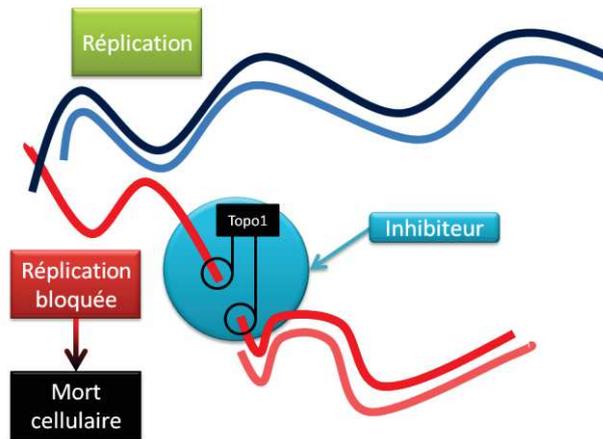


Figure 10 : Fonctionnement des inhibiteurs de Topo1

ii. Les inhibiteurs de topoisomérase II.

La topo-isomérase de type II se lie aux deux brins d'un segment d'ADN et permet le passage d'un autre segment au travers du premier, et à l'ADN de se désenrouler. Dans un premier temps l'enzyme se fixe sur un double brin d'ADN et commence à en cliver un brin puis l'autre et permet ainsi le passage d'un autre double brin d'ADN. Après le passage du second double brin, l'enzyme va « recoller » les brins qu'elle a clivés (Figure 11).

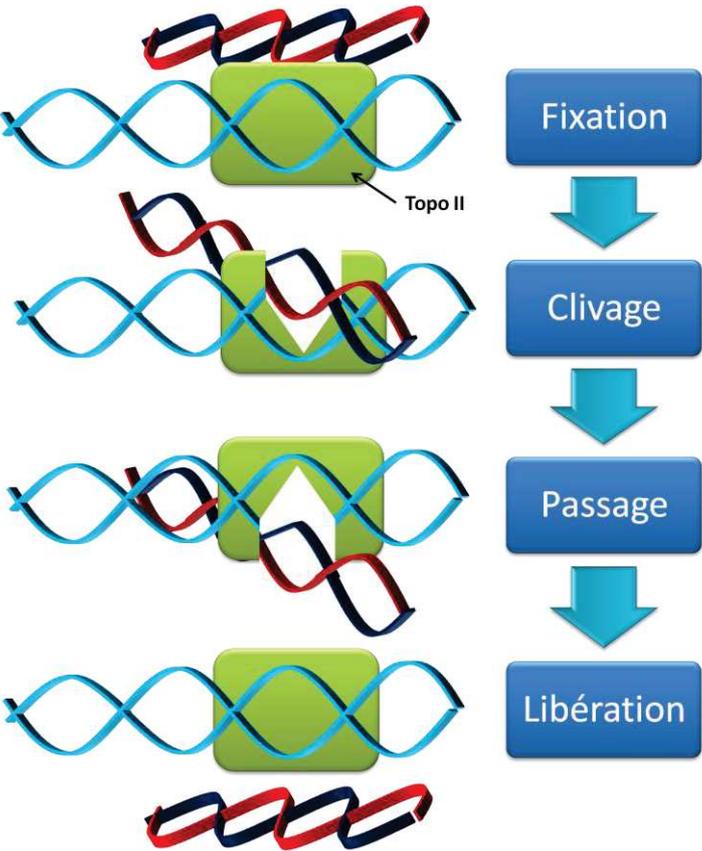


Figure 11 : Fonctionnement des topoisomérases II

Les inhibiteurs de Topoisomérase II vont avoir une action en s’intercalant entre les extrémités de brins d’ADN clivés mais aussi en inhibant l’enzyme. Ces médicaments permettent donc le passage du second double brin d’ADN mais empêchent les brins clivés de se lier. Ceci va alors entrainer la mort cellulaire (Figure 12).

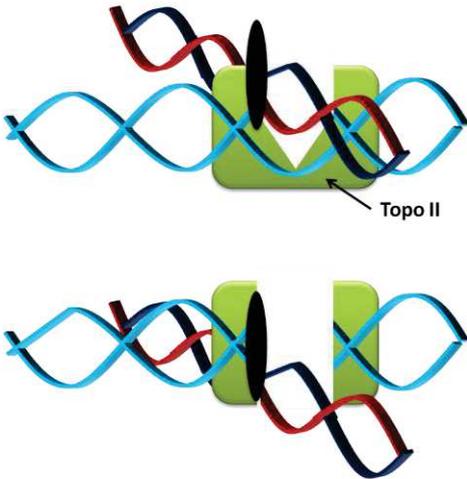


Figure 12 : Fonctionnement des inhibiteurs de topo II

Les composés les plus souvent utilisés sont des dérivés de la famille des anthracyclines dits « intercalants de l'ADN » (Doxorubicine, Daunorubicine, Epirubicines,...) ou encore des Epipodophyllotoxines (Etoposide, Téniposide) (Figure 13).

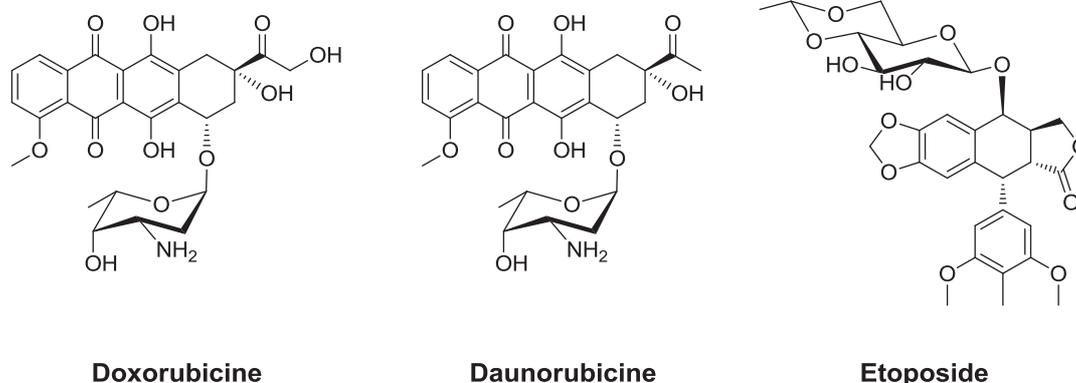


Figure 13 : Structure de la doxorubicine, de la daunorubicine et de l'étoposide

iii. Les agents alkylants.

Les agents alkylants sont capables de « greffer » un groupement hydrocarboné sur différents substrats. La plupart du temps les cibles des alkylations sont situées sur les guanines présentes sur les chaînes d'ADN. Ce faisant, la réplication est avortée et la cellule meurt.

Deux classes d'agents alkylants se distinguent : les monofonctionnels et les bifonctionnels. Les premiers vont être capables de greffer une chaîne sur un atome unique (Figure 14). Du fait de l'existence d'enzymes de réparation de l'ADN (ligase, endonucléase), ils peuvent ne pas entraîner un véritable avortement cellulaire, et au contraire, favoriser l'apparition d'ADN porteur de malformations, susceptibles de dégénérer secondairement en cancers chimio-induits. Dans cette famille de composés sont répertoriés les nitrosourées (fotémustine, streptozotocine) et les triazènes (procarbazine, dacarbazine, temozolomide).

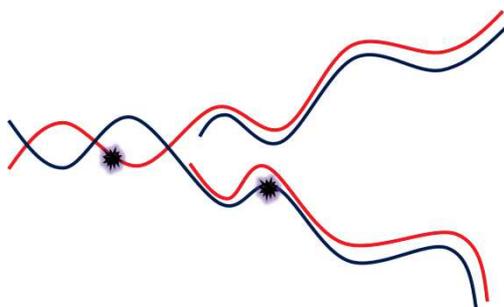


Figure 14 : Fonctionnement des agents alkylants monofonctionnels

Les agents alkylants bifonctionnels vont quant à eux pouvoir se fixer sur deux atomes différents et ainsi former des ponts (Figure 15 et Schéma 3). Il peut alors se former des ponts intracaténares (sur le même brin d'ADN) ou intercaténares (pont entre deux brins d'ADN). Ces liaisons sont plus difficiles à réparer que celles induites par les agents monofonctionnels. Ces agents bifonctionnels peuvent être des composés de type moutardes azotées (melphalan, caryolysine, oxazaphosphorine,...), alkyle sulfonates (busulfan, pipobroman), aziridines et époxydes (thiotépa, mitomycine) ou encore les tétrahydroisoquinolones (trabectédine).

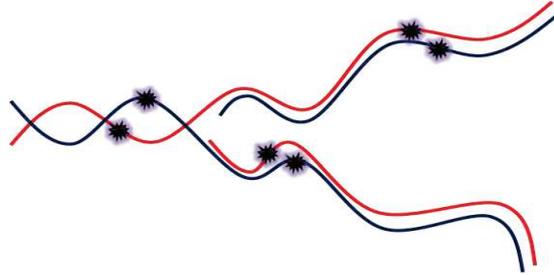


Figure 15 : Fonctionnement des agents alkylants bifonctionnels

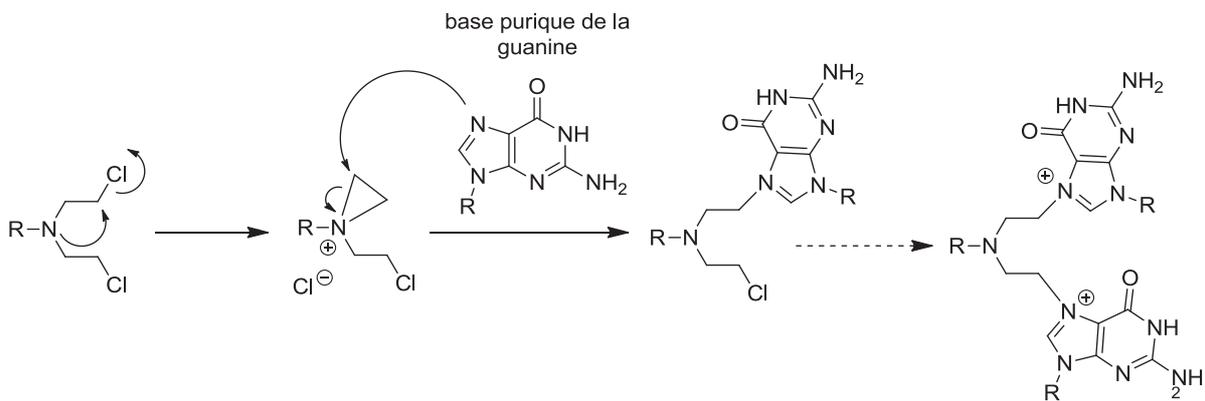


Schéma 3 : Mécanisme d'action d'une moutarde azotée

iv. Les antimétabolites.

Les antimétabolites sont une des classes les plus importantes en chimiothérapie. Ces composés agissent comme des inhibiteurs compétitifs sur les enzymes impliquées dans la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Deux classes d'antimétabolites sont distinguées : les antifolates et les leurres. Ce sont des dérivés nucléosidiques ou nucléotidiques à visées antipurique (fludarabine) et antypyrimidique (gemcitabine ou 5-fluorouracile)

Dans la classe des antifolates, le plus utilisé est le méthotrexate (MTX). Celui-ci inhibe la dihydrofolate réductase, responsable de la formation d'un dérivé de l'acide folique : le tétrahydrofolate (FH4). En temps normal, le FH4 est utilisé par la thymidilate synthétase pour former la dTMP (désoxythymidine monophosphate) à partir de la dUMP (désoxyuridine monophosphate). Cette dTMP est un désoxynucléotide et servira par la suite à la synthèse de l'ADN. Ainsi, en inhibant la conversion de FH2 (dihydrofolate) en FH4, le MTX empêche la formation de dTMP, étape indispensable à la synthèse d'ADN (Figure 16).

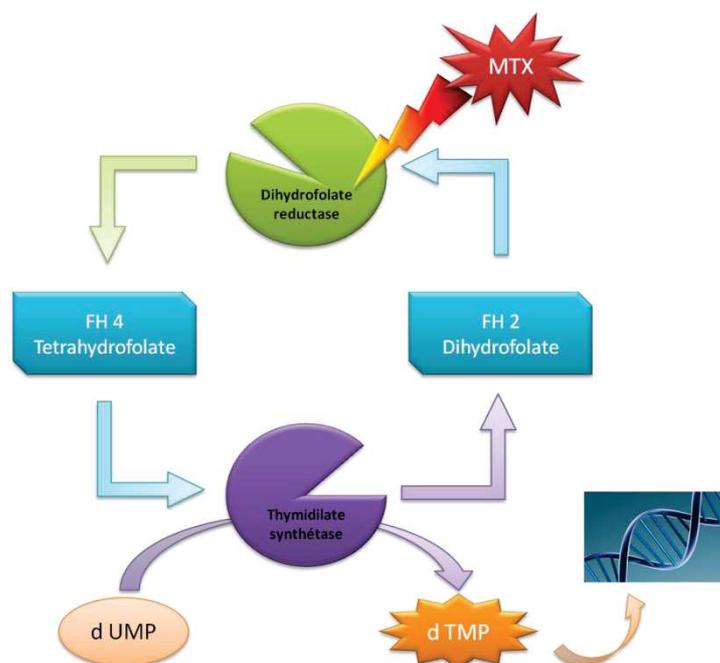


Figure 16 : Principe de l'action des antifolates

Les leurres, de leur côté, vont mimer les précurseurs des bases pyrimidiques et puriques. Ces analogues vont entraîner, après bioactivation (le plus souvent par phosphorylation), la perturbation d'enzymes indispensables à la réplication de l'ADN et l'ARN (Figure 17).

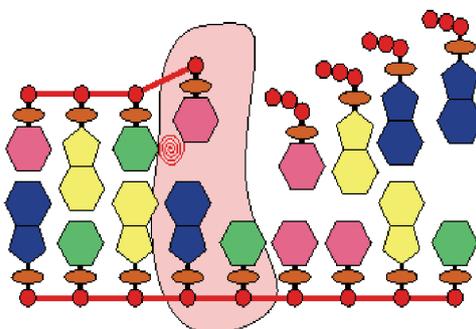


Figure 17 : Mécanisme d'action des leurres¹⁰

¹⁰ http://www.oncoprof.net/Generale2000/g09_Chimiotherapie/g09_ct04.php; consulté en Janvier 2016

Dans cette famille de composés, les antiprimidiques sont des mimes de la cytosine, de la thymine et de l'uracile. Les antipuriques sont quant à eux des mimes de la guanine et de l'adénine.

v. *Les poisons du fuseau mitotique*

Les cibles de ces médicaments sont les microtubules. Les microtubules sont des fibres constitutives du cytosquelette. Prenant leur origine au niveau du centrosome, les microtubules sont impliqués dans la formation de la plaque équatoriale et le déplacement polaire des chromosomes pendant la mitose (Figure 18).

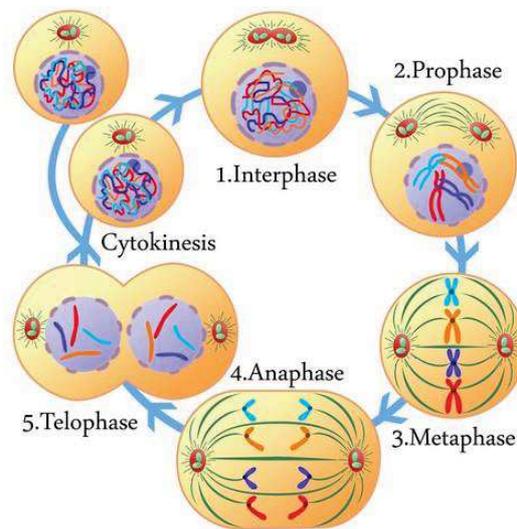


Figure 18 : Cycle de la mitose¹¹

Durant la division cellulaire, les tubulines vont se polymériser pour former des microtubules, mais aussi se dépolymériser. C'est cette dynamique et cet équilibre qui permet le déplacement des chromosomes et donc une bonne division cellulaire.

Les poisons du fuseau regroupent deux familles de produits : les vinca-alcaloïdes et les taxanes. Les premiers vont avoir pour rôle d'empêcher la polymérisation des tubulines en microtubules, et les seconds vont avoir un rôle inverse : empêcher la dépolymérisation. Ces derniers vont stabiliser la structure des microtubules. Dans les deux cas, cela va entraîner la mort cellulaire. En effet, à cause des vinca-alcaloïdes, les chromosomes ne pourront plus se déplacer, et les taxanes vont en quelque sorte figer le squelette de la cellule (Figure 19).

¹¹ <http://pixers.fr/stickers/mitose-et-cycle-cellulaire-12448856>; consulté en Janvier 2016

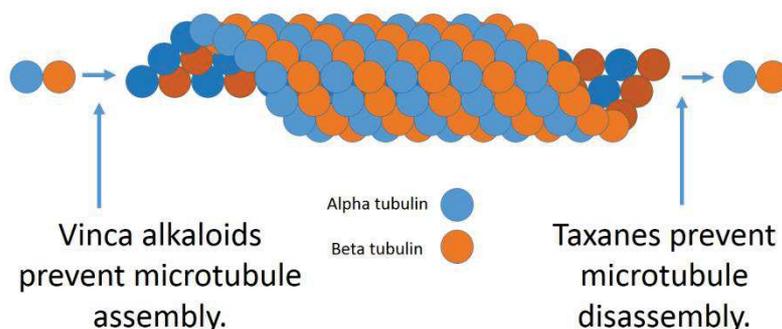


Figure 19 : Actions des Vinca alcaloïdes et des taxanes sur les microtubules¹²

vi. Les sels de platine

Les sels de platine ont un mode d'action similaire aux agents alkylants. En effet, ils vont former des ponts stables (liaison covalente) entre les deux chaînes de l'ADN ou deux bases de la même chaîne en se fixant sur les azotes N7 des guanines ou des adénines.

Le Cisplatine a été introduit dès 1970 mais il a vite montré de nombreux effets secondaires. Depuis, d'autres sels ont été mis en place tels que le Carboplatine ou l'Oxaliplatine (Figure 20).

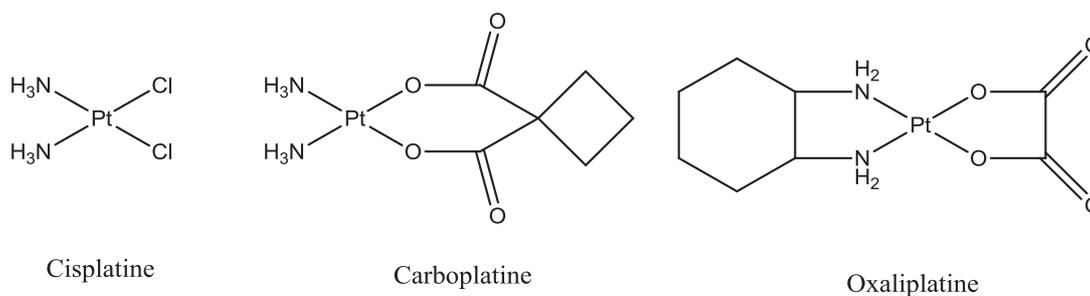
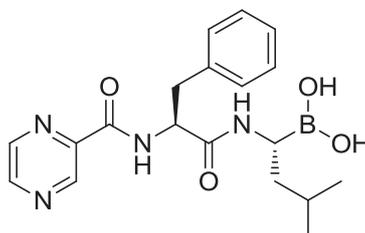


Figure 20 : Quelques sels de platine

Dans un premier temps les groupements partants (chlore ou esters) sont déplacés par l'eau, ce qui active le sel de platine. Cette nouvelle molécule est alors considérée comme électrophile et elle va donc pouvoir s'associer à une autre espèce, en particulier l'azote 7 de la guanine qui est considéré comme le site le plus nucléophile. Ainsi, une liaison covalente va pouvoir être créée (Schéma 4).

¹² <https://en.wikipedia.org/wiki/Chemotherapy>; consulté en Janvier 2016

Aujourd'hui, les inhibiteurs les plus étudiés actuellement sont les acides boroniques, tel que le bortezomib (Figure 24), qui bloquent l'activité catalytique du protéasome, aboutissant à une diminution de la dégradation des protéines régulant le cycle cellulaire. Ceci aboutit à la diminution de la multiplication des cellules tumorales et l'induction de l'apoptose.



Bortezomib

Figure 22 : Structure du bortezomib

e. Les conjugués anticorps-médicament

Les chimiothérapies classiques sont souvent accompagnées d'une toxicité systémique chez les patients. C'est pourquoi des composés ciblant les tumeurs ont été développés : les conjugués anticorps-médicament (ADC en anglais pour Antibody-Drug Conjugate). Ces conjugués sont constitués d'un anticorps permettant la reconnaissance de la tumeur via un marqueur spécifique, et d'un médicament (doxorubicine, MMAE (MonoMéthyle Auristatine E), etc...) rattaché à l'anticorps par un espaceur. Cet assemblage permet d'adresser un composé toxique uniquement à la cellule tumorale, limitant les effets secondaires.

Dans un premier temps l'anticorps (Y violet sur la Figure 23) du conjugué se lie à sa cible (en bleu), surexprimée à la surface de certaines cellules tumorales. Cette reconnaissance entraîne alors une internalisation par endocytose. Pendant la maturation de l'endosome en lysosome, les récepteurs sont recyclés et retournent à la membrane, tandis que le conjugué est hydrolysé. Le détachement de l'anticorps permet au médicament d'être libéré dans la cellule et de pouvoir jouer son rôle¹³.

¹³ a) L lamele, L Vecchia, C Scotti ; *Antibody-drug conjugates : targeted weapons against cancer* ; Antibody Technology Journal ; **2015** ; 5 ; 1-13.

b) A Thomas, BA Teicher, R Hassan ; *Antibody–drug conjugates for cancer therapy* ; Lancet Oncol. ; **2016** ; 17 ; e254-e262

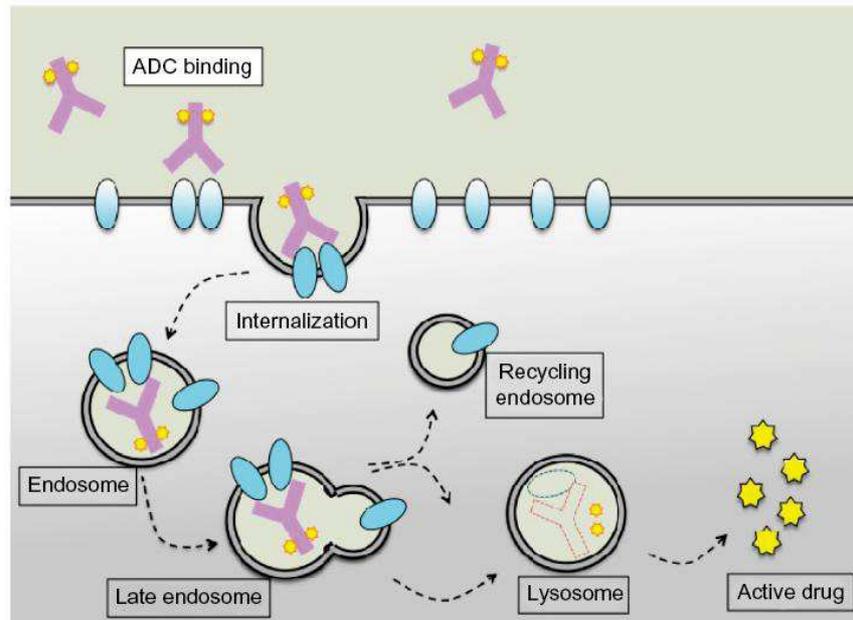


Figure 23 : Principe d'action des ADCs

Le principal conjugué développé aujourd’hui est le Brentuximab. Le brentuximab vedotin est composé d’un anticorps monoclonal anti-CD30 humain qui est lié par une liaison covalente à la monométhyl auristatine E (MMAE), un poison du fuseau (Figure 24). L’espaceur, constitué d’une valine et d’une citruline, est sensible aux cathepsines du lysosome et va donc être coupé après internalisation par voie endolysosomale. Le lien autoimmolable peut alors être éliminé par réaction intramoléculaire. La libération de l’agent antinéoplasique se traduit par l’apoptose des cellules tumorales exprimant l’antigène CD30.

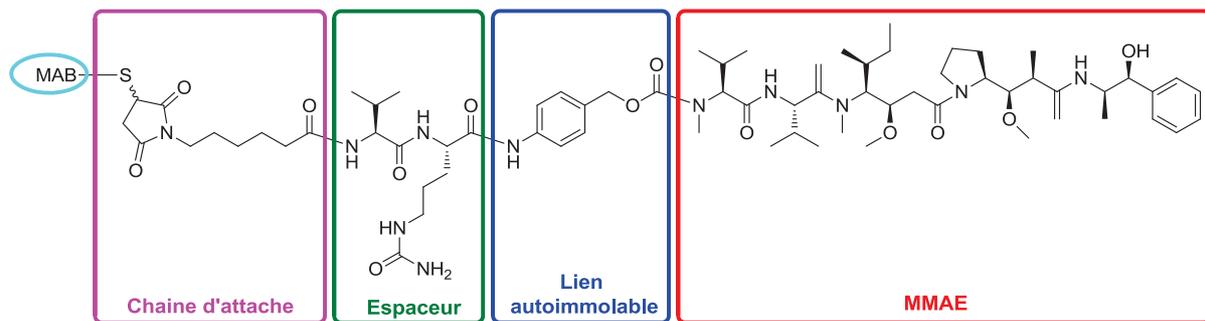


Figure 24 : Structure du brentuximab

Un second ADC a été développé à ce jour : le trastuzumab emtansine. Celui-ci contient un anticorps monoclonal humanisé recombinant conçu pour reconnaître et se fixer sur la protéine HER2, qui se trouve en grandes quantités à la surface de certaines cellules cancéreuses. En se fixant sur HER2, le trastuzumab active des cellules du système immunitaire, qui détruisent alors les cellules cancéreuses. Le trastuzumab empêche également HER2 de stimuler la croissance des cellules cancéreuses. Il est également constitué de DM1, qui est un inhibiteur de microtubules.



A l'heure actuelle, moins d'une vingtaine d'ADC sont en tests cliniques. Ces conjugués sont constitués de différents anticorps capables de reconnaître toute une variété de cibles (telles que CD22, CD33, ENPP3, Mésothéline, ...) et sont liés à des drogues telles que la MMAE, la MMAF, la doxorubicine, la pyrrolobenzodiazépine, et bien d'autres.

f. Les inhibiteurs d'angiogénèse¹⁴

L'angiogénèse est un processus clé dans le développement tumoral, aboutissant à la vascularisation des cellules cancéreuses. Ceci leur permet de recevoir l'oxygène et les nutriments qui leur sont nécessaires pour leur croissance. Ce phénomène fait intervenir à la fois les cellules tumorales, les cellules endothéliales, la matrice extracellulaire (MEC), mais aussi des facteurs pro- ou anti-angiogéniques.

Lors de ce processus, la cellule tumorale va sécréter des facteurs d'angiogénèse qui vont stimuler la croissance, la migration et la différenciation des cellules endothéliales. Les plus connus sont le FGF2 (Fibroblast Growth Factor), l'angiopoïétine-1, mais surtout le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) qui joue un rôle très important dans l'initiation de l'angiogénèse par fixation sur son récepteur VEGFR1. Ces facteurs vont activer les cellules endothéliales qui vont à leur tour synthétiser des facteurs de croissance (IGF1 (Insulin Growth Factor de type 1), PDGF (Platelet Derived Growth Factor) et IL6 (InterLeukine 6)).

L'ensemble de ce processus angiogénique est contrôlé par des inhibiteurs d'angiogénèse présents dans l'organisme tels que l'angiostatine, l'endostatine et la vasostatine. Dans la tumeur, le déséquilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques aboutit à une néovascularisation intensive responsable de la croissance tumorale et de l'apparition de métastases.

Aujourd'hui, de nombreuses équipes ont pu mettre au point des inhibiteurs capables d'agir à différentes étapes du processus d'angiogénèse. Ils peuvent bloquer la liaison des facteurs pro-angiogéniques à leurs récepteurs situés à la surface des cellules endothéliales, ils peuvent aussi empêcher la réponse des cellules endothéliales à ces facteurs, ou encore modifier les interactions entre les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire.

¹⁴ a) NS Vasudev, AR Reynolds ; *Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions* ; *Angiogenesis* ; **2014** ; 17 ; 471-494.

b) M Guyot ; *Les thérapies anti-angiogéniques : entre espoir et réalité. Vers l'identification de marqueurs prédictifs et de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer du rein* ; thèse soutenue en **2013**.

*i. Inhibiteurs de VEGF*

- Le bévacicumab (BVZ)

Le premier traitement anti-angiogénique à avoir été autorisé par la FDA (Food Drug Administration) a été le BVZ en 2004. Le BVZ est un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF-A. Il a pour effet d'inhiber la liaison du facteur de croissance à son récepteur et bloque ainsi l'activation des voies de signalisation en aval. Le premier essai de phase III publié démontrait une certaine efficacité de cet anticorps sur le cancer colorectal métastatique. Une combinaison de traitement chimiothérapeutique avec le BVZ a montré une augmentation de la survie sans progression (SSP, durée pendant laquelle la maladie ne s'aggrave pas après le traitement) de 4 mois, et une augmentation de la survie globale (SG, durée entre le traitement et le décès quel qu'en soit la cause) d'environ 5 mois par rapport à un traitement chimiothérapeutique sans BVZ¹⁵. En se basant sur ces résultats, l'anticorps a été approuvé pour le traitement du cancer colorectal métastatique s'il est combiné à de la chimiothérapie. Il a par la suite été utilisé sur d'autres types de cancers métastatiques (poumon, ovaire, ...).

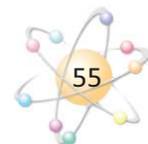
Cependant, il a montré des résultats bien moins prometteurs sur d'autres types de cancer, tels que le mélanome, les cancers du sein, du pancréas ou de la prostate. En 2005, l'étude en phase III AVF2119 a montré que l'addition de BVZ à la capécitabine n'augmentait pas la survie des patients atteints du cancer du sein métastatique (SSP ou SG)¹⁶. Cela étant, en 2007, l'étude en phase III E2100 a mis en évidence que l'ajout de BVZ à un traitement au paclitaxel du cancer du sein métastatique permettait d'augmenter la SSP de 6 mois mais pas la SG¹⁷. Se basant sur ces résultats, la FDA a autorisé l'utilisation de BVZ associé au paclitaxel pour traiter les cancers du sein métastatiques HER2-négatif. Trois études supplémentaires ont montré des résultats similaires, c'est-à-dire une augmentation de la SSP, mais pas de la SG¹⁸. En 2010, en conséquence, la FDA est revenue sur sa décision d'utiliser le BVZ dans ces conditions sur ces types de cancer.

¹⁵ H Hurwitz, L Fehrenbacher, W Novotny, T Cartwright, J Hainsworth, W Heim, J Berlin, A Baron, S Griffing, E Holmgren, N Ferrara, G Fyfe, B Rogers, R Ross, F Kabbinavar ; *Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer* ; N. Engl. J. Med. ; **2004** ; 350 ; 2335-2342.

¹⁶ KD Miller, LI Chap, FA Holmes, MA Cobleigh, P Kelly Marcom, L Fehrenbacher, M Dickler, BA Overmoyer, JD Reimann, AP Sing, V Langmuir, HS Rugo ; *Randomized Phase III Trial of Capecitabine Compared With Bevacizumab Plus Capecitabine in Patients With Previously Treated Metastatic Breast Cancer* ; J. Clin. Oncol. ; **2005** ; 23 ; 792-799.

¹⁷ K Miller, M Wang, J Gralow, M Dickler, M Cobleigh, EA Perez, T Shenkier, D Cella, NE Davidson ; *Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel Alone for Metastatic Breast Cancer* ; N. Engl. J. Med. ; **2007** ; 357 ; 2666-2676.

¹⁸ a) DW Miles, A Chan, LY Dirix, J Cortés, X Pivot, P Tomczak, T Delozier, J Hyuk Sohn, L Provencher, F Puglisi, N Harbeck, GG Steger, A Schneeweiss, AM Wardley, A Chlistalla, G Romieu ; *Phase III Study of Bevacizumab Plus*



Aujourd'hui, le BVZ est toujours utilisé dans le traitement du cancer colorectal métastatique en première et seconde intention. Il est indiqué dans le traitement du cancer du rein à cellules claires métastatiques¹⁹, dans le traitement de seconde ligne du glioblastome multiforme²⁰ et en première ligne dans le cancer du poumon de type NSCLC²¹.

De manière générale, le BVZ n'est pas efficace en monothérapie. En association avec une chimiothérapie, il augmente de façon significative la SSP. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une normalisation vasculaire par les anti-VEGFs. L'inhibition de la voie de signalisation du VEGF normalise les vaisseaux sanguins, ce qui facilite l'administration de la chimiothérapie au sein de la tumeur et augmente son efficacité²².

- L'aflibercept

L'aflibercept est une protéine de fusion contenant les domaines extracellulaires des récepteurs au VEGF. Il est ainsi capable de reconnaître les VEGF-A et -B et le PLGF (Placental Growth Factor). En ciblant VEGF-B et PLGF, qui sont aussi impliqués dans le processus d'angiogenèse et/ou de survie des nouveaux vaisseaux formés, l'aflibercept devrait avoir un effet anti-angiogénique plus important comparé au BVZ ne ciblant que le VEGF-A. Il a été récemment approuvé par la FDA pour traiter en seconde ligne le cancer colorectal, en étant associé à une chimiothérapie. Cette approbation se base sur des résultats obtenus lors d'une étude clinique de phase III qui a montré une

Docetaxel Compared With Placebo Plus Docetaxel for the First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer ; J. Clin. Oncol. ; **2010** ; 28 ; 3239-3247.

b) NJ Robert, V Diéras, J Glaspy, AM Brufsky, I Bondarenko, ON Lipatov, EA Perez, DA Yardley, SYT Chan, X Zhou, SC Phan, J O'Shaughnessy ; *RIBBON-1: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial of Chemotherapy With or Without Bevacizumab for First-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative, Locally Recurrent or Metastatic Breast Cancer* ; J. Clin. Oncol. ; **2011** ; 29 ; 1252-1260.

c) AM Brufsky, S Hurvitz, E Perez, R Swamy, V Valero, V O'Neill, HS Rugo ; *RIBBON-2: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase III Trial Evaluating the Efficacy and Safety of Bevacizumab in Combination With Chemotherapy for Second-Line Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Metastatic Breast Cancer* ; J. Clin. Oncol. ; **2011** ; 29 ; 4286-4293.

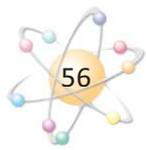
¹⁹ B Escudier, A Pluzanska, P Koralewski, A Ravaud, S Bracarda, C Szczylik, C Chevreau, M Filipek, B Melichar, E Bajetta, V Gorbunova, JO Bay, I Bodrogi, A Jagiello-Gruszfeld, N Moore ; *Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial* ; Lancet ; **2007** ; 370 ; 2103-2111.

²⁰ a) HS Friedman, MD Prados, PY Wen, T Mikkelsen, D Schiff, LE Abrey, WKA Yung, N Paleologos, MK Nicholas, R Jensen, J Vredenburgh, J Huang, M Zheng, T Cloughesy ; *Bevacizumab Alone and in Combination With Irinotecan in Recurrent Glioblastoma* ; J. Clin. Oncol. ; **2009** ; 27 ; 4733-4740.

b) TN Kreisl, L Kim, K Moore, P Duic, C Royce, I Stroud, N Garren, M Mackey, JA Butman, K Camphausen, J Park, PS Albert, HA Fine ; *Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma* ; J. Clin. Oncol. ; **2009** ; 27 ; 740-745.

²¹ A Sandler, R Herbst ; *Combining Targeted Agents: Blocking the Epidermal Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Pathways* ; Clin. Cancer Res. ; **2006** ; 12 ; 4421-4425.

²² RK Jain, DG Duda, JW Clark, JS Loeffler ; *Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer* ; Nat. Clin. Pract. Oncol. ; **2006** ; 3 ; 24-40.



augmentation de la SSP et de la SG des patients atteints d'un cancer colorectal²³. Cette protéine de fusion a été testée dans d'autres études cliniques de phase III. Elle n'a toutefois pas démontré d'avantage clinique dans le traitement du cancer du poumon de type NSCLC²⁴.

ii. *Les peptides RGD*

Le tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD) est un motif retrouvé sur de nombreuses protéines du plasma et de la matrice extracellulaire. Ce motif RGD joue un rôle important dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaire. Il permet aux protéines qui le contiennent de se lier à des récepteurs appelés intégrines. Ces intégrines sont impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la migration, la différenciation ou la survie. Elles jouent entre autre un rôle dans l'initiation et la progression de l'angiogénèse. C'est pourquoi des peptides comportant ce motif RGD ont été étudiés, afin d'inhiber l'interaction des intégrines avec leurs ligands, et par extension l'angiogénèse²⁵.

Un dérivé cyclique est particulièrement étudié, le cRGDfV. C'est un composé cyclique constitué de 4 acides aminés en série L (Arg, Gly, Asp et Val) et d'un acide aminé en série D (D-Phe). Il est sélectif des intégrines α_v qui jouent un rôle dans l'angiogénèse. Ce composé est plus connu sous le nom de Cilengitide et est soumis à des études cliniques pour traiter les glioblastomes. Ainsi, une étude préclinique a pu montrer que le Cilengitide était capable d'engendrer une régression efficace de la tumeur²⁶. Des études en phase II ont démontré que le Cilengitide pourrait potentiellement être utilisé en monothérapie chez les patients atteints de glioblastome récurrent²⁷. Dans une étude sur

²³ E Van Cutsem, J Tabernero, R Lakomy, HPrenen, J Prausova, T Macarulla, P Ruff, GA van Hazel, V Moiseyenko, D Ferry, J McKendrick, J Polikoff, A Tellier, R Castan, C Allegra ; *Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated With an Oxaliplatin-Based Regimen* ; J. Clin. Oncol. ; **2012** ; 30 ; 3499-3506.

²⁴ R Ramlau, V Gorbunova, TE Ciuleanu, S Novello, M Ozguroglu, T Goksel, C Baldotto, J Bennouna, FA Shepherd, S Le-Guennec, A Rey, V Miller, N Thatcher, G Scagliotti ; *Aflibercept and Docetaxel Versus Docetaxel Alone After Platinum Failure in Patients With Advanced or Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Controlled Phase III Trial* ; J. Clin. Oncol. ; **2012** ; 30 ; 3640-3647.

²⁵ F Wang, L Yuanyuan, S Yingqiang, W Anming, W Shuling, X Tian ; *The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering* ; Int. J. Mol. Sci. ; **2013** ; 14 ; 13447-13462.

²⁶ L Oliveira-Ferrer, J Hauschild, W Fiedler, C Bokemeyer, J Nippgen, I Celik, G Schuch ; *Cilengitide induces cellular detachment and apoptosis in endothelial and glioma cells mediated by inhibition of FAK/src/AKT pathway* ; J. Exp. Clin. Cancer Res. ; **2008** ; 27 ; 86.

²⁷ DA Reardon, KL Fink, T Mikkelsen, TF Cloughesy, A O'Neill, S Plotkin, M Glantz, P Ravin, JJ Raizer, KM Rich et al ; *Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme* ; J. Clin. Oncol. ; **2008** ; 26 ; 5610-5617.



des rats xénogreffés, le Cilengitide s'est montré capable de potentialiser les effets cytotoxiques d'un traitement par rayonnement lorsqu'il est administré avant ce traitement²⁸.

iii. *Inhiber l'activité tyrosine kinase*

Un autre moyen de bloquer l'angiogénèse tumorale peut être de cibler directement l'activité tyrosine kinase des récepteurs au VEGF. Les inhibiteurs utilisés sont des petites molécules mimes de l'ATP. Elles diffusent librement dans les cellules et entrent en compétition avec l'ATP pour la fixation au domaine intracellulaire des récepteurs. Cette compétition inhibe l'activation des voies de signalisation en aval des récepteurs cibles. Un grand nombre d'anti-angiogéniques de ce type ont été développés. Ils suivent tous le même mécanisme d'action, mais les récepteurs cibles, les caractéristiques pharmacocinétiques et les effets secondaires diffèrent d'un inhibiteur à l'autre. Voici une liste des principaux TKIs (Tyrosine Kinase Inhibitors) :

- Le sunitinib

Le sunitinib cible une large gamme de récepteurs, dont ceux du VEGF, du PDGF, ainsi que les récepteurs c-KIT, CSF-1R, FLT-3 et RET. Ce TKI est utilisé en deuxième intention dans le traitement des GIST (Gastro-Intestinal Stromal Tumors) résistant au Glivec (traitement de référence). Dans une étude de phase III, le sunitinib augmente la SSP d'environ 5 mois par rapport aux patients non traités mais n'augmente pas la SG²⁹. Dans plusieurs autres études, le sunitinib augmente de façon significative le taux de réponse, la SSP et la SG des patients atteint d'un cancer rénal par rapport au traitement de référence³⁰. Enfin, le sunitinib est

²⁸ T Mikkelsen, C Brodie, S Finniss, ME Berens, JL Rennert, K Nelson, N Lemke, SL Brown, D Hahn, B Neuteboom et al ; *Radiation sensitization of glioblastoma by cilengitide has unanticipated schedule-dependency* ; Int. J. Cancer ; **2009** ; 124 ; 2719-2727.

²⁹ MC Heinrich, RG Maki, CL Corless, CR Antonescu, A Harlow, D Griffith, A Town, A McKinley, WB Ou, JA Fletcher, CDM Fletcher, X Huang, DP Cohen, CM Baum, GD Demetri ; *Primary and Secondary Kinase Genotypes Correlate With the Biological and Clinical Activity of Sunitinib in Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor* ; J. Clin. Oncol. ; **2008** ; 26 ; 5352-5359.

³⁰ a) B Escudier, J Roigas, S Gillessen, U Harmenberg, S Srinivas, SF Mulder, G Fountzilas, C Peschel, P Flodgren, E Chow Maneval, I Chen, NJ Vogelzang ; *Phase II Study of Sunitinib Administered in a Continuous Once-Daily Dosing Regimen in Patients With Cytokine- Refractory Metastatic Renal Cell Carcinoma* ; J. Clin. Oncol. ; **2009** ; 27 ; 4068-4075.

b) RJ Motzer, G Hudes, G Wilding, LH Schwartz, S Hariharan, S Kempin, R Fayyad, RA Figlin ; *Phase I Trial of Sunitinib Malate plus Interferon- α for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma* ; Clinical Genitourinary Cancer ; **2009** ; 7 ; 28-33.

c) RJ Motzer, TE Hutson, P Tomczak, MD Michaelson, RM Bukowski, O Rixe, S Oudard, S Negrier, C Szczylik, ST Kim, I Chen, PW Bycott, CM Baum, RA Figlin ; *Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma* ; New Eng. J. Med. ; **2007** ; 356 ; 115-124.

utilisé pour traiter les tumeurs métastatiques neuroendocrines du pancréas qui ne peuvent pas être éliminées par chirurgie³¹.

- Le sorafenib

Le sorafenib cible les mêmes récepteurs que le sunitinib, ainsi que les kinases B-Raf et c-RAF. L'utilisation de ce TKI est indiquée dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires avancés³² et en deuxième ligne dans le traitement des cancers du rein métastatiques³³. Pour ces derniers, le bénéfice est plus limité et sans réel avantage puisque le sorafenib ne permet d'accroître que la SSP (de presque 3 mois), et pas vraiment la SG. Des études sur le mélanome cherchant à montrer un éventuel bénéfice apporté par l'ajout de sorafenib à une chimiothérapie ont montré l'inverse, c'est-à-dire que le TKI et la chimiothérapie pris séparément étaient plus efficaces³⁴. Ce composé est progressivement éliminé au profit de nouvelles molécules.

- Le pazopanib et l'axitinib

Le pazopanib et l'axitinib sont un peu plus spécifiques que les deux précédents. En effet, ils ne ciblent que les récepteurs du VEGF, du PDGF et le récepteur c-Kit. Ils permettent d'observer une augmentation de la SSP chez des patients atteints du cancer du rein. De plus, l'axitinib apparaît comme étant meilleur que le sorafenib³⁵.

³¹ E Raymond, L Dahan, JL Raoul, YJ Bang, I Borbath, C Lombard-Bohas, J Valle, P Metrakos, D Smith, A Vinik, JS Chen, D Hörsch, P Hammel, B Wiedenmann, E Van Cutsem, S Patyna, D Ray Lu, C Blanckmeister, R Chao, P Ruszniewski ; *Sunitinib Malate for the Treatment of Pancreatic Neuroendocrine Tumors* ; New Eng. J. Med. ; **2011** ; 364 ; 501-513.

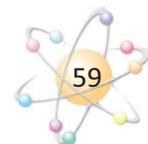
³² JM Llovet, S Ricci, V Mazzaferro, P Hilgard, E Gane, JF Blanc, A Cosme de Oliveira, A Santoro, JL Raoul, A Forner, M Schwartz, C Porta, S Zeuzem, L Bolondi, TF Greten, PR Galle, JF Seitz, I Borbath, D Häussinger, T Giannaris, M Shan, M Moscovici, D Voliotis, J Bruix ; *Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma* ; New Eng. J. Med. ; **2008** ; 359 ; 378-390.

³³ a) T Eisen, S Oudard, C Szczylik, G Gravis, H Heinzer, R Middleton, F Cihon, S Anderson, S Shah, R Bukowski, B Escudier ; *Sorafenib for Older Patients With Renal Cell Carcinoma: Subset Analysis From a Randomized Trial* ; J. Nat. Cancer Inst. ; **2008** ; 100 ; 1454-1463.

b) B Escudier, C Szczylik, TE Hutson, T Demkow, M Staehler, F Rolland, S Negrier, N Laferriere, UJ Scheuring, D Cella, S Shah, RM Bukowski ; *Randomized Phase II Trial of First-Line Treatment With Sorafenib Versus Interferon Alfa-2a in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma* ; J. Clin. Oncol. ; **2009** ; 27 ; 1280-1289.

³⁴ KT Flaherty, SJ Lee, F Zhao, LM Schuchter, L Flaherty, R Kefford, MB Atkins, P Leming, JM Kirkwood ; *Phase III Trial of Carboplatin and Paclitaxel With or Without Sorafenib in Metastatic Melanoma* ; J. Clin. Oncol. ; **2013** ; 31 ; 373-379.

³⁵ a) CN Sternberg, ID Davis, J Mardiak, C Szczylik, E Lee, J Wagstaff, CH Barrios, P Salman, OA Gladkov, A Kavina, JJ Zarba, M Chen, L McCann, L Pandite, DF Roychowdhury, RE Hawkins ; *Pazopanib in Locally Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase III Trial* ; J. Clin. Oncol. ; **2010** ; 28 ; 1061-1068.



Il existe encore d'autres inhibiteurs qui sont développés tels que le vandetanib, le cabozantinib, le linifanib, ou encore le tivozanib. Depuis la découverte de l'angiogénèse tumorale, un enthousiasme important existe autour du développement des molécules contrant ce processus. Même si dans des modèles précliniques un bénéfice à long terme de ces composés existe, en clinique l'augmentation de la SG est souvent limitée. Certains patients deviennent résistants au traitement, et d'autres sont réfractaires dès son initiation³⁶. Il existe des résultats qui se contredisent au sujet des bénéfices des traitements anti-angiogéniques. En effet, dans certains cas, ceux-ci favorisent l'invasion et la formation de métastases³⁷. Ceci étant, une normalisation vasculaire soutenue, induite par ces traitements, est un moyen efficace de combattre les métastases en améliorant la délivrance des médicaments³⁸.

g. Les inhibiteurs de protéines kinases

Les protéines kinases sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupe phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) sur l'hydroxyle des chaînes latérales des acides aminés ayant une fonction alcool : sérine, thréonine et tyrosine. Les protéines kinases sont impliquées dans la transmission du signal de prolifération. En inhiber certaines pourrait donc avoir un impact sur la croissance tumorale, jusqu'à entraîner la mort de cellules cancéreuses. Quelques inhibiteurs de kinases typiques sont présentés ci-après : l'afatinib, le dabrafenib et l'évérolimus.

- L'afatinib :

il est utilisé comme médicament en monothérapie dans le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). L'afatinib, tout comme le lapatinib et le neratinib, inhibe de façon irréversible les récepteurs HER1 et HER2 de la famille ErbB (HER : Human Epidermal Growth Factor Receptor), famille de récepteurs de facteurs de croissance

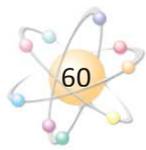
b) CN Sternberg, RE Hawkins, J Wagstaff, P Salman, J Mardiak, CH Barrios, JJ Zarba, OA Gladkov, E Lee, C Szczylik, L McCann, SD Rubin, M Chen, ID Davis ; *A randomised, double-blind phase III study of pazopanib in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma: Final overall survival results and safety update* ; Eur. J. Cancer ; **2013** ; 49 ; 1287-1296.

c) RJ Motzer, B Escudier, P Tomczak, TE Hutson, MD Michaelson, S Negrier, S Oudard, ME Gore, J Tarazi, S Hariharan, C Chen, B Rosbrook, S Kim, BI Rini ; *Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma: overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial* ; Lancet Oncology ; **2013** ; 14 ; 552-562.

³⁶ G Bergers, D Hanahan ; *Modes of resistance to antiangiogenic therapy* ; Nat. Rev. Cancer ; **2008** ; 8 ; 592-603.

³⁷ JML Ebos, RS Kerbel ; *Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis* ; Nat. Rev. Clin. Oncol. ; **2011** ; 8 ; 210-221.

³⁸ S Goel, DG Duda, L Xu, LL Munn, Y Boucher, D Fukumura, RK Jain ; *Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases* ; Physio. Rev. ; **2011** ; 91 ; 1071-1121.



épidermique, eux-mêmes impliqués dans les mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant la croissance, la survie, l'adhésion, ou encore la migration. L'afatinib est capable de former une liaison covalente avec la cystéine 797 de la tyrosine kinase ciblée, inhibant ainsi son activité. Une étude sur des patients atteints d'un adénocarcinome du poumon a montré que l'afatinib seul apportait une meilleure réponse de la tumeur, et une augmentation de la SSP d'environ 4 mois, en comparaison à un traitement chimiothérapeutique habituel (cisplatine / permetrexed)³⁹.

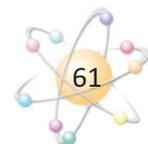
- Le dabrafenib :

Ce composé est un inhibiteur de protéine kinase B-Raf, en particulier la MAPK (mitogen-activated protein kinase). La kinase B-Raf est issue du gène BRAF. Une mutation de ce gène produit une protéine mutée qui agit ensuite de manière non contrôlée au sein de la cellule cancéreuse, lui permettant de se multiplier de plus en plus, résultant en une croissance de la tumeur. La mutation BRAF est relativement fréquente dans les cancers puisque sa présence concerne 7 % des tumeurs solides, tous types confondus. Une étude a démontré que le dabrafenib peut améliorer la SSP de patients atteints du mélanome malin métastatique porteur de la mutation BRAF-V6001 de presque 4 mois. Une seconde étude a pu mettre en évidence que cette SSP pourrait encore être améliorée (environ 3 mois de plus) s'il est utilisé en combinaison avec le trametinib. Le dabrafenib a été approuvé par la FDA en 2013. Un autre composé ayant le même type d'activité avait déjà été approuvé deux ans plus tôt : le vemurafenib.

- L'évérolimus :

L'évérolimus est un inhibiteur de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin). Le mTOR est une enzyme de la famille des sérine/thréonine kinases qui régule la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la mobilité cellulaire, la survie cellulaire, la biosynthèse des protéines et la transcription. La rapamycine (aussi connue sous le nom de silorimus) est un produit bactérien naturel qui peut inhiber mTOR en s'associant à son récepteur intracellulaire. L'évérolimus (dérivé du silorimus) s'est avéré plus efficace que le placebo pour traiter les patients dans toutes les études. Dans l'étude sur le cancer du sein, la SSP a été augmentée

³⁹ LV Sequist, JCH Yang, N Yamamoto, K O'Byrne, V Hirsh, T Mok, SL Geater, S Orlov, CM Tsai, M Boyer, WC Su, J Bennouna, T Kato, V Gorbunova, KH Lee, R Shah, D Massey, V Zazulina, M Shahidi, M Schuler ; *Phase III Study of Afatinib or Cisplatin Plus Pemetrexed in Patients With Metastatic Lung Adenocarcinoma With EGFR Mutations* ; J. Clin. Onco. ; **2013** ; 31 ; 3327-3334.



d'environ 4 mois. Dans une autre étude, les patients atteints de tumeurs neuroendocrines pancréatiques avaient une SSP améliorée de plus de 6 mois en comparaison du placebo⁴⁰. Enfin, dans une étude sur le carcinome rénal, les patients vivaient en moyenne 5 mois sans aggravation de la maladie, contre 2 mois chez les patients sous placebo, soit une augmentation de la SSP de 3 mois⁴¹. L'évérolimus, approuvé en 2009, est un analogue du temsirolimus, approuvé en 2007.

h. L'hormonothérapie

Certains cancers qui se développent dans les organes sous contrôle hormonal sont parfois eux-mêmes hormonodépendants. Dans ce cas là, les cellules tumorales surexpriment des récepteurs de ces hormones au niveau de leur membrane plasmique. Les hormones peuvent donc s'y fixer, pénétrer dans la cellule et interagir en modulant l'expression de certains gènes (oncogènes), favorisant alors la croissance des cellules cancéreuses.

Les cancers hormonodépendants sont la plupart du temps des cancers du sein, des ovaires, de la prostate, de la thyroïde, voire de l'utérus ou des testicules. L'hormonothérapie n'est indiquée que si les cellules expriment ces récepteurs hormonaux. Le diagnostic est réalisé au moyen de biopsies ou d'analyses sur des pièces d'exérèse opératoire.

On distingue deux types d'hormonothérapie :

- Les traitements médicamenteux, qui agissent par voie générale, sur toutes les cellules sensibles aux hormones. On parle de traitement systémique. Le but est de bloquer soit la production des hormones, soit l'action des hormones sur les cellules cancéreuses (Schéma 5).

⁴⁰http://www.ema.europa.eu/docs/fr_FR/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/001038/WC500089454.pdf

⁴¹ RJ Motzer, B Escudier, S Oudard, TE Hutson, C Porta, S Bracarda, V Grünwald, JA Thompson, RA Figlin, N Hollaender, G Urbanowitz, WJ Berg, A Kay, D Lebwohl, A Ravaud ; *Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial* ; Lancet ; **2008** ; 372 ; 449-456.

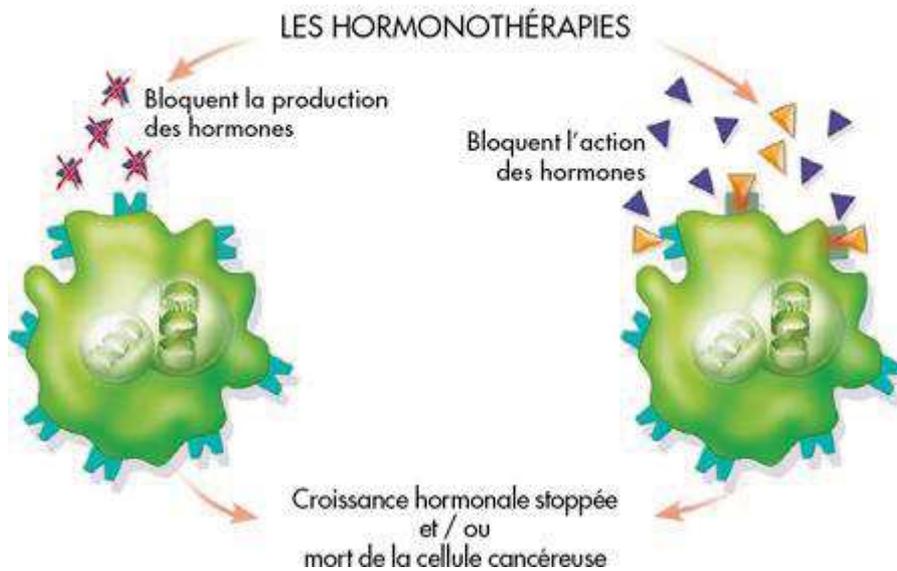
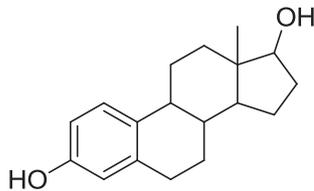


Schéma 5: Principe de l'hormonothérapie

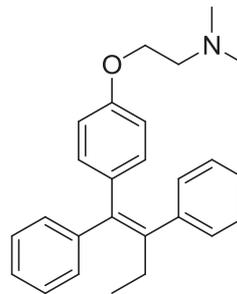
- Les traitements non médicamenteux qui consistent à stopper la production d'œstrogènes par les ovaires en réalisant une ablation (ovariectomie) ou en les irradiant (radiothérapie).

a) Cas des cancers dépendant des hormones sexuelles féminines :

Les composés actifs contre les cancers du sein hormonodépendants sont des molécules de type tamoxifène (Figure 25).



Oestradiol



Tamoxifène

Figure 25 : Structure de l'œstradiol (œstrogène) et du tamoxifène

Le tamoxifène est un antiœstrogène de la famille du triphényléthylène agissant par inhibition compétitive de la liaison de l'estradiol avec ses récepteurs.

Un second moyen de combattre ce type de cancer est l'utilisation d'inhibiteurs de l'aromatase. L'aromatase est une enzyme clé dans la biosynthèse des œstrogènes. En effet, elle permet l'aromatation du cycle A de l'androstènedione conduisant à la formation d'estradiol (Schéma 6).

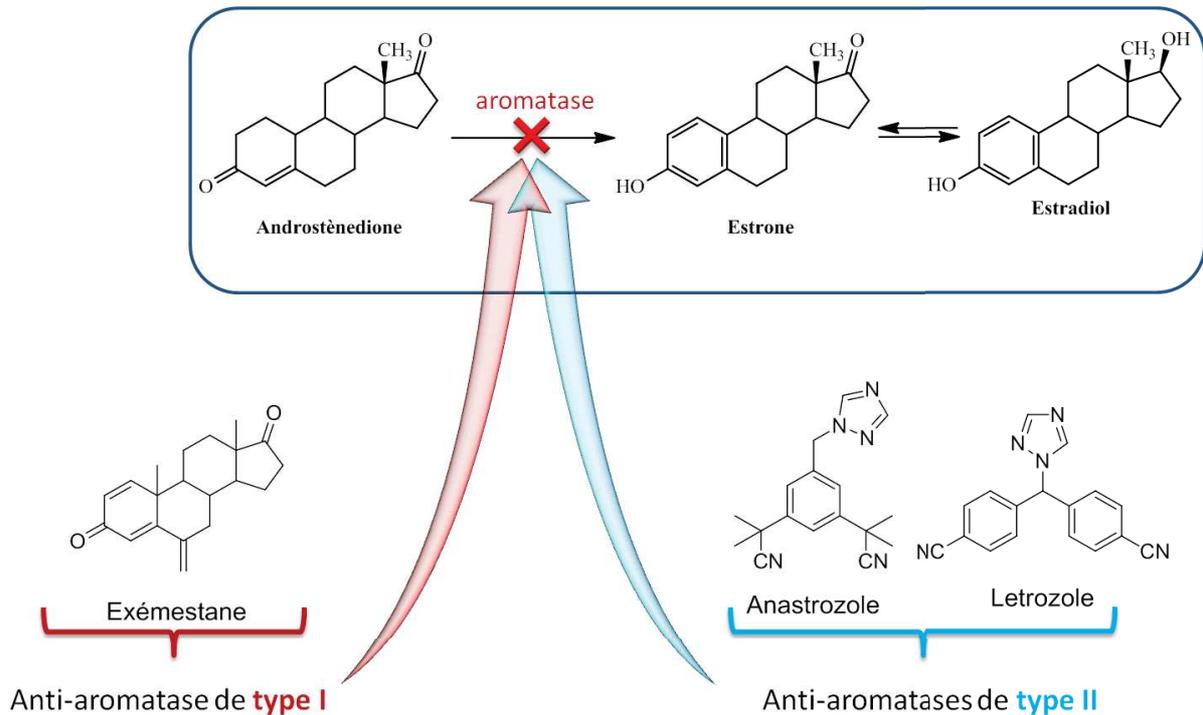


Schéma 6 : L'aromatase : action et inhibiteurs

Les anti-aromatases sont divisés en deux groupes : ceux de type I et ceux de type II. Les anti-aromatases de type I, de nature stéroïdienne, regroupent les produits qui se lient de façon irréversible (inhibiteur suicides) au site actif de l'enzyme qui transforme les androgènes en œstrogènes. Le principal est l'exémestane. Les anti-aromatases de type II agissent de façon réversible et temporaire sur le co-enzyme du complexe enzymatique ayant l'activité aromatase (la réductase). On retrouve ici l'anastrozole et le létrozole.

b) Cas des cancers dépendant des hormones sexuelles masculines :

Les hormones masculines ou androgènes sont indispensables au développement de la prostate, mais ces hormones stimulent également la croissance des cellules cancéreuses prostatiques. Comme vu précédemment, deux voies peuvent être empruntées pour combattre le cancer par hormonothérapie : soit la production de testostérone est réduite (agonistes de la LHRH), soit l'action de la testostérone sur la prostate est réduite (anti-androgènes).

La LHRH est une hormone synthétisée par l'hypothalamus qui a pour mission d'agir sur l'hypophyse. Elle entraîne notamment une sécrétion de LH par l'hypophyse, qui elle aura une action testiculaire avec sécrétion de testostérone. Les agonistes de la LHRH sont des substances similaires à

la LHRH qui vont saturer les récepteurs de cette hormone au niveau hypophysaire entraînant une sécrétion réduite de testostérone. L'hyperstimulation initiale de l'hypophyse entraîne, dans les 15 premiers jours de la mise en marche d'un traitement par agoniste de la LHRH, une élévation brutale de la testostéronémie avec stimulation des cellules tumorales. Cette élévation peut aggraver des lésions dues au cancer de la prostate. Il convient donc de prescrire un anti-androgène dans les premières semaines d'initiation d'un traitement par agonistes de la LHRH, pour éviter cette hyperstimulation des cellules tumorales.

Les anti-androgènes vont avoir pour action d'inhiber l'action de la testostérone sur la prostate en interagissant, de manière compétitive, avec leurs récepteurs. Les principaux anti-androgènes utilisés sont soit de type stéroïdien comme la cyprotérone ou non stéroïdien tel que le bicalutamide (Figure 26) :

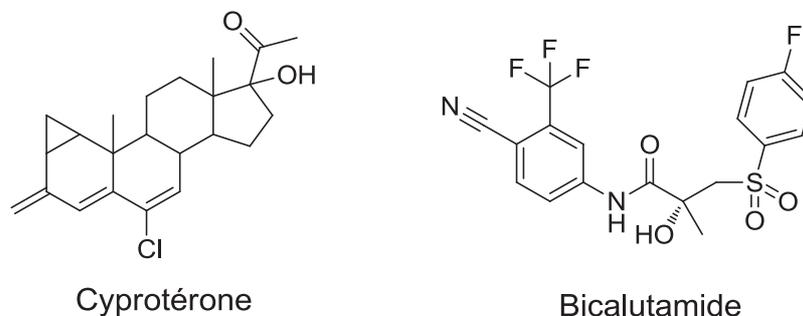


Figure 26 : Structure de la cyprotérone

i. La thérapie photodynamique (PDT)

La PDT (PhotoDynamic Therapy) est une thérapie anti-tumorale qui associe l'utilisation d'une molécule photosensibilisatrice et une irradiation par la lumière. Dans un premier temps le photosensibilisateur est injecté au patient et va s'accumuler plus ou moins préférentiellement dans la zone tumorale. Cette zone est ensuite exposée à une irradiation lumineuse à une longueur d'onde définie afin d'exciter le photosensibilisateur. Celui-ci, en se désexcitant, va convertir l'oxygène présent dans la cellule en oxygène singulet (1O_2) et d'autres espèces oxygénées réactives appelées ROS pour Reactive Oxygen Species. Celles-ci vont par la suite engendrer une cascade de réactions menant à la mort de la cellule irradiée.

L'oxygène est assez difficile à exciter pour le faire passer de son état fondamental triplet à son état excité singulet. Cependant, l'utilisation d'un photosensibilisateur peut permettre cette

transition. En effet, l'exposition de la tumeur à une lumière de type laser va provoquer une photo-activation définie par le changement d'état des molécules photosensibilisatrices. Par absorption de la lumière, les molécules acquièrent de l'énergie et passent d'un état de repos S_0 à différents états excités (S_1 , S_2 ...) (Schéma 7); le premier état dit singulet (S_1) est occupé directement ou après désactivation partielle très rapide des états supérieurs.

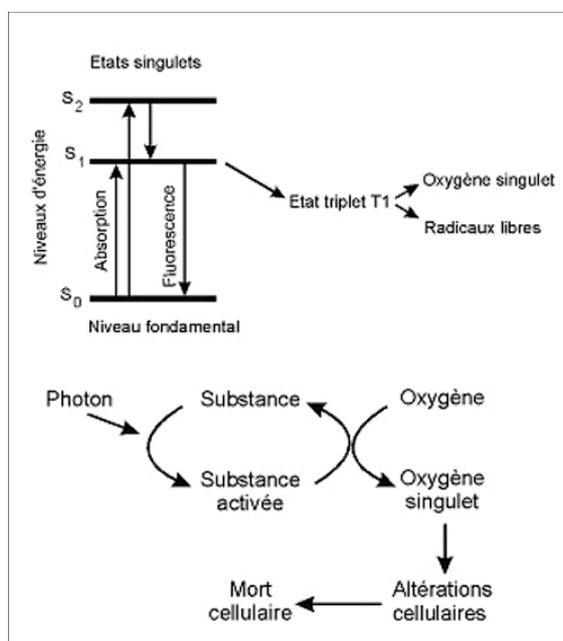


Schéma 7 : Processus d'excitation de l'oxygène dans la PDT⁴²

La molécule excitée possède un excès d'énergie qu'elle va perdre rapidement et spontanément soit sous forme de chaleur, soit en émettant une fluorescence, soit enfin, en passant par un état intermédiaire dit «triplet» responsable des phénomènes de photosensibilisation. L'excès d'énergie de l'état triplet peut être transféré à l'oxygène qui est ainsi excité, la molécule revient ensuite à son état initial et est prête pour une nouvelle collecte d'énergie lumineuse. L'oxygène singulet va entraîner la désactivation d'enzymes. Ceci sera le résultat de la destruction de certains acides aminés (surtout méthionine, histidine, tryptophane, cystéine et tyrosine), mais aussi de l'oxydation des acides nucléiques et des bases qui les constituent. L'oxygène singulet peut aussi altérer les membranes (surtout à cause de l'oxydation des acides gras insaturés et du cholestérol).

Ces réactions aboutissent à la destruction de la cellule cancéreuse selon trois voies :

- La mort par nécrose ou apoptose⁴³

⁴² J.Boyer, V.Maunoury ; *La thérapie photodynamique* ; POST'U Lyon, **2007**.

⁴³ RD Almeida, BJ Manadas, AP Carvalho, CB Duarte ; *Intracellular Signaling Mechanisms in Photodynamic Therapy* ; Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer ; **2004** ; 1704 ; 59-86.

- La destruction de la vascularisation de la tumeur en la privant de l'oxygène et des nutriments nécessaires à sa survie et sa croissance⁴⁴
- L'induction d'une réponse inflammatoire et immunitaire du patient contre les cellules cancéreuses ou les éventuelles métastases⁴⁵

La cytotoxicité induite par la PDT est influencée par la concentration en oxygène du tissu tumoral ; des zones anoxiques pouvant exister au sein d'une tumeur, ceci peut expliquer l'efficacité inégale et partielle du traitement nécessitant une exposition complémentaire.

Pour limiter les risques de lésions sur les tissus sains autour de la zone à traiter, les chercheurs ont mis au point des photosensibilisateurs possédant, dans l'idéal, une bonne affinité pour les cellules cancéreuses, tout en étant non toxiques et éliminés rapidement des cellules saines⁴⁶. La plupart sont des benzoporphyrines (Visudyne[®]), des chlorines (Tookad[®]), des colorants (Photosens[®]), des texaphyrines (Antrin[®]), mais aussi des précurseurs de porphyrines (Levulan[®]) (Figure 27). Actuellement, ces porphyrines et leurs dérivés constituent la seule famille chimique de photosensibilisateurs utilisés en clinique anti-tumorale⁴⁷.

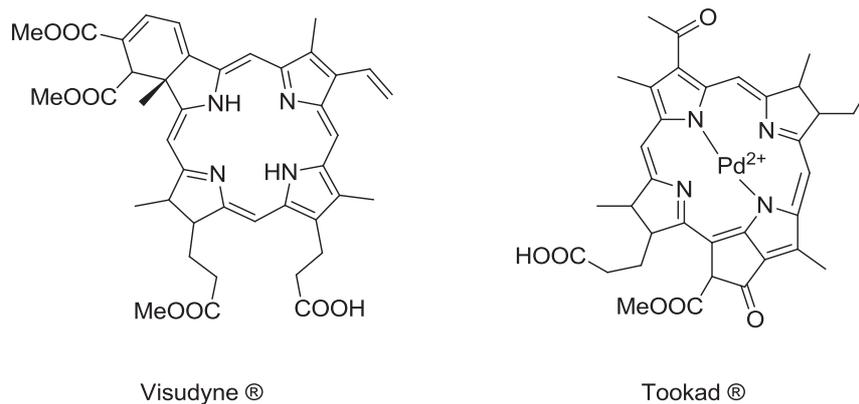


Figure 27 : Exemples de photosensibilisateurs

Cependant ce type de traitement peut entraîner une photosensibilisation du patient qui nécessite alors une protection vis-à-vis de la lumière du jour pendant plusieurs semaines pour éviter de graves brûlures. Une délivrance du photosensibilisateur uniquement au sein de la tumeur ainsi

⁴⁴ BW Henderson, TJ Dougherty ; *How Does Photodynamic Therapy Work?* ; Photochemistry and Photobiology ; **1992** ; 55 ; 145-157.

⁴⁵ TJ Dougherty, CJ Gomer, BW Henderson, G Jori, D Kessel, M Korbelik, J Moan, Q Peng ; *Photodynamic Therapy* ; J. Natl. Cancer Inst. ; **1998** ; 90 ; 889-905.

⁴⁶ ES Nyman, PH Hynninen ; *Research Advances in the Use of Tetrapyrrolic Photosensitizers for Photodynamic Therapy* ; J. Photochem. Photobio. ; **2004** ; 73 ; 1-28.

⁴⁷ P Agostinis, K Berg, KA Cengel, TH Foster, AW Girotti, SO Gollnick, SM Hahn, MR Hamblin, A Juzeniene, D Kessel, M Korbelik, J Moan, P Mroz, D Nowis, J Piette, BC Wilson, J Golab ; *Photodynamic Therapy of Cancer: An Update* ; CA: Cancer J. Clinicians ; **2011** ; 61 ; 250-281.

qu'une meilleure élimination de celui-ci par les tissus sains permettraient de diminuer les effets secondaires.

j. Thérapie génique

La thérapie génique est une thérapie relativement jeune, bien que le concept date des années 1950. Cette thérapie utilise des acides nucléiques (ADN, ARN) pour soigner ou prévenir des maladies telles que le cancer, des maladies cardiovasculaires, des maladies hématologiques, monogéniques, infectieuses, et bien d'autres. La thérapie génique consiste à délivrer aux cellules un gène fonctionnel qui va remplacer le gène défectueux à l'origine de la maladie, un gène thérapeutique ou bien un ARN capable de réguler ou de bloquer l'expression d'un gène altéré (Schéma 8).

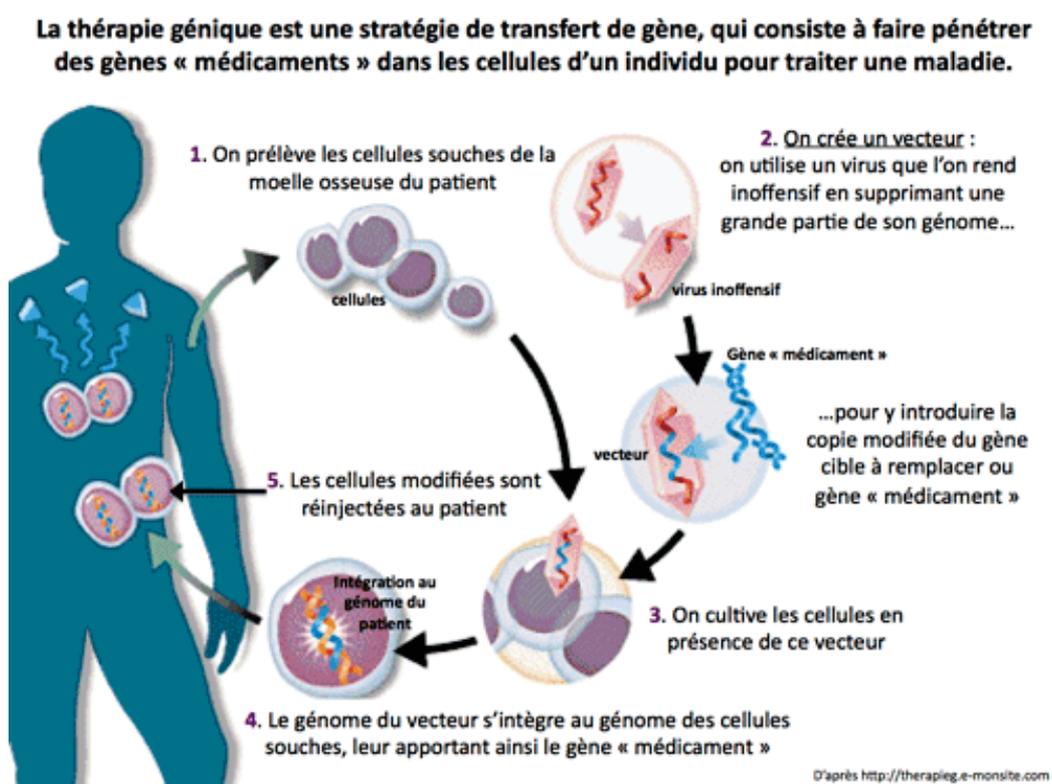
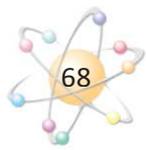


Schéma 8 : Principe de la thérapie génique⁴⁸

Pour faire pénétrer les acides nucléiques à visée thérapeutique dans les cellules du patient, il faut utiliser un vecteur. Dans la plupart des cas, les vecteurs utilisés sont des virus modifiés. Il existe différents types de vecteurs viraux : les non répliquatifs, les intégratifs et les non intégratifs. Il existe

⁴⁸ <http://www.carevox.fr/sante-maladies/article/la-therapie-genique-modifier-les>; consulté en Janvier 2016



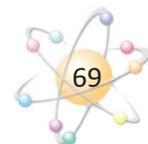
aussi des vecteurs non viraux non intégratifs. Dans tous les cas, ces vecteurs font l'objet d'une grande ingénierie afin d'annuler leur potentiel toxique et de les rendre les plus discrets possible pour le système immunitaire du patient.

Parmi les maladies visées par cette thérapie, le cancer est en première position au niveau des recherches et des tests effectués. Trois types d'approche sont actuellement développés :

- Stimuler le système immunitaire. Cela consiste à introduire dans les cellules tumorales, mais aussi dans les cellules du système immunitaire, le gène de diverses cytokines comme les Interleukines ou l'interféron. Plusieurs protocoles de ce type sont en cours d'évaluation dans différents pays et concernent les cancers du rein, de la prostate, du colon et le mélanome.
- Agir sur les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. Cette deuxième stratégie vise dans son principe à inactiver les oncogènes ou au contraire à rétablir la fonction de gènes suppresseurs de tumeur. Plusieurs travaux visent à rétablir la fonction de la protéine p53 considérée comme le « gardien du génome ». Plusieurs essais sont développés dans le monde et concernent les cancers du sein, du poumon, du colon et certaines leucémies.
- Introduire des gènes suicide. Cette troisième stratégie est, dans son principe, fort astucieuse. L'idée est de détruire de façon contrôlée et spécifique la cellule tumorale. La méthode consiste à introduire uniquement dans la tumeur un gène suicide dont l'expression devient fatale à toute cellule mise en présence de certains médicaments. Les essais qui ont été mis sur pied servent à lutter contre des tumeurs cérébrales, le cancer de l'ovaire, ou encore le mélanome.

Tout cet arsenal thérapeutique ne permet toutefois pas encore de traiter et guérir tous les cancers. Et même dans certains cas si on y arrive, le traitement s'accompagne d'effets secondaires très importants. C'est pourquoi il est nécessaire aujourd'hui de continuer à faire de la recherche sur cette maladie et sur les traitements possibles, afin de les rendre plus efficaces et d'améliorer les conditions de vie des patients en soins. Une des approches les plus développées est d'utiliser un marqueur spécifique d'une tumeur pour mieux cibler une chimiothérapie. Ce peut être un récepteur ou une enzyme.

Ainsi, dans ce contexte, les travaux du Pr Rochefort et du Dr Garcia ont pu mettre en évidence que la cathepsine D était une enzyme impliquée dans la prolifération des cellules



cancéreuses et dans le processus métastatique, faisant d'elle une cible potentiellement intéressante pour un traitement anticancéreux ciblé. Le terme « ciblé » désigne ici une thérapie capable de n'être active que sur les cellules cancéreuses, puisqu'elle va attaquer des éléments surexprimés par les cellules tumorales, et non les cellules saines.

III) La cathepsine D comme cible thérapeutique⁴⁹

Une cible potentielle pour combattre le cancer est la cathepsine D. Les cathepsines sont des protéases qui tiennent une place importante dans la dégradation des protéines dans le lysosome. Elles forment une famille d'au moins 15 membres, appelées cathepsines A, B, C, D, E, F, G, H, K, L1, L2, O, S, W et Z. Il sera détaillé dans cette partie la structure et le rôle de cette enzyme. Il sera également expliqué pourquoi cette enzyme représente une cible potentielle pour lutter contre les cellules cancéreuses.

a. Structure

La cathepsine D (CathD) est une protéase lysosomale. Les protéases sont réparties en 5 catégories, en fonction de leur mécanisme catalytique. Ainsi, il existe des métallo-, cystéine-, sérine-, thréonine- et aspartyl- protéases. La CathD est une aspartyl protéase qui possède deux résidus acide aspartique en position 33 et 231 (Schéma 9). Ces deux résidus sont situés dans une séquence bien conservée de type Asp-Thr-Gly sur chacune des deux sous-unités de la forme active de la CathD (de

⁴⁹ a) O Masson, AS Bach, D Derocq, C Prébois, V Laurent-Matha, S Patingre, A Liaudet-Coopman ; *Pathophysiological functions of cathepsin D : Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity ?* ; Biochimie; **2010**; 92; 1635-1643

b) P Benes, V Vetvicka, M Fusek ; *Cathepsin D – Many functions of one aspartic protease* ; Oncology/Hematology ; **2008** ; 68 ; 12-28

c) O Masson ; *Cancer du sein et micro-environnement tumoral: rôle de la protéase cathepsine D adipocytaire et de son récepteur LRP1* ; thèse soutenue en **2010**

d) E Liaudet-Coopman, M Beaujouin, D Derocq, M Garcia, M Glondu-Lassis, V Laurent-Matha, C Prébois, H Rochefort, F Vignon ; *Cathepsin D : Newly Discovered Functions of a Long-Standing Aspartic Protease in Cancer and Apoptosis* ; Cancer Lett ; **2006** ; 237 ; 167-179.

14 et 34 kDa). D'après l'étude cristallographique de la structure tridimensionnelle de la CathD de 48 kDa, les deux acides aspartiques du site catalytique se font face⁵⁰.

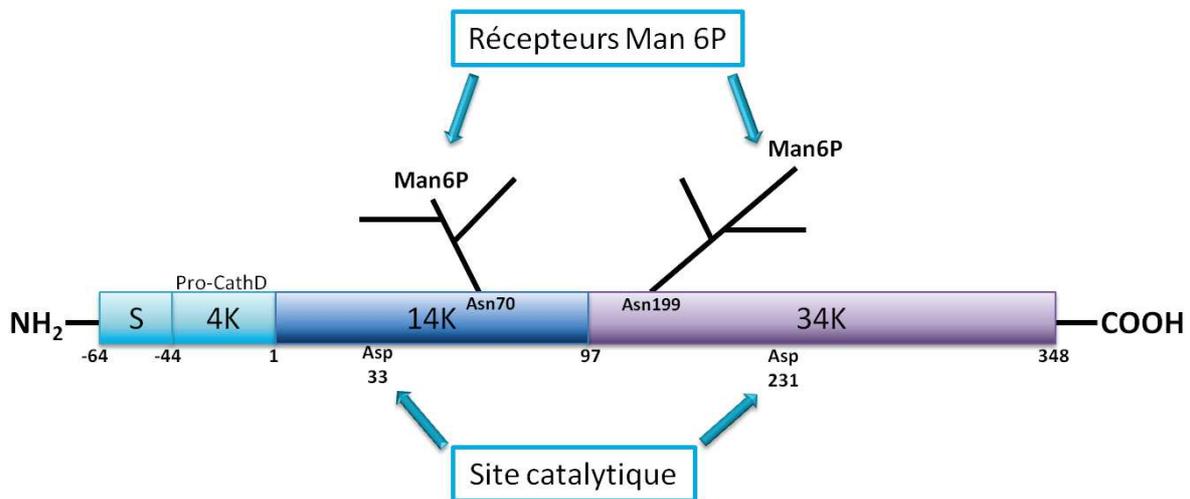


Schéma 9 : Structure de la Cathepsine D

Dans un premier temps, la CathD est biosynthétisée sous forme de pré-pro-CathD dans le réticulum endoplasmique. Une fois le peptide signal (S) éliminé, la pré-pro-enzyme devient alors une Pro-CathD, précurseur protéique de 52 kDa dont le site catalytique n'est pas actif. Cela correspond à la première étape de maturation de l'enzyme. Ce précurseur va ensuite se glycosyler et se protéolyser sous différentes formes, puis il sera reconnu de façon concertée par deux enzymes qui assurent la formation du signal Mannose-6-Phosphate (M6P). Ceci permettra la liaison ultérieure de la cathepsine à des récepteurs du M6P spécifiques dans le réseau trans-Golgien qui assurent leur transport vers les endosomes. L'endosome évoluant progressivement en lysosome, cela entraîne une acidification du milieu. Le milieu plus acide ainsi que des protéases à cystéine et/ou à aspartyl lysosomales vont faire perdre le propeptide de la pro-CathD, formant alors un intermédiaire actif de 48 kDa. Ce dernier est clivé en deux chaînes matures actives de 34 kDa en position C-terminale et de 14 kDa en position N-terminale. Ce clivage est effectué par des protéases à cystéine lysosomales (CathB et CathL) dans les cellules normales, et par autocatalyse en milieu extracellulaire dans certains cas pathologiques. Les deux chaînes sont associées entre elles de façon non covalente via des liaisons de type hydrophobe. La dernière étape de la maturation consiste en une élimination de quelques acides aminés par une carboxypeptidase (2 acides aminés) et par une aminopeptidase (7 acides aminés) sur la plus grande chaîne de la CathD (Schéma 10).

⁵⁰ a) P Metcalf, M Fusek ; *Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site* ; EMBO J ; **1993** ; 12 ; 1293-1302.

b) P Metcalf, M Fusek ; *Cathepsin D crystal structures and lysosomal sorting* ; Adv Exp Med Biol ; **1995** ; 362 ; 193-200.

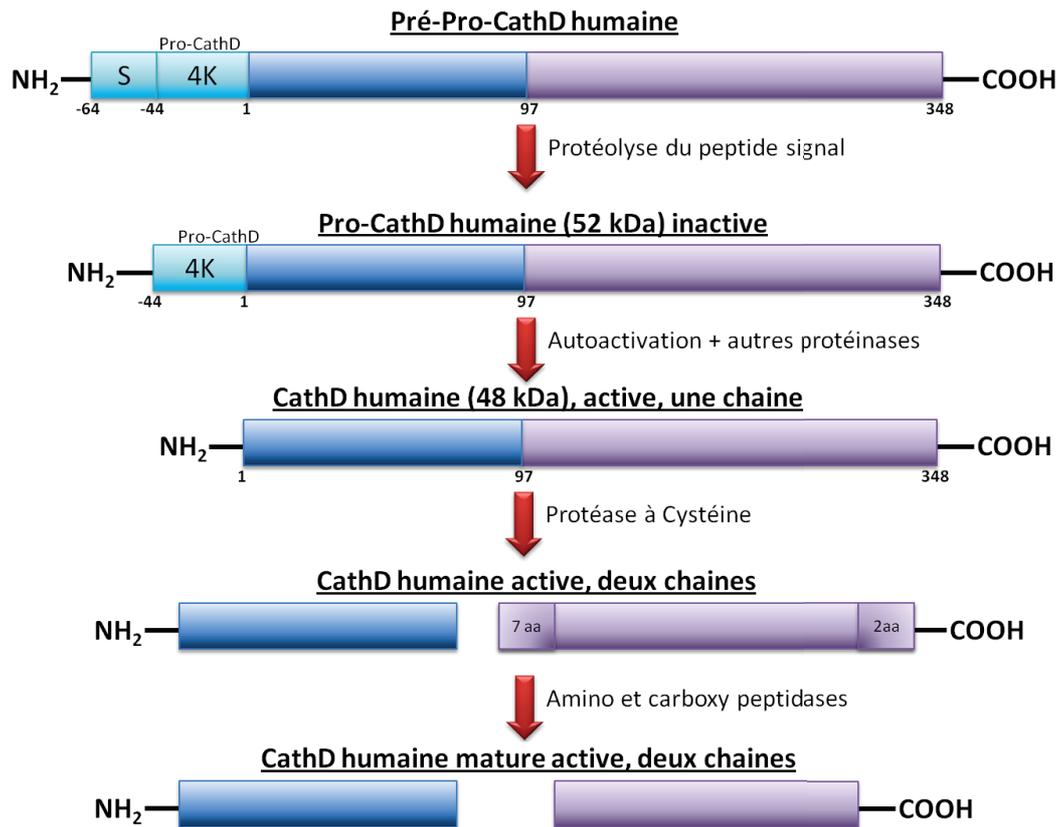


Schéma 10 : Maturation de la CathD

Il est également décrit qu'à pH acide, la Pro-CathD s'autoactive en pseudo-CathD présentant une activité protéolytique *in vitro*. Elle présente un poids moléculaire de 51 kDa et possède 18 résidus (27-44) du pro-fragment résultant du clivage de ce pro-peptide entre Leu26 et Ile27⁵¹. Cependant cet intermédiaire n'a pas encore été observé *in vivo*.

⁵¹ GR Richo, GE Conner ; *Structural requirements of procathepsin D activation and maturation* ; J Biol Chem ; **1994** ; 269, 14806-14812.

b. Rôles

i. Dans les cellules saines

Dans les cellules saines, la CathD est une protéase lysosomale ubiquitaire indispensable qui participe au renouvellement des composants cellulaires en dégradant les protéines à pH acide (pH 3,5)⁵².

Cette endoprotéase clive préférentiellement les liaisons peptidiques entre deux acides aminés hydrophobes (Phe-Phe ; Leu-Tyr ; Tyr-Leu ; Phe-Tyr). Elle joue un rôle crucial dans le catabolisme intracellulaire des protéines dans les lysosomes. De nombreuses fonctions physiologiques de la CathD ont été proposées, basées sur sa capacité à cliver des protéines et des peptides. Ainsi, il a été mis en évidence que la CathD active des précurseurs de protéines biologiquement actives comme l'hormone parathyroïde⁵³ ou la prolactine⁵⁴ dans les compartiments pré-lysosomaux dans des cellules spécialisées. Dans d'autres cellules spécialisées, elle participe à la maturation d'antigènes⁵⁵ et à la dégradation d'hormones telles que l'insuline ou le glucagon⁵⁶.

En ce qui concerne l'apoptose, le rôle de la CathD est en cours d'étude et semble être complexe. En effet, l'enzyme peut selon les conditions d'étude :

- Prévenir l'apoptose⁵⁷

⁵² AJ Barrett ; *Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver* ; Biochem J ; **1970** ; 117 ; 601-607.

⁵³ S Diment , KJ Martin , PD Stahl ; *Cleavage of parathyroid hormone in macrophage endosomes illustrates a novel pathway for intracellular processing of proteins* ; J Biol Chem ; **1989** ; 264 ; 13403-13406.

⁵⁴ D Piwnica, P Touraine, et al. ; *Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance* ; Mol Endocrinol ; **2004** ; 18 ; 2522-2542.

⁵⁵ a) D Baechle, T Flad, A Cansier, et al ; *Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L* ; J Biol Chem ; **2006** ; 281 ; 5406-5415.

b) C Barrera, G Ye, R Espejo, et al. ; *Expression of cathepsins B, L, S, and D by gastric epithelial cells implicates them as antigen presenting cells in local immune responses* ; Hum Immunol ; **2001** ; 62 ; 1081-1091.

c) Mohamadzadeh, H Mohamadzadeh, et al. ; *Identification of M proteases employed by dendritic cells in the processing of protein purified derivative (PPD)* ; J Immune Based Ther Vaccines ; **2004** ; 2 ; 8.

d) N Zaidi, T Burster, V Sommandas, et al. ; *A novel cell penetrating aspartic protease inhibitor blocks processing and presentation of tetanus toxoid more efficiently than pepstatin A* ; Biochem Biophys Res Commun ; **2007** ; 364 ; 243-249.

⁵⁶ a) F Authier, M Metioui, S Fabrega, M Kouach, and G Briand ; *Endosomal proteolysis of internalized insulin at the C-terminal region of the B chain by cathepsin D* ; J Biol Chem ; **2002** ; 277 ; 9437-9446.

b) F Authier, JS Mort, AW Bell, BI Posner, JJ Bergeron ; *Proteolysis of glucagon within hepatic endosomes by membrane-associated cathepsins B and D* ; J Biol Chem ; **1995** ; 270 ; 15798-15807.

⁵⁷ a) M Koike, M Shibata, Y Ohsawa, et al. ; *Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D deficient mice* ; Mol Cell Neurosci ; **2003** ; 22 ; 146-161.



- Favoriser l'apoptose induite par des agents cytotoxiques⁵⁸ ou chimiothérapeutiques⁵⁹

Ensuite, l'étude sur souris déficientes en CathD a permis de montrer que celle-ci n'est pas indispensable au développement de l'embryon, mais est nécessaire au maintien de l'homéostasie de certains tissus. En effet, ces souris meurent au bout de 4 semaines après leur naissance. Elles présentent alors une nécrose intestinale massive, ainsi qu'une destruction importante des organes lymphoïdes entraînant une chute importante des lymphocytes B et T^{49,b}. De plus, elles montrent une atrophie rétinienne les rendant aveugles dans les derniers jours de leur vie⁶⁰. Enfin, le système nerveux central est lui aussi touché puisqu'il a été noté une neurodégénération dans le cerveau de ces souris. On y retrouve une accumulation d'un matériel autofluorescent dans les lysosomes, la lipofuscine céroïde. Ce phénotype est naturellement retrouvé chez des animaux présentant une mutation du gène de la CathD⁶¹. Tout ceci démontre que l'enzyme joue un rôle important dans le maintien et le renouvellement de certains tissus et qu'elle semble indispensable à la survie.

ii. Dans les pathologies

Dans les années 90, quelques études cliniques indépendantes ont montré que le taux de CathD dans le cytosol des cellules de cancers du sein primaires était un paramètre à mettre en corrélation avec l'apparition de métastases et un temps de survie relativement court⁶². La CathD est maintenant reconnue comme étant un marqueur du cancer du sein et impliquant un mauvais pronostic, associé à un risque élevé de métastases⁶³. En effet, il a pu être mis en évidence que chez les patients montrant des métastases, le taux de Pro-CathD dans le plasma était bien plus élevé. Il a été montré que dans la lignée cellulaire cancéreuse mammaire humaine métastatique (MDA-MB-

b) P Saftig, M Hetman, et al ; *Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells* ; *Embo J* ; **1995** ; 14 ; 3599-3608.

⁵⁸ a) LP Deiss, H Galinka, H Berissi, et al. ; *Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha* ; *Embo J* ; **1996** ; 15 ; 3861-3870.

b) L Emert-Sedlak, S Shangary, A Rabinovitz, et al. ; *Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death* ; *Mol Cancer Ther* ; **2005** ; 4 ; 733-742.

⁵⁹ M Beaujoui, S Baghdigian, M Glondu-Lassis, et al. ; *Overexpression of both catalytically active and -inactive cathepsin D by cancer cells enhances apoptosis-dependent chemo-sensitivity* ; *Oncogene* ; **2006** ; 25 ; 1967-1973.

⁶⁰ R Steinfeld, K Reinhardt, K Schreiber, et al. ; *Cathepsin D deficiency is associated with a human neurodegenerative disorder* ; *Am J Hum Genet* ; **2006** ; 78 ; 988-998.

⁶¹ a) T Awano, ML Katz, DP O'Brien, et al. ; *A mutation in the cathepsin D gene (CTSD) in American Bulldogs with neuronal ceroid lipofuscinosis* ; *Mol Genet Metab* ; **2006** ; 87 ; 341-348.

b) J Tynnela, I Sohar, D. E Sleat, et al. ; *A mutation in the ovine cathepsin D gene causes a congenital lysosomal storage disease with profound neurodegeneration* ; *Embo J* ; **2000** ; 19 ; 2786-2792.

⁶² BR Westley, FE May ; *Prognostic value of cathepsin D in breast cancer* ; *Br. J. Cancer* ; **1999** ; 79 ; 189-190

⁶³ PL Fitzgibbons, DL Page , D Weaver, et al. ; *Prognostic factors in breast cancer. College of American pathologists consensus statement 1999* ; *Arch. Pathol. Lab. Med.* ; **2000** ; 124 ; 966-978.



231), l'inhibition de l'expression endogène de la CathD par des ARNs antisens⁶⁴, des ribozymes⁶⁵ et des shRNA⁶⁶ (small hairpin RNA : petit ARN en épingle à cheveux), inhibe la prolifération cellulaire *in vitro*, la croissance tumorale et le potentiel métastatique chez la souris athymique *in vivo*.

De nos jours, nous savons que la CathD est hypersécrétée et surexprimée dans une multitude de cancers : cancer du sein, des ovaires, de l'endomètre, du cou, de la vessie, mélanomes, gliomes malins... De plus, il a été décrit que la CathD était très largement impliquée dans le processus métastatique. Au niveau cellulaire, d'un côté la CathD surexprimée s'accumule dans les cellules et d'un autre côté, la forme pro-enzyme est sécrétée dans le microenvironnement tumoral.

Plusieurs mécanismes d'action de la CathD ont été proposés dans ce contexte.

- La CathD stimulerait la prolifération des cellules cancéreuses et augmenterait le potentiel métastatique de manière autocrine. Dans la cellule, la CathD dégraderait, grâce à son activité catalytique, les inhibiteurs de croissance sécrétés tel que la protéine heat shock cognate 70 : Hsc70⁶⁷. L'équipe du Dr Garcia a mis en évidence qu'après inhibition de la CathD, Hsc70 était hypersécrétée et jouait son rôle d'inhibiteur de croissance sur les cellules tumorales. De plus, son activité protéolytique extracellulaire pourrait intervenir dans l'activation de facteurs de croissance⁶⁸. On sait que le pH dans le microenvironnement tumoral est plus acide⁶⁹, cependant l'activation extracellulaire de la Pro-CathD n'a jamais pu être démontrée, suggérant ainsi qu'elle pourrait agir par un autre mécanisme.
- La CathD pourrait agir par interaction avec d'autres protéines. En effet, il a été montré qu'un mutant catalytiquement inactif de la CathD stimule toujours la prolifération des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*, indiquant l'existence de mécanismes alternatifs indépendants de son activité protéolytique⁷⁰. Il est envisageable que cette protéase agisse aussi comme un ligand.

⁶⁴ M Glondu, E Liaudet-Coopman, D Derocq, et al. ; *Down-regulation of cathepsin-D expression by antisense gene transfer inhibits tumor growth and experimental lung metastasis of human breast cancer cells* ; *Oncogene* ; **2002** ; 21 ; 5127- 5134.

⁶⁵ A Vashishta, SS Ohri, M Proctor, et al. ; *Ribozyme targeting procathepsin D and its effect on invasion and growth of breast cancer cells: an implication in breast cancer therapy* ; *Int J Oncol* ; **2007** ; 30 ; 1223-1230.

⁶⁶ SS Ohri, A Vashishta, M Proctor, et al. ; *Depletion of procathepsin D gene expression by RNA interference: a potential therapeutic target for breast cancer* ; *Cancer Biol Ther* ; **2007** ; 6 ; 1081-1087.

⁶⁷ P Nirde, D Derocq, M Maynadier, et al. ; *Heat shock cognate 70 protein secretion as a new growth arrest signal for cancer cells* ; *Oncogene* ; **2009**

⁶⁸ P Briozzo, J Badet, F Capony, et al. ; *MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D* ; *Exp Cell Res* ; **1991** ; 194 ; 252-259.

⁶⁹ JR Griffiths ; *Are cancer cells acidic?* ; *Br J Cancer* ; **1991** ; 64 ; 425-427

⁷⁰ a) G Berchem, M Glondu, M Gleizes, et al. ; *Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps in vivo: proliferation, angiogenesis and apoptosis* ; *Oncogene* ; **2002** ; 21 ; 5951-5955.



Il est évident qu'il existe des inter-connexions, entre cellules cancéreuses et stromales, responsables de la croissance invasive des tumeurs, dans lesquelles les protéases semblent impliquées. La pro-CathD sécrétée agit aussi au niveau du microenvironnement tumoral, en affectant les cellules stromales tels que les fibroblastes.

Des travaux de Berchem et al.^{70,a} ont montré que la protéase stimule l'angiogenèse tumorale dans des tumeurs greffées chez des souris athymiques. Cet effet semble indépendant de l'activité catalytique de la CathD. Il est donc possible que son action passe par des voies de signalisation activées par la liaison de la CathD à un récepteur de surface non identifié à ce jour. L'angiogenèse étant contrôlée par un équilibre entre les facteurs pro et anti angiogéniques, l'enzyme pourrait contribuer à la libération et l'activation des facteurs de croissance ou bien dégrader les inhibiteurs de croissance présents dans le milieu extracellulaire. Dans ce sens, des travaux ont montré que la CathD facilite le relargage de facteurs pro-angiogéniques à partir de la matrice extracellulaire. Cependant, des études *in vitro* indiquent que la CathD clive la prolactine en plusieurs fragments anti-angiogéniques, ce qui montre que le rôle exact de cette enzyme dans l'angiogenèse n'est pas encore connu et doit être élucidé.

Le schéma 11 suivant représente les rôles hypothétiques de la CathD dans la progression du cancer.

b) M Glondu, P Coopman, V Laurent-Matha, et al. ; *A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells* ; *Oncogene* ; **2001** ; 20 ; 6920-6929.

c) V Laurent-Matha, S Maruani-Herrmann, C Prebois, et al. ; *Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth* ; *J Cell Biol* ; **2005** ; 168 ; 489-499.

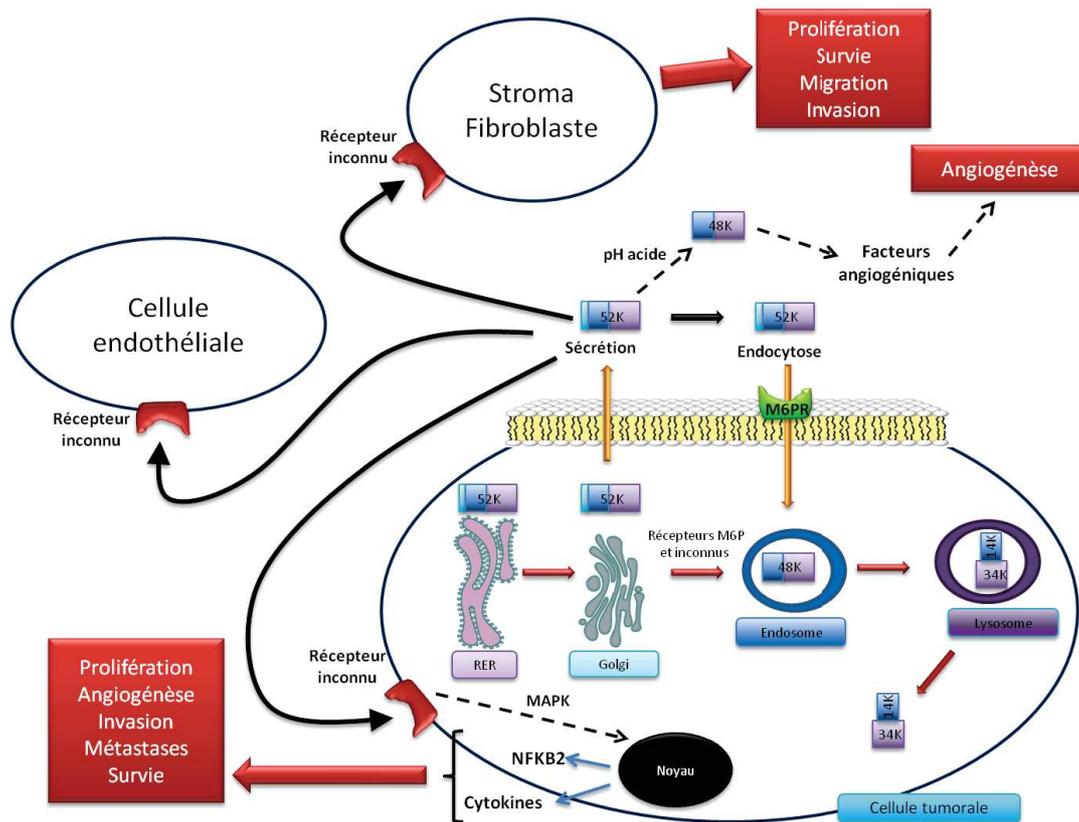


Schéma 11 : Rôles de la CathD dans la cellule tumorale⁷¹

La Pro-CathD (52kDa) hyper-sécrétée par les cellules tumorales stimule la prolifération des cellules cancéreuses de façon autocrine en se fixant à un récepteur de surface qui n'a pas encore été identifié. Cette interaction active la voie des MAPKinases qui va pouvoir promouvoir l'expression de certains gènes dont certaines cytokines ou NFKB2 qui seront ensuite sécrétées. En retour ces protéines vont stimuler la croissance de la tumeur et l'invasion. Cette Pro-CathD va également agir de façon paracrine en stimulant la croissance invasive des fibroblastes. De plus, cette pro-CathD sécrétée va favoriser l'angiogénèse en se liant sur un récepteur présent sur la membrane de ces cellules, et/ou en libérant et activant des facteurs angiogéniques (après que la Pro-CathD ait été activée dans les zones acides du microenvironnement tumoral).

Tout ceci montre à quel point la Cathepsine D peut jouer des rôles importants dans la progression du cancer, et notamment dans le processus métastatique en stimulant entre autres des cellules endothéliales et des fibroblastes.

⁷¹ D'après : a) P Benes, V Vetvicka, M Fusek ; *Cathepsin D – Many functions of one aspartic protease* ; Critical Review in Oncology/Hematology ; **2008** ; 68 ; 12-28

b) O Masson, AS Bach, D Derocq, C Prébois, V Laurent-Matha, S Pattingre, E Liaudet-Coopman ; *Pathophysiological functions of cathepsin D : Targeting its catalytic activity versus its protein binding activity ?* ; Biochimie ; **2010** ; 92 ; 1635-1643



Par ailleurs, la CathD serait impliquée dans d'autres pathologies importantes. Dans la maladie d'Alzheimer, son expression est augmentée⁷² et elle jouerait un rôle dans la maturation de APP (Amyloid Precursor Protein), apoE (apolipoprotein E) et de la protéine Tau : trois des facteurs importants de cette pathologie⁷³. Une variation génétique de la CathD pourrait également constituer un facteur de risque majeur pour la progression de cette maladie⁷⁴.

Des études ont suggéré que cette enzyme serait aussi impliquée dans la maladie de Parkinson via sa capacité à cliver l' α synucléine (protéine retrouvée agrégée dans les neurones des patients atteints de la maladie de Parkinson)⁷⁵.

Enfin, une étude a montré que l'expression de la CathD est augmentée dans les cerveaux de patients atteints d'autisme. Les auteurs suggèrent que la CathD jouerait un rôle dans le développement de la maladie en régulant le processus apoptotique⁷⁶.

c. Inhibiteurs de la cathepsine D

Les inhibiteurs de la CathD sont nombreux et peuvent être divisés en plusieurs catégories : compétitifs, non compétitifs ou mixtes, instantanés ou progressifs, monovalents ou multivalents,

⁷² a) AM Cataldo, JL Barnett, SA Berman, et al. ; *Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system* ; Neuron ; **1995** ; 14 ; 671-680.

b) A Haque, NL Banik, SK Ray ; *New insights into the roles of endolysosomal cathepsins in the pathogenesis of Alzheimer's disease: cathepsin inhibitors as potential therapeutics* ; CNS Neurol Disord Drug Targets ; **2008** ; 7 ; 270-277.

⁷³ a) A Kenessey, P Nacharaju, LW Ko, SH Yen ; *Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration* ; J Neurochem ; **1997** ; 69 ; 2026-2038.

b) G Sadik, H Kaji, K Takeda, et al. ; *In vitro processing of amyloid precursor protein by cathepsin D* ; Int J Biochem Cell Biol ; **1999** ; 31 ; 1327-1337.

c) W Zhou, SA Scott, SB Shelton, KA Crutcher ; *Cathepsin D-mediated proteolysis of apolipoprotein E: possible role in Alzheimer's disease* ; Neuroscience ; **2006** ; 143 ; 689- 701.

⁷⁴ A Papassotiropoulos, HD Lewis, M Bagli, et al. ; *Cerebrospinal fluid levels of beta-amyloid(42) in patients with Alzheimer's disease are related to the exon 2 polymorphism of the cathepsin D gene* ; Neuroreport ; **2002** ; 13 ; 1291-1294.

⁷⁵ a) V Cullen, M Lindfors, J Ng, et al. ; *Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo* ; Mol Brain ; **2009** ; 2 ; 5.

b) L Qiao, S Hamamichi, K. A Caldwell, et al. ; *Lysosomal enzyme cathepsin D protects against alpha-synuclein aggregation and toxicity* ; Mol Brain ; **2008** ; 1 ; 17.

c) D Sevlever, P Jiang, SH Yen ; *Cathepsin D is the main lysosomal enzyme involved in the degradation of alpha-synuclein and generation of its carboxy-terminally truncated species*. Biochemistry ; **2008** ; 47 ; 9678-9687.

⁷⁶ AM Sheikh, X Li, G Wen, et al. ; *Cathepsin D and apoptosis related proteins are elevated in the brain of autistic subjects* ; Neuroscience ; 2009.

naturels ou synthétiques, endogènes ou exogènes⁷⁷. Ils peuvent donc être des peptides naturels ou synthétiques, être issus de plantes, être des protéines animales ou encore des anticorps. Dans cette partie, nous nous concentrerons sur les analogues de substrat synthétiques, ainsi que sur les inhibiteurs produits par des microorganismes.

Parmi les analogues de substrat décrits, on peut citer des oligopeptides contenant au moins cinq résidus aminoacides avec un des résidus L-aminoacide remplacé par un résidu de type D-aminoacide. Il a été mis en évidence que sur un pentapeptide Pro1 – Phe2 – Phe3 – Val4 – Leu5, la Cathepsine D clive le peptide entre les deux Phe. En remplaçant la L-Leu5 par une D-Leu5, ce pentapeptide devient résistant à la CathD. De même, sur un hexapeptide tel que Gly1 – Phe2 – Leu3 – Gly4 – Phe5 – Leu6, la CathD clive au niveau de la liaison Phe2 – Leu3. En remplaçant un de ces aminoacides L par leur équivalent en série D, il a été montré que les oligopeptides analogues étaient résistants à la dégradation causée par la CathD, mais de surcroît pouvaient exercer une activité inhibitrice (Tableau 2).

Tableau 2 : Hydrolyse et inhibition de la CathD pour quelques analogues de substrat

D-isomère	Hydrolyse, %	Inhibition, %
Gly – Phe – Leu – Gly – Phe – Leu	100	0
Gly – Phe – Leu – Gly – Phe – D-Leu	6	89.2
Gly – Phe – Leu – Gly – D-Phe – Leu	3	73.4
Gly – D-Phe – Leu – Gly – Phe – Leu	0	63.1
Gly – D-Phe – Leu – Gly – D-Phe – Leu	0	0

La vulnérabilité vis-à-vis de la CathD ainsi que la capacité inhibitrice de ces hexapeptides semblent dépendre de la position du D-aminoacide. Plus l'aminoacide D est placé loin du site de clivage, plus l'inhibition sera forte. De plus, les peptides avec la D-Phe au niveau du site de clivage ne sont pas hydrolysés. Ceci a aussi été confirmé par les résultats⁷⁸ du tableau 3 suivant, avec des peptides normalement clivés entre les deux Phe adjacentes. De toute évidence, l'efficacité de l'inhibition dépend du nombre d'aminoacides non naturels présents dans la séquence, ainsi que de leur position.

⁷⁷ M Gacko, A Minarowska, A Karwowska, L Minarowski ; *Cathepsin D inhibitors* ; Folia Histochem. Cytobiol. ; **2007** ; 45 ; 291-313

⁷⁸ TY Lin, HR Williams ; *Inhibition of Cathepsin D by Synthetic Oligopeptides* ; J. Biol. Chem. ; **1979** ; 254 ; 11875-11883.

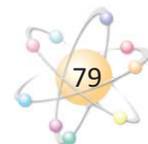


Tableau 3 : Constantes d'inhibition de plusieurs analogues de substrat

Inhibiteurs	K _i μmol/L
pGlu – D-Phe – Pro – Phe – Phe – Val – D-Leu	0.031
D-Phe – Pro – Phe – Phe – Val – D-Leu	0.520
D-Phe – Pro – D-Phe – D-Phe – Val – D-Leu	650
D-Phe – Pro – Phe – Phe – Val	pas d'inhibition

Pour ce qui est des inhibiteurs naturels, les plus importants ont été caractérisés chez des microorganismes de type *Streptomyces*. Ces inhibiteurs ont été appelés pepstatine de par leur capacité à inhiber la pepsine⁷⁹. Ces inhibiteurs sont capables d'inhiber la CathD, mais aussi la CathE, la rénine et d'autres aspartyl protéases⁸⁰.

Les pepstatines sont des pentapeptides contenant des résidus aminoacides naturels (tels que la valine ou l'alanine) mais aussi deux résidus statine qui sont des aminoacides atypiques. La statine est un γ -aminoacide avec une fonction hydroxyle en position β . Les pepstatines ne se différencient que par leur groupement acyl hydrophobe en position N-terminale, qui peut être de type iso-valéryle, caproyle, capryle ou heptanoyle (Figure 28). La présence du groupement hydroxyle sur les statines (en rouge) est primordiale afin d'observer une inhibition de la CathD⁸¹. De ce fait les résidus statine vont avoir un rôle très important dans le processus d'inhibition. Par conséquent, la modification des groupements acyl en N-terminal n'a que peu d'influence sur les IC₅₀ des différentes pepstatines (Tableau 4)⁸². La pepstatine A étant la moins hydrophobe, elle est le plus souvent utilisée dans la littérature pour inhiber les aspartyl-protéases.

⁷⁹ H Umezawa, T Aoyagi, H Morishima, M Matsuzaki, M Hamada, T Takeuchi ; *Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes* ; J. Antibiot. ; **1970** ; 23 ; 259-262.

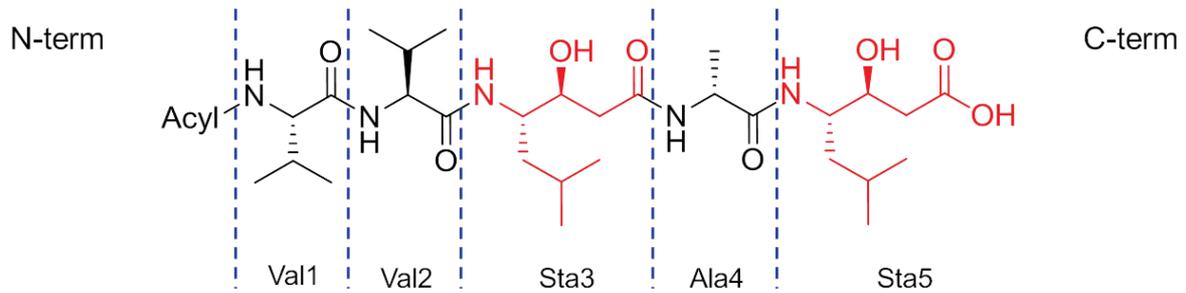
⁸⁰ a) T Aoyagi, H Morishima, R Nishizawa, S Kunimoto, T Takeuchi ; *Biological activity of pepstatins, pepstatone A and partial peptides on pepsin, cathepsin D and renin* ; J Antibiot. ; **1972** ; 25 ; 689-694

b) E Doi, D Shibata, T Matoba, D Yonezawa ; *Characterization of pepstatin-sensitive acid protease in resting rice seeds* ; Agric. Biol. Chem. ; **1980** ; 44 ; 741-747.

c) JM Gunn, RA Owens, WS Liu, GJ Glover ; *Biological activity of aspartic proteinases inhibitors related to pepstatin* ; Acta Biol. Med. Germ. ; **1981** ; 40 ; 1547-1553.

⁸¹ ET Baldwin, TN Bhat, S Gulnik, MV Hosur, I Soder, RE Cachau, J Collin, AM Silva, JW Erickson ; *Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D : implications for lysosomal targeting and drug design* ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA ; **1993** ; 90 ; 6796-6800.

⁸² H Umezawa ; *Protease inhibitors produced by microorganisms* ; Acta Biol. Med. Germ. ; **1977** ; 36 ; 1899-1915.



Pepstatine	Acyl	Structure
A	iso-valeryl	
B	n-caproyl	
C	iso-caproyl	
D	n-heptanoyl	
E	iso-heptanoyl	
F	anteiso-heptanoyl	
G	n-capryl	
H	iso-capryl	

Figure 28: Représentation des différentes pepstatines

Tableau 4 : IC₅₀ de plusieurs pepstatines vis-à-vis de la CathD

Pepstatines	IC ₅₀ (nM)
A	8,8
B	9,3
E	9,1
G	8,9

Une co-cristallisation de la CathD avec la pepstatine A a été obtenue par E.T. Baldwin et al.⁸¹ (Figure 29).

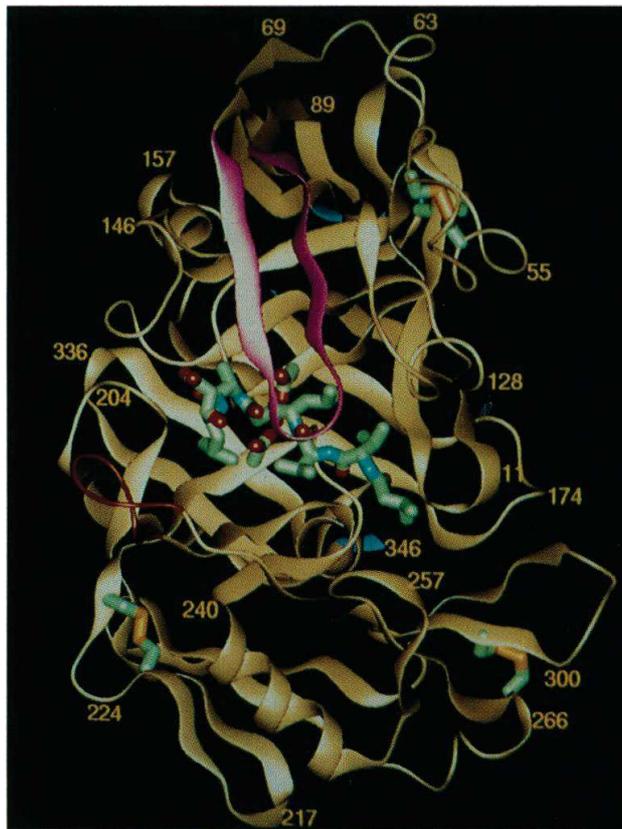


Figure 29: Structure du complexe pepstatine – CathD⁸¹

Cette étude cristallographique⁸¹ a pu mettre en évidence que la pepstatine A interagit avec le site catalytique de la CathD en formant des liaisons hydrogène. Il est important de noter en particulier des interactions entre les Asp231 et 33 et le groupement hydroxyle de la statine 3 de l'inhibiteur (Figure 30).

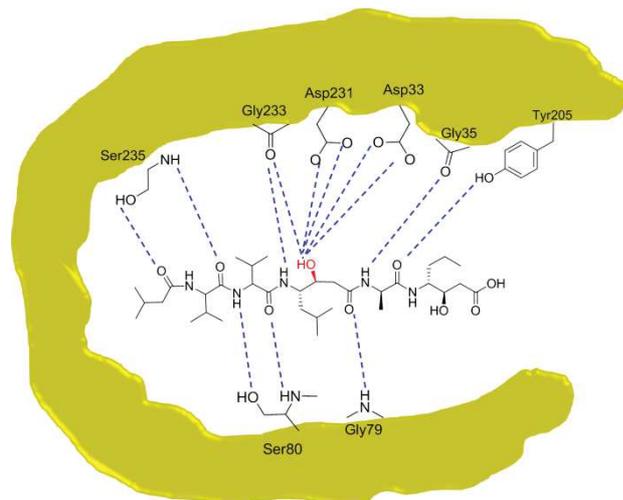


Figure 30 : Interactions entre la pepstatine A et la CathD. Le OH du résidu statine en rouge est en interaction avec les deux acides aspartique du site catalytique

Comme mentionné précédemment, l'activité inhibitrice des pepstatines est due à la présence des résidus statines. En effet, ces résidus vont mimer l'état de transition du substrat lors de son clivage par l'enzyme (Schéma 12). Lors de la coupure, le substrat passe par un état de transition instable et très affiné pour l'enzyme contenant un carbone tétrahédrique avant que la liaison peptidique ne soit rompue. Le résidu statine va mimer cet état de transition tétrahédrique dans un état stable de haute affinité, bloquant ainsi l'enzyme et l'inhibant.

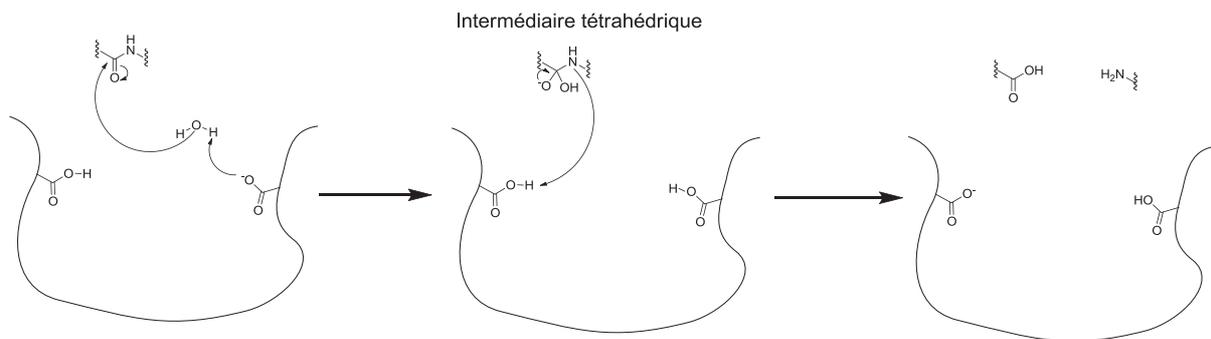


Schéma 12 : Mécanisme du clivage peptidique par la CathD

En 1986, l'équipe d'Agarwal a testé différents analogues de la pepstatine. Dans leur étude, ils ont pu mettre en évidence l'importance de la nature de certains résidus, notamment ceux en position P_3' et P_4 (Figure 31)⁸³. Ceux-ci correspondent respectivement à la chaîne latérale de la statine en C-ter du peptide, et à l'isovaléryl en N-ter.

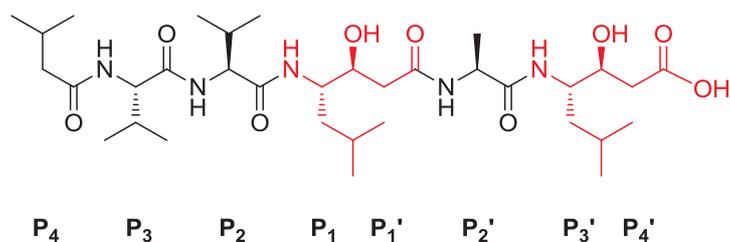
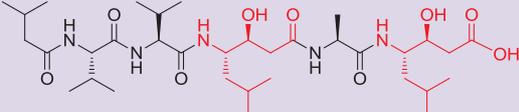
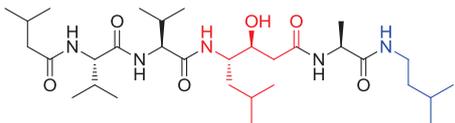
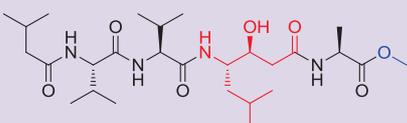
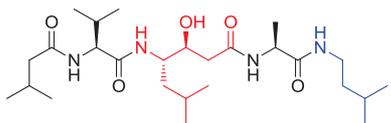
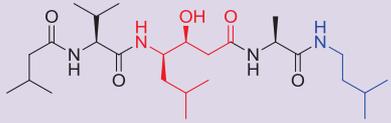
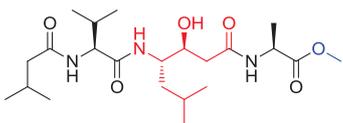
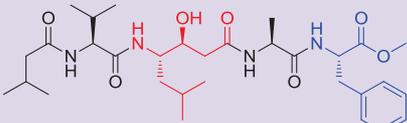


Figure 31 : Position des résidus de la pepstatine

Ainsi, ils ont apporté des modifications sur la pepstatine en synthétisant 36 analogues, dont quelques exemples sont cités dans le tableau 5 suivant, mais aucun n'a montré de meilleure activité que la pepstatine A.

⁸³ NS Agarwal, DH Rich ; *Inhibition of cathepsin D by substrate analogues containing statine and by analogues of pepstatin* ; J. Med. Chem. ; **1986** ; 29 ; 2519-2524.

Tableau 5 : Inhibition de la CathD par des analogues de la pepstatine A

Numéro	Composé	K_i (nM)
1	Iva-Val-Val-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)Sta-Ala-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)Sta-OH 	0,5
2	Iva-Val-Val-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)Sta-Ala- <i>laa</i> 	3,7
3	Iva-Val-Val-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)Sta-Ala-OMe 	90
4	Iva-Val-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)Sta-Ala- <i>laa</i> 	220
5	Iva-Val-(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)Sta-Ala- <i>laa</i> 	2100
6	Iva-Val-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)Sta-Ala-OMe 	1800
7	Iva-Val-(3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)Sta-Ala-Phe-OMe 	23

Il apparait avec ces quelques analogues que le résidu en position P_3' joue un rôle important dans l'inhibition de la CathD. En effet, réduire la statine en isoamylamine (*laa*) (composé 2) augmente le K_i environ 7 fois, et remplacer ce résidu par un hydroxyméthyl fait passer le K_i à 90, soit 180 fois plus élevé que pour la pepstatine (composé 1). De même, remplacer l'ester méthylique de l'alanine du composé 6 par insertion d'un résidu supplémentaire (Phe-OMe) permet de réduire le K_i

d'un facteur proche de 80. Ceci confirme bien l'importance d'avoir une chaîne latérale hydrophobe en P₃' pour permettre une bonne reconnaissance de l'enzyme. De plus, le résidu en P₄ joue lui aussi un rôle puisqu'en comparant deux à deux les composés 2 et 4 puis 3 et 6, il est visible que le fait de retirer une valine (et donc de supprimer le résidu en position P₄) entraîne une nette augmentation du K_i. Enfin, inverser la stéréochimie de la chaîne latérale de la statine (composés 4 et 5) entraîne une augmentation du K_i (facteur 10). Cette étude ainsi que celle de l'équipe de Majer⁸⁴ tendent à montrer que toute modification apportée à la pepstatine entraîne une baisse de son activité, et que par conséquent cet inhibiteur est difficilement modifiable ou optimisable.

L'équipe d'Agarwal a également testé des substrats analogues contenant des résidus statine. Pour ne citer qu'un exemple, ils ont remplacé les groupements Nph-Phe d'un peptide (Phe-Ala-Ala-Phe(NO₂)-Phe-Val-Leu-OMe) affiné pour la CathD, par Sta ou Sta-Phe (Tableau 6).

Tableau 6 : Inhibition de la CathD par des analogues de substrat contenant une statine

Numéro	Composé	K _i (nM)
8	Boc-Phe-Ala-Ala- Sta -Phe-Val-Leu-OMe	60
9	Boc-Phe-Ala-Ala- Sta -----Val-Leu-OMe	12

Ces tests ont permis de montrer qu'à partir d'un peptide qui interagit efficacement avec la CathD de part et d'autre de la liaison hydrolysée, il est possible de synthétiser des inhibiteurs en remplaçant les résidus impliqués dans l'hydrolyse par une statine.

Bien que la pepstatine ait montré une très forte activité inhibitrice sur la CathD, d'autres molécules ont été développées, et notamment des petites molécules de nature non peptidique. En 1999, l'équipe de Dumas a ainsi rapporté une quarantaine de composés inhibiteurs compétitifs réversibles de la CathD. Parmi tous ces composés, ceux ayant présenté la meilleure IC₅₀ sont les suivants, en comparaison avec la pepstatine A⁸⁵ (Tableau 7) :

⁸⁴ P Majer, JR Collins, SV Gulnik, JW Erickson ; *Structure-based subsite specificity mapping of human cathepsin D using statine-based inhibitors* ; Protein Science ; **1997** ; 6 ; 1458-1466.

⁸⁵ J Dumas, D Brittelli, J Chen, B Dixon, H Hatoum-Mokdad, G König, R Sibley, J Witowsky, S Wong ; *Synthesis and structure activity relationships of novel small molecule cathepsin D inhibitors* ; Bioorg. Med. Chem. Lett. ; **1999** ; 9 ; 2531-2536.

Tableau 7 : Structures et IC₅₀ des composés de Dumas et al.⁸⁵

Structure de Base	Modifications	CathD IC ₅₀ (μM)
Pepstatine A	Aucune	0,002
	R ₁ = Cl R ₂ = H	1,2
	R ₁ = H R ₂ = CF ₃	1,1
	X = C	1,8
	X = SO	1,5
	X = SO Y = O	0,46
	X = C Y = NH	0,25
	X = C Y = O	0,49

Malgré la diversité des composés synthétisés et testés, aucun ne présente une meilleure activité que la pepstatine A pour inhiber la CathD. Ceci peut certainement s'expliquer par l'absence d'un groupement du type de la fonction hydroxyle de la pepstatine, ne permettant pas de mimer l'état de transition tétrahédrique, montrant une fois encore l'importance de ce groupement pour la pepstatine.

Deux autres exemples peuvent être cités pour confirmer l'importance de la présence de l'hydroxyle : des tripeptides synthétisés par l'équipe de Bessodes⁸⁶, ainsi que des groupements isostères de type hydroxyéthylamine rapportés par l'équipe de McConnell⁸⁷ (Figure 32).

⁸⁶ M Bessodes, K Antonakis, J Herscovici, M Garcia, H Rochefort, F Capony, Y Lelièvre, D Scherman ; *Inhibition of cathepsin D by tripeptides containing statine analogs* ; Biochem. Pharmacol. ; **1999** ; 58 ; 329-333.

⁸⁷ a) RM McConnell, AW Green, CJ Trana, MS McConnell, JF Lindley, K Sayyar, WE Godwin, SE Hatfield ; *New cathepsin D inhibitors with hydroxyethylamine isosteres : preparation and characterization* ; Med. Chem. ; **2006** ; 2 ; 27-38.

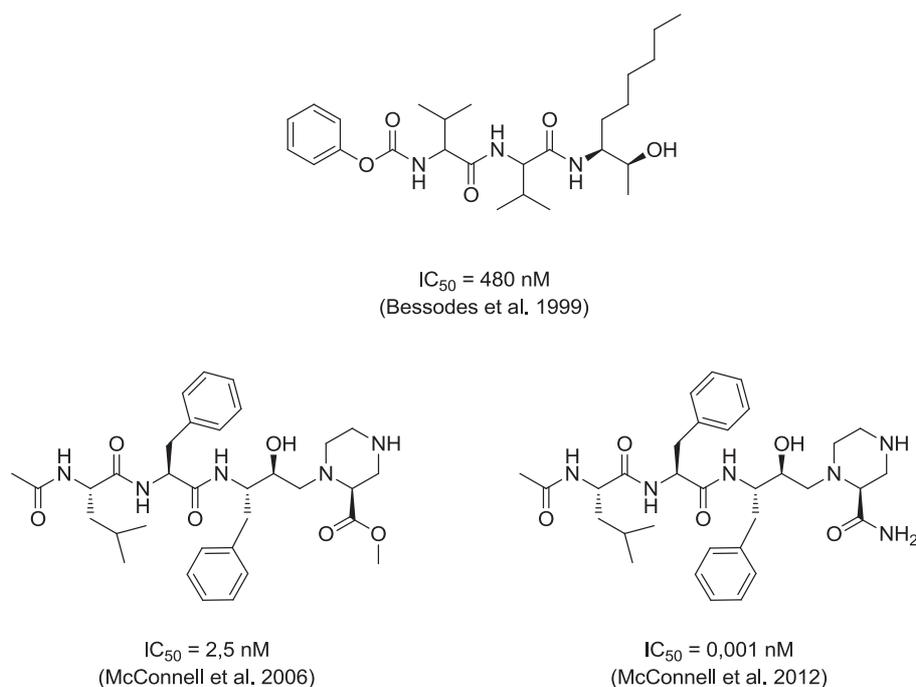


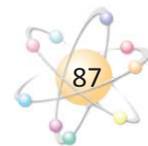
Figure 32 : Structure d'inhibiteurs tripeptidiques de CathD sous forme de tripeptides et comportant des isostères de type hydroxyéthyle

Le premier composé présente une IC_{50} sub-micromolaire, et les deux derniers, nanomolaire à picomolaire.

Cependant, la pepstatine A est restée l'inhibiteur de référence pour inhiber la CathD (avec une IC_{50} de 7 nM sur enzyme isolée). Il faut noter que ce composé ne traverse pas ou peu les membranes cellulaires⁸⁸. Notre équipe a pu développer, il y a peu, un bioconjugué qui a permis de confirmer que l'inhibition de la CathD intracellulaire pouvait conduire à l'inhibition de la prolifération tumorale. Ce conjugué, le JMV4463, sera présenté plus loin.

b) RM McConnell, K Inapudi, N Kadasala, K Yarlagadda, P Velusamy, MS McConnell, A Green, C Trana, K Sayyar, JS McConnell ; *New cathepsin D inhibitor library utilizing hydroxyethyl isosteres with cyclic tertiary amines* ; Med. Chem. ; **2012** ; 8 ; 1146-1154.

⁸⁸ M Fusek, V Vetvicka ; *Dual role of cathepsin D : ligand and protease* ; Biomed. Pap. ; **2005** ; 149 ; 43-50.



IV) Des vecteurs pour franchir les membranes cellulaires

De nos jours, il existe énormément de méthodes différentes et plus ou moins complexes pour vectoriser une substance active, qui sont plus ou moins élaborées. Nous allons ici nous concentrer sur la structure des membranes cellulaires, ainsi que sur les CPP (Cell Penetrating Peptide) et CPNP (Cell Penetrating Non Peptide), qui sont des vecteurs peptidiques, ou mimes de peptides, respectivement.

a. La membrane cellulaire⁸⁹

Tout d'abord, il est nécessaire de définir la membrane cellulaire, ainsi que les différents modes de transport membranaire.

La structure de base de la membrane cellulaire est constituée d'une bicouche de lipides (environ 5 nm d'épaisseur) épaisse d'une cinquantaine d'atomes environ, ainsi que de protéines. Cependant sa simplicité structurale cache des propriétés diverses et variées lui permettant d'être très sélective quant aux échanges qu'elle peut effectuer entre le cytosol et le milieu extérieur. En effet, pour survivre et proliférer, la cellule a besoin de nutriments venant de l'extérieur, mais elle doit également évacuer des déchets vers le milieu extracellulaire. Pour permettre les échanges, la membrane est « percée » de canaux et pompes très spécifiques composés de protéines.

Contrairement à de simples bactéries qui ne contiennent qu'une membrane plasmique, les cellules eucaryotes contiennent en plus des membranes internes qui délimitent les différents compartiments de la cellule. Ainsi, les membranes des endosomes, réticulum endoplasmique, appareil de golgi ou encore les lysosomes ont la même structure que les membranes cellulaires.

La bicouche lipidique est la structure universelle de toutes les membranes cellulaires. Les lipides la constituant combinent deux propriétés opposées : l'hydrophobie et l'hydrophilie. Les lipides les plus répandus sont des phospholipides et sont constitués d'une tête hydrophile reliée par un groupement phosphate à une queue hydrophobe. Les deux chaînes hydrophobes sont, à l'origine, des acides gras dans lesquels des coudes peuvent apparaître au niveau de leurs insaturations. Ces molécules sont dites amphipathiques et partagent ces propriétés avec d'autres

⁸⁹ B Alberts, D Bray, K Hopkin, A Johnson, J Lewis, M Raff, K Roberts, P Walter ; *L'essentiel de la biologie cellulaire 2^{ème} édition* ; éditions Flammarion ; **2005**.

lipides membranaires tels que les stérols (cholestérol) ou les glycolipides. Ces derniers se glissent dans les interstices laissés par les coudes des lipides (Figure 33).

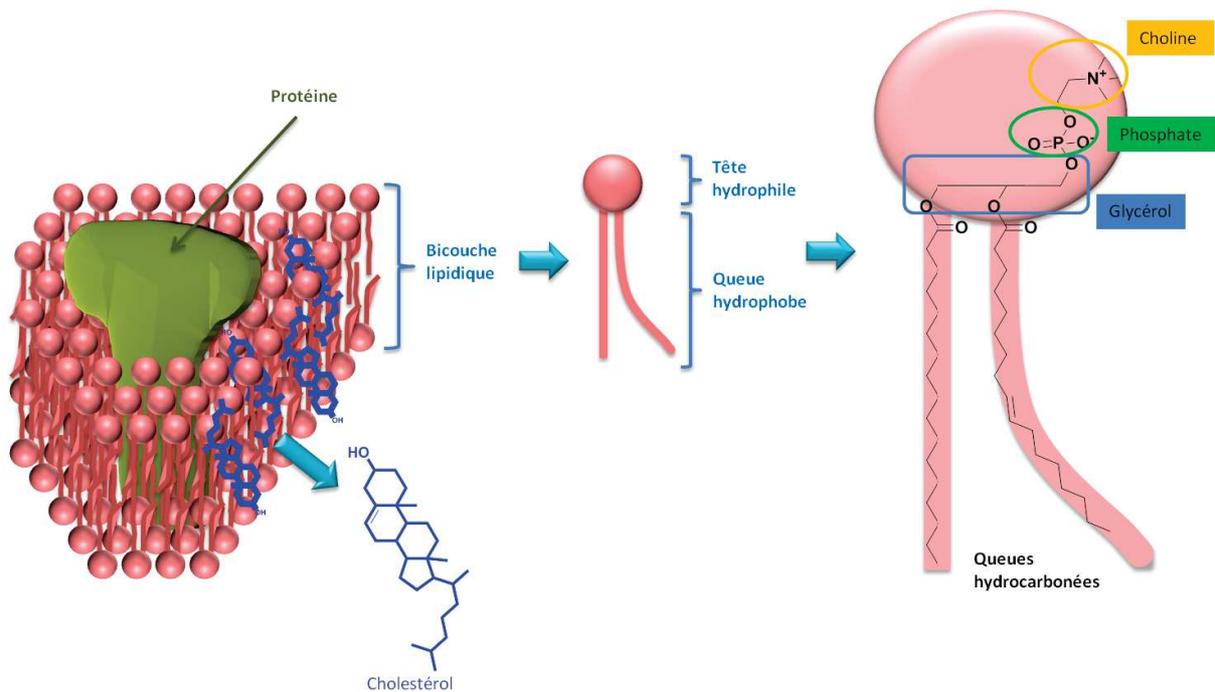


Figure 33 : Structure des lipides et de la bicouche lipidique

Cette membrane est en perpétuel « mouvement » grâce à sa particularité de fluide bidimensionnel. En effet, l'environnement intra et extracellulaire étant aqueux, il est impossible pour les lipides de s'échapper de la bicouche lipidique. Mais rien ne les empêche de se « déplacer » en échangeant leur place entre eux dans le plan de la bicouche. La facilité avec laquelle les lipides peuvent se déplacer au sein de la bicouche est appelée fluidité de la membrane et dépend de sa composition. Ainsi, les lipides peuvent subir des flexions, des rotations, des échanges de position, ou encore passer d'une couche à l'autre.

Comme mentionné plus haut, les membranes sont également constituées de protéines membranaires. Celles-ci sont indispensables à la survie de la cellule. En effet, certaines servent de point d'ancrage pour d'autres macromolécules (d'un côté ou de l'autre), d'autres sont des récepteurs qui détectent les signaux chimiques dans l'environnement cellulaire et les relaient à l'intérieur et d'autres encore sont des enzymes qui catalysent des réactions spécifiques. On peut aussi trouver des protéines de transport membranaire (Figure 34).

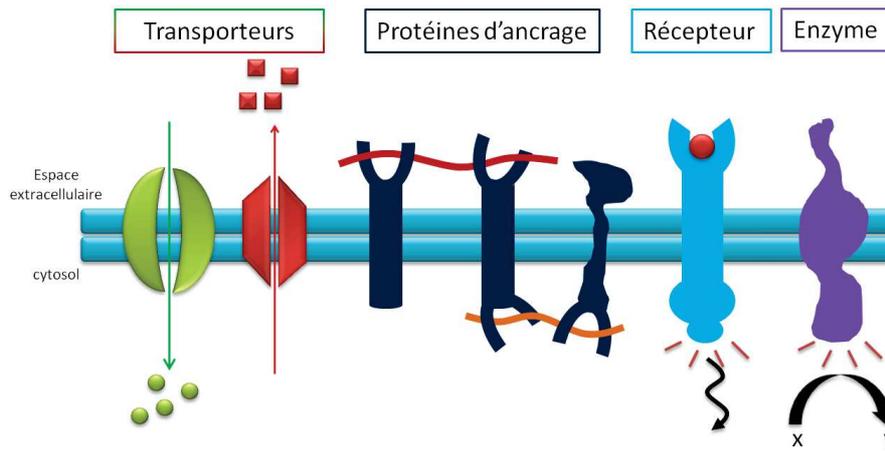


Figure 34 : Liste des différentes protéines membranaires

Chaque type de cellule contient un ensemble différent de protéines membranaires. Ces dernières s'associent à la bicouche lipidique de différentes manières (Figure 35). On va retrouver des protéines :

- Transmembranaires : les protéines traversent une ou plusieurs fois la bicouche lipidique. La zone hydrophobe de la protéine va se situer au milieu de la membrane, alors que les extrémités plus hydrophiles seront en contact avec l'espace extracellulaire ou le cytosol.
- Associées à la membrane : certaines protéines membranaires sont entièrement situées dans le cytosol, associées au feuillet interne de la bicouche par une hélice α amphipatique exposée à la surface de la protéine.
- Liées à un lipide : certaines protéines sont entièrement à l'extérieur de la bicouche lipidique, et ne sont reliées à la membrane que par une liaison covalente à un ou plusieurs lipides.
- Attachées à une protéine : d'autres protéines sont indirectement liées à la membrane uniquement grâce à des interactions avec d'autres protéines membranaires.

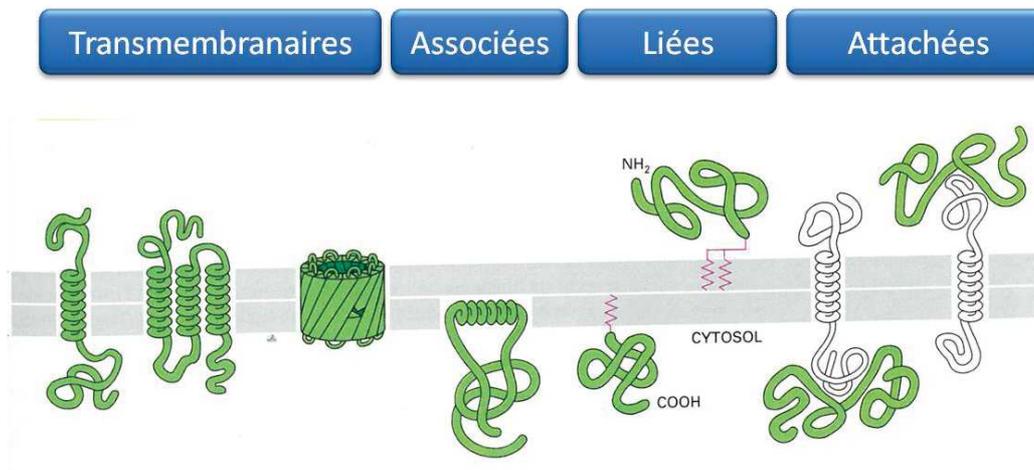
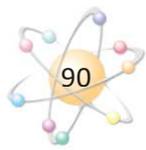


Figure 35 : Types de fixation des protéines membranaires à la membrane cellulaire⁸⁹



Certaines des protéines transmembranaires vont servir de « transporteur » pour la cellule. Il est important de noter qu'il existe deux types de transport cellulaire : un mode passif qui va dans le sens du gradient (de la zone la plus concentrée en soluté vers la moins concentrée) et qui ne nécessite pas d'énergie, et un mode actif qui va dans le sens contraire du gradient mais qui nécessite de l'énergie.

Le mode de transport passif regroupe trois manières de traverser la membrane cellulaire (Schéma 13) :

- La diffusion : les petites molécules hydrophobes (O_2 , CO_2 , N_2) et les petites molécules polaires non chargées (H_2O , glycérol, éthanol) vont pouvoir traverser la membrane par diffusion assez rapidement. En effet, les premières étant hydrophobes, elles vont pouvoir s'insérer dans la couche lipidique aisément, alors que les secondes ne le feront que grâce à leur petite taille. En revanche, les grosses molécules polaires non chargées telles que le glucose ou les acides aminés ne pourront pas entrer dans la cellule par ce biais à cause de leur taille. De plus, la bicouche lipidique est entièrement imperméable aux molécules chargées (H^+ , Na^+ , Ca^{2+} , etc...).
- Les canaux : un canal protéique forme un pore hydrophile à travers la membrane et des ions inorganiques spécifiques peuvent y circuler. Les canaux peuvent être ouverts ou fermés, état qui est contrôlé par un stimulus externe ou interne.
- Les protéines de transport : certaines protéines assurent le transport membranaire de presque toutes les petites molécules organiques (sauf les molécules chargées ou liposolubles qui traversent par simple diffusion) et sont très sélectives. Par exemple, l'aquaporine permet le passage de molécules d'eau sans ions ou solutés ; la lactose perméase permet le passage du lactose dans les cellules grâce au gradient de protons ; ou encore la calcium ATPase qui ne fait passer que les ions Ca^{2+} .

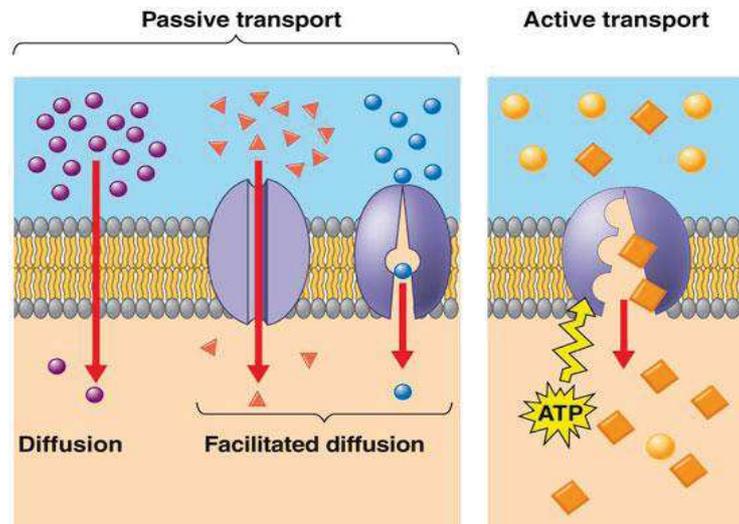


Schéma 13 : Mécanisme des différents modes de transport membranaire⁹⁰

Mais il est nécessaire pour la cellule de pouvoir aussi importer des molécules en allant à l'encontre du gradient de concentration. Il existe pour ça trois modes de transport actif (Schéma 14). Les transporteurs couplés vont utiliser comme source d'énergie le transport d'un soluté dans le sens de son gradient, afin de faire traverser une molécule dans le sens contraire de son gradient (exemple de la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ des cellules eucaryotes). Comme leur nom l'indique, les pompes entraînées par l'ATP vont permettre le passage d'une molécule dans le sens contraire de son gradient via l'hydrolyse de l'ATP. Enfin il existe chez certaines bactéries des pompes entraînées par la lumière.

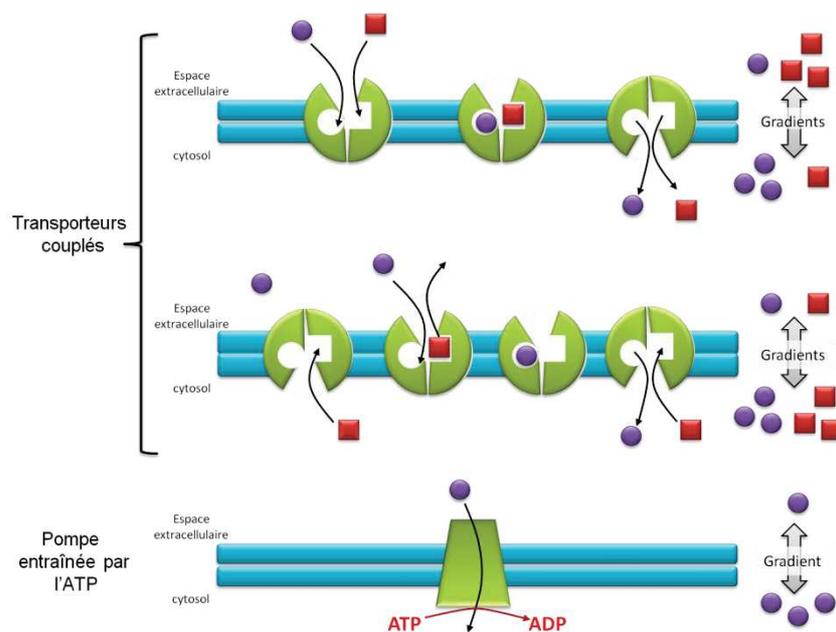


Schéma 14 : Fonctionnement des différents modes de transport actif

⁹⁰ <http://www.microbiologie-medicale.fr/microbiologie-generale/structure-bacterienne.html>; consulté en Janvier 2016

Au-delà de ces modes de transport membranaire, il existe un autre procédé qui permet à la cellule d'intégrer du matériel extracellulaire : l'endocytose. Le matériel à ingérer est progressivement entouré et enfermé dans une petite portion de la membrane plasmique qui va d'abord bourgeonner vers l'intérieur de la cellule pour ensuite se détacher. La vésicule endocyttaire intracellulaire ainsi formée (endosome) va ensuite aller livrer son contenu aux lysosomes où il sera digéré. Trois types d'endocytose sont distingués : la phagocytose, la pinocytose et l'endocytose à récepteurs (Figure 36).

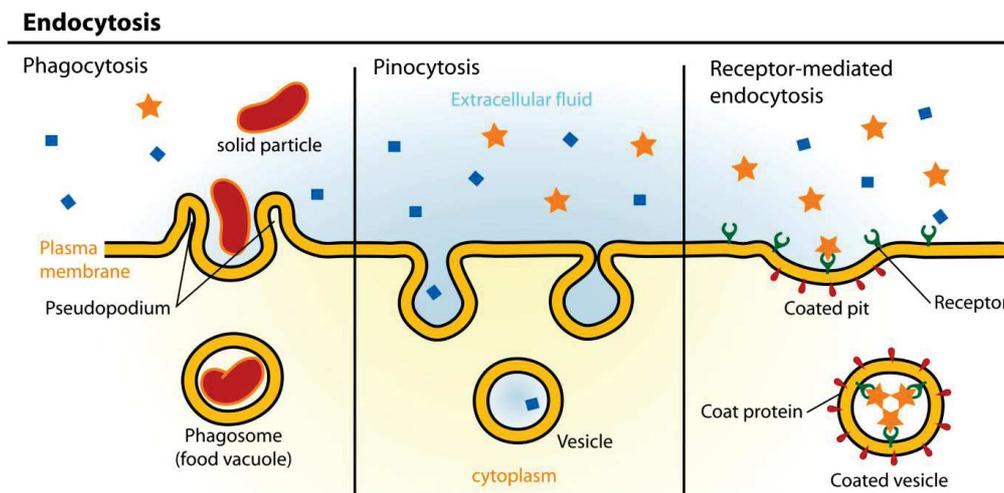


Figure 36 : Les différents types d'endocytose

La phagocytose consiste en la capture et l'ingestion des particules solides inertes ou vivantes du milieu. Elle concerne en général des éléments solides, contrairement à la pinocytose qui consiste à absorber des gouttelettes de liquide extracellulaire. Il s'agit d'une micropinocytose si la vésicule transportée fait environ 80 nm de diamètre, et d'une macropinocytose si la gouttelette invaginée fait environ 1 μm de diamètre. L'endocytose récepteur-dépendante est déclenchée principalement par l'interaction entre un ligand et son récepteur membranaire. Cette dernière est donc une endocytose spécifique. Une fois la vésicule formée, les récepteurs membranaires sont recyclés et transportés vers la membrane de la cellule. La plupart du temps, cette internalisation se fait avec l'intervention de la clathrine (protéine structurelle) (Schéma 15). Celle-ci forme un manteau autour de la vésicule en formation. Une fois la vésicule complètement internalisée, ce manteau de clathrine se sépare pour laisser la vésicule nue.

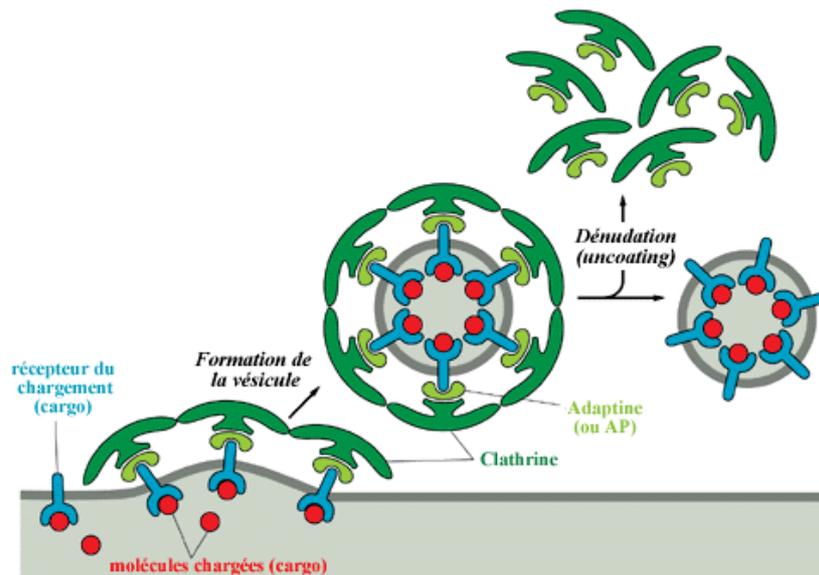
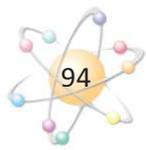


Schéma 15 : Internalisation avec la clathrine

Durant son voyage dans l'endosome, dont le milieu est progressivement rendu acide grâce à des pompes à protons, le matériel ingéré va être trié. Ainsi, certaines molécules liées à certains récepteurs membranaires lors de l'endocytose vont être réexpédiées vers l'extérieur de la cellule, et les autres vont être acheminées vers les lysosomes en passant par plusieurs étapes de maturation de l'endosome : l'endosome précoce (juste après endocytose) puis l'endosome tardif (près du noyau). Les endosomes précoces se transforment en endosomes tardifs soit par maturation, soit par fusion avec un endosome tardif préexistant. Enfin l'endosome tardif va aller fusionner avec un lysosome. Ce dernier est un sac membraneux d'enzymes hydrolytiques responsables de la digestion intracellulaire du matériel extracellulaire qui lui est livré, mais également d'organites usés. Les lysosomes contiennent une quarantaine d'enzymes différentes qui vont dégrader les protéines, les acides nucléiques, les oligosaccharides et les phospholipides. Ces enzymes sont très efficaces dans le milieu lysosomal grâce à l'acidité qui y est maintenue à un pH entre 3,5 et 5. Si elles venaient à s'échapper dans le cytosol, la neutralité du milieu les rendrait beaucoup moins actives.

Pour conclure sur cette partie concernant la membrane cellulaire et les modes d'internalisation, nous avons pu voir que ceux-ci sont régis par différents mécanismes plus ou moins complexes qui permettent à la cellule de contrôler les flux entrant et sortant. Cette membrane constitue une barrière qui reste difficile à franchir pour de nombreuses molécules susceptibles d'avoir des effets thérapeutiques intracellulaire. C'est pourquoi la vectorisation de ces composés à fort potentiel médicinal reste un enjeu de taille pour développer des traitements innovants.



Les vecteurs utilisés ne doivent pas avoir d'effets pharmacologiques et doivent être capables de franchir la membrane en entraînant avec eux les substances actives ou cargo. Celles-ci vont être liées de façon covalente ou non à leur vecteur. De plus, le vecteur utilisé doit être suffisamment résistant à la dégradation métabolique mais doit également pouvoir être éliminé assez aisément. Enfin, il ne doit pas induire de réponse immunitaire de l'organisme.

Parmi tous les types de vecteurs existant, nous allons d'abord présenter les CPP : les « Cell Penetrating Peptides », ou peptides de pénétration cellulaire.

b. Les CPP

Les CPP sont des vecteurs de pénétration cellulaire peptidiques de différentes tailles et de différentes natures. Les CPP existent depuis plus de 20 ans et sont généralement décrits comme des peptides de moins de 40 acides aminés. Ils sont capables de traverser la membrane cellulaire via des mécanismes dépendants et/ou indépendants d'un apport énergétique tout en possédant une faible toxicité. Ces peptides peuvent être des dérivés de protéines, de séquences chimériques (fusion de deux séquences naturelles), mais ils peuvent aussi être élaborés grâce à l'étude de relations structure-activité établissant les requis structuraux pour la pénétration cellulaire⁹¹. La plupart des CPP sont amphipathiques et chargés positivement⁹², mais il a aussi été montré qu'il était possible d'utiliser quelques peptides anioniques ou hydrophobes. Ces vecteurs peuvent transporter leur cargo à travers les membranes cellulaires de deux manières différentes selon les substrats : soit par une liaison covalente entre le peptide et la substance active⁹³, soit par la formation d'un complexe stable non covalent⁹⁴.

⁹¹ R Brasseur, G Divita ; *Happy birthday cell penetrating peptides : already 20 years* ; *Biochimica et Biophysica Acta* ; **2010** ; 1798 ; 2177-2181.

⁹² a) U Langel ; *Cell-Penetrating Peptides : Processes and Applications* ; CRC Press, Boca Raton ; **2002**.

b) U Langel ; *Handbook of Cell-Penetrating Peptides*, CRC Taylor & Francis ; Boca Raton ; **2007**.

⁹³ a) TS Zatsepin, JJ Turner, TS Oretskaya, MJ Gait ; *Conjugates of oligonucleotides and analogues with cell penetrating peptides as gene silencing* ; *Curr. Pharm. Des.* ; **2005** ; 11 ; 3639-3654.

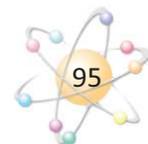
b) S El-Andaloussi, T Holm, Ü Langel ; *Cell-penetrating peptides: mechanism and applications* ; *Curr. Pharma. Des.* ; **2005** ; 11 ; 3597-3611.

c) A Joliot, A Prochiantz ; *Transduction peptides: from technology to physiology* ; *Nat. Cell Biol.* ; **2004** ; 6 ; 189-196.

d) VP Torchilin ; *Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers* ; *Adv. Drug Deliv. Rev.* ; **2008** ; 60 ; 548-558.

⁹⁴ a) S Deshayes, MC Morris, F Heitz, G Divita ; *Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy* ; *Adv. Drug Deliv. Rev.* ; **2008** ; 60 ; 537-547.

b) S Deshayes, MC Morris, G Divita, F Heitz ; *Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics* ; *Cell. Mol. Life Sci.* ; **2005** ; 62 ; 1839-1849.



i. Un peu d'histoire

La première observation des CPP a été réalisée en 1988 par Frankel et Pabo⁹⁵. Ils ont mis en évidence que la protéine TAT du virus d'immunodéficience humaine (VIH-1) était capable de traverser la membrane cellulaire efficacement, contrairement aux autres protéines. En 1991, l'équipe de Prochiantz a fait la même observation avec l'homéodomaine de la protéine Antennapedia de la drosophile, qui traversait les membranes des cellules neuronales⁹⁶. Ces travaux sont à l'origine de la découverte en 1994 du premier domaine de transduction de protéine, un peptide de 16 résidus dérivé de la troisième hélice de l'homéodomaine d'Antennapedia appelé Pénétratine⁹⁷.

En 1997, l'équipe de Lebleu a identifié une séquence de 13 acides aminés dérivée de TAT capable de traverser les membranes cellulaires avec d'aussi bons résultats que la protéine entière⁹⁸. Ils ont ainsi pu mettre en évidence un nouveau CPP.

Ce n'est qu'en 1998 que la notion de « Cell Penetrating Peptide » a été introduite. C'est l'équipe de Langel qui en est à l'origine, avec la conception du premier peptide chimérique : le Transportan. Ce vecteur est dérivé d'un fragment N-terminal du neuropeptide galanine lié au mastoparan, un peptide issu du venin de guêpe⁹⁹.

Dans les années 2000, les équipes de Wender et Futaki ont montré qu'une séquence composée d'un octamère de l'arginine (Arg₈) était suffisant pour conduire de petits et gros cargos dans les cellules et *in vivo*¹⁰⁰.

c) EL Snyder, SF Dowdy ; Recent *advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo* ; Expert Opin. Drug Deliv. ; **2005** ; 2 ; 43-51.

d) A Eguchi, SF Dowdy ; *siRNA delivery using peptide transduction domains* ; Trends Pharmacol. Sci. ; **2009** ; 30 ; 341-345.

⁹⁵ AD Frankel, CO Pabo ; Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus ; Cell ; **1998** ; 55 ; 1189-1193.

⁹⁶ A Joliot, C Pernelle, H Deagostini-Bazin, A Prochiantz ; *Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis* ; Proc. Natl Acad. Sci. USA ; **1991** ; 88 ; 1864-1868.

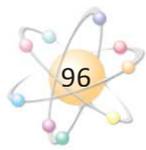
⁹⁷ D Derossi, AH Joliot, G Chassaing, A Prochiantz ; *The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes* ; J. Biol. Chem. ; **1994** ; 269 ; 10444-10450.

⁹⁸ E Vives, P Brodin, B Lebleu ; *A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus* ; J. Biol. Chem. ; **1997** ; 272 ; 16010-16017.

⁹⁹ M Pooga, U Soomets, M Hällbrink, A Valkna, K Saar, K Rezaei, U Kahl, JX Hao, XJ Xu, Z Wiesenfeld-Hallin, T Hökfelt, T Bartfai, U Langel ; *Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo*, Nat. Biotechnol. ; **1998** ; 16 ; 857-861.

¹⁰⁰a) PA Wender, DJ Mitchell, K Pattabiraman, ET Pelkey, L Steinman, JB Rothbard ; *The design, synthesis and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters* ; Proc. Natl Acad. Sci. USA ; **2000** ; 97 ; 13003-13008.

b) S Futaki, T Suzuki, W Ohashi, T Yagami, S Tanaka, K Ueda, Y Sugiura ; *Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery* ; J. Biol. Chem. ; **2001** ; 276 ; 5836-5840.



Depuis, de nouveaux CPP dérivés de séquences naturelles ou non naturelles sont constamment développés et leur nombre ne cesse de croître.

ii. Structures et classification

Nonobstant la grande variété de séquences qui constituent les CPP, il est possible d'identifier trois classes principales : les CPP cationiques, amphipathiques et hydrophobes¹⁰¹. Ces trois familles vont être décrites dans la suite de ce manuscrit.

1. Les CPP cationiques

Un CPP est considéré comme cationique s'il contient un ensemble de charges positives essentielles pour la pénétration cellulaire, et si la structure 3D ne montre pas de formation d'hélices amphipathiques.

En guise de premier exemple de CPP cationique je citerai de nouveau le premier CPP qui fut découvert, dérivé de la protéine Tat du VIH-1¹⁰². Il présente 8 résidus cationiques sur les 13 le constituant (GRKKRRQRRRPPQ). Deux autres peptides représentatifs de cette catégorie sont les polyarginines et la pénétratine. Cette dernière incorpore 7 résidus cationiques dans sa structure (RQKIWFQNRRMKWKK) (Figure 37).

¹⁰¹ F Milleti ; *Cell-penetrating peptides : classes, origin, and current landscape* ; Drug Discovery Today ; **2012** ; 17 ; 850-860.

¹⁰² M Green, M Ishino, PM Loewenstein ; *Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides : identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression* ; Cell ; **1989** ; 58 ; 215-223.

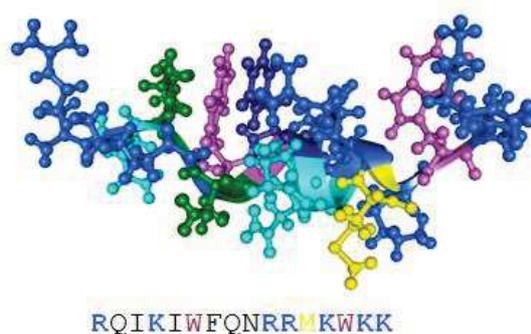


Figure 37 : Représentation de la pénétratine¹⁰³

Des études sur différentes polyarginines (de R₃ à R₁₂) ont montré que la taille minimale pour observer une pénétration cellulaire était une octaarginine¹⁰¹, possédant par conséquent 8 charges positives. L'équipe de Tünnemann a par la suite pu mettre en évidence, dans une étude comparant les polyArg aux polyLys, que les groupements guanidinium avaient un rôle crucial par rapport aux groupements amine pour l'efficacité de la pénétration cellulaire¹⁰⁴. Ceci a pu être récemment expliqué par l'équipe de Li. D'après eux, l'arginine chargée et la lysine chargée causeraient des déformations similaires sur la membrane plasmique. Cependant, l'arginine peut créer plus de liaisons hydrogènes que la lysine, entraînant de plus grandes déformations de la membrane et favorisant donc la pénétration. De plus il a été montré que la lysine serait très probablement déprotonée dans la membrane, à l'inverse de l'arginine qui retient plus fortement sa charge. Ceci explique pourquoi la poly-arginine traverse la membrane cellulaire, et non la poly-lysine.

2. Les CPP amphipathiques

Les composés amphipathiques sont définis comme possédant à la fois des caractéristiques hydrophobes et hydrophiles. Il est possible de trouver quatre types de CPP amphipathiques : les primaires, les secondaires formant des hélices α , les secondaires formant des feuillets β et enfin les riches en proline.

Plusieurs CPP amphipathiques primaires sont des peptides chimériques obtenus en couplant un domaine hydrophobe efficace pour cibler la membrane cellulaire à une NLS. Les NLS (Nuclear Localization Sequences) sont des peptides courts basés sur des motifs riches en arginine, lysine ou

¹⁰³ <http://www.biosyn.com/tew/cell-penetrating-or-trojan-peptides-cpps.aspx>; consulté en Janvier 2016

¹⁰⁴ a) G Tünnemann, G Ter-Avetisyan, RM Martin, M Stöckl, A Herrmann, MC Cardoso ; *Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines* ; J. Pept. Sci. ; **2008** ; 14 ; 469-476.

b) L Li, I Vorobyov, TW Allen ; *The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membrane* ; J. Phys. Chem. ; **2013** ; 117 ; 11906-11920.

proline ciblant les protéines du noyau. Par exemple, MPG¹⁰⁵ (GLAFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKRKV) et Pep-1¹⁰⁶ (KETWWETWWTEWSQPKKRKV) sont tous les deux basés sur la séquence NLS du virus simien 40 (ou SV40) : PKKRKV. La partie hydrophobe de MPG est dérivée de la protéine gp41 du HIV (GALFLGFLGAAGSTMGA), tandis que celle de Pep-1 correspond à un peptide riche en tryptophane (KETWWETWWTEW) possédant une forte affinité pour les membranes. Dans les deux cas les deux parties de ces CPP sont reliées par un espaceur : WSQP. Il a de plus été montré que ces deux CPP pouvaient servir à transporter un cargo (protéines et acides nucléiques) sans liaison covalente¹⁰⁷. Il existe d'autres CPP amphipathiques primaires qui sont directement inspirés de protéines naturelles, comme ARF (1-22) ou BPrPr (1-28). Le premier est issu du domaine N-terminal de la protéine de suppression tumorale p14ARF, et le second vient du peptide signal de la protéine du prion lié au motif KKRPKP. Ce motif correspond à la séquence N-terminale de la protéine après le clivage du peptide signal¹⁰⁸.

La structuration secondaire en hélice α amphipathique est assez commune et fréquente pour les peptides et protéines capables de traverser la membrane. Dans cette structuration, les acides aminés hydrophiles et hydrophobes sont rassemblés sur des faces séparées de l'hélice¹⁰⁹. Ainsi les CPP amphipathiques en hélice présentent une face très hydrophobe tandis que l'autre face peut être cationique, anionique ou polaire. L'amphipathicité de ces CPP peut être visualisée par des représentations en roue hélicoïdales dites roues d'Edmundson (Figure 38). On peut clairement voir sur ce Schéma les spécificités hydrophobes, apolaires, ou chargées des différentes faces des hélices.

¹⁰⁵ MC Morris, P Vidal, L Chaloin, F Heitz, G Divita ; *A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells* ; Nucleic Acids Res ; **1997** ; 25 ; 2730-2736.

¹⁰⁶ MC Morris, J Depollier, J Mery, F Heitz, G Divita ; *A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells* ; Nat. Biotechnol. ; **2001** ; 19 ; 1173-1176.

¹⁰⁷ S Deshayes, M Morris, F Heitz, G Divita ; *Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy* ; Adv. Drug Deliv. Rev. ; **2008** ; 260 ; 537-547.

¹⁰⁸ K Ogłęcka, P Lundberg, M Magzoub, L.E. G Eriksson, Ü Langel, A Gräslund ; *Relevance of the N-terminal NLS like sequence of the prion protein for membrane perturbation effects* ; Biochim. Biophys. Acta : Biomembr ; **2008** ; 1778 ; 206-213.

¹⁰⁹ I Auger ; *Computational techniques to predict amphipathic helical segments* ; *The Amphipathic Helix* ; édité par RM Epanand ; CRC Press ; **1993** ; 8-19.

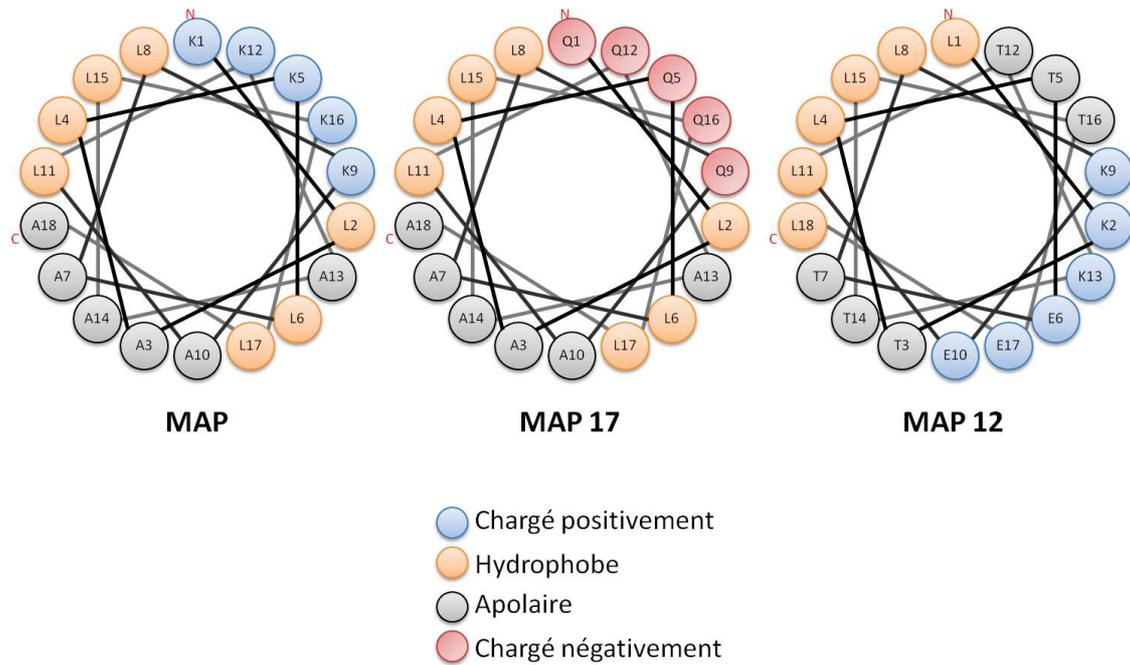


Figure 38 : Représentation en roue hélicoïdale des CPP MAP, MAP 17 et MAP 12

Même si la plupart des CPP sont cationiques, il a été montré que la traversée de la membrane était une conséquence de leur caractère amphiphile et non de la présence de charges positives. Par exemple, une étude sur le modèle amphipathique MAP¹¹⁰ (KLALKLALKALKAAALKLA) a montré que le remplacement des résidus Lysine par d'autres résidus polaires maintenait la pénétration cellulaire si le caractère amphiphile était conservé. Ainsi, l'analogue neutre MAP 17¹¹¹ (QLALQLALQALQAAQLA) et l'analogue anionique MAP 12¹¹² (LKTLETETLKELEKTEL) sont tous deux capables de traverser la membrane cellulaire.

Il existe d'autres exemples de CPP amphipathiques anioniques : Le GALA¹¹³ (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAA) qui est un dérivé d'un CPP cationique (KALA), ou encore le p28 qui est dérivé de l'azurine¹¹⁴. On trouve aussi le CADY, CPP amphipathique adoptant une structure

¹¹⁰ J Oehlke, A Scheller, B Wiesner, E Krause, M Beyermann, E Klausenz, M Melzig, M Bienert ; *Cellular uptake of an [alpha]-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior nonendocytically* ; Biochim. Biophys. Acta: Biomembr ; **1998** ; 1414, 127-139.

¹¹¹ A Scheller, J Oehlke, B Wiesner, M Dathe, E Krause, M Beyermann, M Melzig, M Bienert ; *Structural requirements for cellular uptake of α -helical amphipathic peptides* ; J. Pept. Sci. ; **1999** ; 5 ; 185-194

¹¹² J Oehlke, A Scheller, K Janek, B Wiesner, E Krause, M Beyermann, M Bienert ; *Rapid translocation of amphipathic α -helical and β -sheetforming peptides through plasma membranes of endothelial cells* ; Peptide Science, Present and Future ; Springer ; **2002** ; 782-783.

¹¹³ W Li, F Nicol, FC Jr. Szoka ; *GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery* ; Adv. Drug Deliv. Rev. ; **2004** ; 56 ; 967-985.

¹¹⁴ BN Taylor, RR Mehta, T Yamada, F Lekmine, K Christov, AM Chakrabarty, A Green, L Bratescu, A Shilkaitis, CW Beattie, TK Das Gupta ; *Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells* ; Cancer Res. ; **2009** ; 69 ; 537-546.

hélicoïdale et présentant trois domaines sur celle-ci : un substituant aromatique, un hydrophile et un hydrophobe. Ce CPP est capable de transporter un cargo (siRNA) sans liaison covalente¹¹⁵.

Il faut tout de même noter que bien que beaucoup de CPP soient amphipathiques, l'inverse n'est pas forcément vrai et ainsi tous les peptides amphipathiques ne sont pas des CPP. Ceci a été observé dans différentes études, où il a été montré qu'une suppression ou une mutation d'un seul résidu sur un CPP diminuait fortement l'internalisation, malgré une conservation du caractère amphipathique du peptide.

Une autre forme de structuration secondaire moins fréquente a été observée : le feuillet β . Les peptides de cette famille ont une face hydrophobe et une seconde hydrophile. Il a été montré que cette structuration était essentielle pour certains CPP, tel que VT5 (DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD). En effet, des analogues de ce peptide possédant des mutations de quelques résidus en acides aminés de configuration D sont incapables de former cette structure et montrent une internalisation beaucoup plus faible¹¹⁶.

Enfin, il existe une dernière catégorie de CPP amphipathiques : les CPP riches en prolines. La proline est un acide aminé particulier de par sa rigidité due à la présence du cycle pyrrolidine, son azote tertiaire (dans un peptide), mais aussi par le fait que si elle est abondante dans une structure peptidique, elle entraîne la formation d'une hélice gauche à 3 résidus par tour (et non pas 3,6 résidus par tour d'une hélice α standard). Cette structuration est appelée polyproline II (PPII) et peut se former dans l'eau (Figure 39).

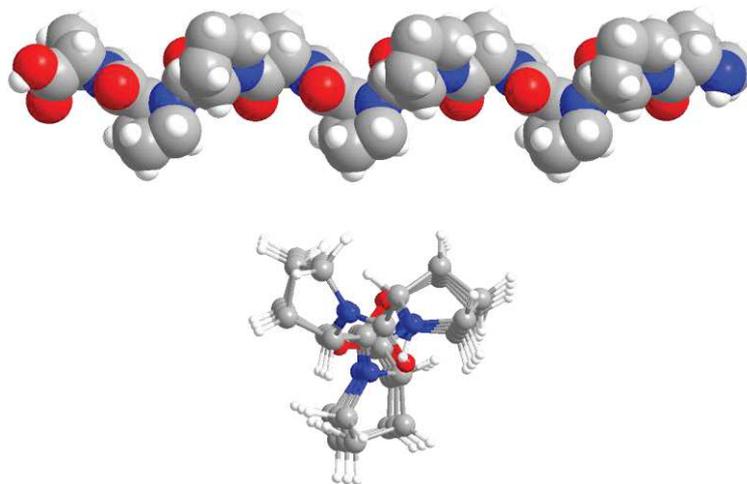
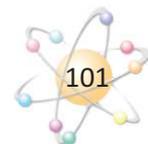


Figure 39 : Structures 3D des Polyprolines II

¹¹⁵ S Deshayes, K Konate, G Aldrian, L Crombez, F Heitz, G Divita ; *Structural polymorphism of non-covalent peptide-based delivery systems : Highway to cellular uptake* ; Bioch. Biophys. Acta ; **2010** ; 1798 ; 2304-2314.

¹¹⁶ J Oehlke, E Krause, B Wiesner, M Beyermann, M Bienert ; *Extensive cellular uptake into endothelial cells of an amphipathic [beta]-sheet forming peptide* ; FEBS Lett ; **1997** ; 415 ; 196-199.



Plusieurs CPP riches en Proline ont été répertoriés. Il y a notamment la Bacténécine 7 ou Bac7¹¹⁷, des peptides synthétiques (PPR)_n et (PRR)_n avec n = 3-4-5-6¹¹⁸, ou encore des dérivés synthétiques d'hélice polyproline avec différents groupements attachés au cycle pyrrolidine¹¹⁹.

Un autre exemple de CPP riche en polyproline pourrait être le SAP¹²⁰, composé de la séquence suivante : (VRLPPP)₃, qui adopte une structuration en PPII. Ce CPP est basé sur une séquence naturelle du domaine N-terminal de la γ -zéine, une protéine végétale. Cette protéine contient une séquence (VHLPPP)₈, responsable de son adressage au réticulum endoplasmique¹²¹.

3. Les CPP hydrophobes

Les CPP sont considérés comme hydrophobes s'ils ne contiennent que des résidus apolaires, s'ils possèdent une charge assez basse, ou encore s'ils présentent un motif hydrophobe qui est crucial, comparé au reste de la séquence, pour la pénétration cellulaire. En comparaison avec le nombre de CPP cationiques ou anioniques décrits dans la littérature, il y a peu de CPP hydrophobes qui ont été découverts aujourd'hui. Ces derniers peuvent être constitués d'acides aminés naturels ou modifiés.

Certaines recherches tendent à montrer que certains CPP pourraient traverser directement la membrane cellulaire. L'équipe de Marks a décrit une série de 18 CPP qui traversent spontanément des membranes lipidiques artificielles¹²². Sur ces 18 peptides, qui étaient tous capables d'être internalisés dans des cellules vivantes, 10 contenaient la séquence PLIL-XXXXX-GQF ou PLIY-XXXXX-GQF et 10 possédaient la séquence XXXX-LRLLR-GQF. Ces CPP qui traversent directement la membrane cellulaire pourraient être très utiles et très intéressants puisqu'ils seraient capables d'arriver directement au cytosol, diminuant le risque de dégradation par les lysosomes.

¹¹⁷ K Sadler, KD Eom, JL Yang, Y Dimitrova, JP Tam ; *Translocating proline-rich peptides from the antimicrobial peptide bacterenecin 7* ; Biochemistry ; **2002** ; 41 ; 14150-14157.

¹¹⁸ DS Daniels, A Schepartz ; *Intrinsically cell-permeable miniature proteins based on a minimal cationic PPII motif* ; J. Am. Chem. Soc. ; **2007** ; 129 ; 14578-14579.

¹¹⁹ a) YA Fillon, JP Anderson, J Chmielewski ; *Cell penetrating agents based on a polyproline helix scaffold* ; J. Am. Chem. Soc. ; **2005** ; 127 ; 11798-11803.

b) I Geisler, J Chmielewski ; *Cationic amphiphilic polyproline helices: side-chain variations and cell-specific internalization* ; Chem. Biol. Drug Des. ; **2009** ; 73 ; 39-45.

¹²⁰ I Martin, M Teixidó, E Giral ; *Design, synthesis and characterization of a new anionic cellpenetrating peptide: SAP(E)* ; ChemBioChem ; **2011** ; 12 ; 896-903.

¹²¹ MI Geli, M Torrent, D Ludevid ; *Two structural domains mediate two sequential events in [gamma]-zein targeting: protein endoplasmic reticulum retention and protein body formation* ; Plant Cell. ; **1994** ; 6 ; 1911-1922.

¹²² JR Marks, J Placone, K Hristova, WC Wimley ; *Spontaneous membrane-translocating peptides by orthogonal high-throughput screening* ; J. Am. Chem. Soc. ; **2011** ; 133 ; 8995-9004.

Enfin, une nouvelle classe de CPP hydrophobes est apparue : les peptides agrafés. Ils sont obtenus par cyclisation via des réactions de métathèse¹²³. L'agrafage confère dans la plupart des cas une capacité de pénétration cellulaire et augmente l'hélicité du peptide en rigidifiant la structure.

Nous avons pu voir ici que les CPP pouvaient présenter une grande variété de séquences et de formes. Ils peuvent présenter différentes propriétés physiques et chimiques : ils peuvent être linéaires, cycliques, cationiques, anioniques, hydrophobes, hydrophiles, en hélice, en feuillet... Cependant ils diffèrent les uns des autres par des mécanismes d'internalisation variés.

iii. Mécanismes d'internalisation

Les premières études sur la Pénétratine, Tat et R₉ ont montré que ces CPP entraînent dans les cellules via un processus indépendant de la température et de récepteurs^{97,98,100b,124}, et qui n'est pas sensible aux inhibiteurs d'endocytose^{97,125}. Il a donc été suggéré que ces peptides entraînent dans les cellules via une traversée directe par des perturbations physiques de la membrane plasmique. Cependant, toutes ces études étaient basées sur des analyses par microscopie confocale de cellules fixées, et il a été démontré par la suite que la fixation de cellules incubées avec des CPP marqués par un fluorophore avant la microscopie confocale à balayage laser pouvait mener à des artefacts¹²⁶. Depuis 2003¹²⁷, l'accent a été porté sur le rôle de l'endocytose dans la pénétration cellulaire et il est apparu que l'endocytose et une traversée directe de la membrane plasmique pouvaient avoir lieu en même temps¹²⁸. De plus, des études récentes suggèrent qu'une entrée dans la cellule par l'intermédiaire d'un récepteur ne serait pas à exclure pour certains CPP. Tous les mécanismes d'internalisation empruntés par les CPP sont plus ou moins connectés et se produisent simultanément (Schéma 16). Une diminution d'une voie de passage entraînerait une augmentation d'une autre. Le passage par une voie de pénétration ou une autre dépend de :

¹²³ CE Schafmeister, J Po, GL Verdine ; *An all-hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides* ; J. Am. Chem. Soc. ; **2000** ; 122 ; 5891-5892.

¹²⁴ D Derossi, S Calvet, A Trembleau, A Brunissen, G Chassaing, A Prochiantz ; *Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent* ; J. Biol. Chem. ; **1996** ; 271 ; 18188-18193.

¹²⁵ T Suzuki, S Futaki, M Niwa, S Tanaka, K Ueda, Y Sugiura ; *Possible existence of common internalization mechanisms among arginine rich peptides* ; J. Biol. Chem. ; **2002** ; 277 ; 2437-2443.

¹²⁶ JP Richard, K Melikov, E Vives, C Ramos, B Verbeure, M.J Gait, L.V Chernomordik, B Lebleu ; *Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake* ; J. Biol. Chem. ; **2003** ; 278 ; 585-590.

¹²⁷ PEG Thorén, D Persson, P Isakson, M Goksör, A Önfelt, B Nordén ; *Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells* ; Biochem. Biophys. Res. Commun. ; **2003** ; 307 ; 100-107.

¹²⁸ P Guterstam, F Madani, H Hirose, T Takeuchi, S Futaki, S El Andaloussi, A Gräslund, Ü Langel ; *Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate* ; Biochim. Biophys. Acta, Biomembr. ; **2009** ; 1788 ; 2509-2517.

- La nature et la structure secondaire du CPP
- La concentration du conjugué
- La capacité à interagir avec la surface membranaire et les lipides
- La nature et le type de cargo transporté
- La composition de la membrane plasmique

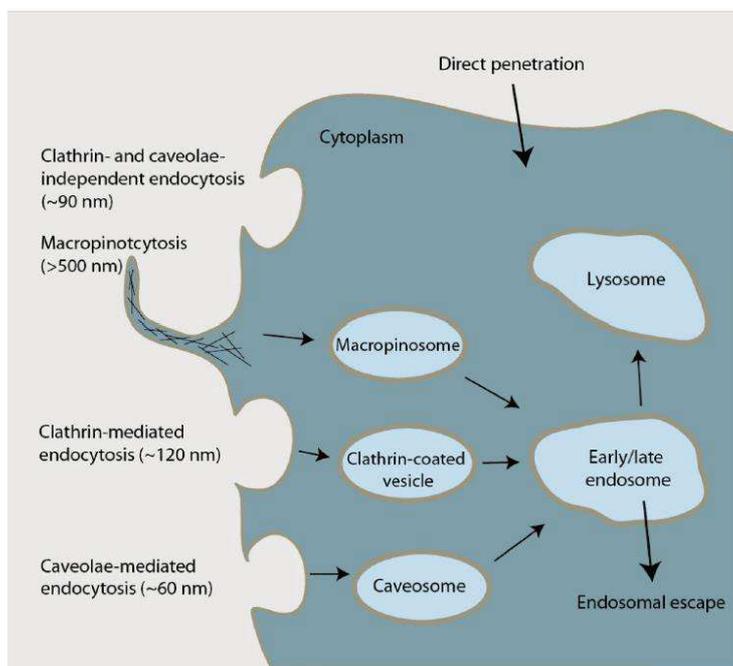


Schéma 16 : Différentes voies d'internalisation des CPPs¹²⁹

Nous allons voir ici plusieurs voies de pénétration cellulaire qui peuvent être empruntées par les CPP : l'endocytose, la translocation directe à travers la membrane plasmique, la formation de micelles, la translocation adaptative, la formation de pore, ou encore l'électroporation¹³⁰.

1. L'endocytose :

L'internalisation par endocytose se fait en deux étapes. Tout d'abord le CPP entre par endocytose et ensuite il doit s'échapper des endosomes. Cette dernière étape est cruciale pour éviter toute dégradation dans les lysosomes et surtout pour permettre au cargo vectorisé d'atteindre sa cible extra-endosomale et d'exercer son activité biologique. Les conditions favorisant cette échappée de l'endosome ne sont pas encore bien connues.

¹²⁹ DM Copolovici, K Langel, E Eriste, Ü Langel ; *Cell-penetrating peptides : Design, Synthesis, and Applications* ; ACS Nano ; **2014** ; 8 ; 1972-1994.

¹³⁰ C Bechara, S Sagan ; *Cell-penetrating peptides : 20 years later, where do we stand ?* ; FEBS Letters ; **2013** ; 587 ; 1693-1702.

Cette voie d'internalisation est un processus naturel se produisant dans toutes les cellules. Elle peut être induite par des interactions électrostatiques avec les protéoglycanes de la surface cellulaire, ou par interaction directe avec la membrane plasmique. Une fois attachés aux glycosaminoglycanes (GAG), les CPP peuvent être internalisés grâce au cycle de recyclage des GAG qui sont ainsi constamment internalisés¹³¹, ou plus efficacement en regroupant des GAG, ce qui va induire un signal intracellulaire puis un remodelage de l'actine¹³² et donc une endocytose. Il a été décrit que la macropinocytose était impliquée dans l'internalisation des polyarginines¹³³ mais également de la pénétratine. La macropinocytose est une catégorie d'endocytose permettant l'internalisation d'une grande quantité de fluide extra-cellulaire et souvent dépendant d'une tyrosine kinase. Le cytosquelette d'actine est réorganisé de façon à permettre l'étalement et l'étirement de la membrane au niveau de la zone concernée. L'étirement se caractérise par la formation de filopodes et l'étalement par la formation d'un lamellipode. Lors de la formation des lamellipodes, les filopodes se rétractent et se referment en formant une boucle. Ils forment ainsi une grande vésicule intracellulaire: le macropinosome. Les macropinosomes ainsi formés peuvent fusionner les uns aux autres, avec des lysosomes ou d'autres endosomes (Schéma 17).

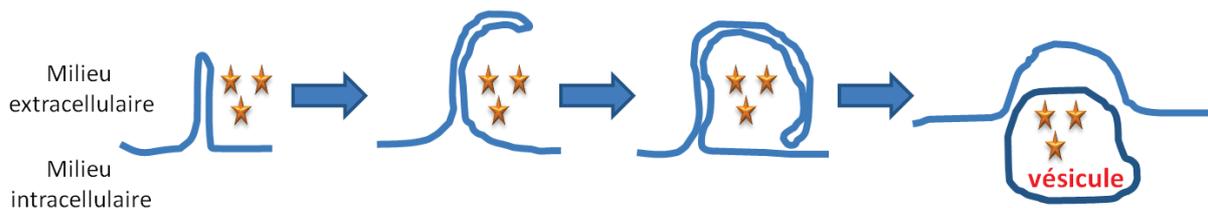


Schéma 17 : Mécanisme de la macropinocytose

Il a ainsi été montré qu'un traitement des cellules avec R₈ entraînait un réarrangement du cytosquelette, mais que R₈ et R₁₆ ne se retrouvent pas au même endroit dans la cellule, montrant ici la présence de différents mécanismes d'entrée pour ces deux oligomères¹³⁰.

¹³¹ a) M Belting ; *Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier* ; Trends Biochem. Sci. ; **2003** ; 28 ; 145-151.

b) M Yanagishita ; *Metabolism of plasma membrane-associated heparan sulfate proteoglycans* ; Adv. Exp. Med. Biol. ; **1992** ; 313 ; 113-120.

¹³² a) CY Jiao, D Delaroche, F Burlina, ID Alves, G Chassaing, S Sagan ; *Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization* ; J. Biol. Chem. ; **2009** ; 284 ; 33957-33965.

b) G.M Poon, J Garipey ; *Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells* ; Biochem. Soc. Trans. ; **2007** ; 35 ; 788-793.

c) P Lundin, H Johansson, P Guterstam, T Holm, M Hansen, U Langel, ELA S ; *Distinct uptake routes of cell-penetrating peptide conjugates* ; Bioconjugate Chem. ; **2008** ; 19 ; 2535-2542.

d) Ziegler A, J Seelig ; *Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds* ; Biophys. J. ; **2008** ; 94 ; 2142-2149.

¹³³ I Nakase, M Niwa, T Takeuchi, K Sonomura, N Kawabata, Y Koike, M Takehashi, S Tanaka, K Ueda, JC Simpson, AT Jones, Y Sugiura, S Futaki ; *Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement* ; Mol. Ther. ; **2004** ; 10 ; 1011-1022.



De même, des tests avec Tat on été réalisés : inhiber la macropinocytose (un traitement par β -cyclodextrine ou nystatine entraine une diminution ou un isolement du cholestérol dans la membrane et perturbe fortement l'endocytose) induit une baisse de la pénétration cellulaire, suggérant donc qu'elle est en effet une voie possible d'internalisation de ce CPP¹³⁴. Une récente étude¹³⁵ propose que Tat pourrait stimuler sa propre internalisation par macropinocytose. Ainsi l'équipe de Mishra suggère qu'après une internalisation via un mécanisme de formation de pores, Tat irait interagir avec l'actine du cytosquelette, ce qui entrainerait la macropinocytose. Cependant selon d'autres études, après attachement et rassemblement de protéoglycanes, le peptide induirait l'activation d'une petite GTPase (Rac1) qui va entrainer un remodelage de l'actine et induire la macropinocytose¹³⁶. Pour finir, l'équipe de Dowdy a confirmé que la macropinocytose était la voie empruntée par Tat, avec la nécessité d'avoir des protéines membranaires actives mais pas spécialement des GAG¹³⁷.

2. Translocation directe à travers la membrane plasmique

Ce mécanisme de passage transmembranaire nécessite une déstabilisation de la membrane plasmique, non dépendante de l'énergie et de la température. Cette voie a été dans un premier temps évoquée comme étant la voie empruntée par les CPP, puis elle a été réfutée en tant qu'artefact de fixation, et enfin elle a été confirmée par la suite grâce à des tests utilisant la fluorescence sur des cellules vivantes, des quantifications à 4°C en l'absence d'endocytose ainsi qu'en utilisant diverses approches biophysiques¹³⁸. Il est à noter qu'en plus de l'endocytose qui est

¹³⁴ a) JS Wadia, RV Stan, SF Dowdy ; *Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis* ; Nat. Med. ; **2004** ; 10 ; 310-315.

b) IM Kaplan, JS Wadia, SF Dowdy ; *Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis* ; J. Control Release ; **2005** ; 102 ; 247-253.

¹³⁵ A Mishra, G Hwee Laia, NW Schmidt, VZ Suna, AR Rodriguez, R Tongd, L Tangd, J Chengd, TJ Deming, DT Kameia, GCL Wong ; *Translocation of HIV TAT peptide and analogues induced by multiplexed membrane and cytoskeletal interactions* ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA ; **2011** ; 108 ; 16883-16888.

¹³⁶ a) S Gerbal-Chaloin, C Gondeau, G Aldrian-Herrada, F Heitz, C Gauthier- Rouviere, nG Divita ; *First step of the cell-penetrating peptide mechanism involves Rac1 GTPase-dependent actin-network remodelling* ; Biol. Cell ; **2007** ; 99 ; 223-238.

b) I Nakase, A Tadokoro, N Kawabata, T Takeuchi, H Katoh, K Hiramoto, M Negishi, M Nomizu, Y Sugiura, S Futaki ; *Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis* ; Biochemistry ; **2007** ; 46 ; 492-501.

¹³⁷ JM Gump, RK June, SF Dowdy ; *Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction* ; J. Biol. Chem. ; **2010** ; 285 ; 1500-1507.

¹³⁸ a) P Saalik, A Niinep, J Pae, M Hansen, D Lubenets, U Langel, M Pooga ; *Penetration without cells: membrane translocation of cell penetrating peptides in the model giant plasma membrane vesicles* ; J. Control Release ; **2011** ; 153 ; 117-125.

inhibée à 4°C, la translocation directe est tout de même diminuée puisque la dynamique et la fluidité membranaires sont affectées par cette basse température¹³⁹. Ce qui signifie que ces tests conduisent à une sous-estimation de la translocation directe.

Plusieurs hypothèses ont été décrites afin d'expliquer cette voie de pénétration cellulaire (Figure 40) : A) formation de micelles inversées, B) formation de pores, C) translocation adaptative.

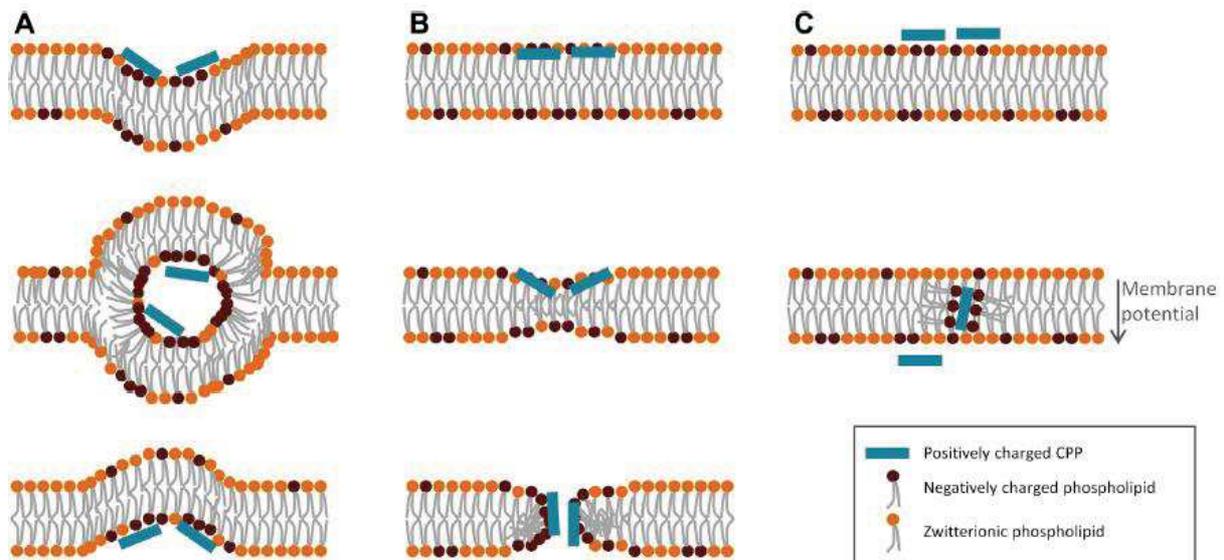


Figure 40 : Mécanismes proposés pour la translocation directe des CPP¹³⁰

La formation de micelles a été la première hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène avec la pénétratine (Figure 40, voie A). Dans ce modèle, les résidus basiques vont interagir avec les phospholipides chargés négativement de la membrane plasmique, et les interactions entre les résidus hydrophobes et la membrane qui en résultent vont induire une déstabilisation de la bicouche lipidique en formant une courbure vers l'intérieur de la cellule¹⁴⁰. La réorganisation de lipides voisins

b) PE Thoren, D Persson, EK Esbjorner, M Goksoy, P Lincoln, B Norden ; *Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides* ; Biochemistry ; **2004** ; 43 ; 3471-3489.

c) H Binder, G Lindblom ; *Charge-dependent translocation of the Trojan peptide penetratin across lipid membranes* ; Biophys. J. ; **2003** ; 85 ; 982-995.

d) A Elmquist, U Langel ; *In vitro uptake and stability study of pVEC and its all-D analog* ; Biol. Chem. ; **2003** ; 384 ; 387-393.

¹³⁹ a) JL Zaro, WC Shen ; *Quantitative comparison of membrane transduction and endocytosis of oligopeptides* ; Biochem. Biophys. Res. Commun. ; **2003** ; 307 ; 241-247.

b) JL Zaro, WC Shen ; *Evidence that membrane transduction of oligoarginine does not require vesicle formation* ; Exp. Cell Res. ; **2005** ; 307 ; 164-173.

¹⁴⁰ ID Alves, N Goasdoue, I Correia, S Aubry, C Galanth, S Sagan, S Lavielle, G Chassaing ; *Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution* ; Biochim. Biophys. Acta ; **2008** ; 1780 ; 948-959.



entraîne alors la formation des micelles inversées¹⁴¹, encapsulant ainsi le peptide. Les mouvements de la membrane vont ensuite permettre le relargage du peptide dans la cellule. Il a été mis en évidence que la substitution des résidus tryptophanes par des phénylalanines inhibait la formation de ces micelles, montrant l'importance de ces résidus dans l'interaction avec la bicouche lipidique, et pas seulement en termes d'hydrophobicité.

Une seconde hypothèse qui a été proposée était la translocation adaptative (Figure 40, voie C). La capacité des groupements guanidinium à former des ponts hydrogène bidentés va donner aux polyarginines des caractéristiques hydrophiles ou hydrophobes selon le contre-anion associé. Avec cette capacité, les interactions entre les peptides riches en arginine et les phospholipides vont masquer la charge du peptide, atténuant sa polarité et permettant ainsi sa diffusion dans et à travers la membrane¹⁴².

Enfin, des études évoquent la formation de pores permettant la diffusion passive de Tat et de peptides riches en arginine à travers la membrane cellulaire (Figure 40, voie B). Les interactions entre les charges positives et les groupements phosphate entraînent une accumulation des peptides sur la membrane, positionnés entre les phosphates et les chaînes carbonées des lipides. L'accumulation des peptides va entraîner un amincissement de la bicouche et l'attraction entre les chaînes latérales d'arginine et de la lysine et les groupes de tête de la couche interne conduit à la formation d'un pore transitoire à travers lequel d'autres peptides diffusent.

iv. Les CPP dans les thérapies anticancéreuses

De par leur capacité à traverser les membranes cellulaires, les CPP sont devenus des outils prometteurs pour le développement de nouveaux traitements dans différents domaines (Figure 41).

¹⁴¹ P Joanne, C Galanth, N Goasdoué, P Nicolas, S Sagan, S Lavielle, G Chassaing, C El Amri, ID Alves; *Lipid reorganization induced by membrane-active peptides probed using differential scanning calorimetry*; *Biochim. Biophys. Acta* ; **2009** ; 1788 ; 1772-1781.

¹⁴² PA Wender, WC Galliher, EA Goun, LR Jones, T.H Pillow ; *The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms* ; *Adv. Drug Deliv. Rev.* ; **2008** ; 60 ; 452-472.

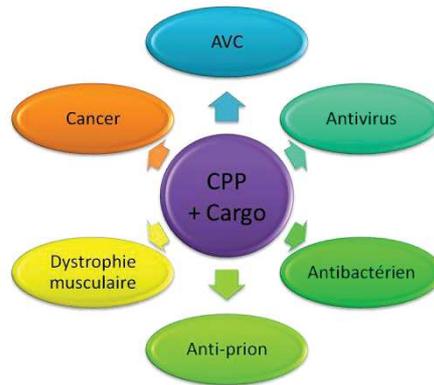


Figure 41 : Applications des CPP

En ce qui concerne le cancer, les CPP ont pu être utilisés dans de nombreuses applications innovantes, aussi bien pour délivrer des substances thérapeutiques¹⁴³ que pour délivrer des protéines pro-apoptotiques¹⁴⁴.

Bien que les CPP aient montré leur capacité à délivrer des agents thérapeutiques dans les cellules, certains comme Tat sont incapables de le faire de façon spécifique, c'est-à-dire de cibler un type de cellule en particulier. De ce fait les cellules cancéreuses ainsi que les cellules saines reçoivent l'agent vectorisé, engendrant entre autres des effets secondaires. Pour rectifier ce problème de sélectivité, un CPP dérivé de Tat a été conjugué à un AHNP (mime peptidique de anti-Her2/neu : anticorps ciblant Her2/neu qui est un récepteur surexprimé dans 25% des cancers du sein favorisant la croissance cellulaire)⁹². Ce mime se lie sélectivement à ErbB2¹⁴⁵, un récepteur de facteur de croissance épidermique surexprimé dans 30% des cancers du sein¹⁴⁶. Ce nouveau transporteur spécifique de certaines cellules cancéreuses a ensuite été exploité à des fins thérapeutiques. Un peptide inhibiteur (STAT3BP) connu pour bloquer l'activité du facteur de transcription STAT3 a été ajouté à cette structure¹⁴⁷. Cette cible a été choisie car il a été montré que STAT3 était activé dans 50% des carcinomes du sein et est impliqué dans un mauvais pronostic¹⁴⁸. La présence du vecteur

¹⁴³ M Tan, KH Lan, J Yao, CH Lu, M Sun, CL Neal, J Lu, D Yu ; *Selective inhibition of ErbB2-overexpressing breast cancer in vivo by a novel TAT-based ErbB2-targeting signal transducers and activators of transcription 3-blocking peptide* ; Cancer Res. ; **2006** ; 66 ; 3764–3772.

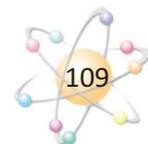
¹⁴⁴ HJ Johansson, S El-Andaloussi, T Holm, M Mae, J Janes, T Maimets, U Langel ; *Characterization of a novel cytotoxic cell-penetrating peptide derived from p14ARF protein* ; Mol. Ther. ; **2008** ; 16 ; 115–123.

¹⁴⁵ BW Park, HT Zhang, C Wu, A Berezov, X Zhang, R Dua, Q Wang, G Kao, DM O'Rourke, MI Greene, R Murali ; *Rationally designed anti-HER2/neu peptide mimetic disables P185HER2/neu tyrosine kinases in vitro and in vivo* ; Nat. Biotechnol. ; **2000** ; 18 ; 194-198.

¹⁴⁶ M Tan, J Yao, D Yu ; *Overexpression of the c-erbB-2 gene enhanced intrinsic metastasis potential in human breast cancer cells without increasing their transformation abilities* ; Cancer Res. ; **1997** ; 57 ; 1199-1205.

¹⁴⁷ J Turkson, D Ryan, JS Kim, Y Zhang, Z Chen, E Haura, A Laudano, S Sebt, AD Hamilton, R Jove ; *Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation*, J. Biol. Chem. ; **2001** ; 276 ; 45443-45455.

¹⁴⁸ a) JF Bromberg, MH Wrzeszczynska, G Devgan, Y Zhao, RG Pestell, C Albanese, JE Darnell Jr. ; *Stat3 as an oncogene* ; Cell ; **1999** ; 98 ; 295-303.



ciblant les cellules cancéreuses a permis de délivrer le STAT3BP sélectivement dans les cellules mutées. Ces résultats ont été observés *in vitro* et *in vivo*. De plus, l'activité du composé thérapeutique n'était pas affectée par la présence du CPP Tat-AHNP, le cargo a donc pu perturber l'activation de STAT3, entraînant l'apoptose et inhibant la prolifération cellulaire des tissus cancéreux *in vivo*.

Une autre stratégie pour utiliser des spécificités tumorales avec les CPP porte sur le ciblage. En effet, un domaine PEGA pouvant cibler les cellules cancéreuses et ayant montré qu'il pouvait s'accumuler dans les vaisseaux sanguins du cancer du sein¹⁴⁹ a été attaché à un CPP : le pVEC¹⁵⁰. Le domaine ciblant n'était pas perméant initialement mais une fois attaché au CPP, il a été observé chez la souris que ce composé pouvait traverser sélectivement les vaisseaux sanguins des cellules du cancer du sein. Ensuite, un agent anticancéreux (le chlorambucil) a été conjugué à la construction et il a été montré qu'il était quatre fois plus efficace que seul.

Des CPP activables (CPPA) ont également été développés. Ils sont constitués d'un CPP polycationique, d'un fragment inactivateur polyanionique relié à ce dernier par un espaceur clivable par des protéases spécifiques et replié sur le CPP, et enfin du cargo attaché sur le CPP¹⁵¹ (Schéma 18). La biodistribution de CPPA contenant un fluorophore (Cy5) à la place du cargot a été établie après injection dans la queue de souris portant des cellules tumorales HT-1080 (fibrosarcome). L'amélioration de la capacité à atteindre les tissus ciblés des CPPA a été expliquée par le clivage de l'espaceur par des protéases associées à la maladie (ici MMP) dans les tumeurs et métastases¹⁵².

b) G Berclaz, HJ Altermatt, V Rohrbach, A Siragusa, E Dreher, PD Smith ; *EGFR dependent expression of STAT3 (but not STAT1) in breast cancer* ; Int. J. Oncol. ; **2001** ; 19 ; 1155-1160.

¹⁴⁹ M Essler, E Ruoslahti ; *Molecular specialization of breast vasculature: A breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature* ; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. ; **2002** ; 99 ; 2252-2257.

¹⁵⁰ H Myrberg, L Zhang, M Mäe, Ü Langel ; *Design of a Tumor-Homing Cell-Penetrating Peptide* ; Bioconjugate Chem. ; **2008** ; 19 ; 70-75.

¹⁵¹ T Jiang, ES Olson, QT Nguyen, M Roy, PA Jennings, RY Tsien ; *Tumor Imaging by Means of Proteolytic Activation of Cell-Penetrating Peptides* ; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. ; **2004** ; 101 ; 17867-17872.

¹⁵² a) TA Aguilera, ES Olson, MM Timmers, T Jiang, RY Tsien ; *Systemic In Vivo Distribution of Activatable Cell Penetrating Peptides Is Superior to That of Cell Penetrating Peptides* ; Integr. Biol. ; **2009** ; 1 ; 371-381.

b) ES Olson, TA Aguilera, T Jiang, LG Ellies, QT Nguyen, EH Wong, LA Gross, RY Tsien ; *In Vivo Characterization of Activatable Cell Penetrating Peptides for Targeting Protease Activity in Cancer* ; Integr. Biol. ; **2009** ; 1 ; 382-393.

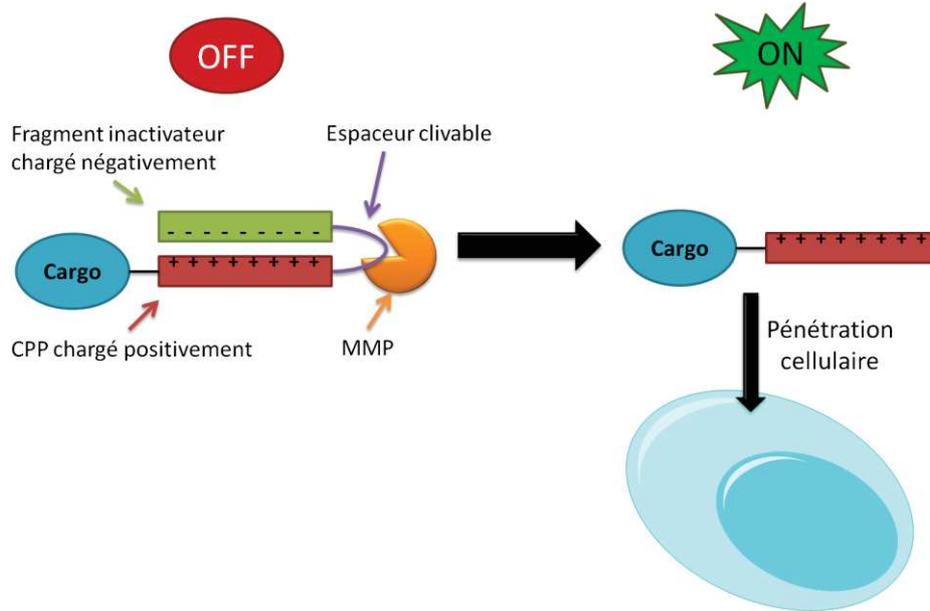


Schéma 18 : Principe des CPP activables

Afin d'améliorer l'utilité des CPPA, alors qu'ils ont montré pour l'instant une forte mortalité chez la souris et une accumulation à long terme dans certains tissus tels que le cartilage ou le foie, le CPP cationique a été attaché à un dendrimère, créant ainsi les CPPAD. Ces composés ont été utilisés *in vivo* pour visualiser l'activité des métalloprotéinases par IRM et fluorescence¹⁵³. Ces composés sont susceptibles d'avoir un avenir prometteur en permettant un ciblage très sélectif des tumeurs.

Dans les thérapies anticancéreuses, les CPP ont également été utilisés pour augmenter la rétention des molécules thérapeutiques dans les tumeurs, comme par exemple en radioimmunothérapie¹⁵⁴. En effet, dans ce genre de traitement déjà sélectif, des anticorps marqués avec un radionucléide permettent d'irradier les cellules cancéreuses sélectivement grâce à la capacité de ciblage des anticorps utilisés. Malheureusement, les fragments de la chaîne simple de FV (scFV) ne provoquent qu'une lente accumulation dans les tumeurs et sont rapidement éliminés par la circulation¹⁵⁵. C'est pourquoi des CPP ont été utilisés afin d'augmenter la vitesse de pénétration cellulaire des anticorps et par conséquent de diminuer leur élimination par la circulation. Des essais

¹⁵³ ES Olson, T Jiang, TA Aguilera, QT Nguyen, LG Ellies, M Scadeng, RY Tsien ; *Activatable Cell penetrating Peptides Linked to Nanoparticles as Dual Probes for In Vivo Fluorescence and MR Imaging of Proteases* ; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. ; **2010** ; 107 ; 4311-4316.

¹⁵⁴ CR Divgi ; *Status of radiolabeled monoclonal antibodies for diagnosis and therapy of cancer* ; Oncology (Williston Park) ; **1996** ; 10 ; 939-953 ; discussion 954, 957-938.

¹⁵⁵ a) SK Batra, M Jain, UA Wittel, SC Chauhan, D Colcher ; *Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies* ; Curr. Opin. Biotechnol. ; **2002** ; 13 ; 603-608.

b) G Pavlinkova, GW Beresford, BJ Booth, SK Batra, D Colcher ; *Pharmacokinetics and biodistribution of engineered single-chain antibody constructs of MAb CC49 in colon carcinoma xenografts*, J. Nucl. Med. ; **1999** ; 40 ; 1536-1546.

utilisant la pénétratine comme CPP ont montré de bons résultats¹⁵⁶. En effet, dès l'ajout de pénétratine, il a été observé une homogénéisation de la distribution des anticorps, ainsi qu'une augmentation de la rétention dans les cellules cancéreuses.

Il a également été décrit un CPP dérivé de la protéine p14ARF (protéine anti tumeur)¹⁵⁷ qui, en plus d'être capable de traverser les membranes, arrive à délivrer des APN (acide peptidonucléique) correcteurs d'épissage.

v. Conclusion

Comme nous venons de le voir, il existe une multitude de CPP, avec des structures et des modèles de pénétration cellulaire divers. Ils peuvent sans problème assurer le rôle de vecteur, afin d'adresser tout type de cargo (protéines, acides nucléiques, anticorps, petites molécules, etc...) en étant lié de façon covalente ou non (Schéma 19).

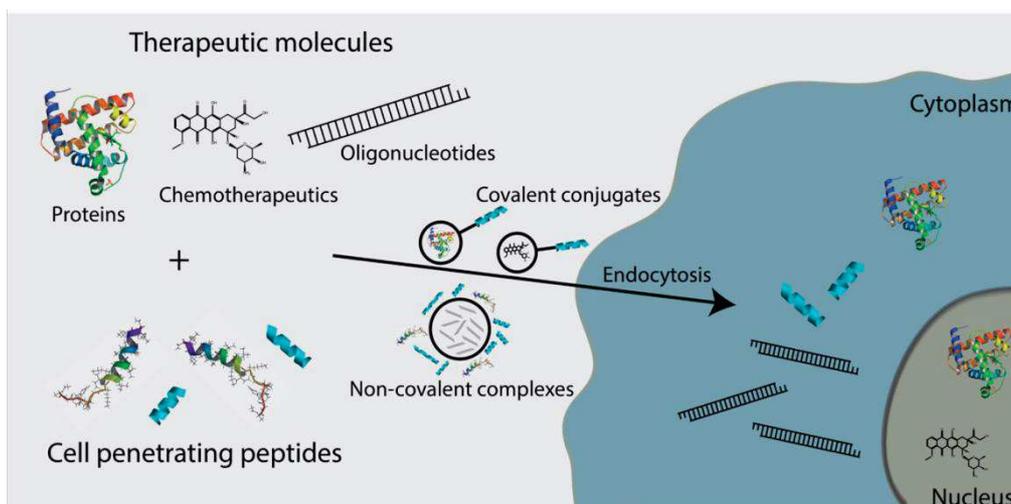


Schéma 19 : Les CPP et leurs cargos¹³⁰

De ce fait leurs applications potentielles sont nombreuses, en plus du combat contre le cancer, comme le résume la Figure 42¹⁵⁸.

¹⁵⁶ M Jain, SC Chauhan, AP Singh, G Venkatraman, D Colcher, SK Batra ; *Penetratin improves tumor retention of single-chain antibodies: a novel step toward optimization of radioimmunotherapy of solid tumors*, Cancer Res. ; **2005** ; 65 ; 7840-7846.

¹⁵⁷ S Bates, AC Phillips, PA Clark, F Stott, G Peters, RL Ludwig, KH Vousden ; *p14ARF links the tumour suppressors RB and p53* ; Nature ; **1998** ; 395 ; 124-125.

¹⁵⁸ SB Fonseca, MP Pereira, SO Kelley ; *Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications* ; Advanced Drug Delivery Reviews ; **2009** ; 61 ; 953-964.

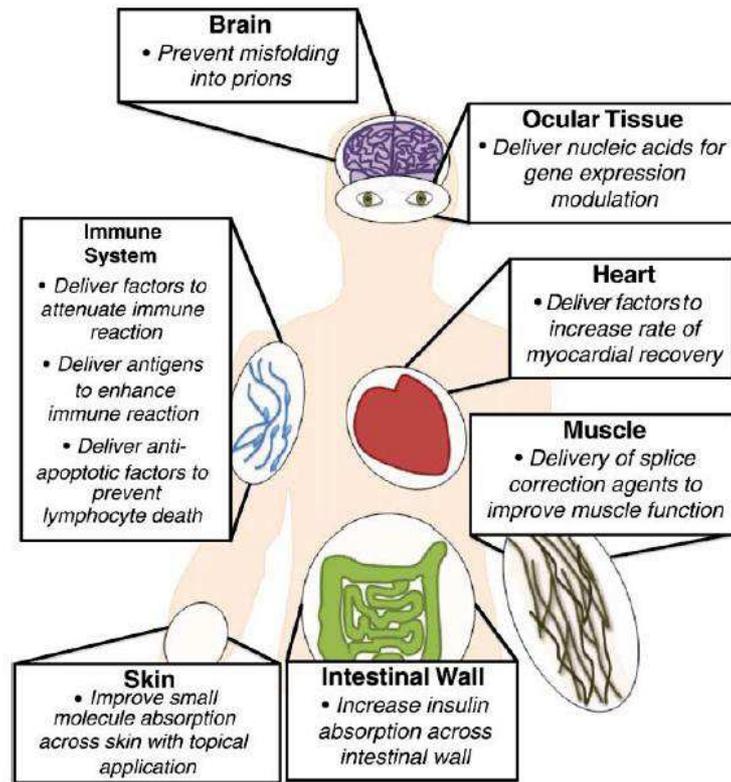
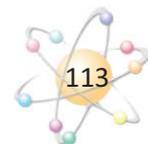


Figure 42 : Représentation des différentes cibles et applications des CPP¹⁵⁸

Cependant ces CPP possèdent quelques faiblesses :

- une faible demi-vie en raison de leur dégradation par les protéases
- une faible spécificité des tissus, organes ou cellules cibles. De ce fait, la plupart des CPP de première génération doivent être administrés directement dans les tissus ciblés
- chaque complexe ou conjugué (CPP + cargo) doit être étudié en profondeur car chaque changement de CPP ou de cargo entraîne des changements de propriété du complexe ou conjugué
- certains CPP nécessitent l'ajout d'adjuvants (parfois cytotoxiques) permettant la déstabilisation des endosomes pour entraîner la libération des CPP dans le milieu intracellulaire

C'est pourquoi au laboratoire, un autre type de vecteur est développé, basé sur l'oligomérisation de mimes contraints de dipeptides. Ces vecteurs ont été nommés CPNP pour Cell Penetrating Non Peptide. Leur ressemblance avec les CPP doit leur permettre d'avoir les mêmes fonctions, sans présenter leurs faiblesses énoncées ci-dessus (en particulier la dégradation).



V) Travaux antérieurs

Dans cette partie sont détaillés les travaux réalisés au sein de notre laboratoire avant le début de ce travail de thèse. Initialement, deux mimes contraints de dipeptide non chargés et leurs oligomères ont été étudiés. Ces mimes sont le DBT et l'AMPA. Le DBT est une D-BenzoThiazépine fonctionnalisée en position 3 par une amine et en position 5 par un résidu acétate. L'AMPA (pour acide AminoMéthylPhénylAcétique) est un dérivé de l'acide phénylacétique substitué en ortho par une chaîne aminométhyle. La capacité de leurs oligomères à franchir la membrane cellulaire a été étudiée afin d'envisager ces objets comme de potentiels outils d'adressage intracellulaire de molécules bioactives. Le tétramère de DBT (DBT₄) a montré une capacité à être internalisé et à s'accumuler dans les endosomes et les lysosomes. Cependant, le conjugué formé par association de ce tétramère avec la pepstatine ne possède pas d'activité antiproliférative. En revanche, l'AMPA, également sous la forme d'un tétramère et conjugué à la pepstatine, a montré sa capacité à amener l'inhibiteur dans les cellules tumorales et une activité antiproliférative prometteuse sur différentes lignées tumorales.

De par leur caractéristique de mime de dipeptide et leur absence de charge, ces peptidomimétiques ont été nommés CPNP pour Cell Penetrating Non Peptide, par analogie aux CPP de la littérature.

Dans un premier temps le DBT sera présenté : sa synthèse et les études réalisées ; puis dans un second temps l'AMPA.

a. Le DBT

Les différents oligomères du DBT ont été assemblés selon une stratégie Fmoc/*t*Bu en phase solide (SPPS, cf Chapitre 2, I) synthèse peptidique). Le prérequis indispensable à la synthèse de ces oligomères était le développement d'une voie de synthèse efficace du précurseur Fmoc-DBT-OH (Figure 43) permettant d'accéder à des quantités de l'ordre du gramme.

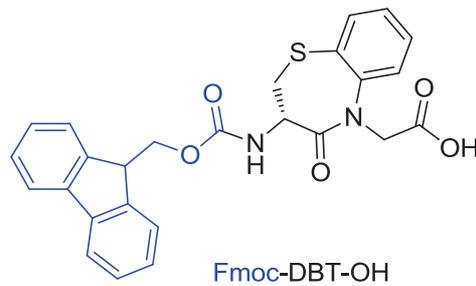


Figure 43 : Structure du Fmoc-DBT-OH

i. Synthèse

Une synthèse en 7 étapes a été mise au point permettant d'obtenir le synthon final avec un rendement global d'environ 50 % (Schéma 20). L'utilisation de la cystéine de configuration D (ou L) comme matière première permet de contrôler la stéréochimie du Carbone 3 de la benzothiazépine finale pour obtenir le DBT (ou LBT).¹⁵⁹

¹⁵⁹ M Amblard, M Calmès, V Roques, S Tabet, A Loffet, J Martinez ; *An improved synthesis of (S)- or (R)-N-Boc-Protected 1,5-benzothiazepine derivatives* ; Org. Prep. Proc. Int. ; **2002** ; 34 ; 405-415.

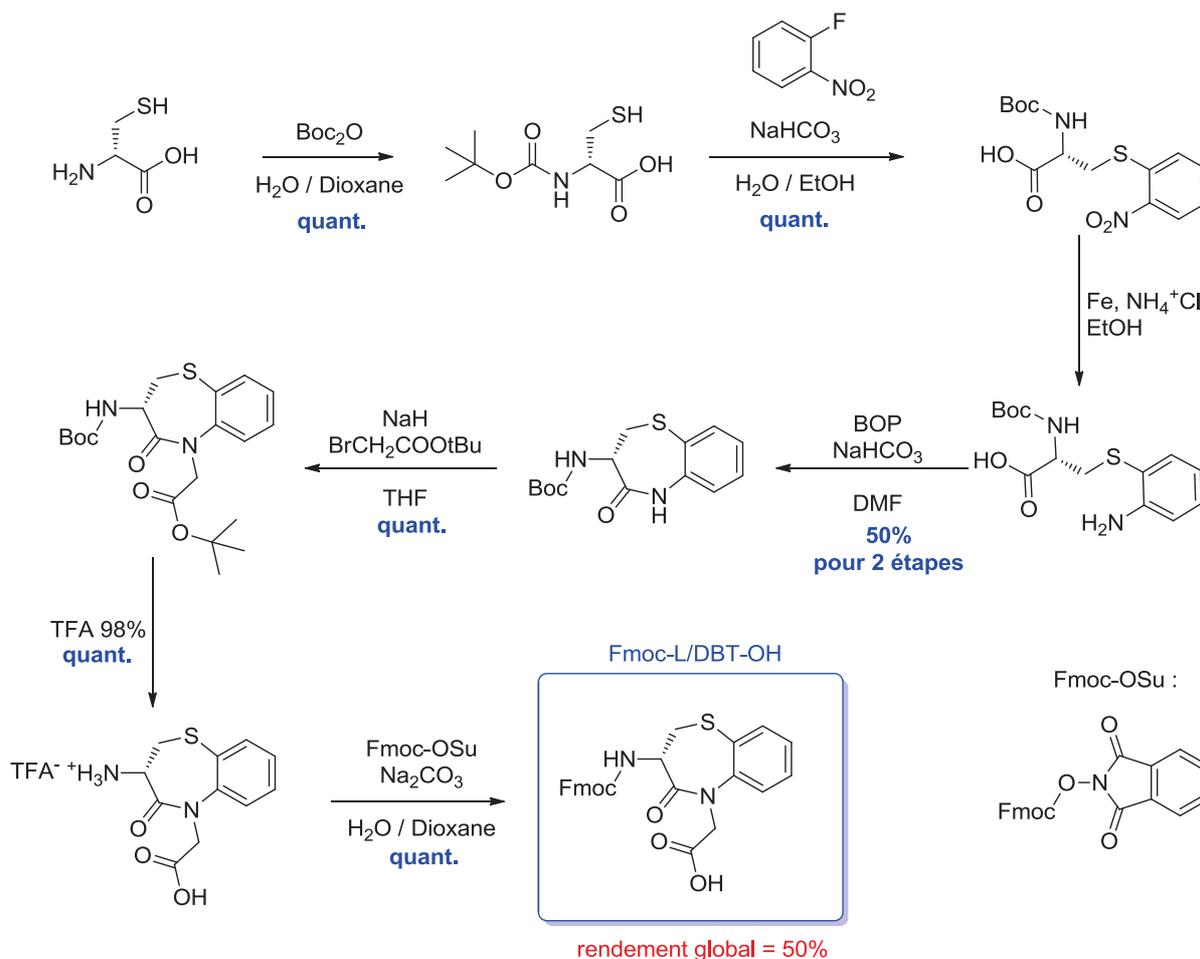


Schéma 20 : Synthèse du DBT

Dans un premier temps, l'amine de la cystéine est protégée par un groupement Boc. Une protection directe avec le groupement Fmoc requis pour la synthèse sur support n'est pas compatible ici avec les conditions basiques et/ou réductrices nécessaires pour les étapes suivantes. Une fois protégée, la cystéine est introduite par substitution nucléophile aromatique sur le fluoronitrobenzène. Le composé nitré obtenu est réduit pour former l'amine correspondante en présence de fer et de chlorure d'ammonium. S'en suit alors une réaction de couplage intramoléculaire en utilisant le BOP comme agent de couplage, ce qui permet la formation de la benzothiazépine attendue. La chaîne acétate est ensuite introduite sous la forme de son ester tert-butyle par alkylation de l'azote 5 en présence d'hydrure de sodium et de bromoacétate de *t*-butyle. Les groupements protecteurs Boc et *t*Bu sont ensuite éliminés en milieu acide en présence de TFA pour donner le sel de TFA correspondant. La dernière étape de protection de l'amine primaire par un groupement Fmoc est réalisée en présence de carbonate de sodium et de Fmoc-OSu pour obtenir le synthon DBT (ou LBT en série L-cystéine) avec un rendement global de 50%.

La synthèse d'oligomères de différentes tailles a été réalisée selon la méthodologie de SPPS. Ainsi des di-, tri-, et tétramères ont été produits, en série D, L, mais également en combinant les deux (Tableau 8). Une fluorescéine FI (fluorophore) a été fixée en N-ter de chaque oligomère afin de pouvoir mesurer la pénétration cellulaire de chacun d'entre eux par mesure de l'intensité de la fluorescence. Pour cela l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) a été utilisé (Figure 44).

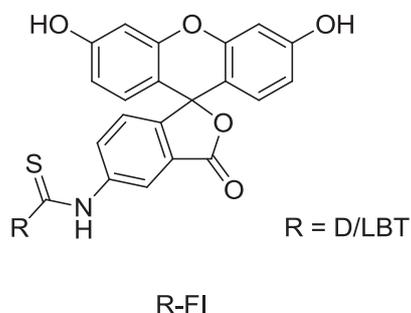


Figure 44 : Structure de la Fluorescéine (FI) sous sa forme FITC après attachement à l'amine

Tableau 8 : Liste des oligomères de L/DBT synthétisés

Structure	Nom
FI – (DBT) ₂ – NH ₂	JMV2949
FI – (DBT) ₃ – NH ₂	JMV2968
FI – (DBT) ₄ – NH ₂	JMV3229
FI – (LBT) ₄ – NH ₂	JMV4228
FI – (DBT-LBT) ₂ – NH ₂	JMV4287

ii. Tests de pénétration cellulaire¹⁶⁰

En premier lieu, l'internalisation cellulaire a été évaluée en mesurant l'intensité de l'émission de fluorescence des cellules (cellules du cancer du sein : MDA-MB-231) après incubation avec les différents oligomères. Ils ont été comparés à un CPP connu : l'octa-arginine, qui a servi de contrôle positif ; mais aussi à la carboxyfluorescéine (CF) pour le contrôle négatif puisqu'elle n'est pas ou peu capable de passer les membranes. Les cellules ont été traitées pendant 5 minutes avec de la trypsine

¹⁶⁰ LL Vezekov, M Maynadier, JF Hernandez, MC Averlant-Petit, O Fabre, E Benedetti, M Garcia, J Martinez, M Amblard ; *Noncationic dipeptide mimic oligomers as cell penetrating nonpeptides (CPNP)* ; *Bioconjugate Chem.* ; **2010** ; 21 ; 1850-1854.

afin d'enlever tout composé qui resterait adsorbé à la membrane. A ce titre, il est intéressant de constater que la quantité d'oligomères liés à la membrane est bien moins important pour les L/DBT que pour la polyarginine (Figure 45).

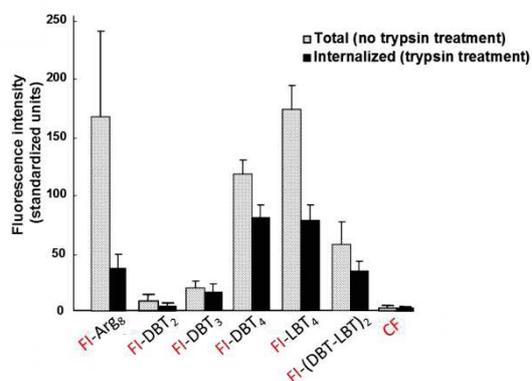


Figure 45 : Tests de pénétration cellulaire des différents oligomères du DBT et du LBT¹⁶⁰

Ces résultats montrent que la plus forte intensité de fluorescence a été observée pour les tétramères de LBT et DBT. On peut également observer une chute drastique de la pénétration cellulaire lorsque les composés contiennent moins de 4 résidus. L'internalisation semble donc dépendante de la longueur des oligomères. De plus, l'internalisation obtenue avec les tétramères est bien plus importante qu'avec l'octa-arginine. L'augmentation de la pénétration de DBT₂ à DBT₄ peut s'expliquer par une augmentation de l'hydrophobicité. Enfin, il est apparu que le tétramère en série L présentait une aussi bonne pénétration cellulaire que son analogue en série D. Ceci pourrait indiquer que la configuration de la benzothiazépine n'a pas d'influence (même si l'oligomère alterné (DBT-LBT)₂ présente une moins bonne pénétration cellulaire), et que l'internalisation ne se fait pas grâce à une interaction avec un récepteur spécifique mais plutôt par des interactions hydrophobes avec la membrane plasmique.

Une étude cinétique a également été réalisée à 10⁻⁵ M pour le composé DBT₄ fluorescent, le JMV3229, en comparaison avec l'octa-arginine. Cette étude montre qu'à 1h, les deux composés présentent une efficacité similaire. Cependant passé ce délai, la fluorescence de la polyarginine atteint un plateau alors que celle du JMV3229 continue de croître durant 15h pour atteindre son maximum qui est 6 fois plus élevé que pour la polyarginine (Figure 46).

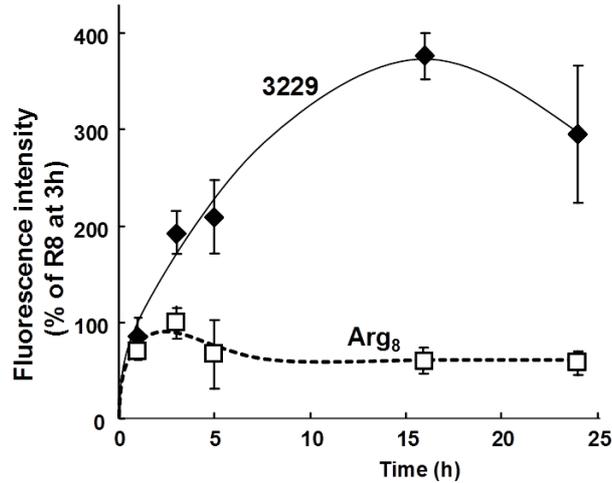


Figure 46 : Etude cinétique comparant le JM3229 à l'octa-arginine¹⁶⁰

Par la suite une étude de la distribution intracellulaire des oligomères du DBT a été réalisée par microscopie confocale. Ces expériences ont été associées à une étude cinétique (Figure 47).

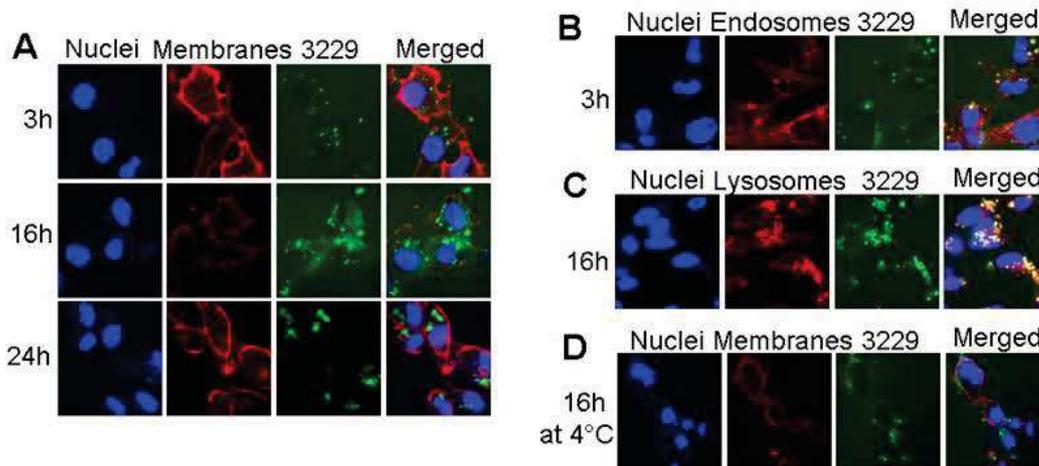
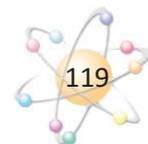


Figure 47 : Localisation du JM3229 étudiée par microscopie confocale¹⁶⁰

A gauche, sur la Figure A, on peut voir l'internalisation du JM3229 après 3, 16 et 24 h. Il apparaît que le maximum d'accumulation a été obtenu après 16h d'incubation, ce qui est en accord avec les tests cinétiques présentés ci-dessus.

L'expérience a été réalisée en utilisant également des marqueurs de lysosomes et d'endosomes. Les résultats ont montré que le JM3229 était majoritairement colocalisé avec les



marqueurs des endosomes après 3h (B) et avec les marqueurs lysosomaux après 16h (C). Ces résultats sont donc en faveur d'une voie d'internalisation endolysosomale, avec une accumulation dans les lysosomes. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'analogue LBT.

A température ambiante, les résultats montrent que le DBT ne reste pas « collé » sur la membrane, alors qu'à 4°C on peut voir que le marqueur des membranes se superpose avec le composé (D). Ceci tend à montrer que le mécanisme d'internalisation est thermo-dépendant, et très certainement énergie-dépendant.

L'ensemble de ces résultats indiquent que ces tétramères de L/DBT sont capables de cibler la voie endolysosomale.

b. L'AMPA

i. Synthèse

De la même manière que pour le DBT, l'obtention de l'AMPA protégé avec un groupement Fmoc était nécessaire pour la synthèse des oligomères par SPPS. Pour cela, il a été nécessaire de réaliser une réaction de protection avec le Fmoc-OSu sur l'acide aminométhylphénylacétique commercial. Le Fmoc-AMPA-OH a ensuite été utilisé pour synthétiser des conjugués associant l'AMPA₄, la pepstatine et une partie hydrophile pour améliorer la solubilité du conjugué. En effet, sans cette dernière, des problèmes de solubilité ont été rencontrés liés vraisemblablement à la lipophilie du conjugué. La partie hydrophile (Hm) est constituée d'une chaîne de type polyéthylène glycol (PEG) contenant 2 unités de d'éthylène glycol (PEG) sous la forme de l'acide 8-amino-3,6-dioxaocitanoïque (O2Oc) et d'une D-Arg. Le conjugué de référence est le JMV 4463 : **Hm** – **Pepstatine** – **AMPA₄** (Figure 48). Dans ces conjugués, l'isovaléryle terminal de la pepstatine a été remplacé par une valine, afin de permettre la fixation par couplage peptidique de la partie hydrophile¹⁶¹.

¹⁶¹M Maynadier, LL Vezekov, M Amblard, V Martin, C Gandreuil, O Vaillant, M Gary-Bobo, I Basile, JF Hernandez, M Garcia, J Martinez ; *Dipeptidic mimic oligomer transporter mediates intracellular delivery of cathepsin D inhibitor : A potential target for cancer therapy* ; Journal of Control Release ; **2013** ; 171 ; 251-257.

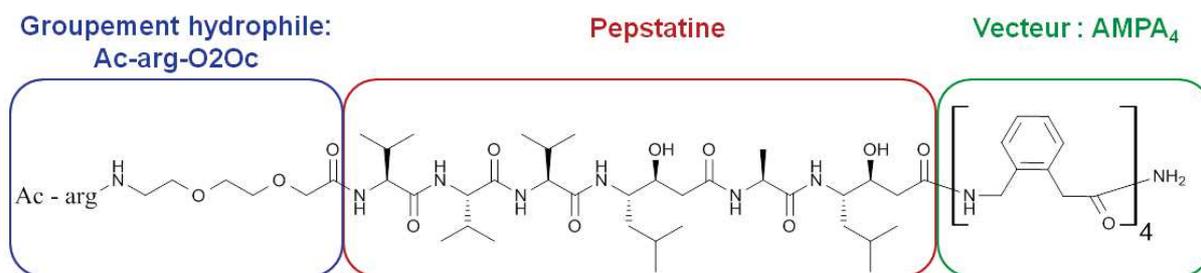


Figure 48 : Représentation du conjugué JMV 4463

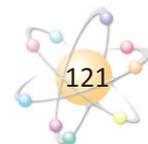
Pour réaliser les tests biologiques qui seront présentés par la suite, des constructions ont été synthétisées comme contrôles négatifs : un constitué du vecteur seul (AMPA₄), un conjugué sans pepstatine (Hm-AMPA₄), et un conjugué sans vecteur (Hm-Pepstatine) (Tableau 9).

Tableau 9 : Noms et structures des contrôles négatifs

Nom	Structure
AMPA₄ CN1	
Hm-AMPA₄ CN2	
Hm-Pepstatine CN3	

i. Tests biologiques

Tout d'abord le conjugué JMV 4463 a été testé sur CathD isolée, afin de vérifier si le vecteur et la partie hydrophile ne gênaient pas l'activité de la pepstatine. Il a été comparé à la pepstatine seule, aux CN2 et CN3, et au DMSO. Par la suite, des tests d'inhibition de CathD ont été réalisés sur des cellules du cancer du sein : MDA-MB-231 (Tableau 10). Ce dernier test donne des informations sur la capacité du conjugué à franchir la membrane plasmique, sans information sur sa localisation intracellulaire. En effet, dans un premier temps les cellules sont incubées avec les différents composés, puis elles sont lavées et lysées. Tous les compartiments cellulaires sont alors mélangés. Sur ce lysat total, l'activité enzymatique est mesurée après acidification du milieu. Ainsi, si le



conjugué rentre dans la cellule, après lyse, il se retrouvera au contact de l'enzyme même si la CathD et le conjugué n'étaient pas co-localisés initialement.

Tableau 10 : Inhibition de la CathD en extra- et en Intra-cellulaire

Composé ($10^{-5}M$)	Effet inhibiteur (% Contrôle DMSO)	
	Sur CathD isolée	Sur CathD intracellulaire
Pepstatine A	95 ± 1	10 ± 10
JMV 4463	95 ± 2	94 ± 4
CN2	1 ± 6	6 ± 13
CN3	92 ± 3	8 ± 14
DMSO	0 ± 9	0 ± 5

Pour ces expériences, l'activité enzymatique a été mesurée, et grâce au contrôle négatif du DMSO, l'effet inhibiteur a pu être calculé en % de ce dernier. Les tests sur enzyme isolée montrent que dès lors que la pepstatine est présente dans le conjugué, il y a inhibition de la CathD, et ce même avec un vecteur et/ou une partie hydrophile attachés à l'inhibiteur. Avec les tests sur cellule, les résultats montrent que la pepstatine seule est incapable de traverser la membrane cellulaire, tout comme le CN3, puisqu'aucune inhibition n'est observée. Le CN2 et le DMSO étant bien sûr inactifs sur enzyme isolée, il est normal qu'ils le soient également sur cellule. Il y a cependant un composé qui conserve une activité inhibitrice en intracellulaire, c'est le JMV 4463.

Par la suite, des tests de cytotoxicité ont été réalisés sur différentes lignées de cellules cancéreuses en raison de l'implication de la CathD dans la prolifération cellulaire et le processus métastatique (Figure 49) : MDA (cancer du sein), LNCaP (cancer de la prostate), HCT116 (cancer du colon), MCF7 (cancer du sein) et SaOs (cancer des os).

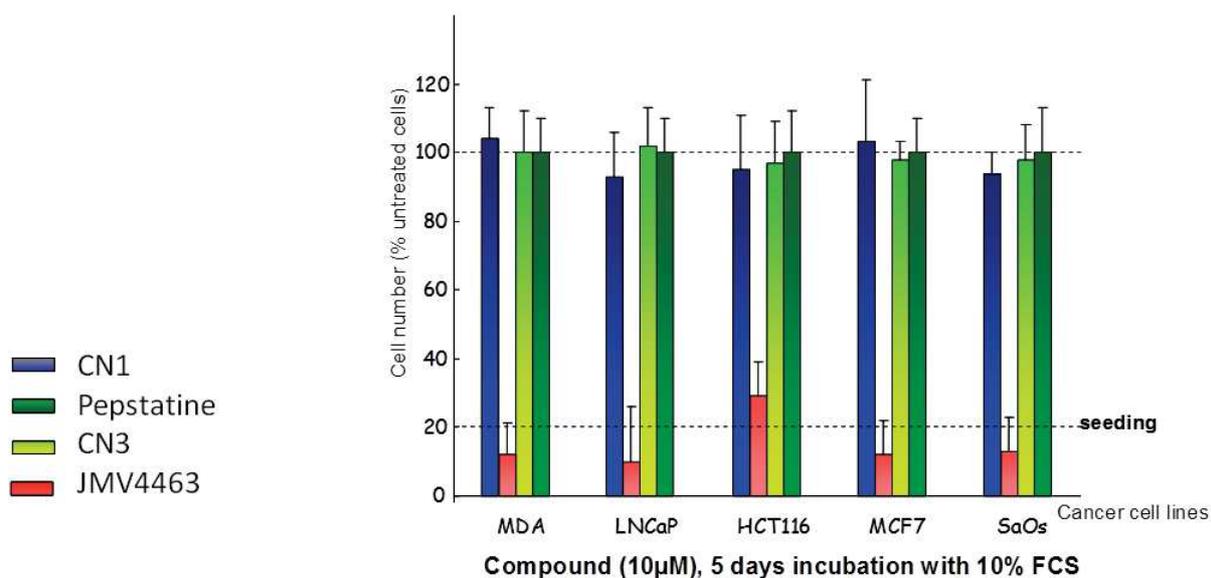


Figure 49 : Tests de cytotoxicité du JMV 4463 et de contrôles sur différentes lignées de cellules cancéreuses¹⁶¹

Les résultats indiquent que la pepstatine seule ou associée à la partie hydrophile n'est pas cytotoxique, ce qui est attendu puisqu'elle ne traverse pas les membranes cellulaires. Par contre, il a été mis en évidence que le conjugué JMV 4463 avait une activité cytotoxique. Ceci indique que la cytotoxicité observée est liée à la capacité d'internalisation du conjugué et vraisemblablement à sa capacité à inhiber la CathD intracellulaire. Ce composé a également été testé sur des cellules normales, des fibroblastes humains, et n'a montré aucune toxicité. D'autre part, le vecteur seul n'est pas cytotoxique non plus, montrant bien que l'activité du JMV 4463 n'est pas due à une activité propre au vecteur. Il a été montré par la suite que le conjugué JMV 4463 induisait l'apoptose chez les cellules traitées.

Enfin, des tests préliminaires *in vivo* ont été réalisés afin d'évaluer l'activité du composé JMV 4463. Il a été testé chez des souris athymiques porteuses d'une greffe de cellules MDA-MB-231 en sous-cutanée, et a été comparé au CN1 et au CN3. Les souris ont été traitées avant l'apparition des tumeurs (20 jours après implantation des cellules cancéreuses) avec les trois composés en ip (injection intrapéritonéale de 18mg/kg, deux fois par semaine) pendant 48 jours.

Les résultats montrent que le JMV 4463 retarde l'apparition de la tumeur, diminue l'incidence de l'apparition de la tumeur alors que les deux contrôles négatifs n'ont pas d'effet. Le conjugué actif permet également de diminuer la taille des tumeurs qui sont tout de même apparues (diminution de 91% dans la première expérience et de 65% dans la seconde).

Ces tests restent cependant préliminaires et doivent être complétés par d'autres expériences.

CHAPITRE II :
**Développement de nouveaux vecteurs
de pénétration cellulaire et étude du
conjugué JMV4463**

Introduction

Dans ce chapitre, deux thèmes sont abordés : la synthèse de nouveaux vecteurs potentiels de pénétration cellulaire, et une étude de relations structure / activité du conjugué JMV4463 présenté précédemment.

De courts oligomères de DBT et d'AMPA ayant démontré des résultats prometteurs de pénétration cellulaire et de vectorisation de la pepstatine, la poursuite de ce programme de recherche nous a conduit à envisager la synthèse de nouvelles plateformes analogues au DBT et à l'AMPA dans le but d'améliorer la compréhension du mode de fonctionnement de ces outils chimiques, mais également d'étoffer la gamme de vecteurs permettant une internalisation cellulaire de composés bioactifs. Différentes synthèses ont été mises en place durant ma thèse, afin d'obtenir différents précurseurs de vecteurs.

Dans le cas de l'AMPA, des analogues en série pyrrole (AMPyrA) et indole (AMIA) ont été envisagés (Figure 50), en modifiant la nature du noyau aromatique. Un dérivé en série cyclohexyle a également été étudié (AMCA).

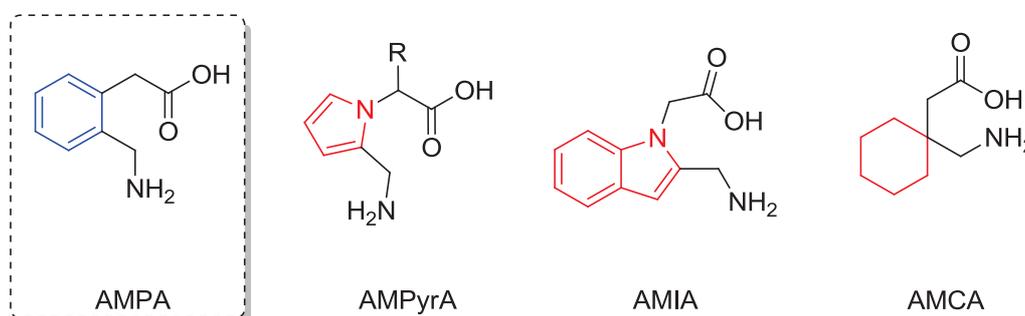


Figure 50 : Analogues de l'AMPA variant par le noyau cyclique

D'autres analogues ont été étudiés, en conservant le noyau benzénique de l'AMPA, mais en introduisant différents substituants sur le noyau aromatique. Ainsi, trois synthons ont été obtenus comportant respectivement (Figure 51):

- deux groupements méthoxy : l'acide (2-(aminométhyl)-4,5-diméthoxyphényl)acétique (diMeO-AMPA)
- un *o*-diphénol : l'acide (2-(aminométhyl)-4,5-dihydroxyphényl)acétique (diOH-AMPA)
- un atome de brome : l'acide (2-(aminométhyl)-4-bromophényl)acétique (BromoAMPA)

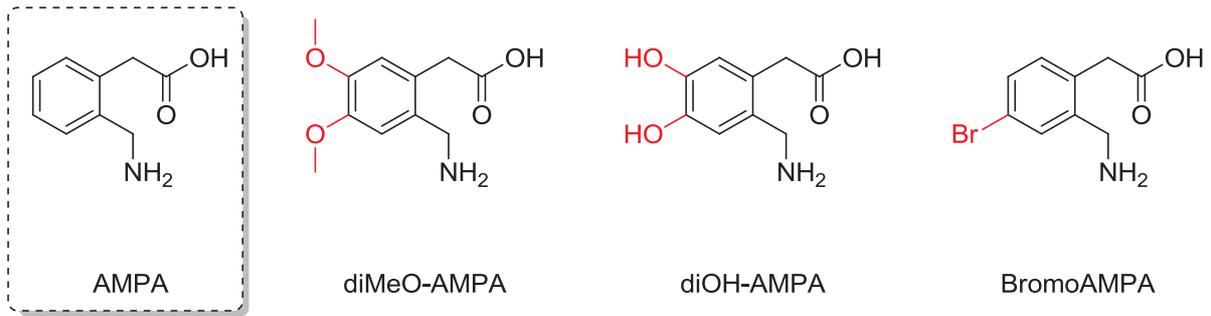


Figure 51 : Analogues de l'AMPA substitués

Une troisième catégorie d'analogues du synthon AMPA a été étudiée. Ces analogues sont des isomères de position qui possèdent leur chaîne aminométhyle respectivement en position méta (*m*-AMPA) ou para (*p*-AMPA) du groupement acétique (Figure 52).

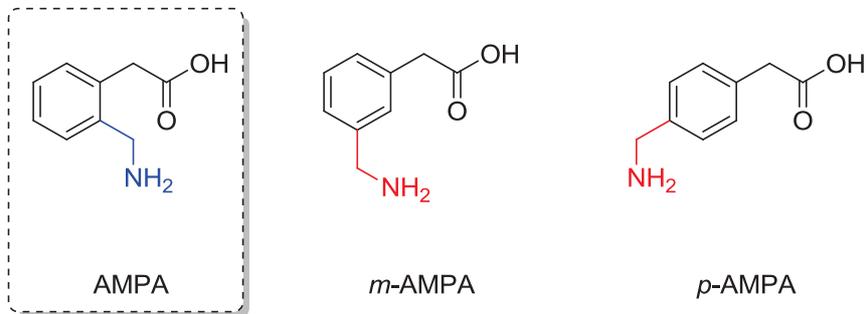


Figure 52 : Analogues isomères de position de l'AMPA

Enfin un dernier analogue de l'AMPA a été étudié. Il s'agit d'un homologue inférieur pour lequel la chaîne acétique a été raccourcie d'un carbone, formant ainsi un dérivé de l'acide benzoïque (AMBA) (Figure 53).

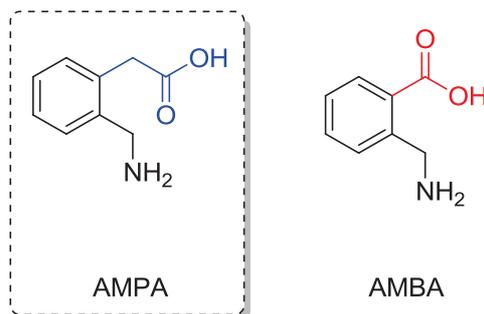


Figure 53 : Structures de l'AMPA et de l'AMBA

Dans le cas du DBT, un synthon analogue a été synthétisé, en remplaçant l'atome de soufre du DBT par un atome d'azote, formant ainsi une benzo[1,4]diazépine (Figure 54). Celui-ci sera appelé LBD pour L-BenzoDiazépine dans la suite du manuscrit.

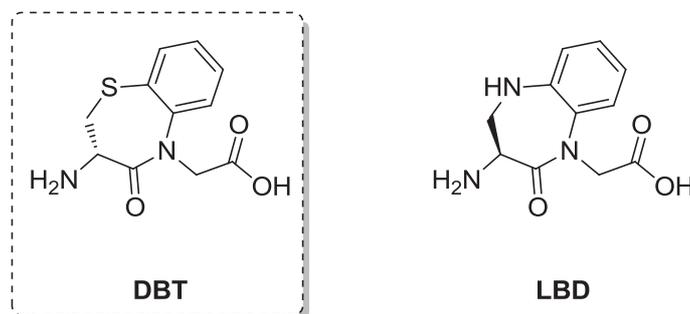


Figure 54 : Structures du DBT et du LBD

Comme précisé plus haut, le projet de thèse a également eu pour but d'approfondir l'étude du conjugué de référence JMV4463. Dans cet esprit, plusieurs conjugués ont été synthétisés, en leur appliquant diverses modifications structurales afin d'effectuer une étude des relations structure / activité. Ceci avait également pour but d'obtenir des informations sur le mode de fonctionnement et les requis structuraux nécessaires pour observer une bonne activité cytotoxique des composés sur les cellules tumorales. Ainsi, les conjugués de pepstatine réalisés pour l'étude de relations structure / activité, ainsi que ceux incorporant les nouveaux vecteurs, ont été testés pour leur capacité à inhiber la CathD et pour leur capacité à traverser les membranes cellulaires (tests réalisés sur des cellules MDA-MB-231). Enfin, des tests de cytotoxicité ont été réalisés et une nouvelle étude *in vivo* sur le JMV4463 a été réalisée.

I) Synthèses de plateformes précurseurs de nouveaux vecteurs

Dans cette partie sont présentées les synthèses qui ont été réalisées afin d'obtenir les analogues des mimes contraints de dipeptides étudiés au laboratoire que sont l'AMPA et le DBT présentés précédemment (Chapitre 1, V).

a. Synthèse d'un analogue de l'AMPA en série pyrrole

Le pyrrole est un noyau aromatique ayant montré sa capacité à mimer une liaison peptidique.¹⁶² De ce fait, l'utilisation de ce cycle azoté permettrait la formation d'un nouveau mime contraint de dipeptide. De plus, le pyrrole est un isostère connu du benzène, c'est pourquoi le premier analogue de l'AMPA qui a été étudié est un analogue pyrrolique (Figure 55), intégrant ainsi un hétérocycle comme noyau aromatique. Celui-ci a été appelé AMPyrA pour acide 2-(2-(AminoMéthyl)-1H-Pyrrol-1-yl)Acétique (Composé 1).

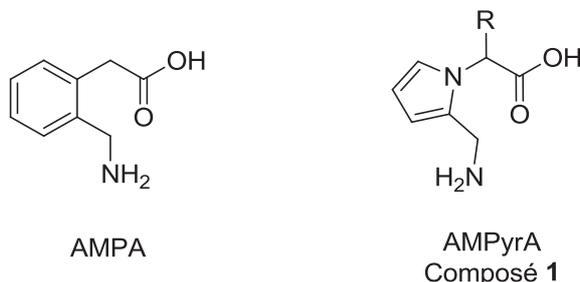


Figure 55 : Structures de l'AMPA et de l'AMPyrA

L'AMPyrA possède une chaîne aminométhyle. Les aminométhylpyrroles ont été largement décrits pour la synthèse de porphyrines¹⁶³ en jouant sur leur capacité à polymériser. Cependant, en 1992, l'équipe d'AD Abell a décrit la synthèse de pyrroles 1,2-disubstitués en 5 étapes à partir de diméthoxytétrahydrofurane¹⁶⁴ (Schéma 21) sans rapporter de problèmes liés à cette polymérisation. La première étape met en jeu une réaction de Clauson-Kaas, qui permet dans un premier temps de former un cycle pyrrole (composés **A4** et **A5**) à partir de l'amine primaire de dérivés d'acide aminé (alanine et valine). Par la suite, une réaction de formylation permet d'introduire une fonction

¹⁶² AD Abell ; *Heterocyclic-based peptidomimetics* ; Int. J. Pept. Res. Ther. ; **2002** ; 8 ; 267-272.

¹⁶³ JB Paine III, WB Kirshner, DW Moskowitz ; *An Improved Synthesis of Octaethylporphyrin* ; J. Org. Chem. ; **1976** ; 21 ; 3857-3860.

¹⁶⁴ AD Abell, DA Hault, EJ Jamieson ; *Synthesis of 1,2-disubstitued pyrroles : a cis peptide bond surrogate* ; Tet. Lett. ; **1992** ; 33 ; 5831-5832.

aldéhyde en position 2 du pyrrole pour former les composés **A6** et **A7**. Après une saponification de l'ester pour former les dérivés pyrroliques **A8** et **A9**, une amination réductrice permet la formation de la chaîne aminométhyle souhaitée (**A11**, **A12** et **A13**). Ces trois étapes sont des étapes clés de la synthèse et permettent d'obtenir différents dérivés en série pyrrole. Le dérivé de la glycine **A10** est obtenu à partir du pyrrole-2-carboxaldéhyde qui a subi une réaction d'alkylation. L'obtention du composé **1** nous a donc semblé envisageable à partir d'une matière première de type α -aminoester.

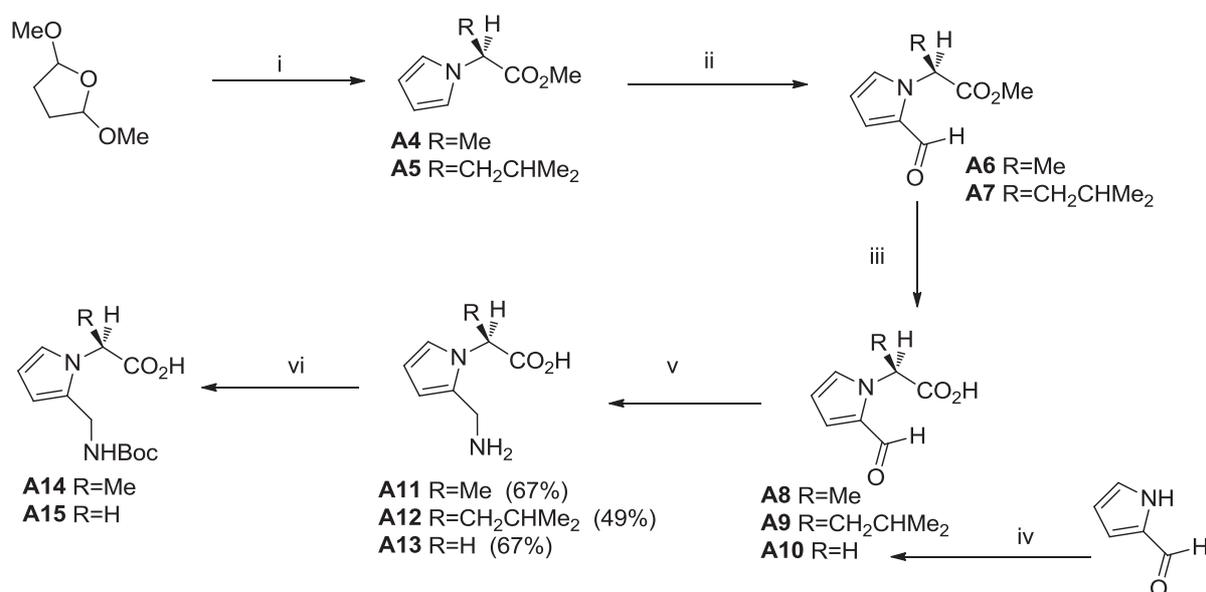


Schéma 21 : Synthèse des dérivés pyrroliques par Abell et al.¹⁶⁴

Dans un premier temps, la synthèse du composé **1** a été entreprise à partir d'un ester de l'alanine comme substrat modèle. En effet, selon le schéma rétrosynthétique qui suit, le dérivé protégé Fmoc-AMPyrA **2** (précurseur nécessaire à la synthèse sur support solide) pourrait être obtenu après protection de l'amine de l'AMPyrA **3** par un groupement Fmoc. La fonction acide du composé **3** pourrait résulter de l'hydrogénolyse d'un ester benzylique (composé **4**), et l'amine primaire de l'amination réductrice réalisée sur l'aldéhyde correspondant en α de l'azote pyrroliques (composé **5**). Ce dernier serait formé en amont via une formylation de Vilsmeier sur le composé **6**. Pour finir, la première étape de cette synthèse pourrait être une réaction de Clauson-Kaas. Cette réaction permettrait de faire réagir le diméthoxytétrahydrofurane **7** avec une amine primaire pour former le pyrrole souhaité. En utilisant des acides aminés comme par exemple l'ester benzylique de l'alanine (H-Ala-OBn) **8**, cette réaction pourrait permettre l'introduction d'une grande variété de chaînes latérales sur cette partie de l'AMPyrA (Schéma 22).

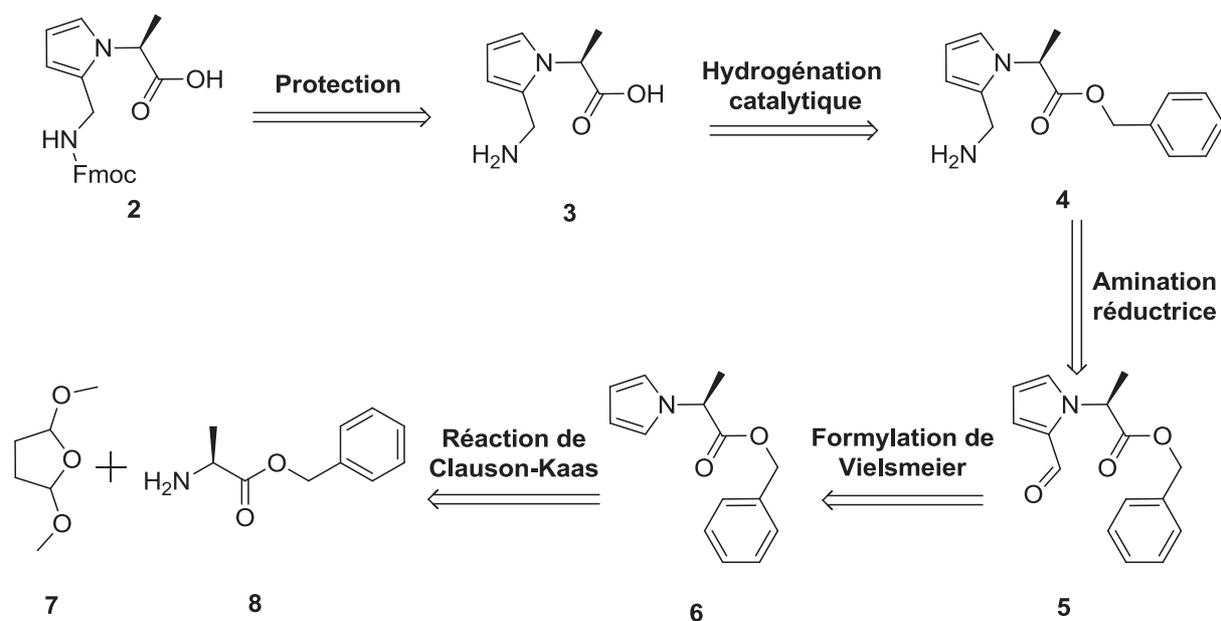


Schéma 22 : Schéma rétrosynthétique de la synthèse envisagée pour obtenir le Fmoc-AMPyra 2

La première étape, comme précisé précédemment, est une réaction de Clauson-Kaas¹⁶⁵, permettant la formation d'un pyrrole par réaction du diméthoxytétrahydrofurane en présence d'une amine primaire.

D'après le mécanisme réactionnel présenté ci-dessous (Schéma 24), la réaction de Clauson-Kaas nécessite un milieu réactionnel acide. En 2005, l'équipe de Gourlay¹⁶⁶ a étudié cette réaction et a élaboré un protocole ne nécessitant pas l'ajout d'acide dans le milieu. En effet, l'utilisation d'un aminoacide ou aminoester sous la forme d'un chlorhydrate auquel est ajouté de l'acétate de sodium permet d'ajuster le pH du milieu à environ 5 sans avoir à introduire d'acide dans le milieu. Ce pH acide optimal pour la réaction de Clauson-Kaas va alors favoriser les déshydratations de l'intermédiaire réactionnel lors de la réaction. De plus, ils ont montré la nécessité de former le diol **9** avant de faire réagir l'amine primaire sur le noyau furanique, passant d'un rendement de 10% lorsque le furane est diméthoxylé, à 91% lorsqu'il est dihydroxylé. De plus, il a été montré que cette réaction permettait une rétention de la stéréochimie du carbone asymétrique de l'acide, à condition que le produit formé ne reste pas dans le milieu aqueux acide. C'est pourquoi la réaction est réalisée dans une solution biphasique, ainsi le pyrrole formé passe dans la phase organique et n'est plus exposé au milieu acide aqueux.¹⁶⁷

¹⁶⁵ N Clauson-Kaas, Z Tyle ; *The preparation of pyrroles from furans* ; Acta Chem. Scand ; **1952** ; 6 ; 867-874.

¹⁶⁶ BS Gourlay, PP Molesworth, JH Ryan, JA Smith ; *A new and high yielding synthesis of unstable pyrroles via a modified Clauson-Kaas reaction* ; Tet. Lett. ; **2006** ; 47 ; 799-801.

¹⁶⁷ CW Jefford, F de Villedon de Naide, K Sienkiewicz ; *The synthesis of chiral 1-(1H-pyrrole) derivatives* ; Tetrahedron : Asymmetry ; **1996** ; 7 ; 1069-1076.

Dans notre cas, l'alanine sous la forme de son ester benzilyque a été utilisée (Schéma 23). Cet acide aminé protégé a été choisi comme substrat de référence afin de démontrer la faisabilité de cette séquence réactionnelle avant une diversification éventuelle avec différents acides aminés naturels ou non.

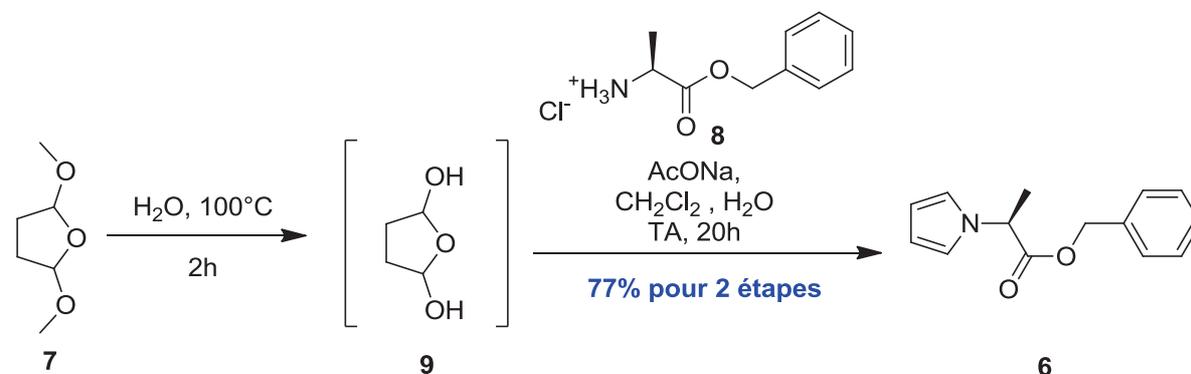


Schéma 23 : Réaction de Clauson-Kaas

Cette réaction s'effectue en deux temps. Tout d'abord le dérivé du furane **7** est dissous dans l'eau et chauffé pendant deux heures afin de former le tétrahydrofuran-2,5-diol **9**. Après refroidissement à température ambiante sont ajoutés successivement l'ainoester **8**, l'acétate de sodium et le dichlorométhane. Lors de cette réaction, le milieu acide (pH 5) favorise la déshydratation de l'intermédiaire **I** obtenu après attaque nucléophile de l'amine primaire sur **9** (Schéma 24) mais n'entraînerait pas de racémisation puisque le pyrrole formé passe au fur et à mesure dans la phase organique.

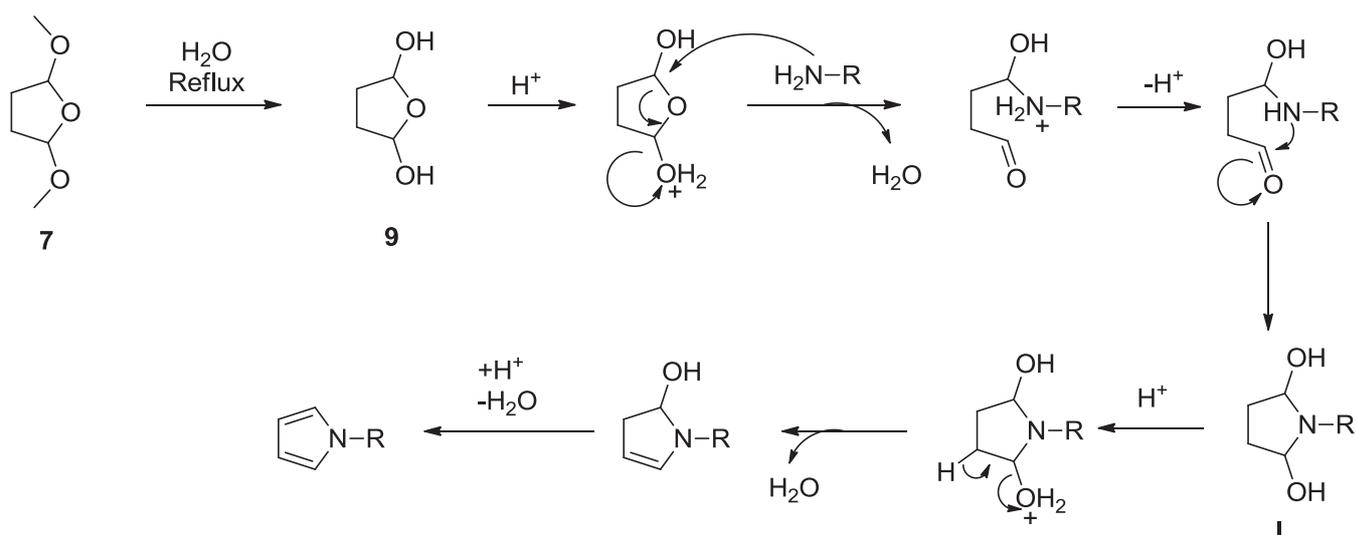


Schéma 24 : Mécanisme de la réaction de Clauson-Kaas

Cette réaction a permis l'obtention du pyrrole **6** souhaité avec un rendement de 77% après purification.

La seconde étape avait pour but la formylation sélective en α de l'azote du pyrrole. Les premiers essais ont été conduits d'après les travaux d'Abell et al.¹⁶⁴ en utilisant de l'orthoformiate de triméthyle et du tétrachlorure de titane dans le DCM pendant 2h à -40°C et ont permis d'obtenir l'aldéhyde désiré **5** avec un rendement de 21% (Schéma 25, voie A).

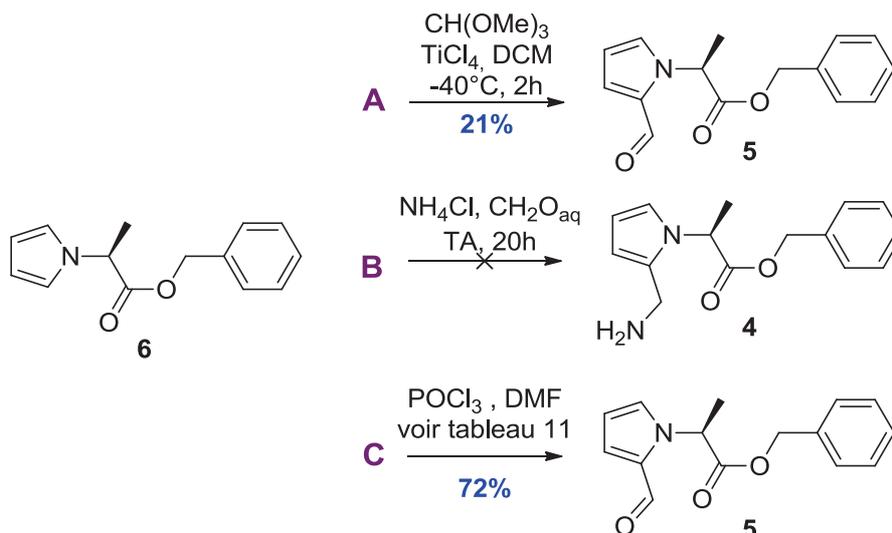


Schéma 25 : Réactions à partir du 2-pyrrol-1-yl-propanoate de benzyle **6**

En parallèle de ces essais de formylation, des essais de formation « one pot » de la fonction aminométhyle ont été effectués en utilisant du chlorure d'ammonium et du paraformaldéhyde à température ambiante pendant 20h sur le composé **6** (voie B) en s'inspirant des travaux de Sutcliffe et al.¹⁶⁸ Les analyses LC-MS ont montré dans ce cas que le pyrrole **6** de départ était retrouvé intact sans formation du dérivé aminométhyle **4**. Finalement, des essais de formylation de Vilsmeier ont été réalisés en s'inspirant des travaux de Bu et al.¹⁶⁹, Ilyin et al.¹⁷⁰, et Nenajdenko et al.¹⁷¹ (voie C) et se sont révélés plus prometteurs. Cependant les conditions réactionnelles ont dû être optimisées afin d'accroître le rendement de 39% obtenu lors des premiers essais (Tableau 11).

Lors de la première tentative (entrée 1 du tableau 11), le réactif de Vilsmeier a été préparé par ajout direct de 1,2 éq de POCl_3 sur 1,2 éq de DMF à 0°C sous N_2 . Ce mélange est agité à cette

¹⁶⁸ OB Sutcliffe, RC Storr, TL Gilchrist, P Rafferty ; *Azafulvenium methides : new extended dipolar systems* ; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1 ; **2001** ; 1795-1806.

¹⁶⁹ X Bu, YLi, J Liu, D Zeng, W Zhao ; *Synthesis of 2-(5-hydroxymethyl-2-formylpyrrol-1-yl)propionic acid lactone* ; Chem. Nat. Comp. ; **2012** ; 48 ; 194-197.

¹⁷⁰ PV Ilyin, AS Pankova, MA Kuznetsov ; *Direct and efficient synthesis of pyrrole-3-carbaldehydes by Vilsmeier-Haack formylation of pyrroles with sterically crowded amides* ; Synthesis ; **2012** ; 44 ; 1353-1358.

¹⁷¹ VG Nenajdenko, AL Reznichenko, ES Balenkova ; *Diastereoselective Ugi reaction without chiral amines : the synthesis of chiral pyrroloketopiperazines* ; Tetrahedron ; **2007** ; 63 ; 3031-3041.

température pendant 20 minutes puis une solution de DMF contenant 1 éq de composé **6** est ajoutée. Le mélange a été agité à TA pendant la nuit puis la réaction est traitée pour obtenir le composé **5** avec un rendement de 39%. Lors de cette réaction, un produit secondaire se forme : le produit formylé en β du pyrrole pour un ratio α/β : 60/40 (Figure 56).

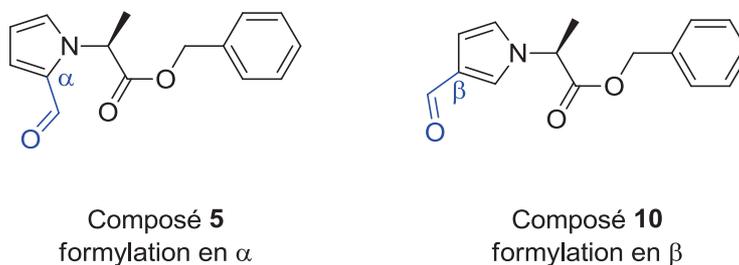


Figure 56 : Produits formés lors de la réaction de Vilsmeier

D'un point de vue mécanistique, lors de cette réaction de formylation, l'oxychlorure de phosphore réagit avec le diméthylformamide pour générer le sel de Vilsmeier **13** (Schéma 26). Celui-ci réagit ensuite avec le carbone en α du pyrrole pour donner la chloro-*N,N*-diméthylméthanamine correspondante **14**. L'atome de chlore est éliminé, permettant l'attaque d'une molécule d'eau pour former un intermédiaire hydroxy-*N,N*-diméthylméthanaminium **15**. L'aldéhyde est finalement formé en perdant un proton et une molécule de diméthylamine.

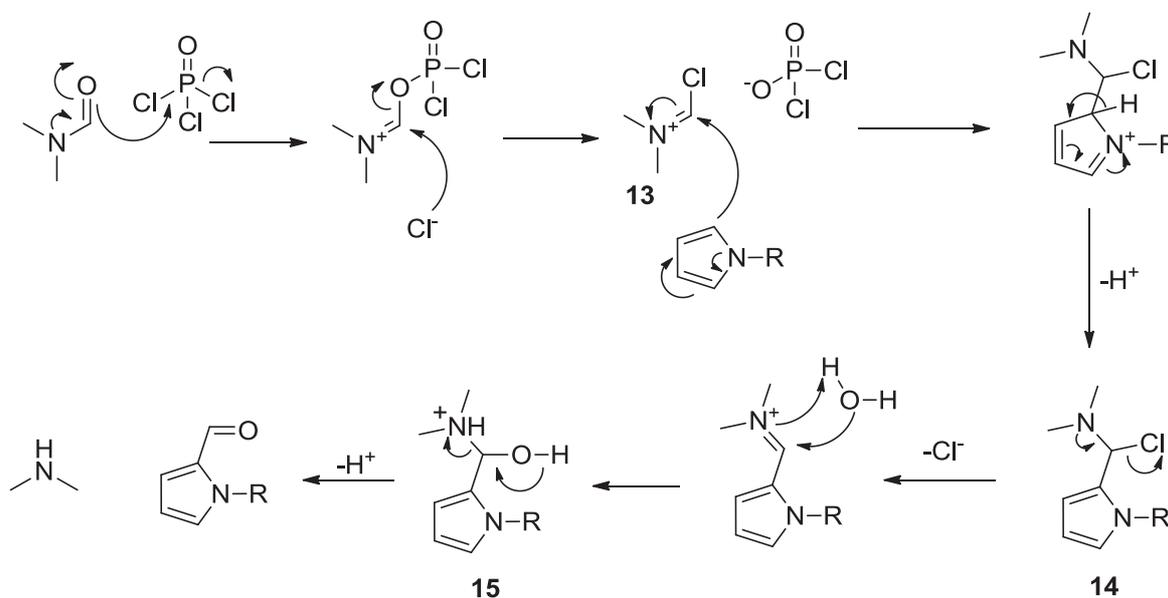


Schéma 26 : Mécanisme de la réaction de Vilsmeier

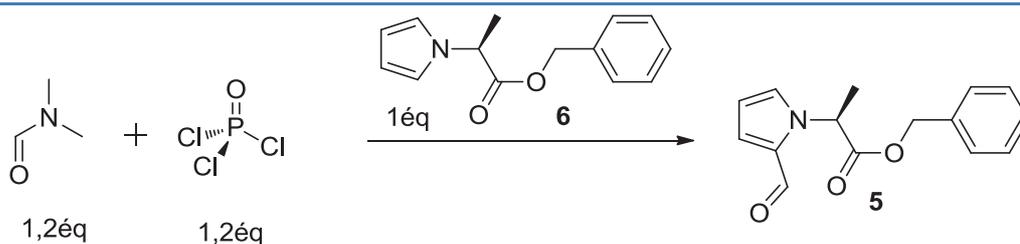
Afin d'optimiser les conditions opératoires de cette réaction, différents paramètres expérimentaux ont été modifiés, ils sont résumés dans le tableau 11 :



- Le mode d'addition de POCl_3 dans le DMF et du pyrrole **6** (dans le DCM) sur le sel de Vilsmeier est réalisé via un goutte à goutte (Tableau 11, entrée 2). De plus, la réaction a été stoppée au bout de 4h. Une amélioration du *modus operandi* est observée puisque le composé **5** est obtenu avec un rendement en produit isolé de 64% et un ratio HPLC α/β : 65/35.
- La température de la réaction : après addition du pyrrole **6**, le mélange est agité pendant 5h30 à 0°C, puis 1h à 5°C et enfin 2h30 à TA (Tableau 11, entrée 3). Cette séquence avait pour but de limiter la formation du composé **10** mais ces conditions ne sont pas optimales puisqu'un rendement inférieur est observé. Nous observons dans ce cas une réaction incomplète avec une formation des 2 régioisomères avec un ratio α/β : 65/35.
- Le pyrrole **6** est ajouté sans solvant dans le mélange contenant le réactif de Vilsmeier (Tableau 11, entrée 4). Le rendement obtenu reste moins élevé qu'avec les conditions de l'entrée 2 mais permet d'obtenir un ratio HPLC α/β : 80/20.
- Les entrées 5 et 6 du Tableau 11 correspondent à des temps de réactions différents, dans le cas où le composé **6** est ajouté sans solvant sur le sel de Vilsmeier. Un rendement de 72 % est obtenu pour un temps de réaction de 6h à température ambiante avec un ratio HPLC α/β : 75/25.
- Afin de diminuer la quantité de produit secondaire **10** formé, les conditions de l'entrée 6 ont été exploitées, en abaissant la température de réaction à -15°C. Mais cela n'a pas permis d'améliorer le rendement (Tableau 11, entrée 7).
- L'entrée 8 (Tableau 11) correspond à des conditions où le réactif de Vilsmeier est préparé à basse température (-15°C) mais sans amélioration du rendement.
- Tous les réactifs ont été introduits dans le ballon successivement et le mélange a été agité à -10 °C pendant 4h, pour obtenir le composé **6** avec un rendement de 69% (Tableau 11, entrée 9).

Deux modes opératoires ressortent de ce tableau : les conditions réactionnelles 6 et 9. Il en ressort selon la réaction 6 que le réactif de Vilsmeier doit se former à froid pendant une demi-heure (sous flux d'azote), le pyrrole est ensuite ajouté en une fois et le mélange réactionnel doit être agité pendant 6h à TA. D'autre part, si tous les réactifs sont introduits « one pot », et que le mélange est agité à froid (-10°C, réaction 9), le rendement reste satisfaisant. Le réactif de Vilsmeier est dans ce cas consommé dès sa formation. Au total, la réaction a été optimisée sans toutefois bloquer la formation concomitante de l'isomère **10** formylé en β du pyrrole. Cet isomère, bien que minoritaire, est observé dans tous les essais. Il a pu être isolé lors de la purification par chromatographie sur gel de silice.

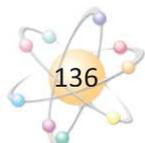
Tableau 11 : Optimisation de la réaction de Vilsmeier



N° réaction	Préparation du sel de Vilsmeier (POCl ₃ sur DMF)	T ₁ (°C)	t ₁ (min)	Ajout du pyrrole	T ₂ (°C)	t ₂ (h)	Rdt isolé (%)	α/β
1	En 1 fois	0	20	En 1 fois dans DMF	TA	nuit	39	60/40
2	Goutte à goutte	0	30	Goutte à goutte dans DCM à 0°C	TA	4	64	65/35
3	En 1 fois	0	30	Goutte à goutte dans DCM à 0°C	0 5 TA	5,5 1 2,5	36	65/35
4	En 1 fois	0	30	Sans solvant (rajout de POCl ₃ + DMF)	TA	3h	56	80/20
5	En 1 fois	0	30	Sans solvant	TA	3h	52	70/30
6	En 1 fois	0	30	Sans solvant	TA	6h	72	75/25
7	En 1 fois	0	30	Sans solvant	-15	6h	54	60/40
8	En 1 fois	-15	30	Sans solvant	TA	6h	62	65/35
9	Tout introduit successivement				-10	4h	69	75/25

Une fois le pyrrole-2-carboxaldéhyde **5** obtenu, des essais ont été entrepris afin de convertir sa fonction aldéhyde en chaîne aminométhyle (Schéma 27). Dans un premier temps, des essais d'amination réductrice ont été réalisés en s'inspirant de la littérature :

- Voie A¹⁶⁴ : l'aldéhyde **5** est dissous dans le MeOH avec 7 éq d'acétate d'ammonium puis 2,5 éq de cyanoborohydrure de sodium sont ajoutés. Après une agitation à TA pendant 18h l'aldéhyde **5** est retrouvé intact.



- Voie B¹⁷² : dans cet essai, un autre agent réducteur a été utilisé (le triacétoxyborohydrure de sodium). L'acétate d'ammonium est introduit ici en quantité stoechiométrique en présence de sulfate de magnésium et d'une base organique (DIEA). Cependant aucune réaction n'est observée après 15h d'agitation à TA.

Par la suite, un essai alternatif a été envisagé à partir d'un protocole développé au sein du laboratoire¹⁷³ et inspiré des travaux de Dubé¹⁷⁴ afin d'introduire directement une amine protégée par un groupement Cbz (voie C). Pour ce faire, 1 éq d'aldéhyde **5** est dissous dans le toluène. Sont ensuite ajoutés successivement dans le milieu 3 éq de carbamate de benzyle, 3 éq de triéthylsilane et 2 éq de TFA. Le mélange obtenu est chauffé à 120°C. Le suivi de la réaction par HPLC et LC-MS a révélé que le composé de départ ne réagissait pas, même après 24h de chauffage. Nous avons donc envisagé de former l'amine en deux étapes : i) formation d'une oxime en premier lieu, puis ii) hydrogénation palladocatalysée (voie D¹⁷⁵).

¹⁷² JA Hudson, JB Sxeeney ; *An efficient method for reductive amination of carbonyl compounds under nonacidic conditions* ; Synlett ; **2012** ; 23 ; 2176-2178.

¹⁷³ E Ayral ; Synthèse d'inhibiteurs du facteur VIIA ; Thèse soutenue le 30 Juin 2005 à Montpellier.

¹⁷⁴ D Dubé, AA Scholte ; *Reductive N-alkylation of amides, carbamates and ureas* ; Tet. Lett. ; **1999** ; 40 ; 2295-2298.

¹⁷⁵ GV Mokrov, AM Likhosherstov, VS Troitskaya, TA Gudasheva ; *Azacycloalkanes : XXXIX. * New syntheses of 1H-Pyrrole-1-carboxylic acid and 1,2-dihydropyrrolo-[1,2-a]pyrazin-3(4H)-one derivatives* ; Russ. J. Org. Chem. ; **2009** ; 45 ; 1829-1833.

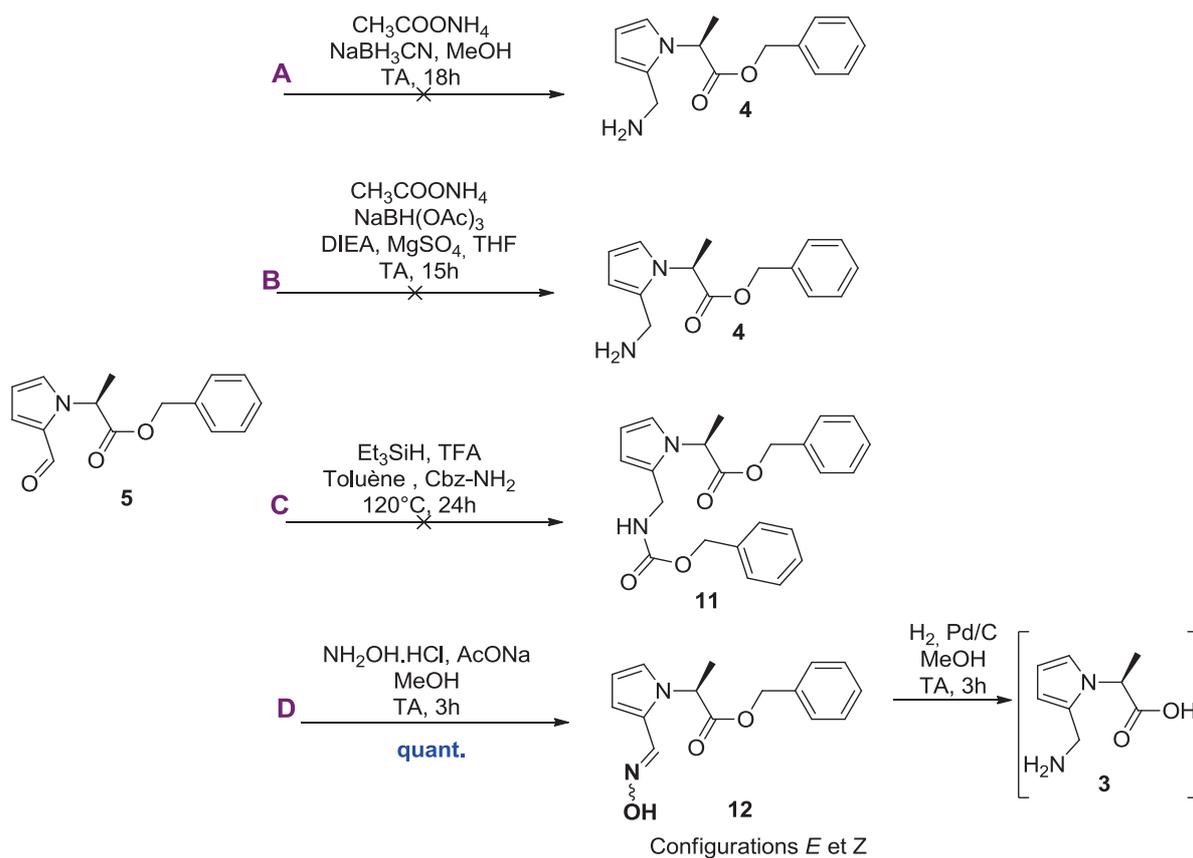


Schéma 27 : Essais de formation de l'amine à partir de l'aldéhyde

Lors de la première étape de la voie D, le pyrrole **5** est dissous dans le MeOH puis 1,2 éq d'hydroxylamine sous la forme de son chlorhydrate et 1,2 éq d'acétate de sodium sont ajoutés. La solution obtenue est agitée à température ambiante pendant 3h, permettant d'obtenir après extraction l'oxime avec un rendement quantitatif. Lors de cette réaction, deux oximes sont formées, correspondant aux deux configurations différentes, *E* et *Z* (25/75 ou 75/25). Ceci a été mis en évidence par analyses LC-MS montrant deux pics de temps de rétention différents mais de même masse ($m/z = 273,2$). Dans le cadre de cette synthèse, la séparation des deux conformères n'est pas nécessaire puisque l'étape suivante consiste à réduire l'oxime en amine primaire.

Dans la seconde étape, l'hydrogénation en présence de palladium sur charbon, permet non seulement la réduction de l'oxime **12** en amine, mais également d'éliminer la protection benzylique de la fonction acide. L'oxime est dissoute dans le MeOH en présence du catalyseur. Du dihydrogène est mis à buller dans la solution et le mélange est agité à TA pendant 3h. Les résultats obtenus par LC-MS ont montré la présence de traces du composé de masse attendue mais le caractère amphotère du dérivé obtenu ne nous a pas permis de l'isoler afin de le caractériser. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser un autre type d'ester pour réaliser la réaction de Clauson-Kaas, afin de disposer sur l'acide d'une protection résistante aux conditions de l'hydrogénation pallado-catalysée.

Une séquence réactionnelle analogue à celle décrite précédemment en série benzylique a été mise au point à partir de l'ester tertibutylique de l'alanine (Schéma 28).

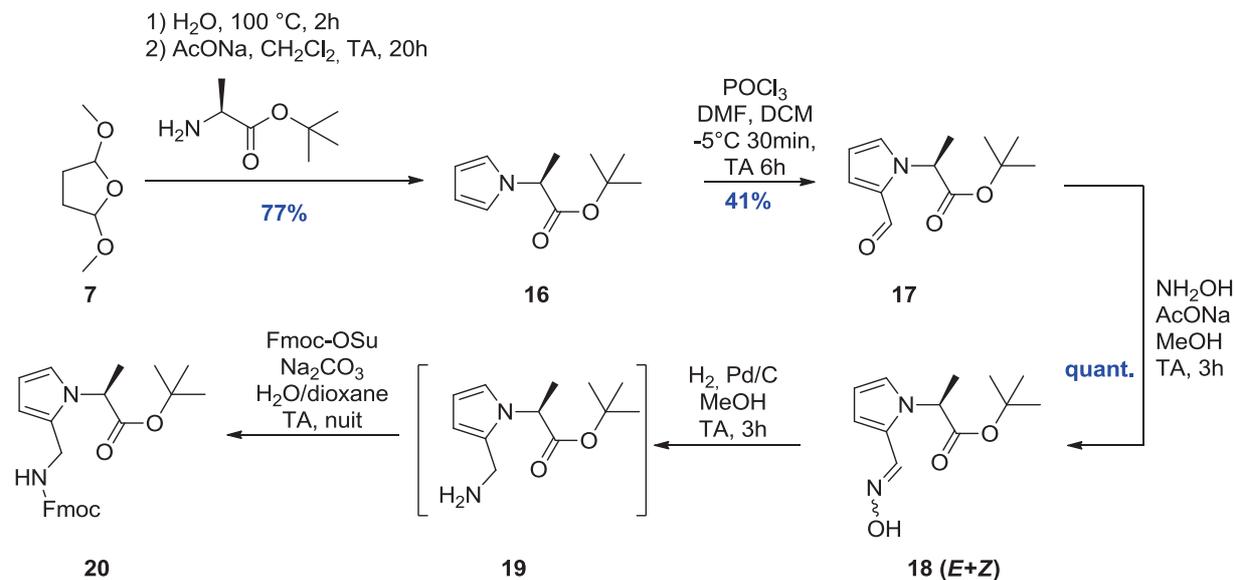


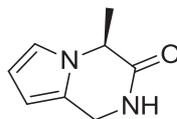
Schéma 28 : Synthèse envisagée pour obtenir l'AMPyrA

La réaction de Clauson-Kaas réalisée dans les conditions décrites précédemment a permis d'obtenir le pyrrole **16** avec un rendement de 77%. Par la suite la réaction de formylation a été réalisée, formant ainsi l'aldéhyde **17** souhaité avec un rendement de 41%. La formation du composé formylé en β de l'azote a également été observée avec un ratio HPLC α/β : 45/55. L'aldéhyde **17** réagit ensuite avec de l'hydroxylamine en présence d'acétate de sodium pour générer l'oxime **18** de façon quantitative, qui est ensuite réduite en amine **19** en présence de Pd/C. Les conditions de ces quatre premières étapes sont les mêmes que décrites pour la synthèse du dérivé pyrrolique possédant un ester de benzyle (composé **12**) vu plus haut. Compte tenu de la probable instabilité de l'amine **19**, celle-ci a été directement engagée dans une réaction de protection par un groupement Fmoc dans des conditions classiques pour obtenir l'AMPyrA **20**. Ce dernier a été observé en HPLC, mais n'a été obtenu qu'en très faible quantité, ne permettant pas de calculer un rendement, ni de le caractériser.

La réaction d'hydrogénation catalytique ainsi que la protection par un groupement Fmoc sont des réactions connues pour être très efficaces et quantitatives. La très faible quantité de produit obtenu ici a été attribuée à une cyclisation intramoléculaire formant un bicyclopyrrolopyrazinone (Figure 57) de masse $m/z = 151$, ainsi qu'à la polymérisation de l'aminométhylpyrrole (Schéma 29)¹⁷⁶. En effet, l'instabilité de ces aminométhylpyrroles a été étudiée dans le cadre de la synthèse de

¹⁷⁶ RB Frydman, S Reil, B Frydman ; *Relation between structure and reactivity in porphopilinogen and related pyrroles* ; Biochem. ; **1971** ; 10 ; 1154-1160.

porphyrines.¹⁶³ Nonobstant cette étude, les travaux d'Abell semblaient indiquer que ce type d'intermédiaire pouvait être suffisamment stable pour être isolé puis protégé sur sa fonction amine.



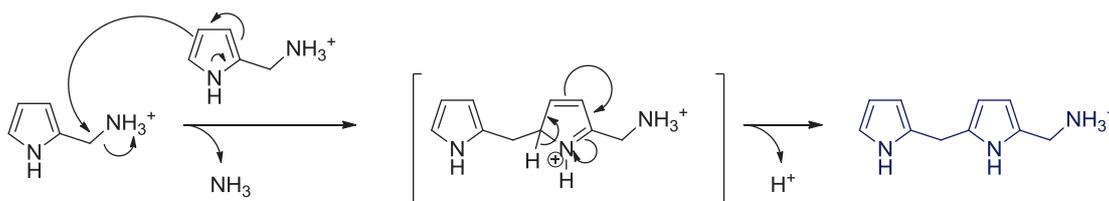
(S)-4-méthyl-1,2-dihydropyrrolo[1,2-a]pyrazin-3(4H)-one

Figure 57 : Produit formé par cyclisation lors de la réduction palladocatalysée

La polymérisation peut se faire selon deux voies différentes, l'une étant favorisée par rapport à l'autre selon le pH du milieu. En milieu acide, l'amine est protonée, rendant plus facile le départ d'une molécule d'ammoniaque. La délocalisation du doublet libre de l'azote du pyrrole permet dans un premier temps au carbone α le moins encombré d'attaquer le carbone aliphatique d'une seconde molécule pour conduire au départ d'ammoniaque. Dans un second temps l'intermédiaire obtenu se ré-aromatise, formant ainsi un dimère de l'aminométhylpyrrole.

En milieu neutre, il y a également substitution nucléophile et perte d'une molécule d'ammoniaque dans un premier temps. Dans ce cas, l'attaque nucléophile procède via le carbone α portant la chaîne aminométhyle. Le réarrangement qui s'en suit pour ré-aromatiser le noyau pyrrole entraîne alors la libération d'une molécule de méthaniminium, qui réagira avec l'eau pour former de l'ammoniaque et du formaldéhyde. Le dimère ainsi formé ne comporte plus de fonction amine.

En milieu acide :



En milieu neutre :

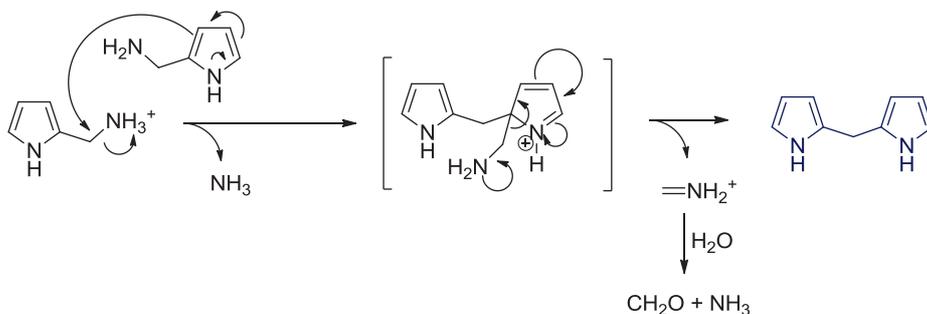


Schéma 29 : Polymérisation de l'aminométhylpyrrole

Après purification du produit obtenu par réduction du composé **18**, l'analyse par LC-MS a pu mettre en évidence que le produit isolé correspond au dimère de masse $m/z = 432$. Ce dernier se fragmente en un produit de même masse que le produit attendu **19** ($m/z = 225$). Avec ces résultats, nous avons approfondi l'étude des analyses LC-MS obtenues pour le dérivé **3** formé par réduction de l'oxime et de l'ester de benzyle (composé **12**). Il a ainsi pu être mis en évidence que la masse correspondant au produit souhaité correspondait également à une fragmentation du dimère formé par polymérisation (Figure 58).

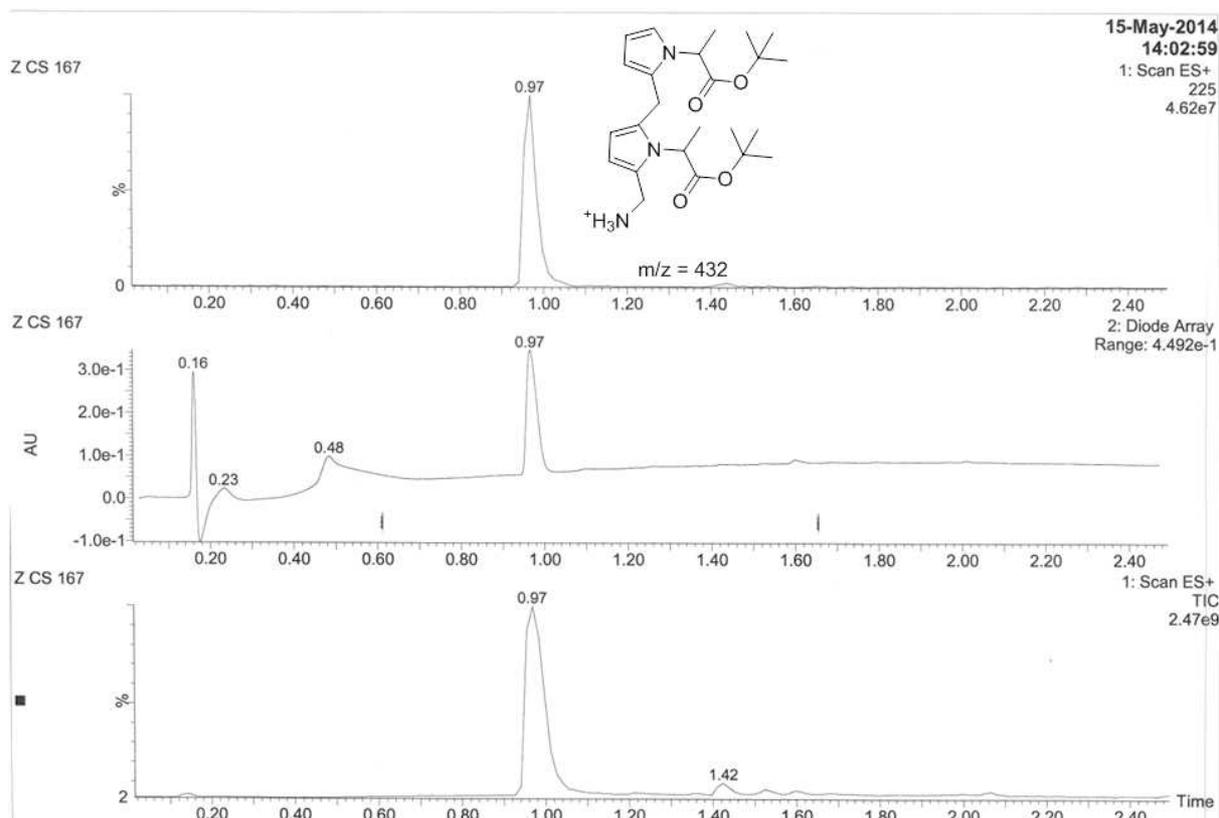


Figure 58 : LC-MS obtenue après réduction de l'oxime en série ester tert-butyle

Contrairement aux travaux décrits par Abell¹⁶⁴, cette réactivité/instabilité impose à minima d'envisager la protection de l'aminopyrrole immédiatement après l'étape d'hydrogénation. Il est intéressant de noter à ce stade que cette réaction secondaire ne rend pas impossible l'oligomérisation du synthon envisagée sur support solide en stratégie Fmoc/*t*-Bu (cf II) Synthèse peptidique). En effet, les enchainements de déprotection et de couplage procèdent en milieu basique, ne favorisant pas a priori la polymérisation.

Afin de pallier ce problème, plusieurs voies synthétiques ont été explorées afin de former directement l'amine protégée sans passer par l'amine libre intermédiaire. Les essais menés en ce

sens ont été réalisés d'une part à partir d'un produit commercial, le pyrrole-2-carboxaldéhyde **21**, et d'autre part à partir de son dérivé *N*-alkylé **22** (Schéma 30).

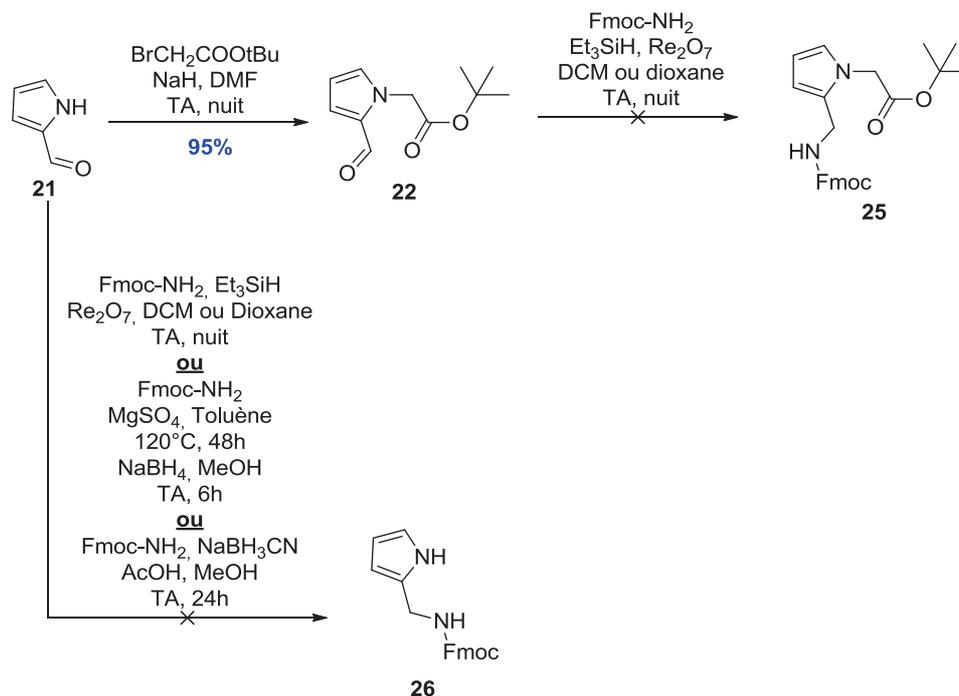
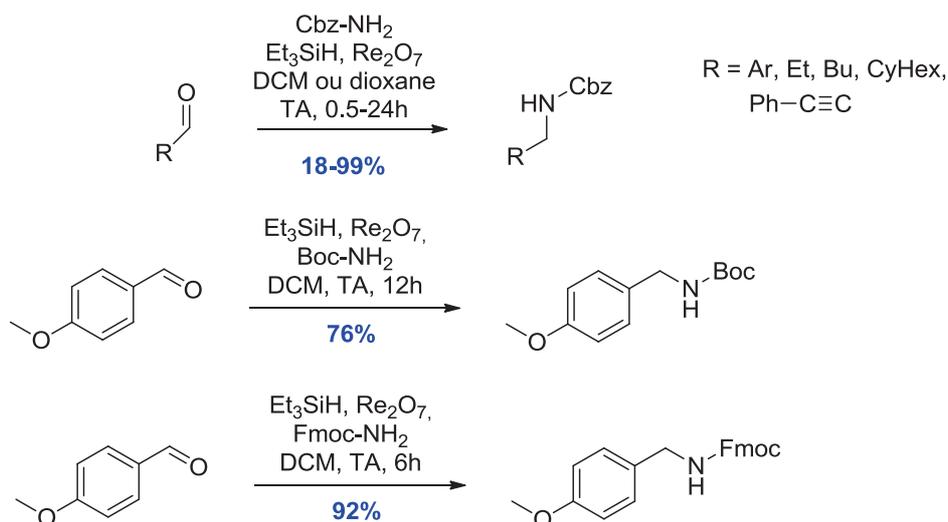


Schéma 30 : Essais de formation de l'aminométhyle protégé sans passer par un aminométhyle libre

Dans un premier temps le pyrrole-2-carboxaldéhyde **21** subit une réaction d'alkylation par le bromoacétate de tert-butyle en présence d'hydrure de sodium dans le DMF à TA durant une nuit, pour conduire au pyrrole *N*-alkylé **22** (Schéma 30) avec un rendement optimisé de 95%.

Les premiers essais ont été conduits sur le pyrrole *N*-alkylé **22** en s'inspirant des travaux de Gopal et Ghorai¹⁷⁷. En effet, ces auteurs ont décrit l'introduction d'un carbamate de benzyle par amination réductrice sur différents substrats aldéhydiques en présence d'un catalyseur au rhénium (Re_2O_7), de triéthylsilane et de Cbz-NH_2 (Schéma 31). Ils ont ainsi réalisé des essais sur différents aldéhydes aromatiques, mais aussi aliphatiques et ont obtenu de bons rendements pour l'introduction directe d'une amine protégée par un groupement Cbz. Mais ils ont également montré qu'il était possible d'appliquer cette stratégie en série Boc et Fmoc.

¹⁷⁷ B Gopal, P Ghorai ; *The direct reductive amination of electron-deficient amines with aldehydes : the unique reactivity of the Re_2O_7 catalyst* ; Chem. Commun. ; **2012** ; 48 ; 8276-8278.

Schéma 31 : Réactions décrites par Gopal Das et Ghorai¹⁷⁷

Nos essais d'introduction directe de Fmoc-NH₂ ont été réalisés en mettant en réaction 1,2 éq de Fmoc-NH₂, 1,2 éq de triéthylsilane, 1 éq du pyrrole alkylé **22** et 0,015 éq de catalyseur au rhénium dans deux solvants différents (Schéma 30), le dichlorométhane ou le dioxane, à TA pendant une nuit. A l'issue de ces deux tentatives le pyrrole **22** est récupéré intact sans trace du produit **25** attendu. Par la suite, des tentatives d'amination réductrice dans différentes conditions ont été réalisées sur le pyrrole-carboxaldéhyde **21**. Après une nuit, aucune réaction n'est observée, ces essais n'ont pas pu conduire à la formation du Fmoc-aminométhylpyrrole **26**.

Nous avons alors envisagé de piéger *in situ* l'amine primaire obtenue lors de l'hydrogénation pallado-catalysée de l'oxime **23** en ajoutant dans le milieu réactionnel le Fmoc-OSu, mais cet essai s'est soldé par un échec en raison notamment de la sensibilité du groupement Fmoc en milieu réducteur (Schéma 32, Voie A). En parallèle de cet essai, une hydrogénation catalytique a été réalisée sur l'oxime **23** suivie immédiatement après filtration d'une protection par un groupement Fmoc, sans attendre, dans les mêmes conditions que décrites plus haut (Voie B). 400 mg de composé **25** ont été obtenus, soit un rendement de 39% sur les deux étapes. Pour éliminer l'ester tert-butyle, le composé **25** est traité par le TFA. Cependant, les analyses par HPLC et LC-MS du produit obtenu ont montré que le pyrrole **25** se décomposait en présence de TFA pour libérer du Fmoc-NH₂ **33**.

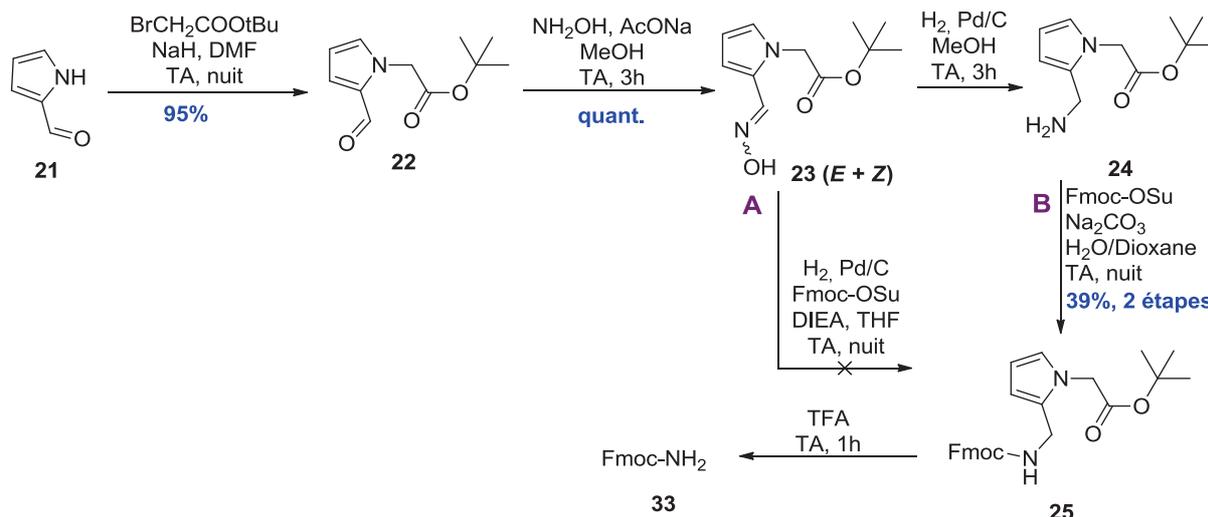


Schéma 32 : Essais de synthèse du composé 25

L'obtention du composé **25** selon la voie B avec un rendement de 39% nous a conduit à optimiser ce type d'approche. Néanmoins, compte tenu de l'instabilité du pyrrole **24**, cette optimisation a été envisagée selon les voies A et B du schéma 33 à partir du pyrrole-2-carboxaldéhyde **21**. L'objectif était ici d'obtenir des dérivés «aminométhyles» plus stables.

L'équipe de Young a décrit dans un brevet¹⁷⁸ la stabilisation de l'aminométhylpyrrole sous la forme de son chlorhydrate. C'est pourquoi des essais de réduction d'oxime ont été réalisés en ajoutant in situ de l'acide chlorhydrique (12N), afin de piéger l'amine formée sous la forme de son chlorhydrate (Schéma 33).

¹⁷⁸ KS Young, KJ Kwan, KH Ju, MJ Hyun, LY Su, YJ Bum, OY Im ; *Novel thiourea derivatives and the pharmaceutical compositions containing the same* ; WO 02/16318 A1, **2002**.

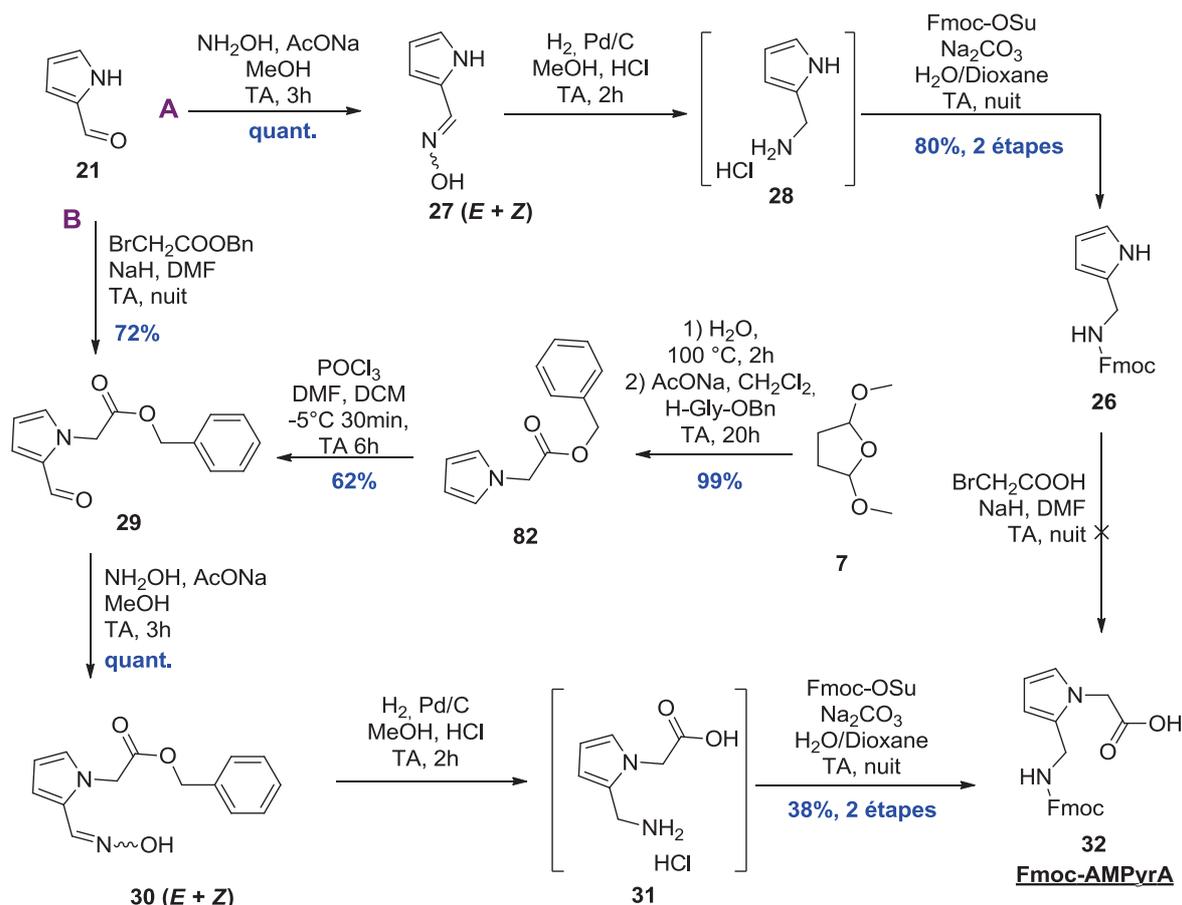


Schéma 33 : Synthèses envisagées passant par un chlorhydrate afin d'obtenir le Fmoc-AMPyrA

En suivant la voie A, l'aldéhyde **21** est d'abord transformé en oxime **27** de façon quantitative en utilisant les conditions décrites précédemment. Le mélange Z/E est ensuite dissous dans le MeOH. 0,02 éq de Pd/C est ajouté, ainsi que 6 éq de HCl concentré sous un flux de dihydrogène à TA pendant 2h. Dans ces conditions le chlorhydrate **28** a été obtenu et utilisé sans purification pour la réaction de protection de l'amine primaire par un groupement Fmoc. Cette réaction est réalisée dans des conditions proches de celles décrites précédemment, en utilisant cette fois-ci 3 éq de Na_2CO_3 afin de déplacer le sel. Le composé **26** a ainsi pu être obtenu avec un rendement de 80 % sur les deux étapes. La dernière réaction de cette voie de synthèse consistait à introduire la chaîne acide acétique par une réaction d'alkylation en présence d'acide bromoacétique et de NaH dans le DMF anhydre. Cette dernière étape n'a pas fonctionné, puisque le groupement protecteur Fmoc s'est avéré non compatible avec les conditions basiques nécessaires à cette étape. Nous avons alors envisagé l'utilisation d'une base inorganique moins forte (Na_2CO_3), sans observer la formation du produit **32** attendu.

Face à l'échec de l'approche synthétique selon la voie A, nous avons alors envisagé de ré-évaluer la faisabilité chimique en série ester benzyle. Ainsi, lors de la première étape, le pyrrole alkylé **29** est obtenu avec un rendement de 72 % *via* la *N*-alkylation du pyrrole-2-carboxaldéhyde en

présence de NaH et de bromoacétate de benzyle dans le DMF. Cet intermédiaire a également été obtenu à partir du diméthoxytétrahydrofurane via une réaction de Clauson-Kaas en introduisant une glycine sous forme d'ester benzylique. Le pyrrole **82** est obtenu avec un rendement de 99% et a ensuite subi une étape de formylation pour donner le composé **29** avec un rendement de 62%. Cette voie de synthèse permettrait d'exemplifier la synthèse en série glycine, montrant ainsi sa faisabilité pour d'autres séries d'acides aminés.

L'aldéhyde **29** est ensuite transformé en oxime **30** quantitativement et ce dernier subit une hydrogénation pallado-catalysée en présence d'acide chlorhydrique pour former le chlorhydrate correspondant **31**. Lors de cette étape, l'ester benzylique subit concomitamment une hydrogénéolyse, ce qui permet de former le chlorhydrate de l'acide aminé. Après traitement de la réaction d'hydrogénation, l'acide aminé **31** est immédiatement engagé dans une réaction de protection de son amine en présence de Fmoc-OSu et de Na₂CO₃. L'acide Fmoc-AminoMéthylPyrrolAcétique **32** (Fmoc-AMPyrA) a ainsi pu être isolé avec un rendement de 38 % pour les deux dernières étapes.

En parallèle de cette dernière synthèse, des tests de stabilité ont été effectués sur le substrat **25** obtenu précédemment (Schéma 34). Afin d'envisager l'oligomérisation de ce pseudodipeptide dérivé du pyrrole en synthèse supportée, nous avons testé la possibilité de réaliser une étape de déprotection standard du Fmoc (DEA dans le DMF). Après 1h, une analyse LC-MS nous a montré une totale disparition du pyrrole protégé **25**, au profit du composé déprotégé attendu **24**. Dans ce cas-ci, aucune polymérisation n'a été observée. D'autre part, comme mentionné plus haut, le pyrrole **25** soumis aux conditions de clivage standard d'une résine Rink amide (TFA 99%) s'est révélé instable avec la détection en LC/MS du sous-produit **33** issu probablement du mécanisme de dégradation en milieu acide décrit dans le schéma 29.

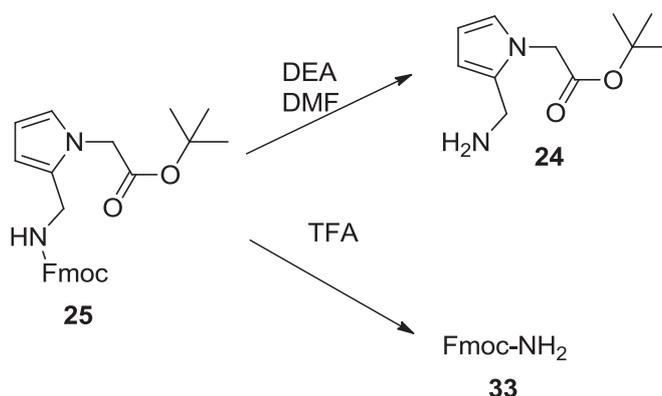


Schéma 34 : Tests de stabilité du pyrrole **25** dans les conditions de synthèse peptidique sur support

Face à cette instabilité du lien NH-pyrrole en présence de TFA, nous avons souhaité examiner dans les mêmes conditions la stabilité d'un lien amide (Schéma 35). Pour cela, après réduction pallado-catalysée du composé **23**, le pyrrole **24** obtenu a été immédiatement engagé dans une réaction de couplage peptidique en présence d'acide hexanoïque pour former le composé acylé **34** attendu. Comme le dérivé **25**, le composé **34** soumis aux conditions acides (TFA 99%) s'est révélé instable avec la détection en LC/MS du sous-produit **35**. Cependant, après 1h dans le TFA, le dipeptide était toujours visible, montrant ainsi qu'une liaison peptidique résisterait mieux aux conditions de clivage que le carbamate.

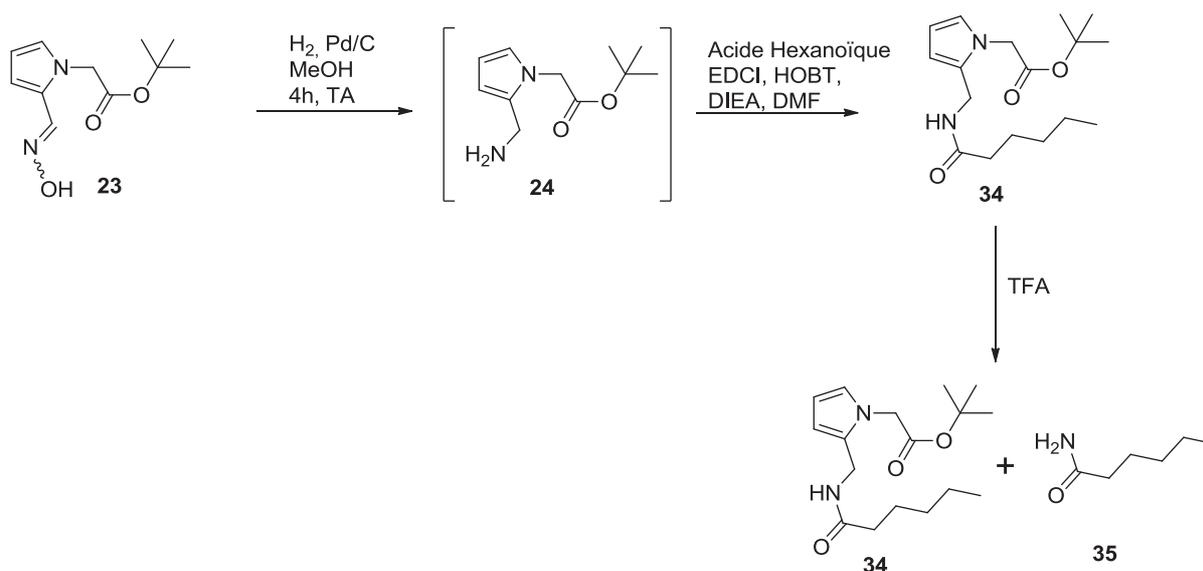


Schéma 35 : Tests de stabilité d'un composé aminométhylpyrrole N-acylé en présence de TFA

L'utilisation du TFA lors de la synthèse peptidique sur support solide semble donc être à proscrire avec ce type de composé, au moins à forte concentration. La synthèse du tétramère de l'AMPyrA pourrait cependant être réalisable sur une résine clivable en milieu basique (par exemple une résine HMBA clivable avec NH_3). Une résine de type SIEBER amide clivable à basse concentration de TFA (2%) pourrait être également envisagée. D'autre part, l'utilisation du support solide devrait permettre de limiter les réactions de polymérisation du pyrrole grâce notamment à l'effet de pseudo-dilution lié à l'espacement des sites fonctionnels présents sur le support. Enfin, en préactivant l'acide à coupler avant de le mettre en présence de l'aminométhylpyrrole porté par la résine, la réaction de couplage peptidique devrait être favorisée par rapport à la polymérisation. Ceci pourrait donc permettre de synthétiser le tétramère souhaité. Le Fmoc-AMPyrA **32** n'a été que récemment obtenu et les essais d'oligomérisation n'ont pas pu être mis en place avant la fin de la thèse.

b. Synthèse d'un analogue de l'AMPA en série indole

La synthèse d'un autre analogue de l'AMPA a été envisagée, en conservant un hétérocycle azoté : l'indole (Figure 59). Cet analogue est appelé AMIA pour acide 2-(2-(AminoMéthyl)-1*H*-Indol-1-yl)Acétique.

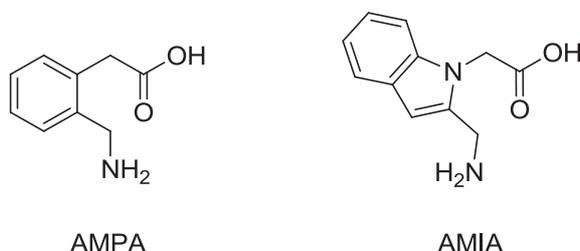


Figure 59 : structure de l'AMPA et de l'AMIA

Ce nouvel analogue pourrait être formé à partir de l'acide 1*H*-indole-2-carboxylique commercial **44** qui subirait une réaction pour donner l'amide **43** puis une réduction pour former le 2-aminométhylindole **42**. Une alkylation pourrait être alors réalisée afin d'introduire la chaîne acétique protégée (composé **40**). Cependant, l'amine primaire en 2 devra être préalablement protégée (composé **41**) puisqu'elle est a priori plus réactive que l'azote indolique vis à vis de la réaction d'alkylation (Schéma 36). Après déprotections successives de la fonction acide (composé **39**) et de l'amine (composé **38**), l'aminoacide **38** pourra être protégé par un groupement Fmoc, dans le but d'utiliser le composé final **37** en synthèse en phase solide.

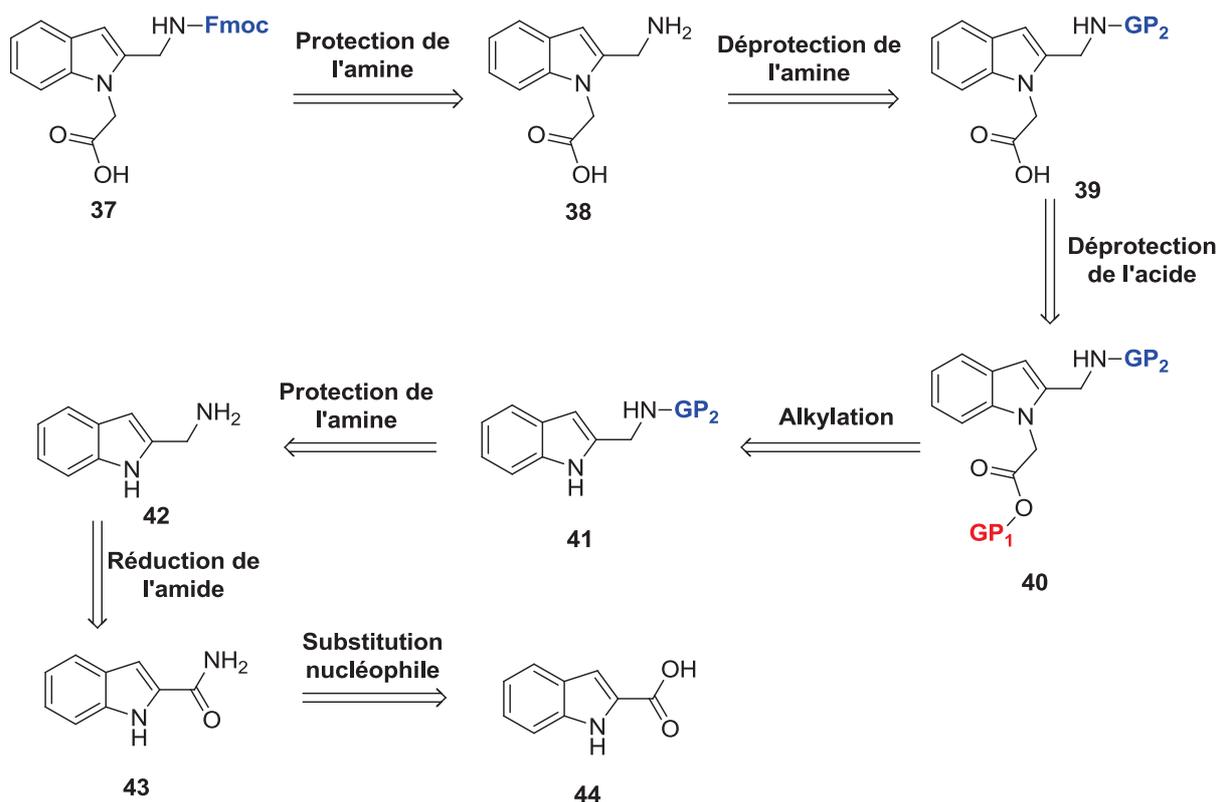


Schéma 36 : Rétrosynthèse envisagée pour l'obtention de l'AMIA

Dans un premier temps il s'agit donc de synthétiser le 2-aminométhylindole **42**. Ce composé est obtenu en deux étapes selon une méthode adaptée des travaux de l'équipe de Csomos¹⁷⁹. Tout d'abord l'acide indole-2-carboxylique **44** est dissous dans du THF et mis en présence de SOCl₂ à 50°C pour former le chlorure d'acide correspondant. Après refroidissement et évaporation du solvant, le chlorure d'acide brut isolé est dissous dans une solution de dichlorométhane saturée en ammoniacale. L'amide souhaité **43** est obtenu avec un rendement de 90%. Cet amide est ensuite réduit en présence de LiAlH₄ pendant une nuit à 70°C dans le THF pour donner l'aminométhylindole **42** avec un rendement de 64%. Par la suite, ce synthon a servi de point de départ pour différentes stratégies de synthèse.

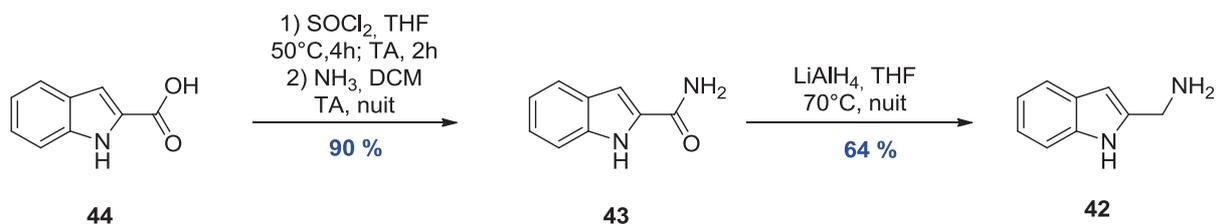


Schéma 37 : Synthèse de l'aminométhylindole 42

¹⁷⁹ P Csomos, L Fodor, I Mandity, G Bernath ; *An efficient route for the synthesis of 2-arylthiazino[5,6-b]indole derivatives* ; Tetrahedron ; **2007** ; 63 ; 4983-4989.

Dans le cadre de la première voie de synthèse étudiée, des groupements acido-labiles non orthogonaux ont été introduits sous la forme d'un groupement Boc pour protéger l'amine et d'un ester tertiobutylique pour la chaîne acétique respectivement. Cette approche nous permettait d'envisager une étape de déprotection unique avant l'introduction du groupement Fmoc (Schéma 38).

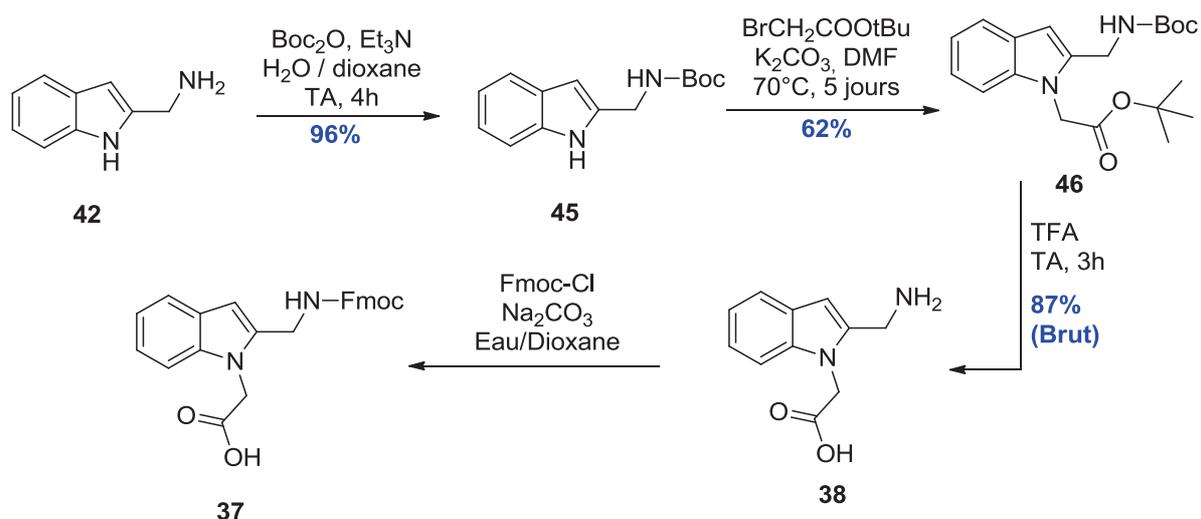


Schéma 38 : Voie de synthèse de l'AMIA en utilisant un Boc

La protection de l'amine primaire par un groupement Boc est réalisée dans un mélange eau / dioxane, en présence d'1,1 éq de triéthylamine et 1,1 éq de Boc_2O . Le mélange est agité à TA durant 4h et permet d'obtenir le composé protégé **45** avec un rendement de 96%. Ce dernier réagit ensuite avec le bromoacétate de tertiobutyle dans le DMF en présence de K_2CO_3 pour former l'indole alkylé **46** avec un rendement de 62%. Lors de cette étape de *N*-alkylation, la cinétique de conversion de **45** en **46** est très lente. En effet après 34h d'agitation à TA seul 40% de conversion est observé par HPLC. Le chauffage à 70°C du mélange réactionnel associé à l'ajout d'un excès des réactifs a permis néanmoins d'obtenir un taux de conversion de 90%.

A ce stade, il nous a semblé important de vérifier que cette réaction d'alkylation était régiosélective. En effet, compte tenu de la réactivité de type énamine du cycle indole, une *C*-alkylation en 3 de l'indole ne pouvait pas être totalement exclue même si les conditions favorables à ce type de réactivité nécessitent une base forte de type *n*-BuLi. L'analyse RMN ^1H du composé **46** a confirmé la présence du proton aromatique lié au carbone C_3 nous permettant de conclure en faveur d'une réaction de *N*-alkylation (Figure 60).

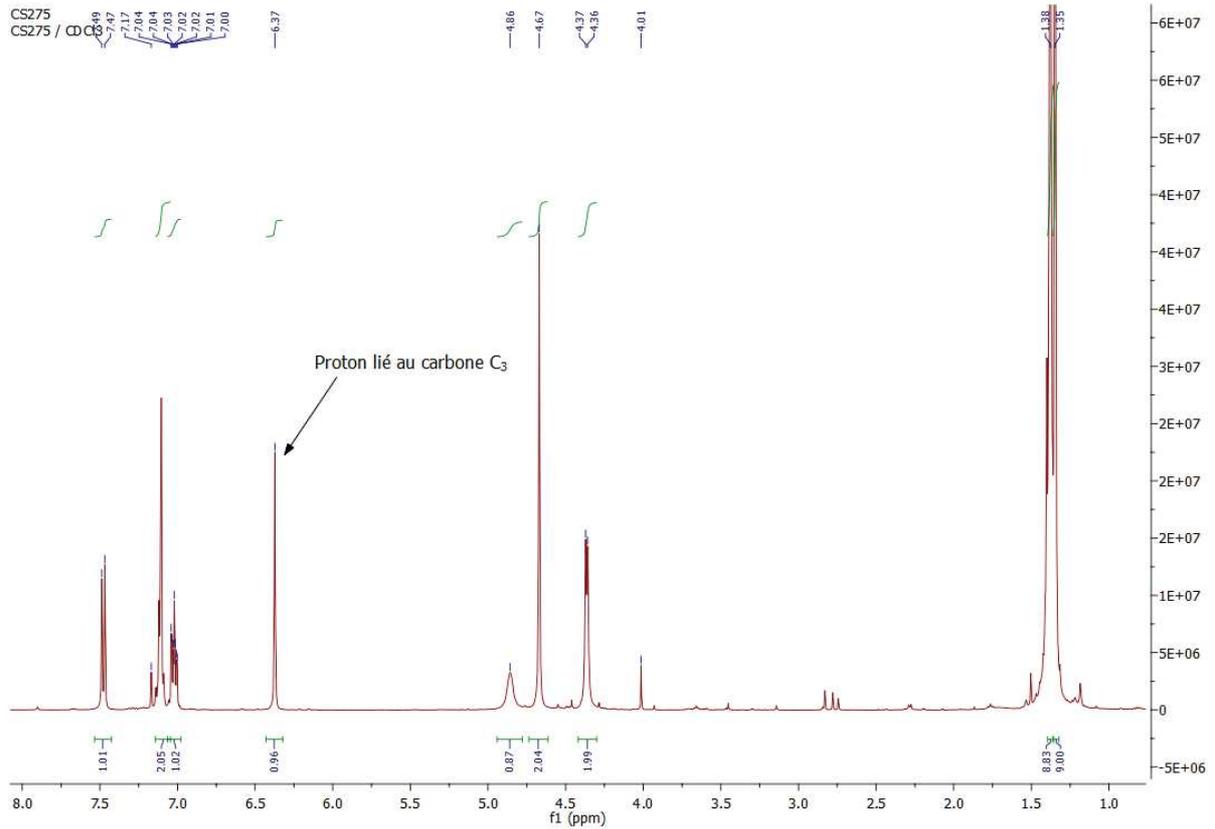


Figure 60 : Spectre RMN ¹H du composé 46

L'étape suivante consiste en une double déprotection en milieu acide (TFA) pour générer le composé aminoacide **38** avec une pureté brute peu satisfaisante (50-60%). Cette observation couplée à la lenteur de la réaction d'alkylation nous a poussés alors à nous orienter vers des stratégies alternatives. Nous avons alors envisagé la synthèse du composé **37** par alkylation directe du 2-aminométhylindole protégé par un groupement Fmoc **47** en présence d'acide bromoacétique (Schéma 39).

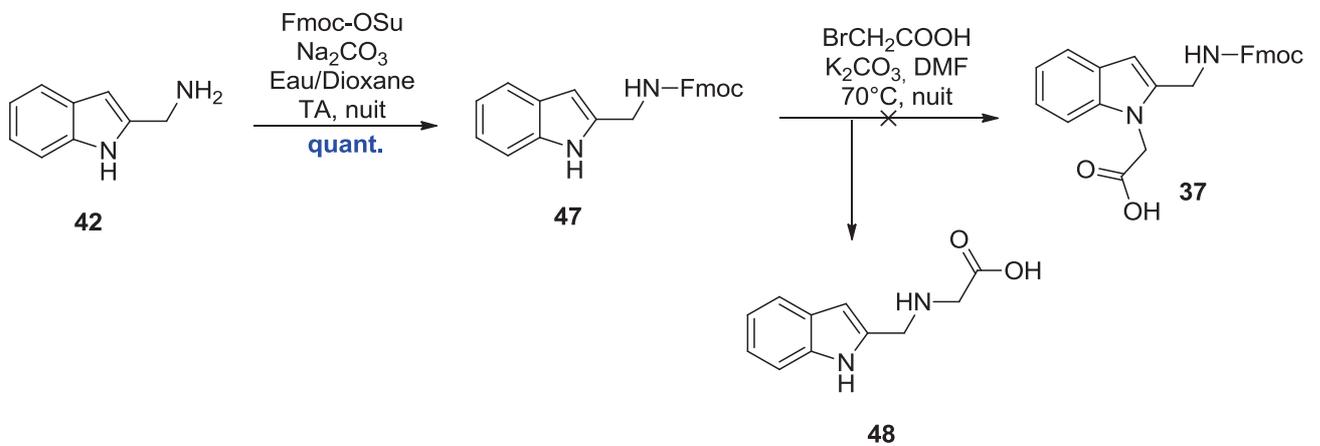
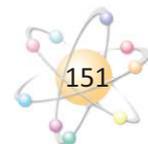


Schéma 39 : voie de synthèse de l'AMIA en utilisant une protection Fmoc



D'après cette stratégie, l'amine primaire du 2-aminométhylindole est directement protégée par un groupement Fmoc, pour générer l'indole **47** de façon quantitative selon la procédure décrite précédemment. La seconde et dernière étape consiste en la *N*-alkylation par l'acide bromoacétique pour former le composé final **37**. Cependant, les conditions de cette réaction ont conduit à la déprotection de l'amine primaire qui a réagi avec l'acide bromoacétique pour donner l'adduit **48**. Sa structure a été confirmée par analyses RMN.

Une troisième stratégie a alors été envisagée où l'amine est cette fois protégée par un groupement Z (schéma 40). La protection de l'amine primaire du 2-aminométhylindole **42** par ce groupement Z est réalisée dans des conditions analogues à celles utilisées en série Fmoc. Le composé **42** est dissous dans un mélange eau/dioxane (50/50) en présence de Na₂CO₃ (1,5 éq) et de Z-OSu (1,1 éq). Le mélange est alors agité à TA pendant la nuit pour donner de façon quantitative l'indole protégé **49**.

L'étape de *N*-alkylation suivante a été modifiée selon les conditions décrites par l'équipe de Brogan¹⁸⁰. L'indole **49** est dissous dans l'acétonitrile avec 2 éq de K₂CO₃, 0,05 éq de KI et 5 éq de bromoacétate de méthyle. Le mélange réactionnel est chauffé à 90°C pendant 24h. Après extraction, une partie a été purifiée pour caractériser l'intermédiaire **50**, et le reste a été directement engagé dans une réaction de saponification dans un mélange dioxane/1M NaOH (50/50). Après trois heures de réaction à TA, l'indole **51** est obtenu avec un rendement de 50% pour les deux étapes. Une hydrogénation pallado-catalysée à TA pendant 2h30 a permis d'obtenir l'indole **38** avec un rendement de 64%.

Constatant que la méthode d'alkylation décrite par Brogan était plus efficace que celle suivie auparavant, nous avons décidé de préparer le dérivé protégé sous forme d'ester benzylique **52**, afin d'envisager l'hydrogénolyse simultanée du carbamate et de l'ester. Pour ce faire, le composé **49** est dissous dans l'acétonitrile avec 2 éq de K₂CO₃, 0,05 éq de KI et 5 éq de BrCH₂COOBn. Le mélange est agité pendant 24h à 90°C. Il a été nécessaire de rajouter 4 éq de bromoacétate de benzyle au cours de la réaction pour atteindre un taux de conversion de 90%. Après traitement, l'indole di-protégé **52** a été obtenu avec un rendement de 65% après purification par chromatographie sur gel de silice. Celui-ci a ensuite subi une hydrogénation pallado-catalysée dans le THF à température ambiante pendant 22h. De façon inattendue, cette étape s'est révélée très lente et le rendement de cette réaction reste peu satisfaisant (48%) malgré nos tentatives d'optimisation du procédé. Des essais de déprotection des groupements Z et O-benzyle en milieu acide (HCl 6N, reflux) ont alors été effectués,

¹⁸⁰ JT Brogan, SL Stoops, CW Lindsley ; *Total synthesis and biological evaluation of phidianidines A and B uncovers unique pharmacological profiles at CNS targets* ; ACS Chem. Neurosci. ; **2012** ; 3 ; 658-664.

mais n'ont permis d'avoir un taux de conversion que de 30% au bout de trois jours, et pour ne former que le composé déprotégé au niveau de l'acide.

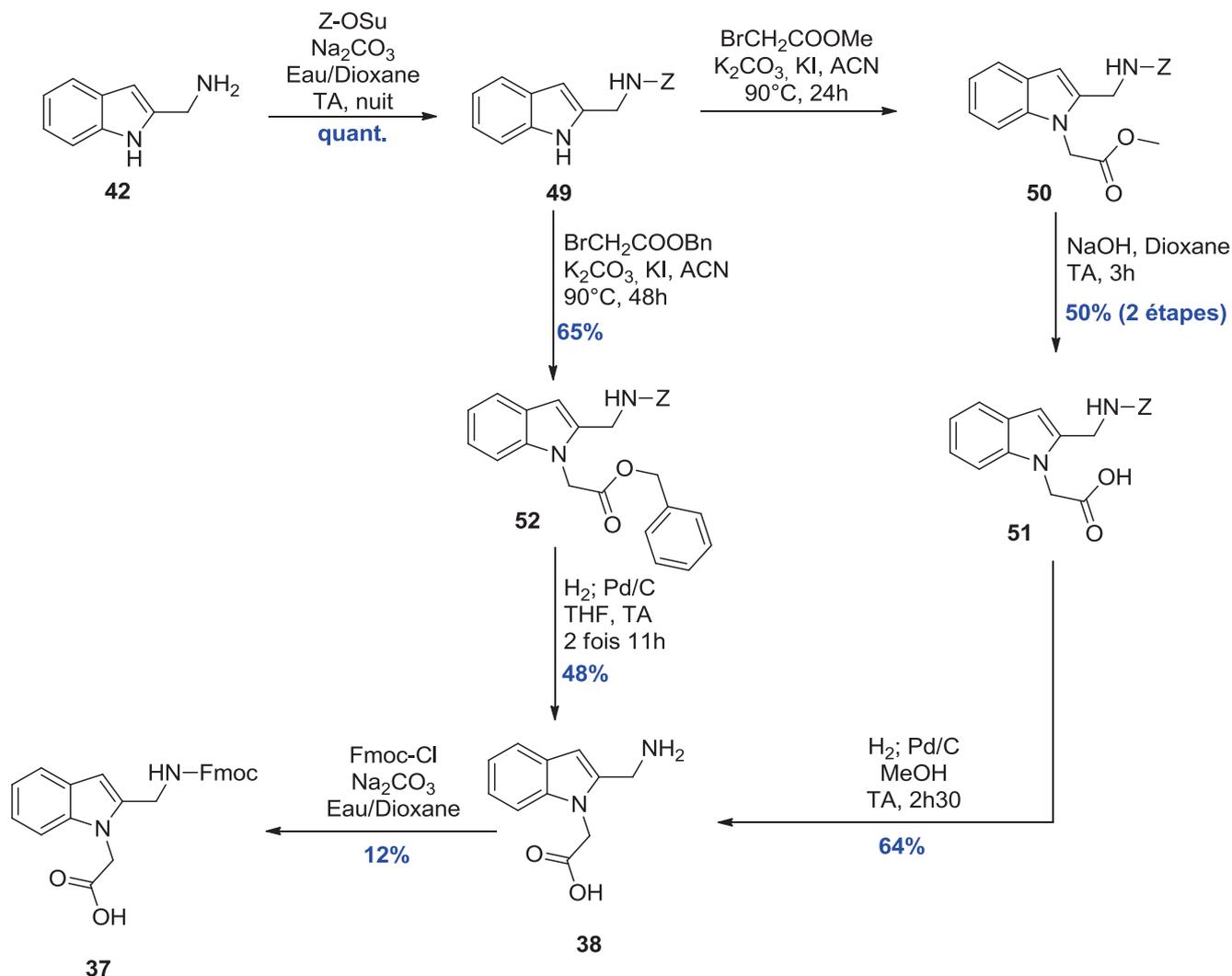


Schéma 40 : voie de synthèse de l'AMIA en utilisant un groupement protecteur Z

La dernière étape de ces deux voies de synthèse est la protection par un groupement Fmoc de l'amine primaire libérée pour donner le composé final **37** avec un rendement de 12%. L'étape de réduction et celle de la protection finale nécessitent d'être optimisées afin de permettre la synthèse en plus grande quantité du synthon **37**, pré-requis indispensable pour la synthèse en phase solide d'un conjugué avec la pepstatine.

c. Synthèses de dérivés de l'AMPA substitués

Afin d'évaluer les conséquences d'une ou plusieurs substitution(s) sur le noyau aromatique de l'AMPA, des analogues portant des groupements méthoxy, nitro, hydroxy, ou des composés bromés ont été envisagés.

i. Synthèse d'un dérivé mono-méthoxylé en position 4

Dans un premier temps, la synthèse d'un AMPA substitué en position 4 par un groupement méthoxy (composé **53**) a été envisagée (Figure 61).

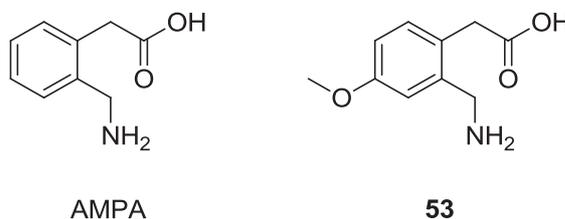


Figure 61 : Structure de l'AMPA et du composé **53**

Ce composé pourrait provenir du nitrile **54** correspondant qui aurait subi une étape de réduction (Schéma 41). Le groupement cyano pourrait être introduit par substitution nucléophile aromatique du composé bromé **55** commercial.

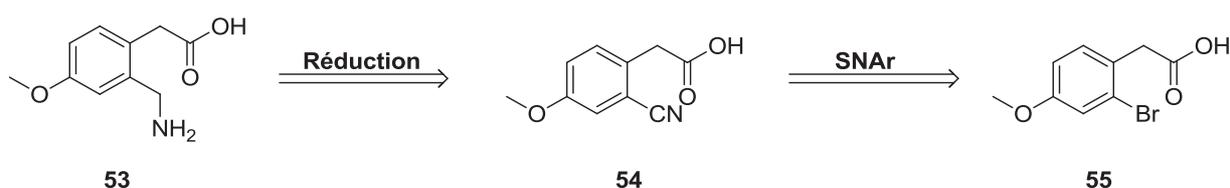


Schéma 41 : Rétrosynthèse conduisant à la formation du composé **53**

La première étape de cette synthèse consiste donc en une substitution nucléophile aromatique en présence de CuCN sur le substrat **55**. Les premiers essais ont été inspirés des travaux de Cho et Le.¹⁸¹ Après 3h de réaction dans le DMF à 160°C seuls des produits de dégradation ont été détectés par LC-MS. Aucune amélioration n'est observée quelque soit les conditions de chauffage.

¹⁸¹ TN Le, WJ Cho ; *Novel synthesis of the natural protoberberine alkaloids: oxypalmatine and oxypseudopalmatine* ; Bull. Korean Chem. Soc. ; **2007** ; 28 ; 763-766.

Tableau 12 : Essais de substitution sur le composé 56

Entrée	Réactifs	Solvant	T(°C)	Temps	Résultats
1	CuCN	DMF (anhydre)	130	5h	Absence de réaction
2	CuCN	DMF (anhydre)	160	10 jours	Absence de réaction
3	CuCN, L-Proline	DMF (anhydre)	130	48h	Absence de réaction
4	K ₄ [Fe(CN) ₆], Na ₂ CO ₃ , Pd(OAc) ₂	DMAC	120	8 jours	Absence de réaction

Pour résumer, tous les essais réalisés sans irradiation microondes ne permettent pas la formation du produit cyané attendu. Même si le produit attendu est formé en faible proportion dans les conditions d'une irradiation microondes, la complexité du mélange réactionnel obtenu couplée à des difficultés techniques rencontrées (de type explosion du réacteur) nous ont conduits à abandonner la synthèse de ce dérivé méthoxylé.

ii. Synthèse de dérivés di-méthoxylé en positions 3,4 et bromé en position 4

Les essais de synthèse de synthons AMPA substitués ont été poursuivis par la synthèse d'un dérivé mono-bromé et d'un analogue diméthoxylé. Face aux échecs rencontrés précédemment pour la réaction de substitution nucléophile aromatique en présence de CuCN, une voie synthétique alternative a été développée. Selon cette approche, le 4-Bromo-AMPA **58** pourrait être obtenu par ouverture en milieu acide de l'isoquinolinone **59**. Celle-ci pourrait être formée à partir du 4-bromophénylacétonitrile **60** (Schéma 43).

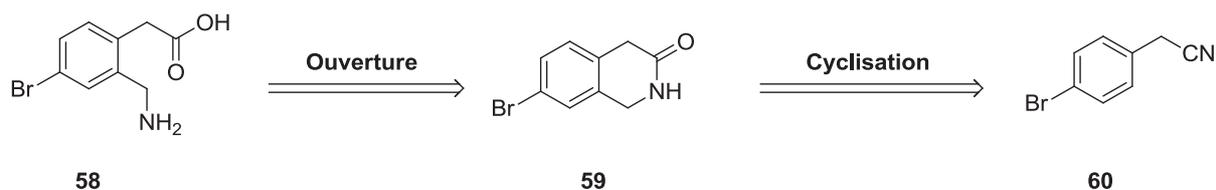


Schéma 43 : Rétrosynthèse permettant l'obtention du dérivé bromé en position 4 de l'AMPA

La première étape de cette synthèse consiste en la réaction du 4-bromophénylacétonitrile **60** en présence de paraformaldéhyde et d'acide polyphosphorique (PPA). Cette réaction réalisée sans solvant a été décrite par l'équipe de Barbry.¹⁸⁵ Après chauffage à 130°C pendant 24h et des ajouts répétés de formaldéhyde au cours de la réaction, l'isoquinolinone **59** est isolée par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 41% (Schéma 44). Lors de cette réaction, des produits secondaires se forment, dont un de masse m/z : 440,9 dont la structure la plus probable est celle du composé **61**, correspondant à une réaction intermoléculaire entre 2 amides issus de l'hydrolyse acide de la fonction nitrile.

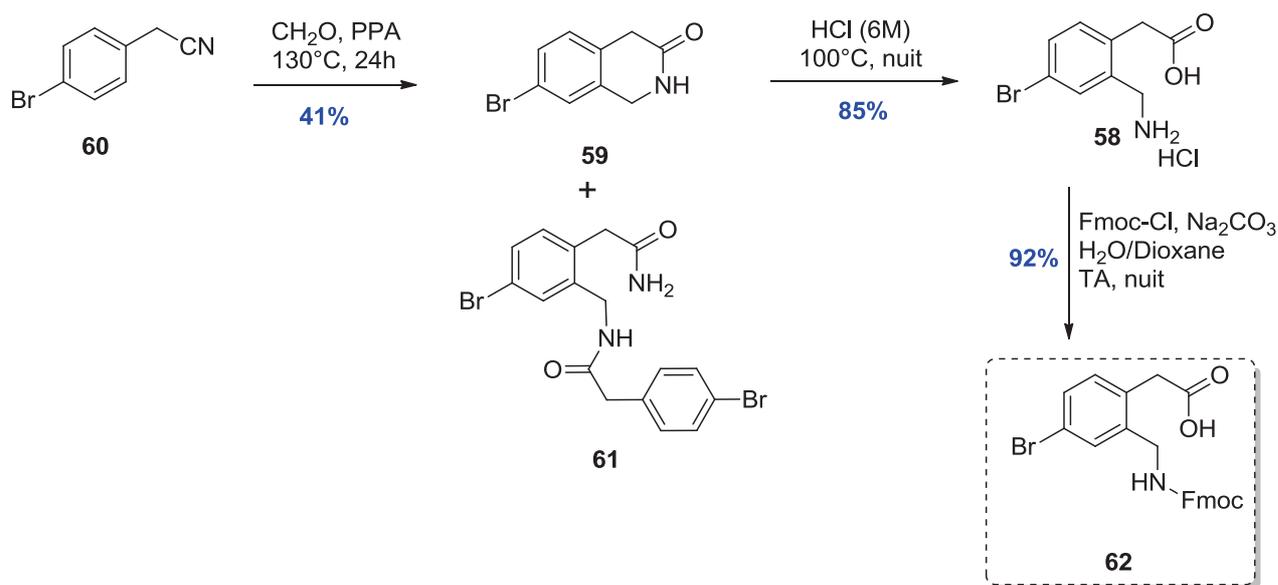


Schéma 44 : Synthèse du dérivé bromé en position 4 de l'AMPA

La seconde étape permet d'ouvrir l'isoquinolinone **59** en milieu acide (HCl (6N)) à reflux pendant la nuit. Le composé **58** est isolé sous la forme de son chlorhydrate avec un rendement de 85%. L'amine primaire est ensuite protégée par un groupement Fmoc avec un rendement de 92% selon les conditions de protection décrites précédemment. Cet analogue bromé de l'AMPA a été utilisé en synthèse sur support solide pour la préparation du vecteur correspondant (voir plus loin).

Cette synthèse semblant efficace, elle a été appliquée afin d'obtenir d'autres dérivés de l'AMPA, à partir de dérivés *para*-substitués du phénylacétonitrile tels que le *p*-méthoxy-, le *p*-nitro-, le *p*-hydroxy- ou le *p*-amino-phénylacétonitrile, mais aussi à partir du *mé*ta-nitrophénylacétonitrile (Schéma 45). Les essais de cyclisation avec le paraformaldéhyde et le PPA ont, dans tous ces cas,

¹⁸⁵ D Barbry, G Sokolowski, P Campagne ; *A convenient synthesis of 1-substituted 1,4-dihydroisoquinolin-3-ones* ; Syn. Com. ; **2002** ; 12 ; 1787-1790.

conduit à des mélanges réactionnels complexes dans lesquels aucune trace du produit attendu n'a été détectée.

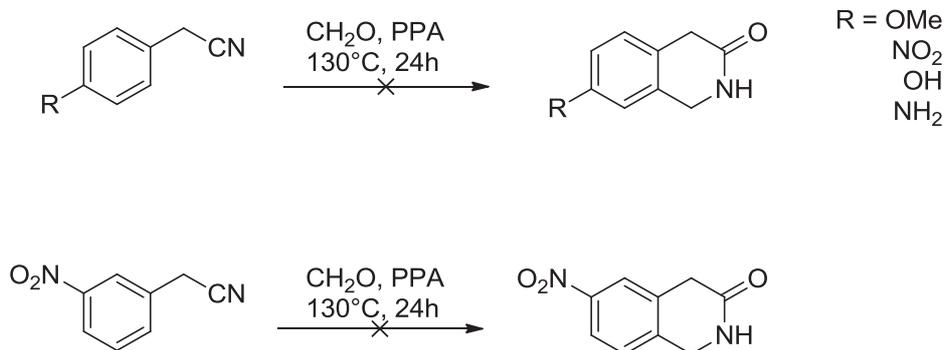


Schéma 45 : Essais de formation de l'isoquinolinone avec différentes substitutions

Selon la même approche synthétique, nous avons envisagé le remplacement du formaldéhyde dans la réaction de cyclisation précédente par une cétone afin d'étudier l'accès à un dérivé **64** disubstitué en α de l'azote. La synthèse du composé ouvert **63**, a donc été envisagée selon la voie rétrosynthétique suivante (Schéma 46).

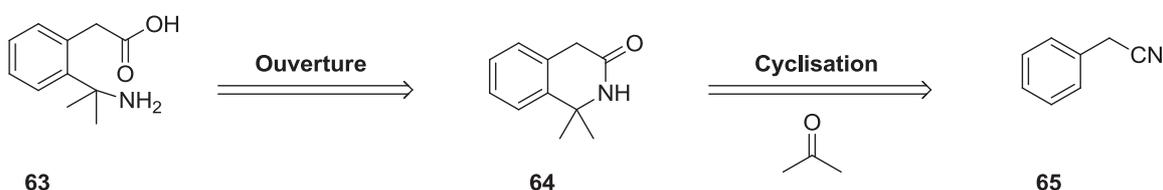


Schéma 46 : Rétrosynthèse permettant la formation du composé 63

Le phénylacétonitrile **63** est dissous dans l'acide polyphosphorique à 130°C et l'acétone est ajoutée en excès durant 1h pour compléter la réaction. L'isoquinolinone **64** est extraite par soxhlet et est obtenue avec un rendement de 79% (Schéma 47).

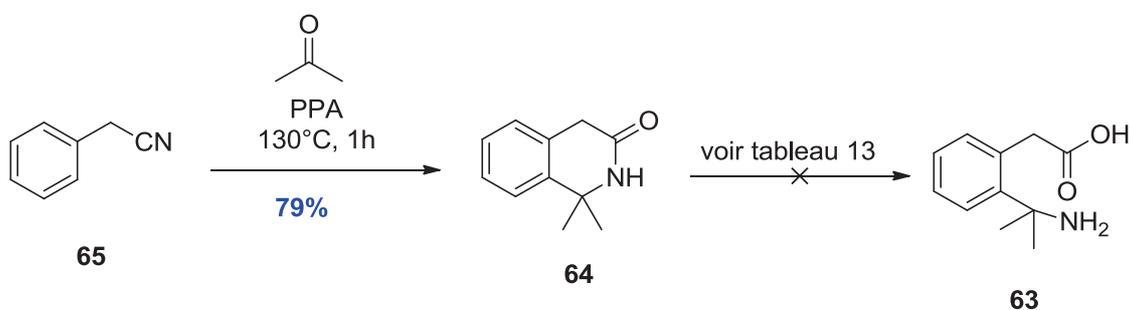
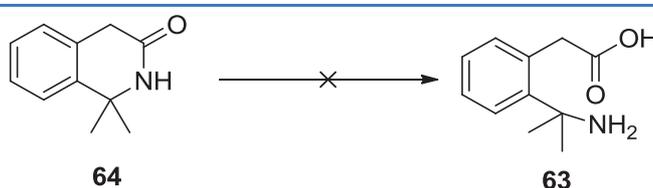


Schéma 47 : Synthèse du dérivé 63

Le composé **64** soumis à une hydrolyse acide en présence d'HCl 6N à 100°C sous pression atmosphérique n'a toutefois pas permis de former l'analogue de l'AMPA **63** (Tableau 13, entrée 1). Un essai a été réalisé dans un tube scellé (entrée 2) pour travailler sous pression mais sans succès. Nous avons alors décidé d'essayer d'utiliser de l'acide chlorhydrique concentré 12N, toujours en tube scellé, à 100°C (entrée 3) et à 150 °C (entrée 4). Là encore, après 24h, le composé **64** est retrouvé intact. Nous avons ensuite tenté une hydrolyse de l'isoquinolinone en milieu basique avec une solution de soude à 12N (entrée 5), ou en utilisant d'autres acides forts tels que l'acide bromhydrique (entrée 6), l'acide sulfurique (entrée 7) ou l'acide trifluoroacétique (entrée 8). Aucune de ces conditions n'a permis l'ouverture de l'isoquinolinone **64**.

Tableau 13 : tentatives d'ouverture de l'isoquinolinone 64



Entrée	Ouvert / fermé	Réactif	T°C	Temps
1	Ouvert	HCl (6N)	100	24h
2	Fermé	HCl (6N)	100	24h
3	Fermé	HCl (12N)	100	24h
4	Fermé	HCl (12N)	150	24h
5	Fermé	NaOH (12N)	100	24h
6	Fermé	HBr (47%)	100	24h
7	Fermé	H ₂ SO ₄ (96%)	130	24h
8	Fermé	TFA (99%)	130	24h

Toujours en suivant la même approche, nous avons enfin envisagé de synthétiser d'autres isoquinolinones différemment substituées. Ainsi, la réaction de cyclisation dans l'acide polyphosphorique en présence de paraformaldéhyde a été réalisée sur des dérivés *o*-methoxy, *o*-nitro, *m*-nitro, *o*-hydroxy ou *o*-aminophénylacétonitrile. En fin de réaction, les profils HPLC et LC-MS des mélanges obtenus montraient, dans tous les cas, la formation d'une grande quantité de produits secondaires, ne permettant pas d'envisager de purification pour ces dérivés.

En parallèle de ces essais, un dérivé diméthoxylé en position 3,4 de l'AMPA (Schéma 48) a été synthétisé. L'isoquinolinone **65** commerciale est ouverte dans une solution d'acide chlorhydrique 6N

à 100°C pendant une nuit. Le chlorhydrate correspondant **66** est isolé avec un rendement de 91%. L'amine primaire ainsi formée est ensuite protégée par un groupement Fmoc de façon quantitative pour donner le dérivé **67** qui servira lors de la synthèse sur support solide du vecteur tétramérique correspondant.

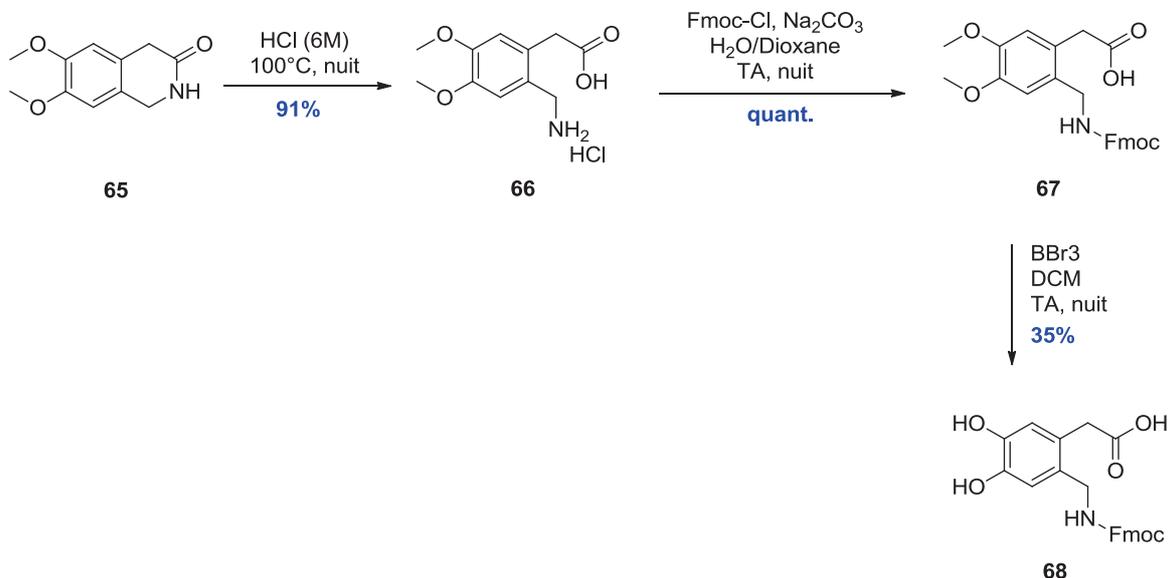


Schéma 48 : Synthèse des dérivés diméthoxylé **67 et dihydroxylé **68**.**

Une partie du composé **67** obtenu a été engagée dans une réaction de déméthylation. Pour ce faire, il a été dissous dans du DCM et 3 éq de BBr_3 (1M dans DCM) ont été ajoutés. Après une nuit à TA, le composé dihydroxylé **68** (diOH-AMPA) a été obtenu avec un rendement de 35%.

d. Autres dérivés de l'AMPA

Parallèlement à la synthèse d'analogues substitués de l'AMPA, nous avons envisagé la synthèse de conjugués dans lesquels l'AMPA était remplacé par un dérivé de l'acide benzoïque **69**, des isomères de position (**70** et **71**) ainsi que par la gabapentine (**72**).

Trois de ces quatre dérivés de l'AMPA envisagés étaient disponibles commercialement protégés par un groupement Fmoc (Figure 62) :

- L'AMBA : Acide ortho-AminoMéthylBenzoïque (**69**)
- *m*-AMPA : *mé*ta-AMPA (**70**)
- *p*-AMPA : *para*-AMPA (**71**)

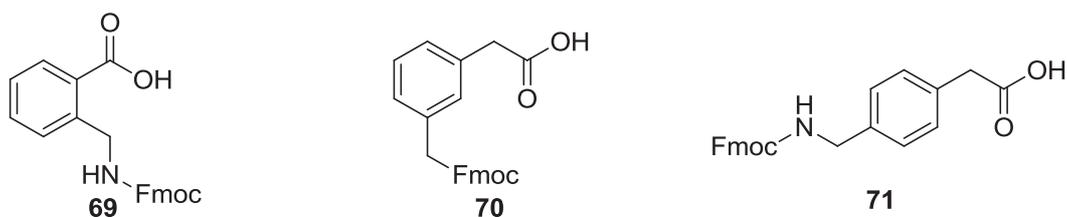


Figure 62 : Structures des composés 69, 70 et 71

Il a toutefois été nécessaire de protéger l'amine primaire de la gabapentine ou AMCA (acide AminoMéthylCyclohexylAcétique) (Schéma 49, composé **72**) par un groupement Fmoc. Cette protection s'est faite en suivant les conditions classiques de protection. Le composé protégé **73** a été obtenu avec un rendement de 99%.

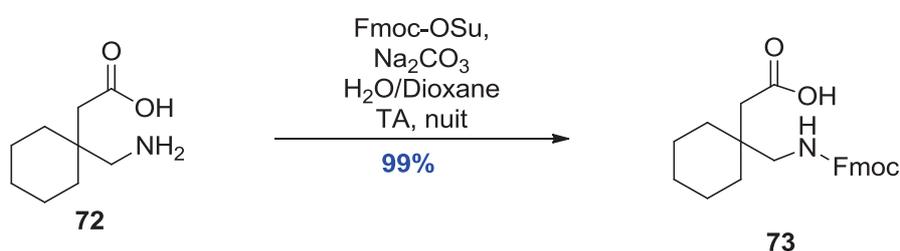


Schéma 49 : Synthèse du composé AMCA 73

e. Synthèse du dérivé du DBT en série benzodiazépine (LBD)

Les travaux antérieurs réalisés au sein de notre laboratoire ont permis de développer une chimie autour du motif D-Benzothiazépine (DBT) avec une application potentielle comme vecteur de pénétration cellulaire sous la forme de son tétramère.¹⁶⁰ Le DBT est issu de la fusion d'un cycle benzénique avec une aminothiazépinone. Compte tenu de l'expertise de notre laboratoire dans le domaine des diazépines¹⁸⁶, il nous a semblé intéressant de réaliser la synthèse de l'analogue en série aminodiazépinone pour évaluer son comportement sous forme oligomérique (Figure 63). La

¹⁸⁶ a) S Denoyelle, G Tambudet, N Masurier, LT Maillard, J Martinez, V Lisowski ; *Synthesis of thieno[3,2-e][1,4]diazepin-2-ones : application of an uncatalysed Pictet-Spengler reaction* ; Eur. J. Org. Chem. ; **2015** ; 7146-7153.

b) M Amblard, I Daffix, P Bedos, G Bergé, D Pruneau, JL Paquet, JM Luccarini, P Bélichard, P Dodey, J Martinez ; *Design and synthesis of potent bradykinin agonists containing a benzothiazepine moiety* ; J. Med. Chem. ; **1999** ; 42 ; 4185-4192.

c) JD Malcor, Y Brouillette, J Graffion, K Spielmann, N Masurier, LT Maillard, J Martinez, V Lisowski ; *Synthesis and reactivity of pyrrolo[3,2-d][1,3]oxazine-2,4-dione. Access to new pyrrolo[3,2-e][1,4]diazepine-2,5-diones* ; Tetrahedron ; **2014** ; 70 ; 4631-4639.

d) E Ayral, P Gloanec, G Bergé, G de Nanteuil, P Mennecier, A Rupin, TJ Verbeuren, P Fulcrand, J Martinez, JF Hernandez ; *Design, synthesis, and biological evaluation of 1,5-benzothiazepine-4-one derivatives targeting factor VIIa/tissue factor* ; Bioorg. Med. Chem. Lett. ; **2009** ; 19 ; 1386-1391.

stéréochimie du carbone asymétrique C₃ de la benzothiazépine n'ayant pas d'influence sur les propriétés de pénétration des oligomères DBT₄ ou LBT₄, nous avons choisi de travailler en série L (LBD pour L-BenzoDiazépine) pour des raisons de coût.

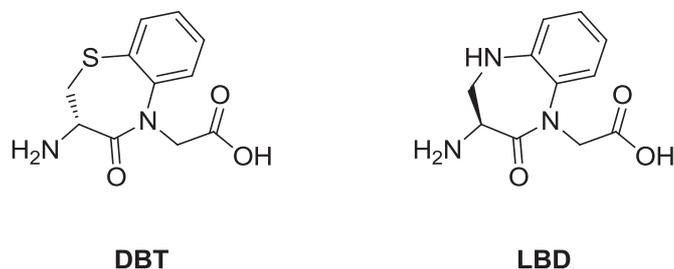


Figure 63 : Structures du DBT et du LBD

La voie de synthèse envisagée est analogue à celle mise en œuvre pour synthétiser le DBT. La benzo[1,4]diazépine finale **74** pourrait donc être obtenue après une double déprotection en milieu acide de l'amine et de l'acide, à partir du composé protégé **75** (Schéma 50). Sur celui-ci, la fonction amine serait protégée par un groupement Boc et l'acide serait protégé sous la forme de son ester tert-butylique, tous deux acido-labiles. L'ester tert-butylique en question pourrait être introduit par alkylation sélective de la benzodiazépine **76** issue d'une cyclisation intra-moléculaire sur le composé **77**. Celui-ci pourrait être obtenu en deux étapes en traitant le Boc-L-Dap-OH (acide DiAminoPropionique) **79** en présence du fluoronitrobenzène **80**.

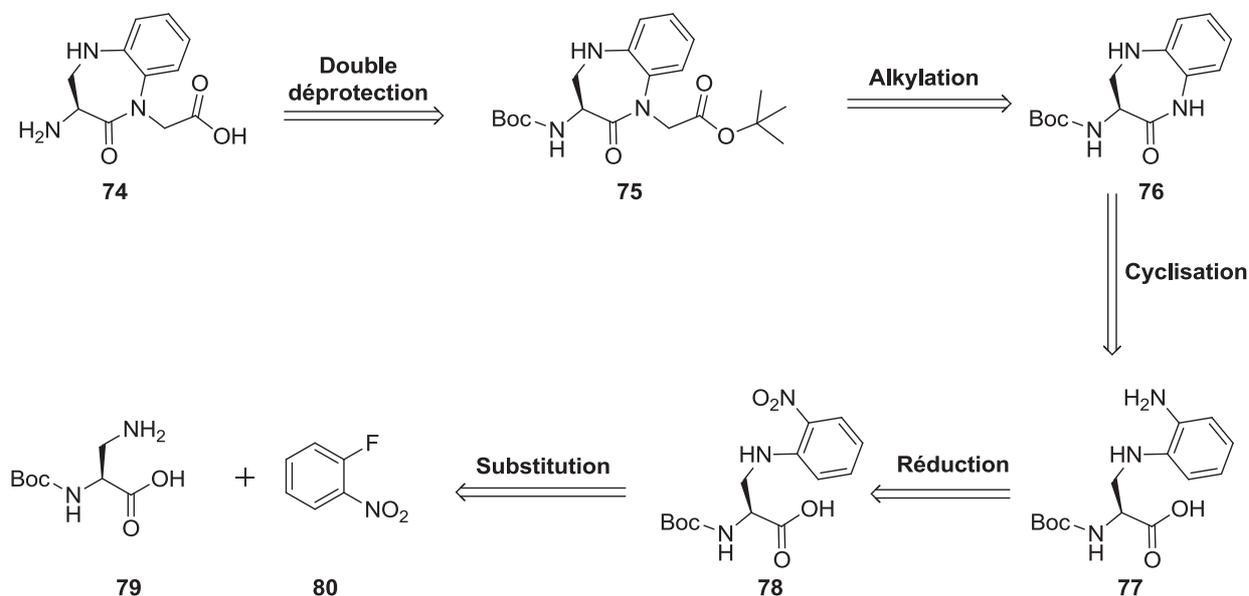


Schéma 50 : Rétrosynthèse envisagée pour accéder au LBD 74

Dans un premier temps, le Boc-L-Dap-OH **79** est mis en présence du fluoronitrobenzène **80** (1 éq) dans un mélange H₂O/EtOH (1 : 1) avec 3 éq de NaHCO₃ (Schéma 51). Le composé nitré **78** issu de

la réaction de substitution nucléophile aromatique est obtenue avec un rendement de 73%. Le groupement nitro est ensuite réduit par hydrogénation catalytique (Pd/C) pour former l'aniline **77** avec un rendement quantitatif. L'étape suivante de cyclisation intramoléculaire a été réalisée via une réaction de couplage peptidique. L'agent de couplage utilisé est le BOP (1 éq) et la réaction est réalisée en présence de NaHCO₃ en excès (5 éq) dans le DMF à TA pendant 24h. Après traitement et purification par chromatographie, la benzodiazépine **76** est obtenue avec un rendement de 94%.

L'étape suivante est une étape clé qui consiste en une alkylation régiosélective pour introduire la chaîne acétate de tertiobutyle sur l'azote de la liaison amide. Un premier essai en utilisant le bromoacétate de *t*-butyle et une base forte telle que le NaH (pKa 35) n'a pas permis l'obtention du composé mono-alkylé **75**. En effet, dans ces conditions, le produit secondaire dialkylé est observé majoritairement malgré l'addition d'une quantité stoechiométrique de bromoacétate de *t*-butyle. Un second essai a été réalisé en utilisant une base moins forte: le LiHMDS (pKa 26) à -80°C. Après traitement, le composé mono-alkylé **75** est isolé avec un rendement de 90%.

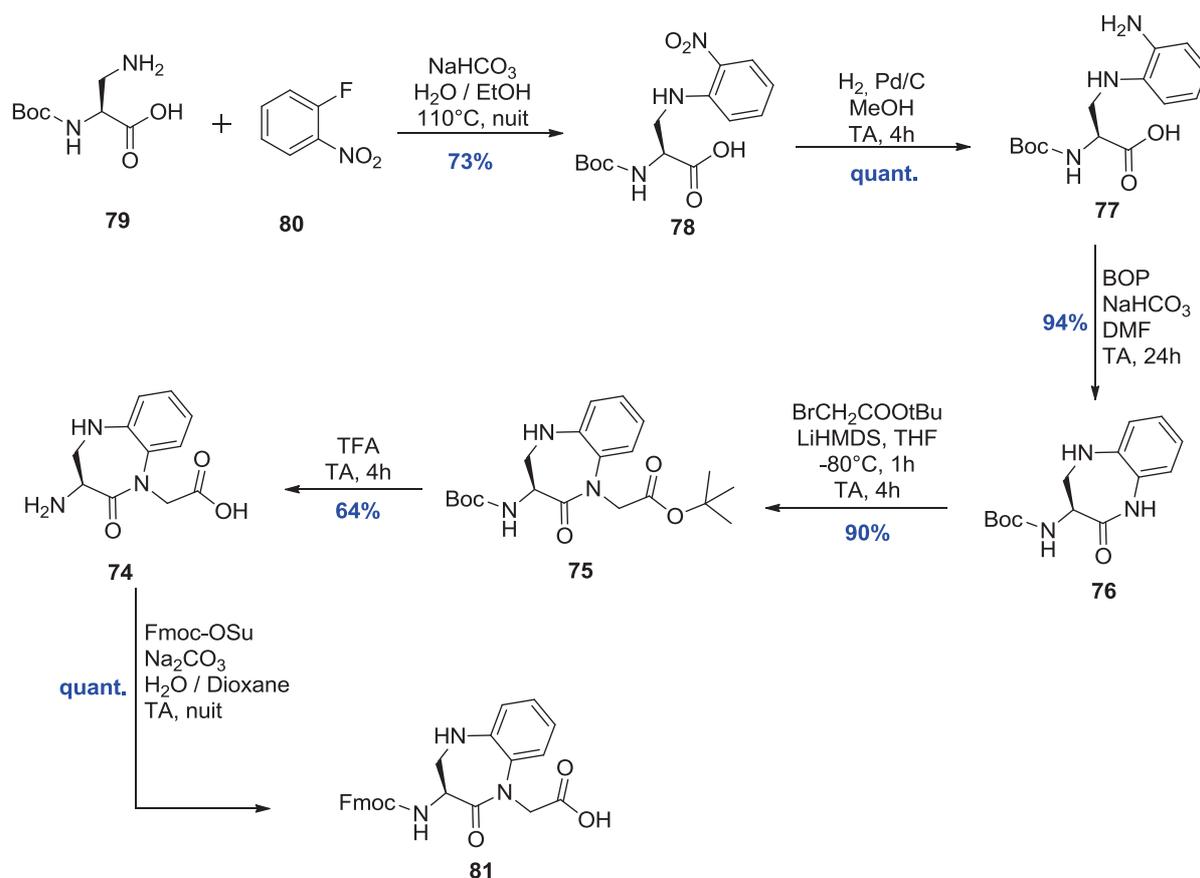


Schéma 51 : Synthèse du LBD

Même si le LiHMDS est une base moins forte que le NaH, l'hypothèse retenue ici pour expliquer cette mono-alkylation repose sur la possible coordination du lithium par l'atome d'oxygène de la liaison amide (Schéma 52), permettant ainsi d'avoir une déprotonation régiosélective. L'alkylation sur l'azote amidique a été confirmée par analyses de RMN 2D. En effet, nous avons pu observer des corrélations entre les protons du CH₂ de la chaîne acétate et le carbone de la liaison amidique (Figure 64).

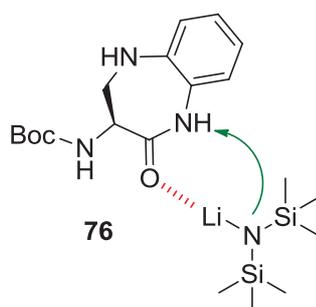


Schéma 52 : Chélation du LiHMDS par le composé 76

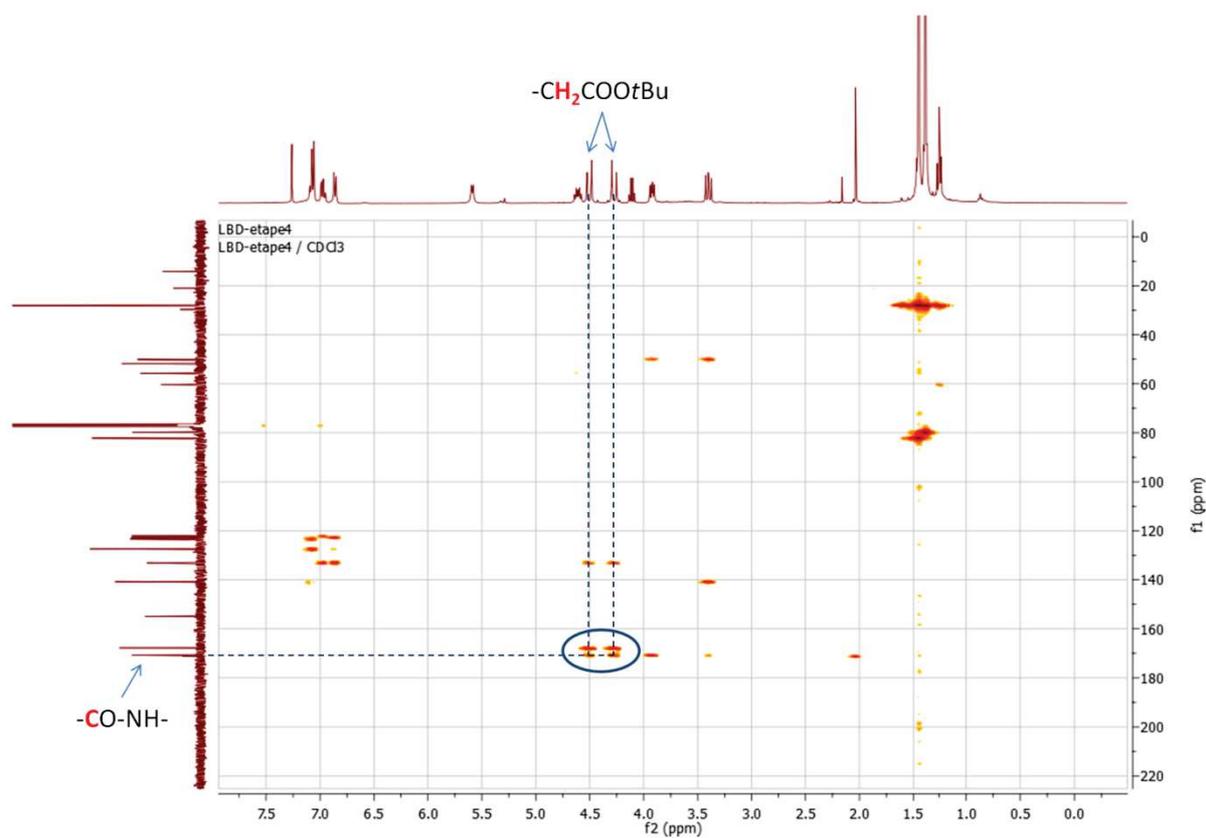


Figure 64 : Corrélations HMBC du composé 75



La double déprotection du composé **75** est ensuite réalisée en milieu acide fort (TFA 99%) à TA pendant 4h. Le composé déprotégé **74** est obtenu sous la forme de son sel de TFA avec un rendement de 64%. Il est engagé sans autre purification dans la dernière étape de protection de l'amine primaire par un groupement Fmoc selon les conditions décrites précédemment. La benzodiazépine finale **81** est obtenue avec un rendement quantitatif pour cette dernière étape et elle sera utilisée sous cette forme pour envisager son oligomérisation sur support solide.

f. Conclusion

Plusieurs mimes contraints de dipeptide protégés par un groupement Fmoc ont été synthétisés en assez grande quantité afin de préparer les tétramères correspondants susceptibles de vectoriser la pepstatine. Il s'agit des analogues de l'AMPA suivants : Br-AMPA, DiMeO-AMPA, AMCA, AMBA, *m*-AMPA, *p*-AMPA. L'analogue du DBT en série benzodiazépine (LBD) a également été obtenu en quantité suffisante pour la préparation du tétramère.

Les analogues de l'AMPA en série pyrrole (AMPyrA), en série indole (AMIA), et le dérivé dihydroxylé (diOH-AMPA) ont été synthétisés récemment, mais pas en quantité suffisante pour pouvoir les engager dans une synthèse peptidique.

Leurs voies de synthèse étant maintenant établies, ces derniers mimes contraints de dipeptides pourront être resynthétisés en grande quantité afin d'évaluer leur capacité à vectoriser la pepstatine.

La section suivante est consacrée à quelques rappels concernant la synthèse peptidique, puisque tous les oligomères et les conjugués dont la synthèse va être décrite ultérieurement ont été assemblés selon la méthodologie de SPPS (Synthèse Peptidique en Phase Solide).

II) Synthèse peptidique

La synthèse peptidique sur support est une technique largement utilisée permettant d'obtenir assez aisément les peptides souhaités.

Il existe néanmoins un grand nombre de paramètres pouvant affecter l'efficacité des synthèses peptidiques : le type de synthèse envisagé (par fragment ou linéaire), le sens de la

synthèse, les groupements protecteurs utilisés, les conditions de couplage, les solvants utilisés, les agents de couplage, ou encore l'emploi d'additifs. Il est intéressant de noter que la séquence et la longueur du peptide synthétisé peuvent aussi avoir un impact sur le succès de la synthèse en raison notamment de problèmes d'agrégation.

a. Types de synthèse

On peut distinguer deux grands types de synthèse de peptides : la synthèse par fragments dite convergente, et la synthèse « pas à pas » dite linéaire (Schéma 53).

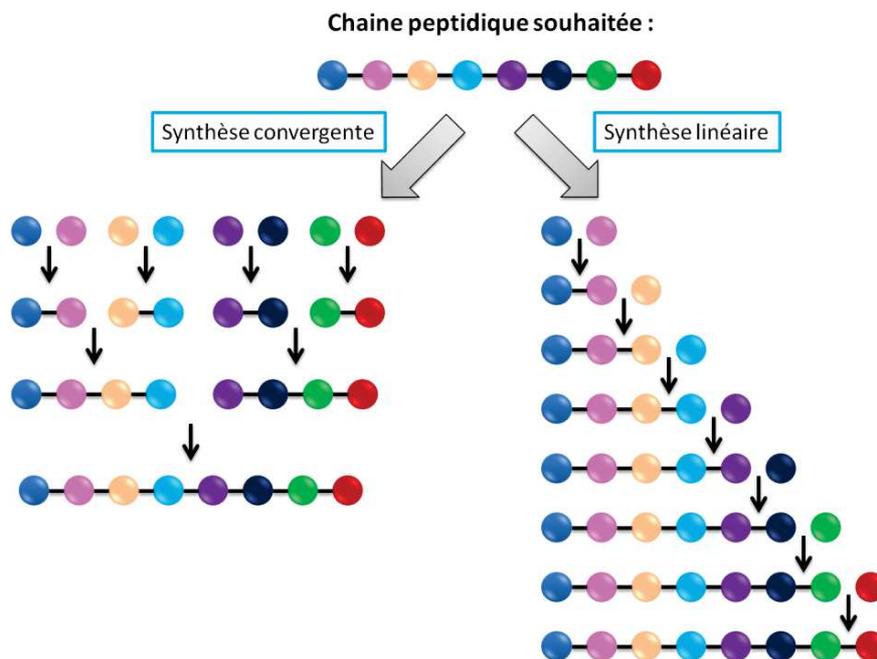


Schéma 53 : Types de synthèse peptidique

La première consiste à assembler la chaîne peptidique par l'introduction de blocs de plusieurs résidus préparés en amont par stratégie itérative. Cette stratégie présente des avantages : une certaine facilité d'isolement des intermédiaires de synthèse et des fragments faciles à resynthétiser en cas de besoin. Cependant, elle présente généralement des rendements assez faibles, des problèmes de solubilité des fragments totalement protégés qui sont engagés dans le couplage, mais surtout des problèmes d'épimérisation dont nous parlerons plus tard.

Le second type de synthèse consiste à incorporer chaque résidu l'un après l'autre sur le peptide. Cette stratégie est simple à mettre en place et permet surtout d'éviter les problèmes d'épimérisation. Un autre avantage est qu'elle s'applique parfaitement à la synthèse sur support

solide (SPPS). C'est cette méthode qui a été utilisée pour la synthèse des composés décrits dans la suite du manuscrit.

En SPPS, le peptide est assemblé sur un support polymérique réticulé insoluble appelé résine, qui est placé dans un réacteur muni d'un fritté. La synthèse se décompose en une succession de déprotections, de lavages et de couplages peptidiques pour introduire un à un les résidus dans la chaîne peptidique en élongation. Le fait d'utiliser un tel système permet de s'affranchir de toutes les étapes d'extraction et de purification pour chaque couplage. En effet, une simple filtration permet d'éliminer les excès de réactifs et tout produit en solution, tout en conservant les billes de résine, sur lesquelles les peptides sont accrochés (Schéma 54). Cette facilité des lavages autorise l'utilisation d'excès de réactifs se traduisant par une meilleure cinétique des réactions et l'obtention de rendements proches de 100% pour chaque étape. Ce dernier point est primordial lorsque la taille des peptides augmente (20 étapes pour un peptide de 10 résidus). Par rapport à la synthèse en solution, la SPPS permet de gagner un temps considérable, et permet aussi l'automatisation du processus.

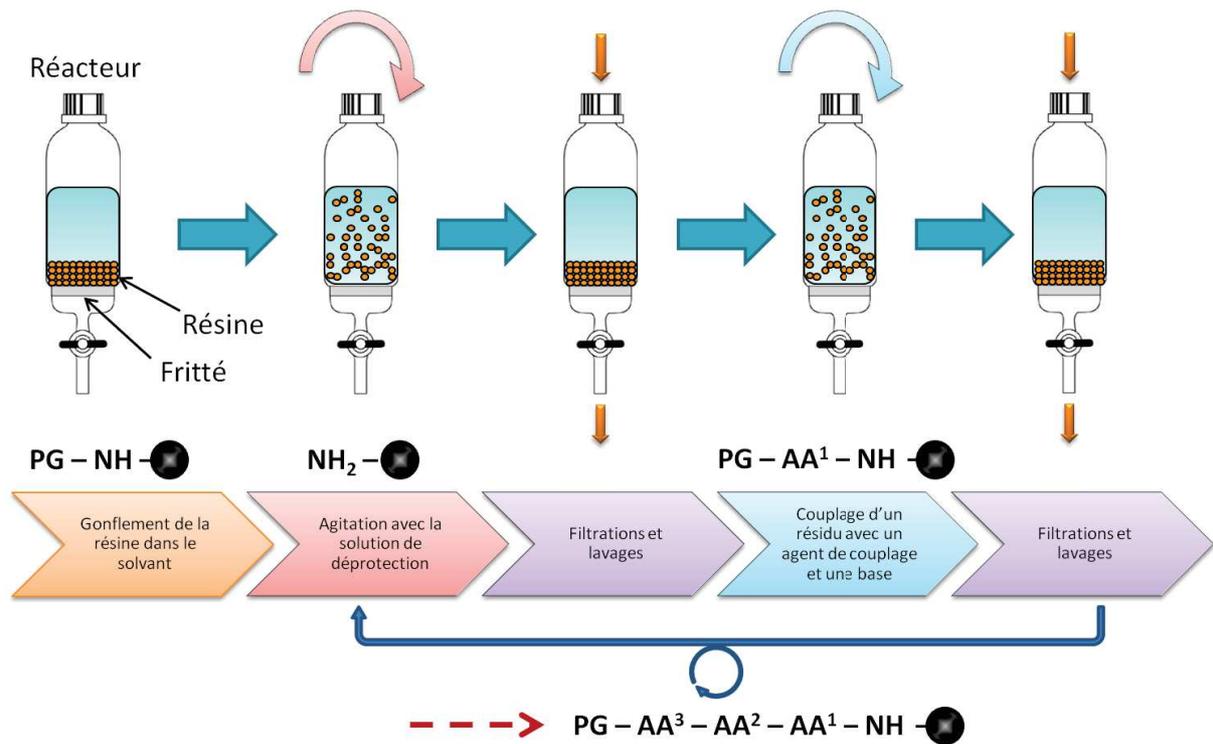


Schéma 54 : Principe de la SPPS (Synthèse Peptidique en Phase Solide)

Chimiquement, la déprotection a pour but de libérer l'amine primaire sur lequel on veut fixer un nouvel aminoacide. Suite à cette déprotection, le couplage peptidique peut avoir lieu, en introduisant dans le réacteur l'acide aminé suivant *N*-protégé, dont la fonction acide va être activée

pour réagir avec l'amine primaire (schéma 55)¹⁸⁷. Plusieurs cycles de déprotection/couplage permettent ainsi de synthétiser un peptide, ici de l'extrémité C-ter vers l'extrémité N-ter. Il faut noter que pour les aminoacides possédant sur leurs chaînes latérales des fonctions susceptibles d'interférer avec la réaction de couplage (Lys, Arg, Glu, Asp, ...), celles-ci doivent être protégées par des groupements protecteurs orthogonaux stables tout le long de la synthèse.

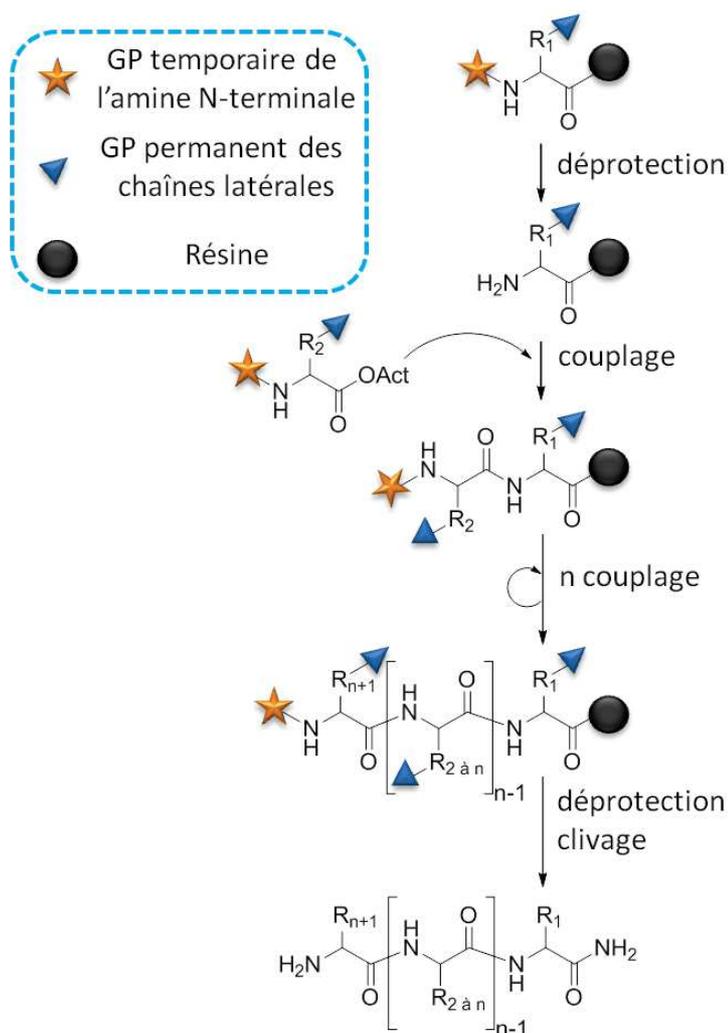


Schéma 55 : Principe de l'élargissement peptidique en SPPS

Cependant ce type de synthèse présente également certains inconvénients. En effet, les intermédiaires réactionnels n'étant pas isolés, le suivi des réactions devient plus compliqué que pour les synthèses en solution. Il existe des tests colorimétriques permettant de vérifier si le couplage ou

¹⁸⁷ M Amblard, JA Fehrentz, J Martinez, G Subra ; *Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis* ; Mol. Biotechnol. ; **2006** ; 33 ; 239-254.

la déprotection a bien eu lieu via la détection des amines primaires, mais ces tests (TNBS¹⁸⁸ et Kaiser¹⁸⁹) sont qualitatifs. Le seul outil pour visualiser le bon déroulement d'une synthèse peptidique supportée reste le microclivage, c'est-à-dire un clivage réalisé sur une petite quantité de résine pour analyser le peptide clivé par analyse LC-MS.

b. Sens de synthèse (SPPS)

A l'inverse de la synthèse ribosomale des protéines qui procède du côté *N*-terminal vers le côté *C*-terminal du squelette peptidique, la synthèse peptidique se fait dans le sens contraire : du côté *C*-terminal vers le côté *N*-terminal pour des raisons liées aux problèmes d'épimérisation. En effet, dans une synthèse *N*→*C*, le fait d'activer le carboxylate peut entraîner la formation d'une oxazolone. Le proton porté par le carbone α devient alors plus acide et l'inversion de configuration est facilitée (Schéma 56).

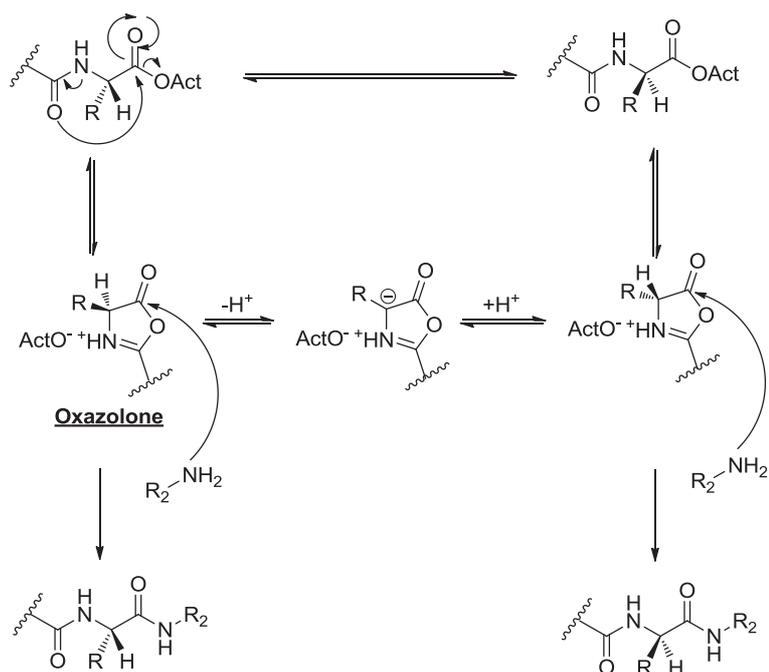
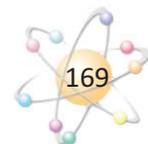


Schéma 56 : Formation de l'oxazolone menant à l'épimérisation

La formation de l'oxazolone, et donc le risque d'épimérisation, peut être largement réduite ou éliminée si la fonction amine de l'acide aminé activé est protégée par un groupement exerçant des

¹⁸⁸ WS Hancock, JE Battersby ; *A new micro-test for the detection of incomplete coupling reaction in Solid-Phase Peptide Synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid* ; Anal. Biochem. ; **1986** ; 25 ; 469-487.

¹⁸⁹ E Kaiser, RL Colescott, CD Bossinger, PI Cook ; *Color test for detection of free terminal amino groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides* ; Anal. Biochem. ; **1970** ; 34 ; 595-598.



effets électroattracteurs. C'est pourquoi la synthèse peptidique s'effectue dans le sens C→N, avec les fonctions amines des aminoacides activés protégés par des groupements de type uréthane (Boc ou Fmoc dans la majorité des cas).

c. Stratégies de synthèse et groupements protecteurs

Dans une synthèse peptidique, afin d'éviter d'avoir plusieurs réactions de couplage successives ou un allongement de peptide anarchique, il est nécessaire d'avoir des protections appropriées. C'est le groupement protecteur temporaire de la fonction amine α des résidus qui va déterminer la stratégie de synthèse qui sera empruntée. En SPPS, deux stratégies principales sont utilisées : la Boc/Bzl et la Fmoc/tBu (Tableau 14).

Tableau 14 : Stratégies de synthèse utilisées en SPPS

Stratégie	Conditions de déprotection	
	A chaque cycle	En fin de synthèse
Boc/Bzl ¹⁹⁰	TFA	HF
Fmoc/tBu ¹⁹¹	Pipéridine	TFA

Dans ces stratégies, les groupements protecteurs des chaînes latérales vont être éliminés dans les conditions de clivage du peptide. Par exemple, dans les synthèses que nous avons réalisées, nous avons utilisé un résidu arginine possédant un groupement protecteur Pbf (Figure 65), en stratégie Fmoc, qui a été éliminé lors du clivage de la résine avec du TFA.

¹⁹⁰ RB Merrifield ; *Solid Phase Peptide Synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide* ; J. Am. Chem. Soc. ; **1963** ; 85 ; 2149-2154.

¹⁹¹ LA Carpino, GY Han ; *9-Fluorenylmethoxycarbonyl fonction, a new base-sensitive amino-protecting group* ; J. Am. Chem. Soc. ; **1970** ; 92 ; 5748-5749.

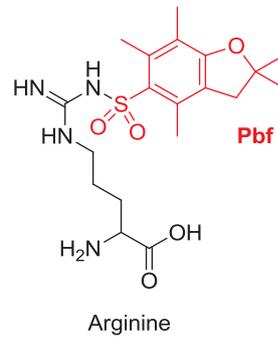


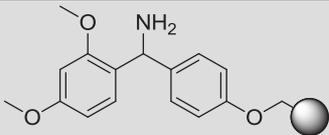
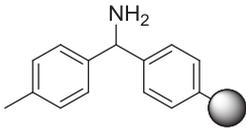
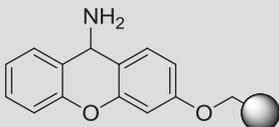
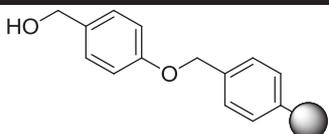
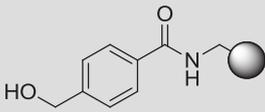
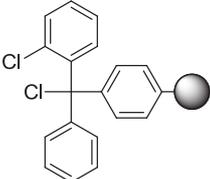
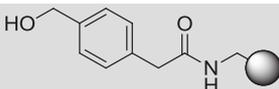
Figure 65: Structure de l'arginine protégée par le groupement Pbf

Les synthèses décrites dans le manuscrit ont été menées en stratégie Fmoc/tBu. Le groupement protecteur temporaire Fmoc est clivé par une solution de pipéridine à 20% dans du DMF. Cette stratégie est plus simple à mettre en oeuvre et notamment lors du clivage du support où un cocktail à base de TFA est utilisable alors qu'un traitement au HF est nécessaire en stratégie Boc/Bzl.

d. Résines

Les résines se présentent sous la forme de billes constituées de polystyrène, de polyamide, de polyéthylène glycol ou d'un mélange polystyrène-polyéthylène glycol. La taille des billes peut varier entre 50 μm et 500 μm . Elles sont fonctionnalisées par des bras qui déterminent les conditions d'accrochage et de décrochage du peptide ainsi que la fonction portée par le résidu en C-ter après clivage (Tableau 15). Les résines sont caractérisées par leur charge qui indique le nombre de sites d'accrochage disponible, en mmol/g de résine.

Tableau 15: Exemples de types de résine utilisés

Fonction C-ter	Résine	Structure	Clivage	Commentaires
Amide	Rink amide		TFA, 95%	Clivage + déprotection des chaînes latérales
	MBHA		HF	Clivage en milieu très acide
	Sieber		TFA, 1% dans DCM	Conservation des protections des chaînes latérales
Acide	Wang		TFA, 95%	Clivage + déprotection des chaînes latérales
	HMBA		Soude 1h ou TEA 6h	Clivage en milieu basique
	Trityl chloride		TFA 1% dans DCM	Conservation des protections des chaînes latérales
	PAM		HF	Clivage en milieu très acide

Comme nous pouvons le voir avec les quelques exemples mentionnés dans le tableau 15, il existe divers types de résines, permettant d'obtenir en C-ter un peptide amide ou acide, de cliver le peptide de la résine dans différentes conditions et également de conserver les protections des chaînes latérales ou non. Certaines sont adaptées à la stratégie Fmoc tandis que d'autres le sont pour la stratégie Boc.

Les synthèses décrites dans ce manuscrit ont été réalisées en utilisant la résine Rink Amide AM-PS (AminoMéthyle, PolyStyrène). Cette résine est clivée en présence de TFA 95% et permet d'obtenir le peptide complètement déprotégé avec une fonction amide en position C-ter (Figure 66).

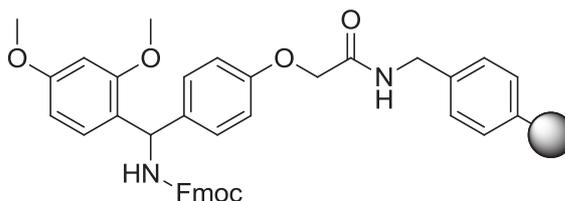


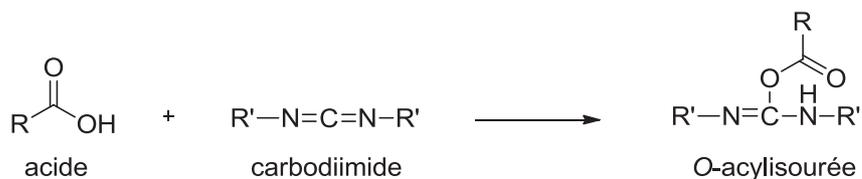
Figure 66 : Structure de la résine Rink Amide AM-PS

e. Agents de couplage

Comme nous avons pu le voir plus haut, lors du couplage peptidique, l'acide du résidu à coupler sur le support doit être activé. Pour cela, nous utilisons des agents de couplage pour réaliser une activation *in situ* de l'acide. Il en existe une grande variété¹⁹², et tous ne seront pas détaillés ici. Nous verrons les principaux : les carbodiimides et les sels de phosphonium et d'uronium.

i. Les carbodiimides

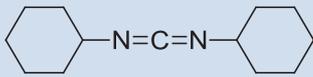
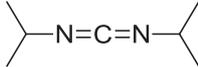
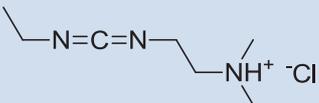
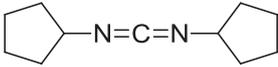
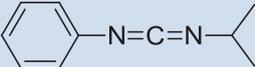
Les carbodiimides possèdent deux atomes d'azote peu alcalins, mais suffisamment pour entraîner une réaction avec l'acide à activer pour former une *O*-acylisourée (Schéma 57).

Schéma 57 : Formation de l'*O*-acylisourée avec un carbodiimide

Le tableau 16 suivant présente une liste de quelques carbodiimides utilisés pour faire des couplages peptidiques.

¹⁹² A El-Faham, F Albericio ; *Peptide coupling reagents, more than a letter soup* ; Chem. Rev. ; **2011** ; 111 ; 6557-6602.

Tableau 16: Exemples de quelques carbodiimides utilisés

Abréviation	Nom et structure	Référence
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide 	193
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide 	194
EDC	<i>N</i> -éthyl- <i>N'</i> (3-diméthylaminopropyl)carbodiimide chlorhydrate 	194
CPC	<i>N,N'</i> -dicyclopentylcarbodiimide 	195
PIC	<i>N</i> -phényl, <i>N</i> -isopropylcarbodiimide 	196

Une fois formée, l'acylisourée peut réagir de différentes manières selon les espèces présentes (Schéma 58). En effet, en présence d'une amine, une liaison amidique va se former entre cette amine et le résidu activé en libérant un dérivé d'urée (**A**). Si le milieu présente un excès d'acide carboxylique, il va attaquer l'*O*-acylisourée pour former un anhydride, qui va ensuite pouvoir réagir avec une amine pour former une liaison amidique et allonger ainsi le peptide (**B**). Cependant il est également possible de former une oxazolone si la réaction avec l'amine est trop lente. Cet intermédiaire peut donner par la suite le peptide souhaité, mais peut aussi entraîner une épimérisation (**C**). Enfin il est possible également d'avoir une réaction non désirée qui consiste en un réarrangement pour former une *N*-acylurée inerte (**D**).

¹⁹³ JC Sheehan, GP Hess; *A new method of forming peptide bonds*; J. Am. Chem. Soc.; **1955**; 77; 1067-1068.

¹⁹⁴ NL Benoiton, FMF Chen; *Not the alkoxycarbonylamino-acid O-acylisourea*; J. Chem. Soc., Chem. Commun.; **1981**; 11; 543-545.

¹⁹⁵ FS Gibson, MS Park, H Rapoport; *Bis[[4-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolyl)]methyl]-carbodiimide (BDDC) and Its Application to Residue-Free Esterifications, Peptide Couplings, and Dehydrations*; J. Org. Chem.; **1994**; 59; 7503-7507.

¹⁹⁶ LA Carpino, A El-Faham; *The diisopropylcarbodiimide/1-hydroxy-7-azabenzotriazole system: Segment coupling and stepwise peptide assembly*; Tetrahedron; **1999**; 55; 6813-6830.

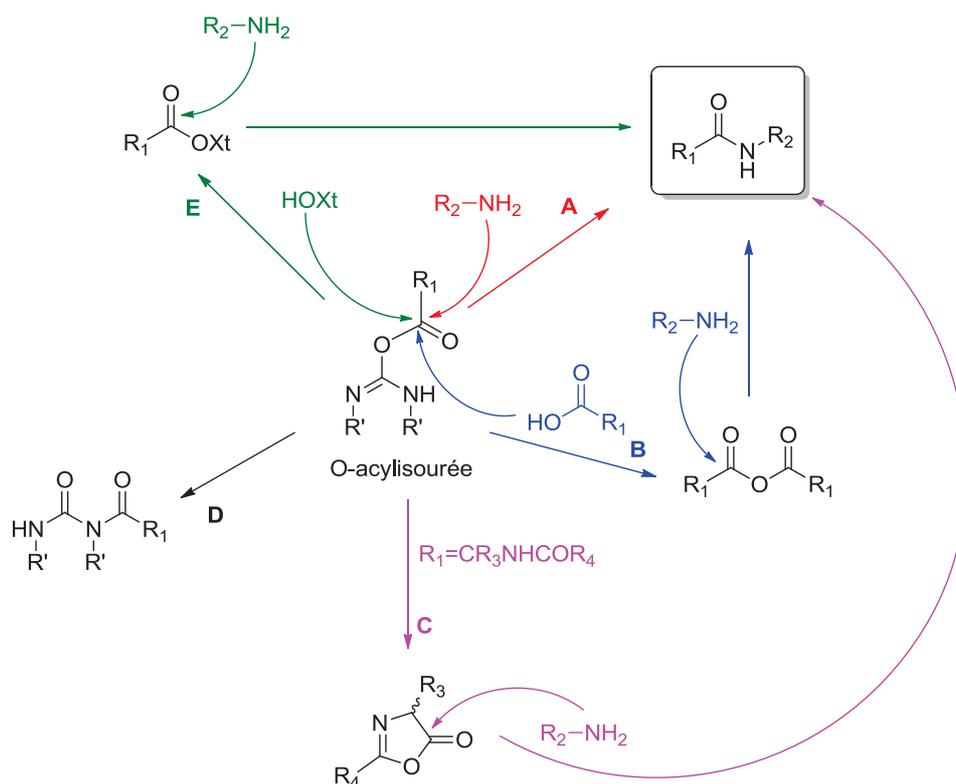


Schéma 58 : Mécanismes proposés pour la formation de la liaison amidique par les carbodiimides et réactions secondaires

Afin d'éviter certaines de ces réactions secondaires, il est possible d'utiliser des molécules additives, qui vont former des esters activés plus réactifs que l'*O*-acylisourée. Ceci permet de supprimer la formation de la *N*-acylisourée et de diminuer fortement la racémisation (**E**)¹⁹⁷.

L'approche la plus traditionnelle que l'on peut rencontrer est une méthode utilisant le dicyclohexylcarbodiimide (DCC), avec HOBT ou HOAt comme additif (Tableau 17).

¹⁹⁷ LA Carpino ; 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive ; J. Am. Chem. Soc. ; **1993** ; 115 ; 4397-4398.

Tableau 17: Deux additifs très utilisés : HOBt et HOAt

Abréviation	Nom et structure	Référence
HOBt	1-hydroxybenzotriazole 	193
HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole 	197

ii. Les sels de phosphonium

L'équipe de Kenner a été la première à décrire l'utilisation de sels acylphosphonium comme agents de couplage¹⁹⁸. Ces réactifs ont été largement adoptés après plusieurs études complémentaires réalisées notamment par Castro et Coste¹⁹⁹ qui ont introduit l'agent de couplage BOP (Tableau 18).

Tout d'abord le sel de phosphonium va réagir avec l'ion carboxylate. Pour la suite, le mécanisme a été assez controversé. Certains auteurs avancent que le sel acyloxyphosphonium ainsi formé est l'espèce active²⁰⁰, pour d'autres ce sel est très réactif et va réagir immédiatement, même à basse température, avec des ions carboxylates pour former l'anhydride correspondant¹⁹⁹. Cependant, il a été largement admis par la suite que l'espèce active était un ester activé d'HOBt (Schéma 59).

¹⁹⁸ G Gawne, GW Kenner, RC Sheppard ; *Acyloxyphosphonium salts as acylating agents. Synthesis of peptides* ; J. Am. Chem. Soc. ; **1969** ; 91 ; 5669-5671.

¹⁹⁹ B Castro, JR Dormoy, G Evin, C Selve ; *Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino phosphonium (B.O.P.)* ; Tetrahedron Letters ; **1975** ; 16 ; 1219-1222

²⁰⁰ a) LE Barstow, VJ Hruby ; *Simple method for the synthesis of amides* ; J. Org. Chem. ; **1971** ; 36 ; 1305-1306.

b) S Yamada, Y Takeuchi ; *A new method for the synthesis of peptides using the adducts of phosphorus compounds and tetrahalomethanes* ; Tetrahedron Letters ; **1971** ; 12 ; 3595-3598.

c) AJ Bates, IJ Galpin, A Hallett, D Hudson, GW Kenner, R Ramage, RC Sheppard ; *A New Reagent for Polypeptide Synthesis: μ -Oxo-bis-[tris-(diméthylamino)-phosphonium]-bis-tetrafluoroborate* ; Helv. Chim. Acta ; **1975** ; 58 ; 688-696.

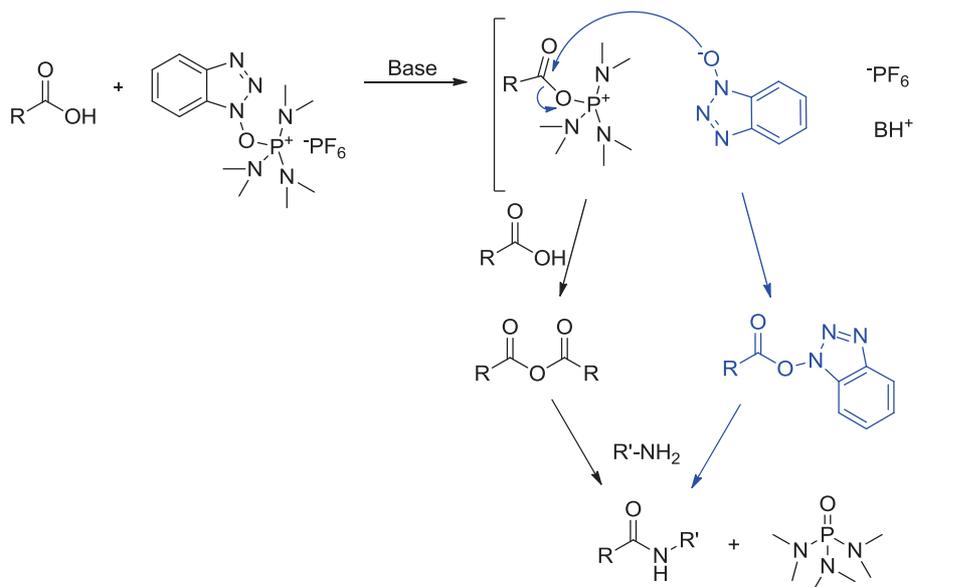


Schéma 59 : Mécanisme de formation de la liaison amidique en utilisant des sels de phosphonium (ici le BOP)

C'est en 1975 que l'équipe de Castro¹⁹⁹ a découvert le BOP (hexafluorophosphate de (benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)-phosphonium). Celui-ci contient le HOBT vu plus haut. Bien que ce réactif ait été très utilisé et qu'il soit un excellent agent de couplage, il génère un composé toxique : l'hexaméthylphosphoramide²⁰¹ (HMPA). Afin d'éviter la formation de ce composé, l'équipe de Coste a développé des analogues : PyCloP, PyBroP et PyBOP (Tableau 18). Dans ces composés, la fonction diméthylamine est remplacée par une pyrrolidine²⁰².

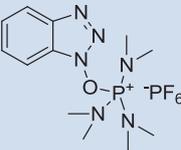
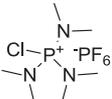
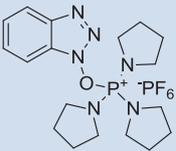
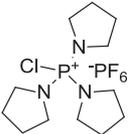
²⁰¹ D Hudson ; *Methodological implications of simultaneous solid-phase peptide synthesis. 1. Comparison of different coupling procedures* ; J. Org. Chem. ; **1988** ; 53 ; 617-624.

²⁰² a) J Coste, E Frerot, P Jouin ; *Coupling N-Methylated Amino Acids Using PyBroP and PyCloP Halogenophosphonium Salts: Mechanism and Fields of Application* ; J. Org. Chem. ; **1994** ; 59 ; 2437-2446.

b) E Frerot, J Coste, A Pantaloni, MN Dufour, P Jouin ; *PyBOP[®] and PyBroP: Two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, Aib* ; Tetrahedron ; **1991** ; 47 ; 259-270.

c) J Coste, D Le-Nguyen, B Castro ; *PyBOP[®]: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product* ; Tetrahedron Letters ; **1990** ; 31 ; 205-208.

Tableau 18 : Plusieurs sels de phosphonium couramment utilisés

Abréviation	Nom et structure	Référence
BOP	Hexafluorophosphate de Benzotriazol-1-yloxy- <i>tris</i> (diméthylamino)phosphonium 	199
CloP	Hexafluorophosphate de Chloro- <i>tris</i> (diméthylamino)phosphonium 	203
PyBOP	Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxy- <i>tris</i> (pyrrolidino)phosphonium 	202c
PyCloP	Hexafluorophosphate de Chloro- <i>tris</i> (pyrrolidino)phosphonium 	204

iii. Les sels d'uronium / aminium

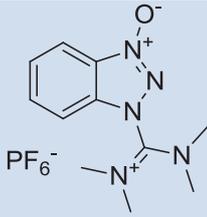
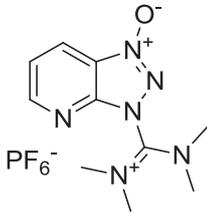
Les sels d'uronium ou d'aminium sont aussi très utilisés en synthèse peptidique. Ils possèdent une charge positive sur un carbone, à la place du phosphore pour les sels de phosphonium.

²⁰³ JR Dormoy, B Castro ; *The reaction of hexamethyl phosphoric triamide (HMPT) with phosphoryl chloride : A reexamination. Application to a novel preparation of BOP reagent for peptide coupling* ; Tetrahedron Letters ; **1979** ; 20 ; 3321-3322.

²⁰⁴ J Coste, E Frérot, P Jouin ; *Coupling N-Methylated Amino Acids Using PyBroP and PyCloP Halogenophosphonium Salts: Mechanism and Fields of Application* ; J. Org. Chem. ; **1994** ; 59 ; 2437-2446.

Initialement, leur structure a été décrite en tant que sel d'uronium²⁰⁵ mais par la suite, il a été montré que ces sels cristallisaient en sels d'aminium (guanidinium *N*-oxides)²⁰⁶. Ceci a notamment été mis en évidence pour deux sels d'uronium/aminium très fréquemment utilisés pour les couplages peptidiques : l'HBTU et le HATU (Tableau 19).

Tableau 19 : Deux sels d'uronium / aminium très utilisés en SPSS

Abréviation	Nom	Structure
HBTU	Hexafluorophosphate de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)(diméthylamino)méthylène]- <i>N</i> -méthylméthanaminium <i>N</i> -oxide	
HATU	Hexafluorophosphate de <i>N</i> -(diméthylamino)-1- <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridin-1-yl méthylène]- <i>N</i> -méthylméthanaminium <i>N</i> -oxide	

D'un point de vue mécanistique, l'aminium/uronium va réagir de façon similaire aux analogues de sels de phosphonium. Dans un premier temps, il va y avoir formation d'un sel carboxyluronium, qui va ensuite générer un ester activé (aidé par la présence d'une base). L'amine à coupler va pouvoir réagir sur l'ester activé ainsi formé pour donner la liaison amidique (Schéma 60).

²⁰⁵ V Dourtoglou, B Gross, V Lambropoulou, C Zioudrou ; *O-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium Hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest* ; Synthesis ; **1984** ; 7 ; 572-574.

²⁰⁶ a) LA Carpino, P Henklein, BM Foxman, I Abdelmoty, B Costisella, V Wray, T Domke, A El-Faham, C Mügge ; *The Solid State and Solution Structure of HAPyU* ; J. Org. Chem ; **2001** ; 66 ; 5245-5247.

b) I Abdelmoty, F Albericio, LA Carpino, BM Foxman, SA Kates ; *Structural studies of reagents for peptide bond formation : Crystal and molecular structures of HBTU and HATU* ; Let. Pep. Sci. ; **1994** ; 1 ; 57-67.

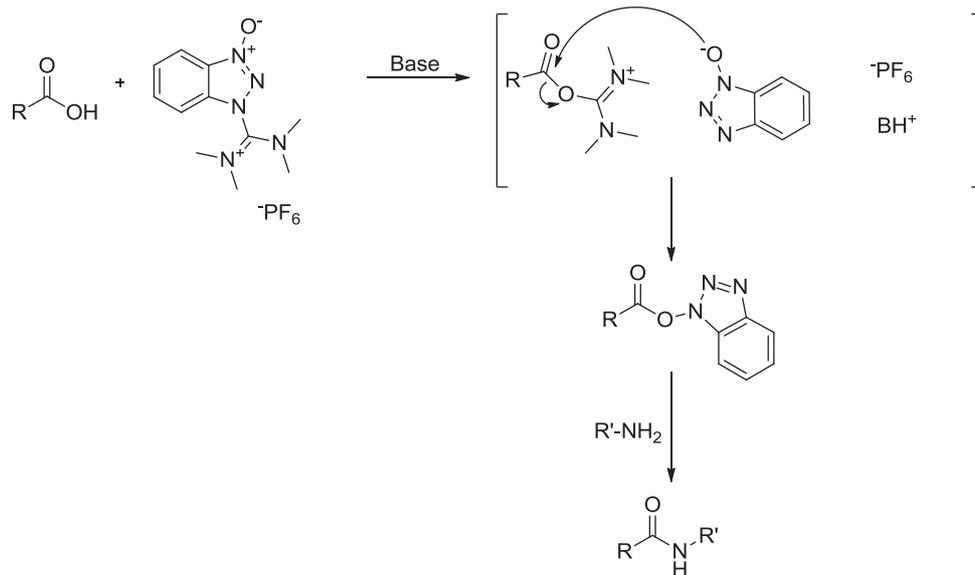


Schéma 60 : Mécanisme de formation de la liaison peptidique en utilisant les sels d'uronium / aminium

Pendant une réaction secondaire peut se produire si l'agent de couplage est introduit en excès et avant le carboxylate lors d'une synthèse. En effet, dans le cas où la réaction de couplage est lente et le pH acide, les sels d'uronium peuvent réagir avec l'amine primaire du peptide pour former un dérivé tétraméthylguanidinium, ce qui bloque de façon irréversible l'amine terminale du peptide (Schéma 61). Il est donc très important de générer en premier lieu le carboxylate de l'acide aminé à coupler puis de rajouter en dernier l'agent de couplage qui réagira avec l'espèce la plus réactive, c'est-à-dire le carboxylate et non l'amine.

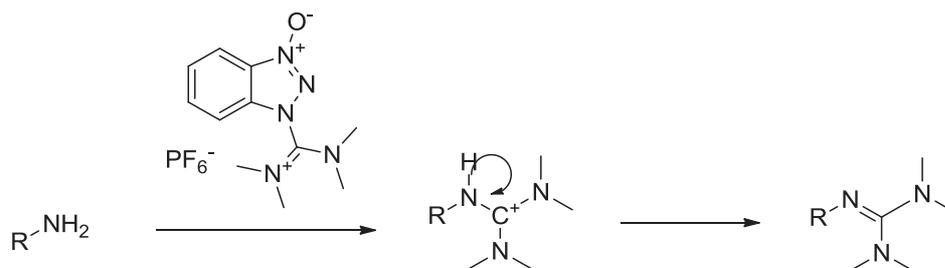


Schéma 61 : Réaction secondaire liée aux sels d'uronium / aminium

f. Clivage et purification du peptide

Comme nous avons pu le voir plus haut, en stratégie Fmoc/tBu, le clivage s'effectue en présence de TFA. Ce réactif permet également d'enlever les protections acido-labiles des chaînes latérales. Dans ces conditions, lors de la déprotection de certaines chaînes latérales avec le TFA, des



carbocations provenant de groupements protecteurs (ou du bras restant sur le support en SPPS) peuvent être formés. De par leur nature, ils pourraient réagir avec des chaînes latérales d'autres résidus sur le peptide (par exemple les chaînes latérales de cystéine, sérine, tryptophane, tyrosine ou méthionine). Pour éviter ces réactions parasites, divers nucléophiles (« scavengers ») sont utilisés pour piéger ces carbocations. Dans notre cas, nous avons utilisé l'eau et le triisopropylsilane (TIS) qui permettent notamment de piéger les cations dérivés du tBu et Pbf. De ce fait le cocktail suivant a été utilisé lors des clivages : TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5).

Une fois clivé, le peptide est sous forme de sel de TFA dans le TFA. Dans un premier temps l'acide est concentré puis le peptide est précipité dans le diéthyléther (Et₂O). Après centrifugation, le culot peptidique est enfin purifié par HPLC préparative en phase inverse.

g. Suivi de la synthèse peptidique sur support

Comme nous avons pu le mentionner plus haut, le suivi des réactions est plus complexe sur support solide qu'en solution. Je vais présenter ici deux types de tests qui peuvent donner une bonne idée de l'avancement et de l'état du peptide. Cependant le microclivage reste le moyen le plus précis pour connaître l'état du peptide en cours de synthèse.

i. Les tests colorimétriques

Deux types de tests colorimétriques sont très utilisés lors des synthèses peptidiques en phase solide : le test TNBS et le test de Kaiser ou à la ninhydrine. Ils permettent de détecter les amines primaires libres (que l'on obtient par exemple après une déprotection).

D'après le mécanisme présenté ci-après pour le test de Kaiser (Schéma 62), la solution doit devenir bleue en présence d'amines primaires libres. Mais dans la pratique ce bleu colore également les billes de résine, le chromophore anionique restant certainement piégé au cœur de la bille²⁰⁷.

²⁰⁷ VK Sarin, SBH Kent, JP Tam, RB Merrifield ; *Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction* ; Anal. Biochem. ; **1981** ; 117 ; 147-157.

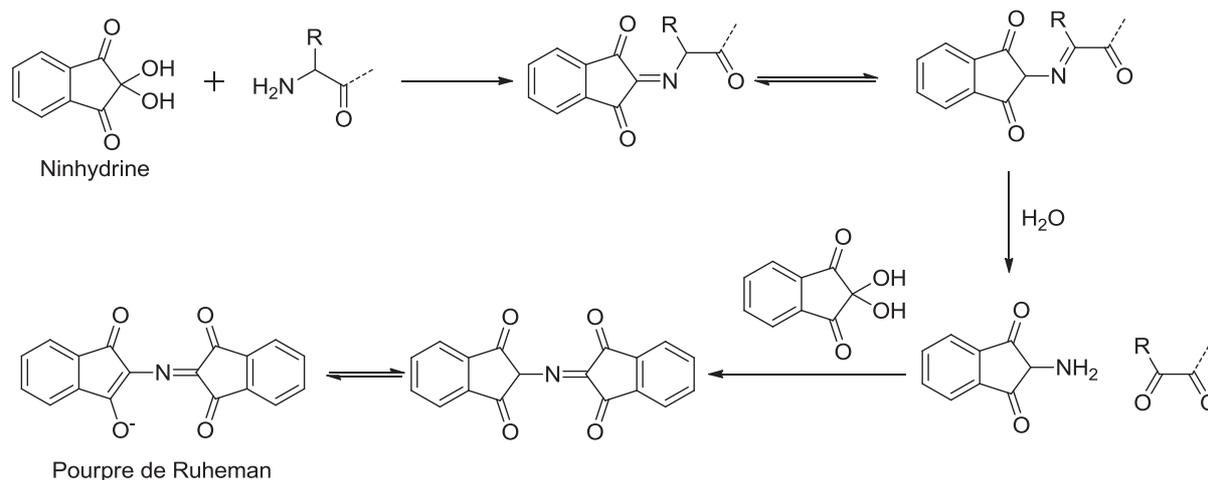


Schéma 62 : Mécanisme du test de Kaiser

Le second test, TNBS, va lui aussi réagir avec les amines primaires libres mais cette fois-ci la bille va changer de couleur car le dérivé coloré demeure attaché au support. Dans ce cas une couleur rouge-orange apparaît (Schéma 63).

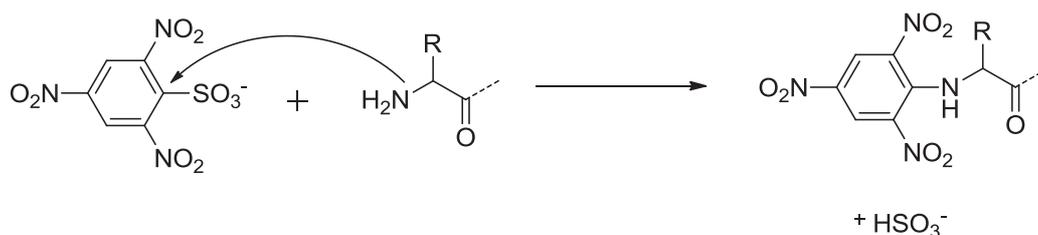


Schéma 63 : Réaction du test TNBS

En routine, ces tests ne sont que qualitatifs dans le cas du suivi de l'étape de déprotection, mais une version quantitative du test de Kaiser peut être mise en œuvre par dosage spectrophotométrique du dérivé coloré libéré en solution. Leur principal intérêt est de suivre les réactions de couplage puisqu'une réaction complète se traduira par des tests négatifs. Un test légèrement positif après un couplage entrainera un nouveau cycle de couplage pour minimiser les risques de délétion.

ii. Le dosage du Fmoc

Afin de déterminer la charge de la résine, mais surtout de déterminer la quantité de peptide sur une résine, un dosage de Fmoc peut être entrepris. Pour cela, une déprotection de l'amine en présence d'une solution de pipéridine à 20% dans le DMF est réalisée sur une masse précise de

résine. Lors de cette étape, le dibenzofulvène formé par élimination du Fmoc va être piégé par la pipéridine pour former un adduit (Schéma 64).

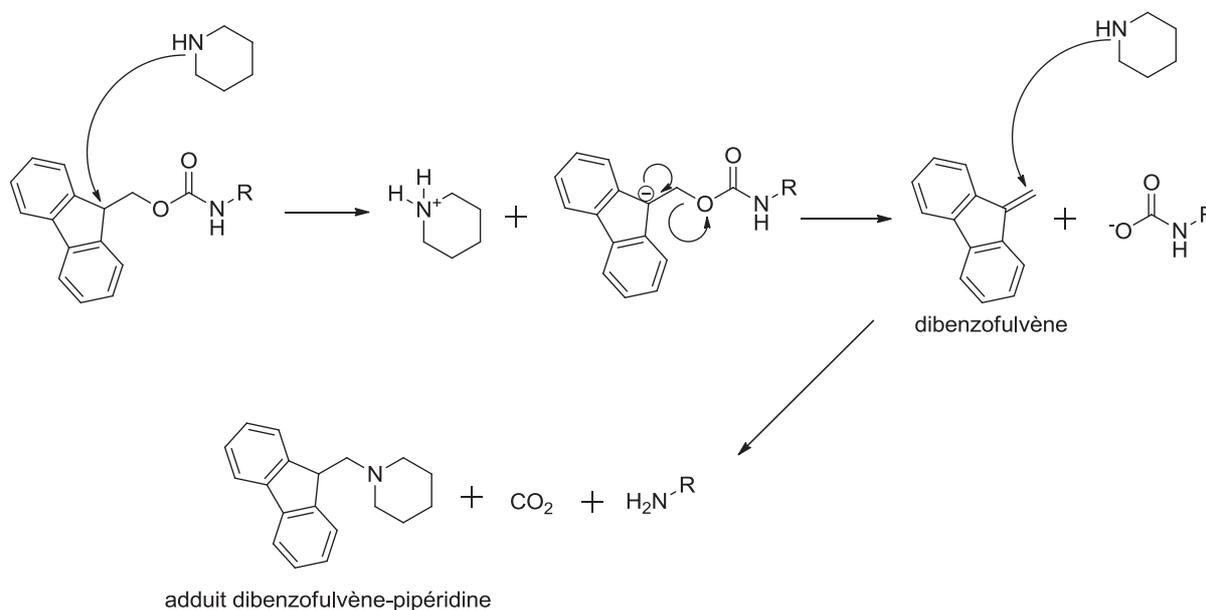


Schéma 64 : Réaction de déprotection du Fmoc

Une analyse par spectroscopie UV à 301 nm de cette solution de déprotection permet par la suite de quantifier l'adduit de dibenzofulvène-pipéridine formé lors de la déprotection et par conséquent de déterminer la charge de la résine.

Plusieurs peptides ont été synthétisés et sont présentés ci-dessous. Ils ont été synthétisés en suivant les stratégies SPPS définies précédemment.

III) Etude de conjugués analogues du JMV4463

Une partie importante de ma thèse a été consacrée à l'étude de relations structure / activité du conjugué JMV4463. Pour ce faire, différents conjugués ont été synthétisés sur support solide, et testés afin d'évaluer leur activité. Les différents conjugués diffèrent par leur composition. En effet, pour évaluer l'importance du vecteur AMPA₄, celui-ci a été remplacé par différents vecteurs en intégrant notamment certains analogues de l'AMPA et du DBT décrits précédemment. Nous avons également évalué l'importance des résidus statine de la pepstatine. Enfin, l'influence de la position de chaque élément constitutif du conjugué (vecteur, pepstatine et partie hydrophile) a été évaluée (schéma 65).

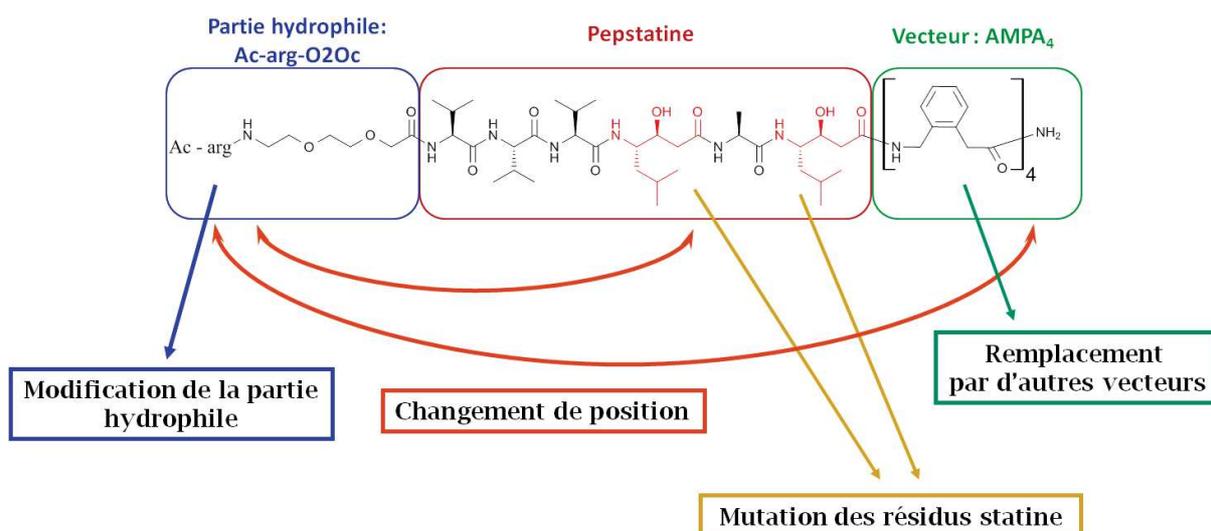


Schéma 65 : Présentation des modifications apportées au conjugué de référence, le JMV4463

a. Synthèse des conjugués

Tous les conjugués ont été synthétisés en suivant une stratégie Fmoc/tBu (Schéma 66).

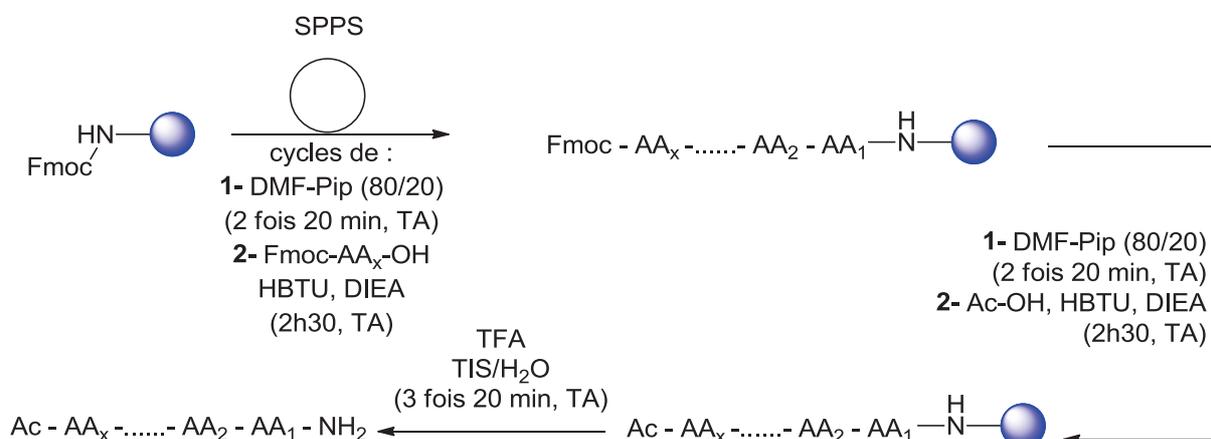


Schéma 66 : méthode de synthèse générale pour tous les conjugués

Les déprotections ont été réalisées en mettant la résine en présence d'une solution de pipéridine dans le DMF (20/80) à deux reprises durant 20 min à TA. Les couplages peptidiques ont été réalisés en mettant la résine en présence d'un excès de réactifs. L'acide est activé par HBTU en présence de DIEA et le couplage est laissé 2h30 à TA. L'amine terminale du conjugué est ensuite acétylée par couplage de l'acide acétique. L'anhydride acétique n'est pas utilisé dans le cas des

composés contenant des résidus statines en raison de la réactivité de leur fonction alcool qui peut être acétylée dans ces conditions. Enfin, les conjugués ont été clivés de la résine en présence de TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5). Après évaporation du TFA et précipitation dans du diéthyléther, les conjugués ont été purifiés par HPLC semi-préparative en phase inverse.

Lors du clivage, le milieu acide entraîne un réarrangement intramolécule partiel du conjugué au niveau de sa partie peptidique : un transfert N-O acylique de l'ordre de 10% du carbonyle de la liaison amide formée avec l'une des deux statines vers le groupement hydroxyle de cette statine (schéma 67). Cette réaction est réversible en milieu basique. C'est pourquoi avant purification par HPLC préparative, un traitement en présence d'un tampon phosphate à pH = 7.4 est effectué.

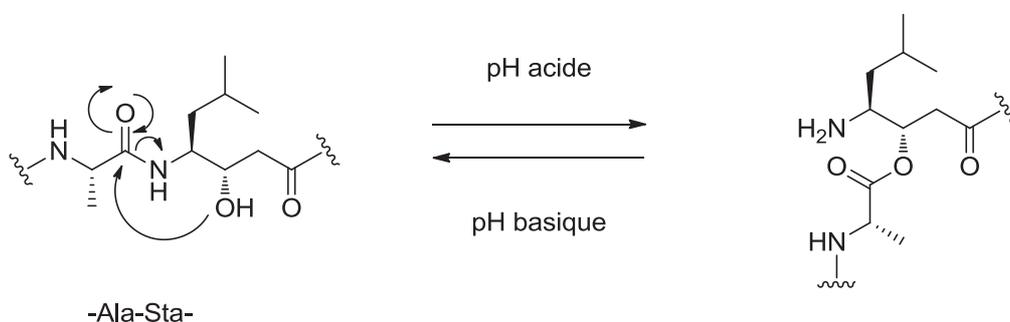


Schéma 67 : Réaction de transfert N-O acylique

Le tableau 20 recense tous les conjugués synthétisés.



Tableau 20 : Liste des conjugués synthétisés et rendements obtenus

Conjugués	N°	JMV	Rdt(%)
Modifications du Vecteur			
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMPA) ₄ -NH ₂	1	4463	30
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMPA) ₂ -NH ₂	2	4879	16
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMPA) ₃ -NH ₂	3	4880	15
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMPA) ₅ -NH ₂	4	4464	23
Iva-(Val) ₂ -Sta-Ala-Sta-Penetratine*-NH ₂	5	5610	2
Iva-(Val) ₂ -Sta-Ala-Sta-(Arg) ₈ -NH ₂	6	5611	1.4
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(DBT) ₄ -NH ₂	7	4630	25
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(LBD) ₄ -NH ₂	8	5785	6
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(mAMPA) ₄ -NH ₂	9	6008	1.8
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(pAMPA) ₄ -NH ₂	10	6007	3
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMBA) ₄ -NH ₂	11	6043	30
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(Br-AMPA) ₄ -NH ₂	12	6275	2
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(diMeO-AMPA) ₄ -NH ₂	13	6276	11
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMCA) ₄ -NH ₂	14	6274	5
Mutation de la statine			
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -γLeu-Ala-γLeu-(AMPA) ₄ -NH ₂	15	4564	26
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -γAla-Ala-γAla-(AMPA) ₄ -NH ₂	16	4674	20
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-γAla-(AMPA) ₄ -NH ₂	17	5606	10
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -γAla-Ala-Sta-(AMPA) ₄ -NH ₂	18	5607	11
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -ChaSta-Ala-γAla-(AMPA) ₄ -NH ₂	19	5840	15.5
Modification de la place de chaque éléments constitutifs			
Ac-(AMPA) ₄ -(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-O ₂ Oc-arg-NH ₂	20	5609	4.2
Ac-arg-O ₂ Oc-(AMPA) ₄ -(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-NH ₂	21	4860	3.5
Ac-arg-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-O ₂ Oc-(AMPA) ₄ -NH ₂	22	5608	18
Modification de la partie hydrophile			
Ac-arg-O ₁₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMPA) ₄ -NH ₂	23	5992	25
Bétaine-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMPA) ₄ -NH ₂	24	5994	15
Contrôles négatifs			
Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-NH ₂	25	4567	18
Ac-arg-O ₂ Oc-(AMPA) ₄ -NH ₂	26	4727	52

*Pénétratine : RQIKIWFQNRRMKWKK

Les conjugués **1** à **14** diffèrent par leur vecteur. Ces conjugués ont été synthétisés dans le but d'évaluer la capacité de différents vecteurs à traverser la membrane cellulaire et ainsi adresser la pepstatine. Les bioconjugués **1** à **4** contiennent des vecteurs constitués d'oligomères de l'AMPA de différentes tailles, afin d'évaluer la taille minimale nécessaire pour avoir une internalisation cellulaire efficace.

Afin de comparer l'efficacité de nos vecteurs à des CPP connus, les conjugués **5** et **6** ont été synthétisés, incorporant la polyarginine et la pénétratine, respectivement. Cette dernière possède une méthionine dans sa chaîne peptidique. Lors du clivage de la résine, cette méthionine est partiellement oxydée en méthionine sulfoxyde (schéma 68). C'est pourquoi, d'après les travaux de l'équipe de Taboada²⁰⁸, des conditions particulières de clivage ont été utilisées : TFA / thioanisole / anisole / EDT (99/0,5/0,2/0,3). En fin de clivage, ce peptide a été mis en présence de Bu₄NBr afin de réduire le sulfoxyde formé. Ces conjugués ne comportent pas de partie hydrophile, puisque ces vecteurs CPP le sont déjà.

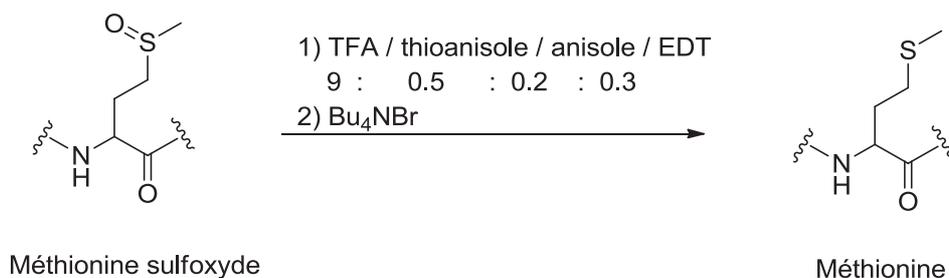


Schéma 68 : Clivage du peptide contenant une méthionine

Les conjugués **7** à **14** possèdent les différents vecteurs composés de tétramères des mimes de dipeptide décrits plus haut.

Les bioconjugués **15** à **19** diffèrent du composé **1** (JMV4463) par modification de la pepstatine au niveau de ses résidus statines. Ceci avait pour but d'évaluer l'importance de chaque statine contenue dans le JMV4463. Deux conjugués sans statine ont ainsi été préparés. Le **15** possède deux γ Leu en remplacement des statines. De ce fait, les fonctions OH indispensables à l'inhibition de la CathD sont absentes (Figure 67), mais les chaînes latérales sont toujours présentes. Le composé résultant di-déoxy-pepstatine possède un pouvoir inhibiteur modéré sur les aspartyl-peptidases. Le conjugué **16** possède deux γ Ala à la place des statines. Ce composé ne possède donc ni les fonctions OH, ni la chaîne latérale correspondant à la statine. Cela devrait théoriquement réduire, voire abolir l'activité inhibitrice du conjugué vis-à-vis de la CathD. Ainsi, ces deux conjugués analogues du

²⁰⁸ L Taboada, E Nicolas, E Giralt ; *One-pot full peptide deprotection in Fmoc-based solid-phase peptide synthesis: methionine sulfoxide reduction with Bu₄NBr* ; Tet. Let. ; **2001** ; 42 ; 1891-1893.

JMV4463 doivent permettre de vérifier l'existence d'une corrélation entre le pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la CathD et l'activité anti-proliférative observée pour le conjugué JMV4463.

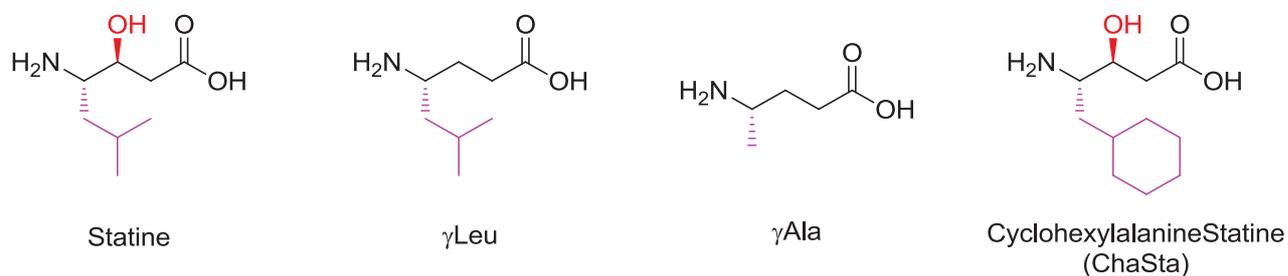


Figure 67 : Structures de la statine, de la γ Leu, de la γ Ala et de la ChaSta

Pour les bioconjugués **17** et **18**, une seule des deux statines a été remplacée par une γ Ala, afin d'étudier l'importance de chaque statine dans l'inhibition de la CathD. Comme nous le verrons plus loin lors de l'analyse des résultats biologiques, il est apparu possible de remplacer la seconde des deux statines sans affecter l'activité inhibitrice. Nous avons alors tenté d'augmenter l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme en remplaçant la première statine par une ChaSta (conjugué **19**) qui possède une chaîne latérale plus volumineuse (Figure 67).

Le troisième point abordé dans cette étude était de déterminer l'importance de la position de chaque élément (partie hydrophile, pepstatine, vecteur AMPA₄) dans le bioconjugué JMV4463 (composés **20** à **22**). Le conjugué **20** présente une structure totalement inversée, c'est-à-dire que le vecteur se trouve en position *N*-terminale, alors que la partie hydrophile se situe en *C*-ter. Le conjugué **21** possède quant à lui le vecteur en position centrale entre la partie hydrophile et la pepstatine. Enfin, dans le conjugué **22** le résidu PEG (O₂Oc) a été introduit comme bras espaceur entre le vecteur et la pepstatine.

Le dernier point abordé dans cette étude portait sur la partie hydrophile avec l'objectif d'améliorer la solubilité dans l'eau. Cette partie a été modifiée dans les conjugués **23** et **24**. Le conjugué **23** présente une chaîne PEG plus longue, alors que le **24** possède un résidu bêtaïne en remplacement de la D-arginine (Figure 68).

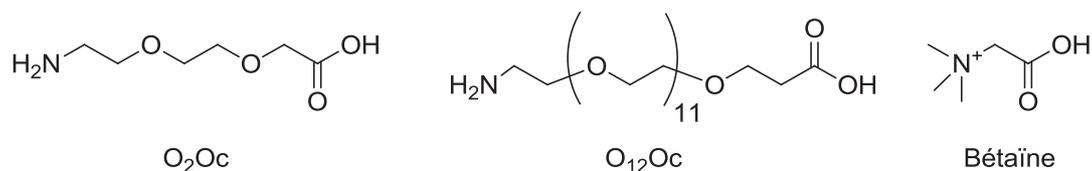


Figure 68 : Structures de l'O₂Oc, de l'O₁₂Oc et de la Bétaïne

Les conjugués **25** et **26** sont des contrôles négatifs. Le **25** ne possède pas de vecteur, ainsi la pepstatine n'est pas à priori capable de traverser la membrane cellulaire. Le **26** ne possède pas de pepstatine, afin de vérifier que le vecteur et la partie hydrophile ne jouent pas de rôle dans l'inhibition de la CathD et dans l'activité antiproliférative.

Tous ces bioconjugués ont subi les mêmes tests biologiques. Ceux-ci ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans le paragraphe suivant.

b. Tests biologiques

Les tests décrits ici ont été réalisés par l'équipe du Dr Garcia de l'IBMM, en particulier par Marie Maynadier, Virginie Bellet et Nadir Bettache.

Trois types de tests ont été mis en place :

- Tests d'inhibition de la CathD isolée à l'aide d'un substrat à fluorescence quenchée (FRET). Ces tests ont pour but de vérifier si les conjugués inhibent l'enzyme. En effet, lorsque le substrat est clivé par la CathD (non inhibée), le composé fluorophore (EDANS) n'est plus assez proche de son extincteur (DABCYL) pour être quenché. De ce fait, ce peptide permet de déterminer s'il reste une activité due à la CathD après traitement avec les différents conjugués par mesure de la fluorescence (Schéma 69). Ainsi, on détermine si un changement dans la structure du conjugué affecte ou non son activité inhibitrice vis-à-vis de l'enzyme.

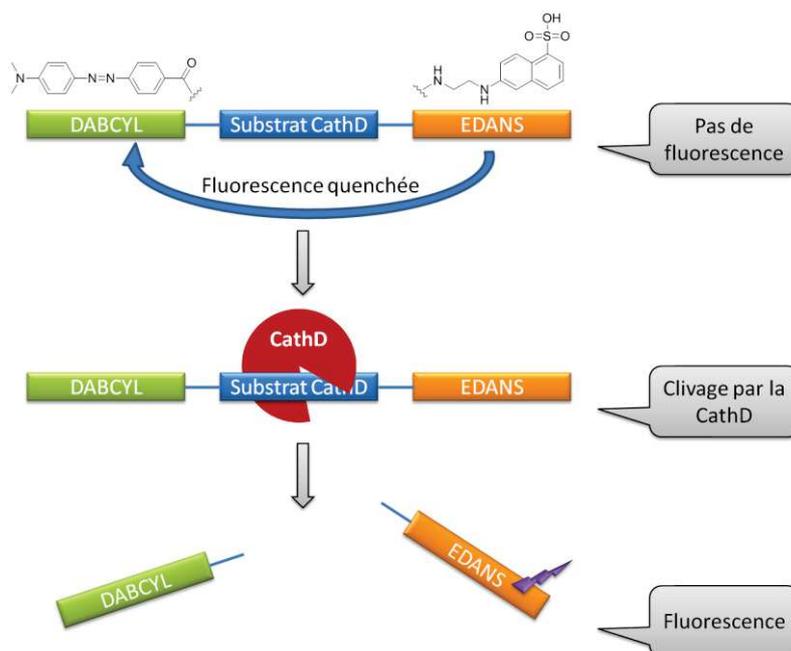


Schéma 69 : Principe des tests FRET

- Tests d'inhibition de la CathD intracellulaire (MDA-MB-231) : détermination de la capacité des conjugués à pénétrer dans les cellules. Après avoir été incubées en présence des différents conjugués à une concentration de 10 μM , les cellules traitées sont lavées puis lysées. De ce fait, tous les compartiments cellulaires se retrouvent mélangés lors de la mesure de l'inhibition enzymatique. Par voie de conséquence, si un conjugué a traversé la membrane cellulaire sans pour autant interagir avec la CathD, la lyse cellulaire va permettre, *in fine*, la rencontre des deux partenaires, entraînant une mesure positive de l'inhibition de la CathD. Ce test nous permet donc d'évaluer la capacité du conjugué à franchir la membrane cellulaire, mais en aucun cas de savoir s'il adresse correctement la pepstatine dans les compartiments cellulaires contenant la CathD.
- Tests de cytotoxicité : ces tests nous permettent d'évaluer si le conjugué est toxique pour les cellules traitées (MDA-MB-231 (cancer du sein)) ou non.

La prise en compte des résultats de ces trois tests nous permet ensuite d'établir des relations entre l'activité inhibitrice, la capacité d'internalisation et la cytotoxicité d'un conjugué et sa structure. Les détails des conditions opératoires de ces tests seront présentés dans la partie expérimentale.



c. Etude des relations structure-activité

Dans cette partie vont être présentés les résultats des tests biologiques mentionnés ci-dessus sous forme d'histogrammes, en fonction du type de modification apporté au conjugué JMV4463. Certains de ces résultats ont fait l'objet d'une publication parue en 2016 dans le journal ChemMedChem (cf Annexe)²⁰⁹.

Dans les représentations suivantes, le pourcentage d'inhibition de la CathD isolée à 10^{-5} M est représenté en bleu, et celui obtenu lors des tests sur cellules MDA-MB-231 est en rouge. Les activités cytotoxiques des conjugués sont évaluées à partir du pourcentage de cellules vivantes après traitement, représentées en violet, et sont comparées aux contrôles négatifs qui sont en noir ainsi qu'au conjugué de référence représenté en vert.

La notation des conjugués a été simplifiée dans les figures. Ainsi, **P** désigne la pepstatine non modifiée et **Hm** désigne la partie hydrophile non modifiée (Hydrophilic Moiety).

i. Modification du vecteur

Les tests sur enzyme isolée à 10^{-5} M nous montrent que quelque soit le vecteur utilisé, tout conjugué contenant une pepstatine non modifiée inhibe l'activité enzymatique de la CathD (Figure 69). Cela montre que le vecteur n'interfère pas dans la reconnaissance de l'inhibiteur par l'enzyme. En ce qui concerne les contrôles négatifs, ceux ne contenant pas de pepstatine (conjugué **26** et DMSO) ne sont pas actifs, comme attendu.

Les tests d'inhibition intracellulaire nous montrent avec les différents oligomères de l'AMPA que la taille du vecteur a son importance (conjugués **1** à **4**). En effet, la taille minimale requise pour l'internalisation cellulaire du conjugué est le tétramère de l'AMPA, conformément aux résultats antérieurs obtenus pour les vecteurs seuls (cf V.Travaux antérieurs). De plus, tous les autres vecteurs étudiés présentent une capacité d'internalisation similaire car le niveau d'inhibition de la CathD est comparable (> 90%). Il apparait que modifier l'AMPA au niveau de sa structure (méta (**9**), para (**10**), bromo (**12**), diMeO (**13**) ou AMCA (**14**)) n'altère pas la capacité à franchir les membranes cellulaires,

²⁰⁹ CA Sanchez, LL Vezekov, V Bellet, V Martin, M Maynadier, N Bettache, V Lisowski, J Martinez, M Garcia, M Amblard, JF Hernandez ; *Structure-activity relationships of JMV4463, a vectorized cathepsin D inhibitor with antiproliferative properties: the unique role of the AMPA-based vector* ; Chem. Med. Chem. ; **2016** ; 11 ; 302-308.

tout comme le fait d'utiliser son homologue inférieur (**11**). Il est toutefois intéressant de noter que le LBD₄ (**8**), analogue en série benzodiazépine du DBT₄, semble moins internalisé que le DBT₄ (**7**).

Aucun des contrôles négatifs n'a montré d'activité intracellulaire. Ceci confirme que la pepstatine seule et son conjugué **Hm-P** ne passent que très difficilement les membranes cellulaires. Le conjugué **Hm-(AMPA)₄** ne possède pas d'inhibiteur et ne présente pas d'activité sur l'enzyme comme attendu.

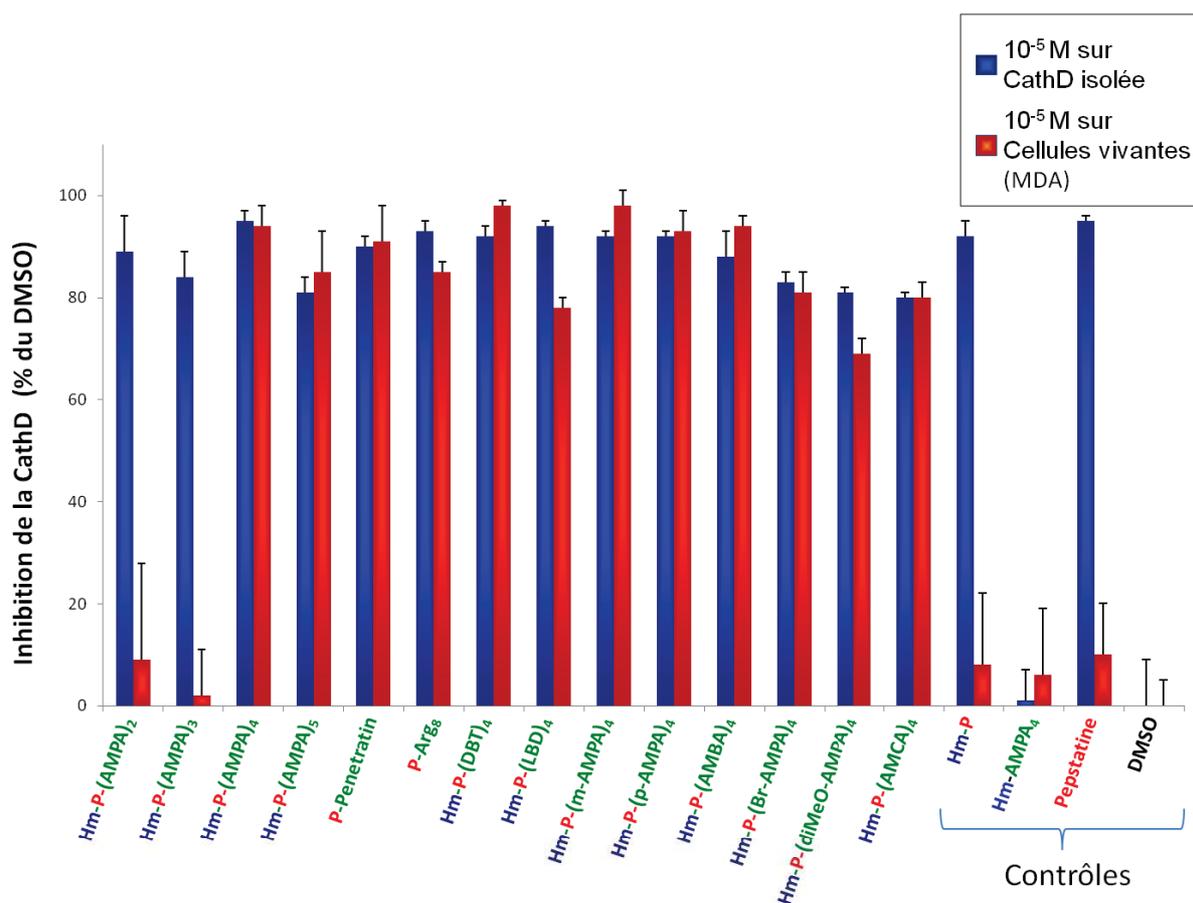


Figure 69 : Inhibition de la CathD isolée (barres bleues) et intracellulaire (barres rouge) par les conjugués différent par la nature du vecteur à 10⁻⁵M

Ces tests ont permis d'établir que tous les tétramères de mimes contraints de dipeptides étudiés sont aussi capables de traverser la membrane cellulaire que les deux CPP Arg₈ (**6**) et Pénétratine (**5**). En revanche, ces résultats ne préjugent pas de la capacité de ces oligomères à adresser la pepstatine dans le bon compartiment cellulaire, où doit être inhibée la CathD. Les tests de cytotoxicité permettent alors de révéler les vecteurs capables d'adresser l'inhibiteur dans le bon compartiment. Les résultats de ces tests sont présentés sur la figure 70.

Tout d'abord, les contrôles négatifs sont tous inactifs, ce qui est en accord avec leur incapacité à inhiber l'enzyme intracellulaire pour les raisons évoquées plus haut.

Comme attendu, les conjugués contenant les di- et trimère de l'AMPA (**2** et **3**) n'entraînent pas l'inhibition de la prolifération cellulaire. Le conjugué possédant un pentamère de l'AMPA (**4**) présente comme le JMV4463 (**1**) une très bonne inhibition de la prolifération des cellules MDA-MB-231, montrant sa capacité à atteindre l'enzyme ciblée.

A l'instar des deux CPP testés (**5** et **6**), les tétramères du DBT (**7**), du LBD (**8**), du *m*-AMPA (**9**), du *p*-AMPA (**10**), du Br-AMPA (**12**) et du diMeO-AMPA (**13**) n'entraînent aucune inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses. Nonobstant leur capacité à internaliser les conjugués, ils ne sont pas capables d'atteindre la CathD. Les résultats nous montrent également que le conjugué contenant le tétramère de l'AMBA (**8**) présente une légère activité antiproliférative avec une inhibition de la croissance d'environ 30%. Ceci peut s'expliquer par sa forte analogie structurale au seul vecteur efficace : l'AMPA₄. Cependant, le fait d'avoir un carbone en moins sur la chaîne acide le rend moins efficace. De même, l'analogue AMCA (**14**) permet a priori un adressage partiel de la pepstatine à la CathD, entraînant une inhibition de la croissance d'environ 40%.

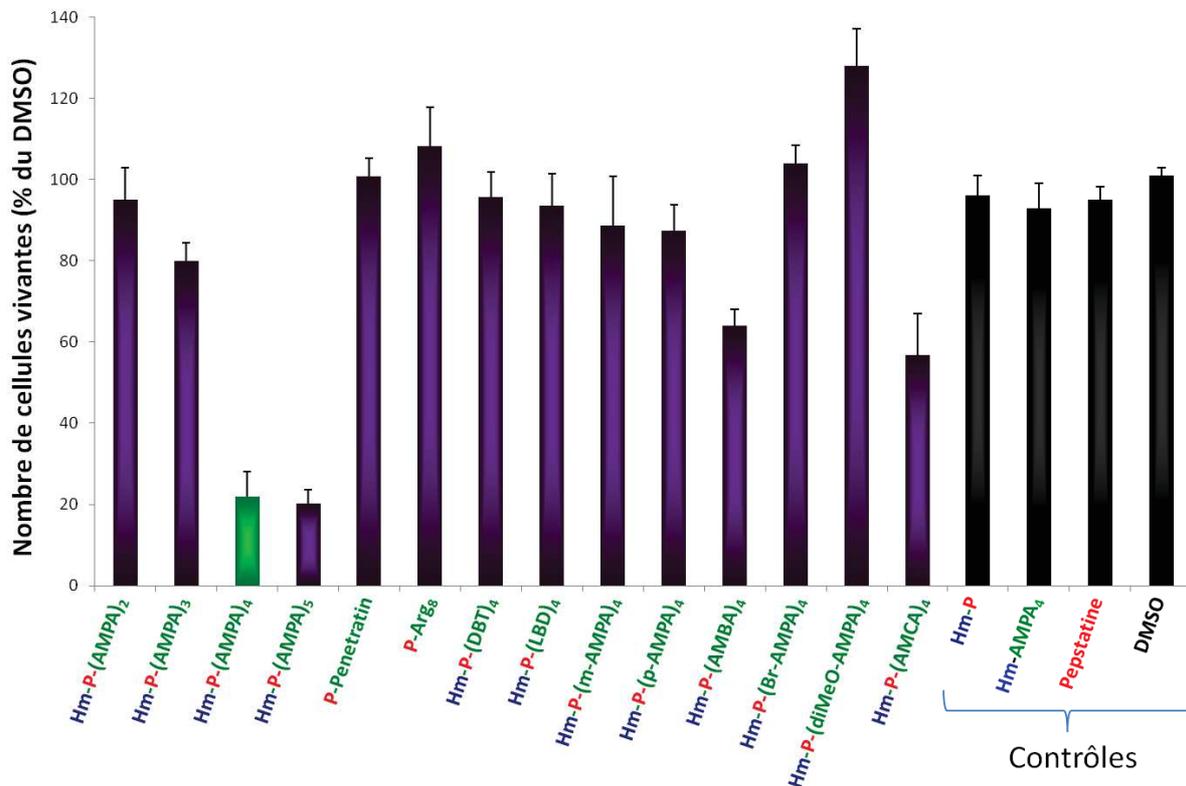
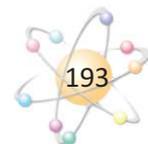


Figure 70 : Cytotoxicité des conjugués différant par leur vecteur à 10^{-5} M sur des cellules MDA-MB-231



ii. *Modification de la pepstatine*

Comme décrit plus haut, (cf Chap1,III,c) l'activité inhibitrice de la pepstatine sur la CathD est due à la présence de la fonction hydroxyle portée par les deux résidus statine. Nous avons souhaité évaluer l'importance de ces deux résidus contenus dans l'inhibiteur. Pour cela, des conjugués ont été synthétisés où l'une des statines (ou les deux) a (ont) été remplacée(s) par des analogues ne possédant pas la fonction hydroxyle et ayant une chaîne latérale identique ou plus petite (respectivement γ Leu, γ Ala) (**15**, **16**, **17** et **18**). De plus, un conjugué possédant un résidu ChaSta (analogue de la statine possédant une chaîne latérale plus volumineuse) et un résidu γ Ala a été synthétisé dans le but d'évaluer l'importance de la chaîne latérale de la première statine (**19**). Dans les histogrammes suivants (Figures 71, 72 et 73), la désignation des conjugués a été simplifiée pour plus de clarté. Ainsi, seuls les résidus statine ou leurs mutants ont été indiqués, avec un exposant numéroté pour indiquer de quelle Statine il s'agit. Par exemple, le conjugué noté $\text{Sta}^1, \gamma\text{Ala}^2$ correspond au conjugué **17** (Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta-Ala- γ Ala-(AMPA)₄-NH₂).

Les tests d'inhibition de CathD isolée présentés sur la figure 71 montrent que lorsque l'on remplace chacune des deux statines par une γ Leu, il y a une perte partielle de l'activité inhibitrice pour le conjugué $\text{di-}\gamma\text{Leu}^{1,2}$ (**15**). Ceci est en accord avec l'observation faite par Rich et al. Qui démontrait que la $\text{di-}\gamma\text{Leu}^{1,2}$ -pepstatine ou didéoxy-pepstatine inhibe significativement les aspartyl-protéases.²¹⁰ Par contre le conjugué $\text{di-}\gamma\text{Ala}^{1,2}$ (**16**) ne présente aucune activité, montrant que La chaîne latérale de type leucine est aussi essentielle pour la reconnaissance de l'enzyme.

Les composés $\text{Sta}^1, \gamma\text{Ala}^2$ et $\gamma\text{Ala}^1, \text{Sta}^2$ (**17** et **18**) présentent à 10^{-5} M une capacité d'inhibition de la CathD comparable à celle du conjugué de référence JMV4463 (Hm-P-(AMPA)₄). Ceci indique clairement qu'il est possible de substituer l'une des deux statines par un autre résidu sans pour autant altérer l'activité inhibitrice sur l'enzyme, à cette concentration. Cela confirme qu'il est nécessaire d'avoir à minima une statine pour avoir une activité inhibitrice comparable à celle de la pepstatine. Enfin, pour tenter d'augmenter l'activité inhibitrice du composé **17** $\text{Sta}^1, \gamma\text{Ala}^2$, nous avons synthétisé un conjugué où la statine est remplacée par un analogue portant une chaîne latérale de type cyclohexylalanine (ChaSta). Le conjugué résultant (**19**), $\text{ChaSta}^1, \gamma\text{Ala}^2$, n'a pas un pouvoir inhibiteur sur CathD isolée meilleur que celui du JMV4463, indiquant que l'introduction d'une chaîne latérale plus encombrante et hydrophobe ne semble pas interférer significativement avec la reconnaissance de l'inhibiteur par l'enzyme.

²¹⁰ DH Rich, E Sun, J Singh ; *Synthesis of dideoxy-pepstatin. Mechanism of inhibition of porcine pepsin* ; Biochem. Biophys. Res. Commun. ; **1977** ; 74 ; 762-767.

Les tests d'inhibition de la CathD intracellulaire montrent que, conformément à leurs activités sur enzyme isolée, le conjugué $di-\gamma\text{Leu}^{1,2}$ (**15**) présente une activité modérée, tandis que le $di-\gamma\text{Ala}^{1,2}$ (**16**) est totalement inactif. Enfin, les conjugués **17**, **18** et **19** contenant un seul dérivé statine (Sta ou ChaSta) conservent une activité inhibitrice comparable à celle du JMV4463.

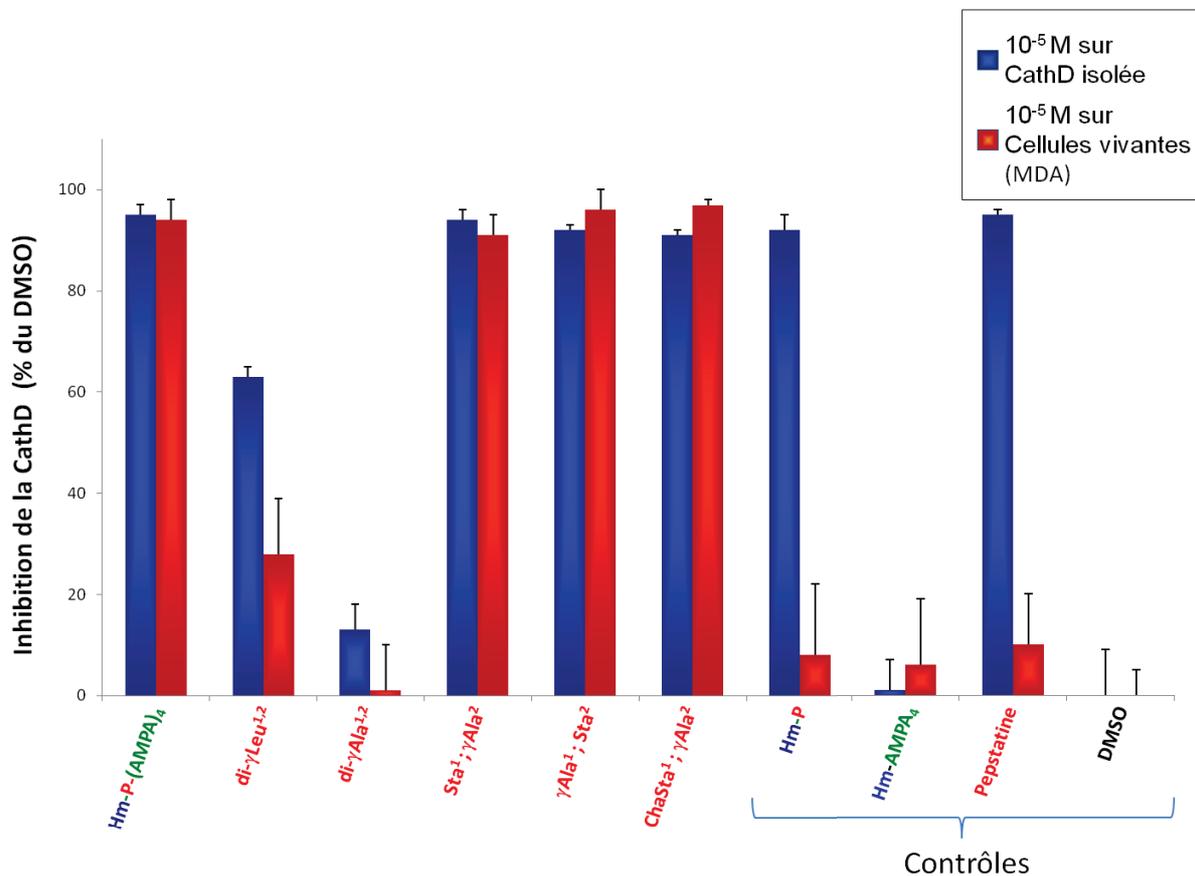


Figure 71 : Inhibition de la CathD isolée et intracellulaire pour les conjugués différant par leur composante pepstatine à 10⁻⁵M

Le test sur enzyme isolée réalisé à 10⁻⁵M semble indiquer que l'une ou l'autre des deux statines est suffisante pour observer une activité inhibitrice comparable à celle de la pepstatine. Nous avons vérifié cela à une concentration plus faible (10⁻⁸M) (Figure 72). A cette concentration, le conjugué $di-\gamma\text{Leu}^{1,2}$ (**15**) a effectivement une activité plus faible qu'à 10 μM , tandis que les conjugués $di-\gamma\text{Ala}^{1,2}$ (**16**) et ChaSta¹- γAla^2 (**19**) conservent la même activité. Cependant, alors que le conjugué Sta¹- γAla^2 (**17**) reste autant actif qu'à 10⁻⁵M, le γAla^1 -Sta² (**18**) est nettement moins actif à 10⁻⁸M (Figure 72). Ceci suggère que la Sta¹ est la principale statine responsable de l'activité inhibitrice de la pepstatine. Ainsi, il est possible de remplacer la Sta² sans modifier l'activité du conjugué, ce qui permet d'envisager une synthèse plus économique.

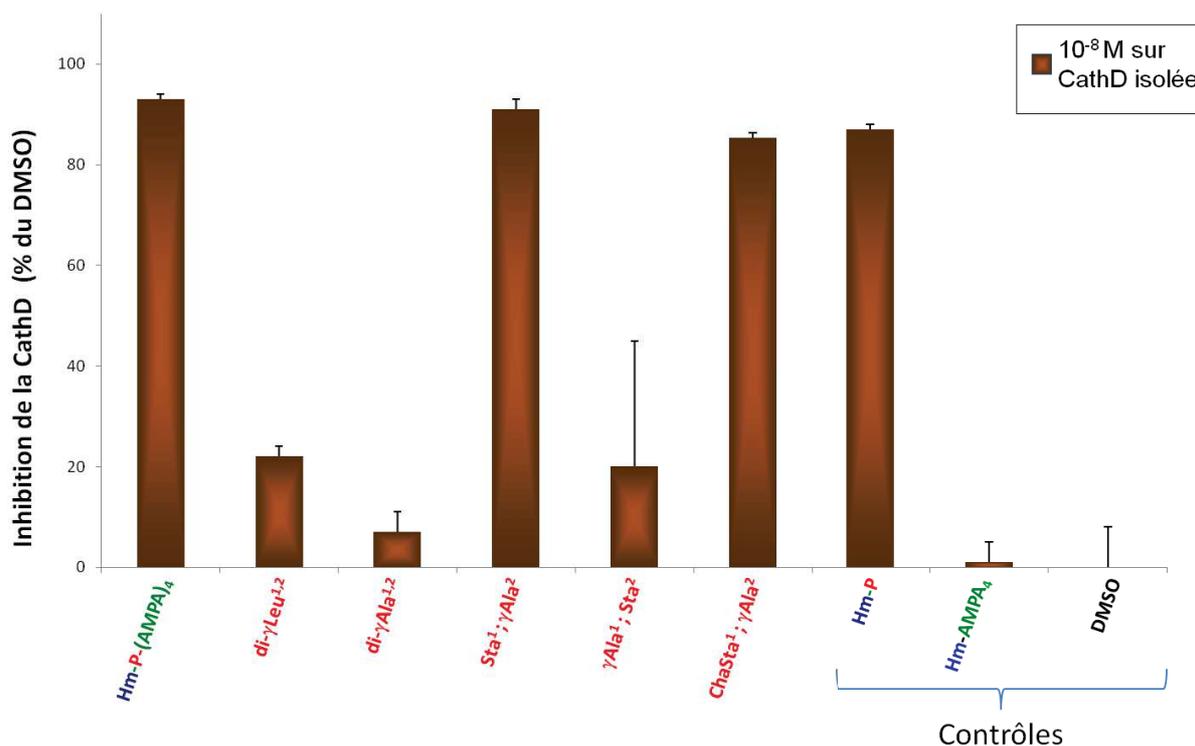


Figure 72 : Inhibition de la CathD isolée et intracellulaire par les conjugués différant par leur composante pepstatine à 10^{-8} M

Les tests de cytotoxicité sur cellules MDA-MB-231 ont donné des résultats totalement en accord avec ceux des tests d'inhibition (Figure 73). En effet, le composé $\text{di-}\gamma\text{Leu}^{1,2}$ (**15**), qui possède une activité inhibitrice modérée de la CathD, présente une cytotoxicité également modérée alors que le conjugué $\text{di-}\gamma\text{Ala}^{1,2}$ (**16**), qui n'était pas actif sur l'enzyme, n'entraîne aucune inhibition de la prolifération cellulaire. Cette baisse, ou disparition, de la cytotoxicité est très probablement causée par l'absence des résidus statine. Nous pouvons donc affirmer que la cytotoxicité du conjugué de référence JMV4463 est effectivement corrélée à l'inhibition de la CathD, et donc à l'adressage de la pepstatine dans le compartiment contenant l'enzyme grâce au vecteur AMPA_4 .

Comme attendu, les composés **17**, **18** et **19**, comportant au moins une statine (ou ChaSta) présentent une activité cytotoxique à 10^{-5} M comparable à celle obtenue avec le conjugué de référence. Ceci confirme qu'il est possible de s'affranchir d'une statine, de préférence la Sta^2 , sans engendrer de baisse d'activité du conjugué. Ceci a été confirmé par un test de cytotoxicité réalisé à différentes concentrations (Figure 74). En effet, sur ce graphe nous pouvons observer une superposition de la courbe d'activité du conjugué de référence avec celle des deux analogues mono-statine (**17** et **18**).

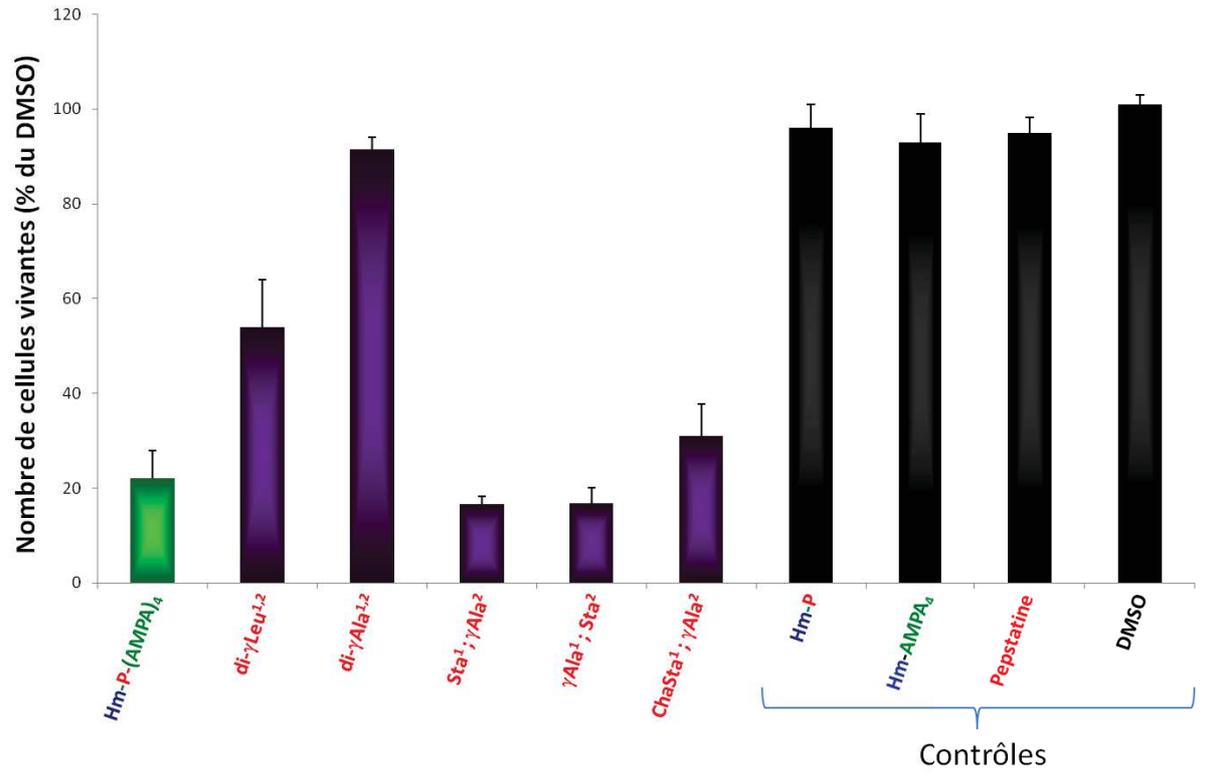


Figure 73 : Cytotoxicité des conjugués différant par la composante pepstatine à 10⁻⁵M sur des cellules MDA-MB-231

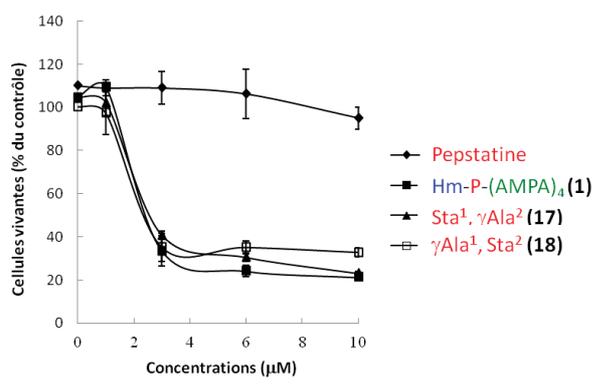


Figure 74 : Test de cytotoxicité des conjugués 1 (JMV4463), 16 et 17 à différentes concentrations sur des cellules MDA-MB-231

i. Modification de l'agencement des trois éléments constitutifs du JMV4463

Le troisième point abordé est l'importance de la position de chaque élément dans le conjugué. Nous avons également exploré la nature de la partie hydrophile, en particulier pour tenter d'améliorer la solubilité du conjugué dans les milieux aqueux. Les résultats des tests d'inhibition sur enzyme isolée montrent une activité inhibitrice conservée quel que soit l'ordre dans lequel les éléments ont été positionnés, et quelle que soit la nature de la partie hydrophile testée (Figure 75). Ceci montre que la pepstatine est toujours accessible à l'enzyme quelle que soit sa place dans le conjugué. En ce qui concerne l'activité inhibitrice de la CathD intracellulaire, tous les composés sont aussi actifs que le JMV4463 à l'exception du conjugué présentant le vecteur au coeur de sa structure, entre la partie hydrophile et la pepstatine (**21**). Il est donc nécessaire que le vecteur soit situé en position C- ou N-terminale du conjugué pour conserver une capacité à internaliser la pepstatine.

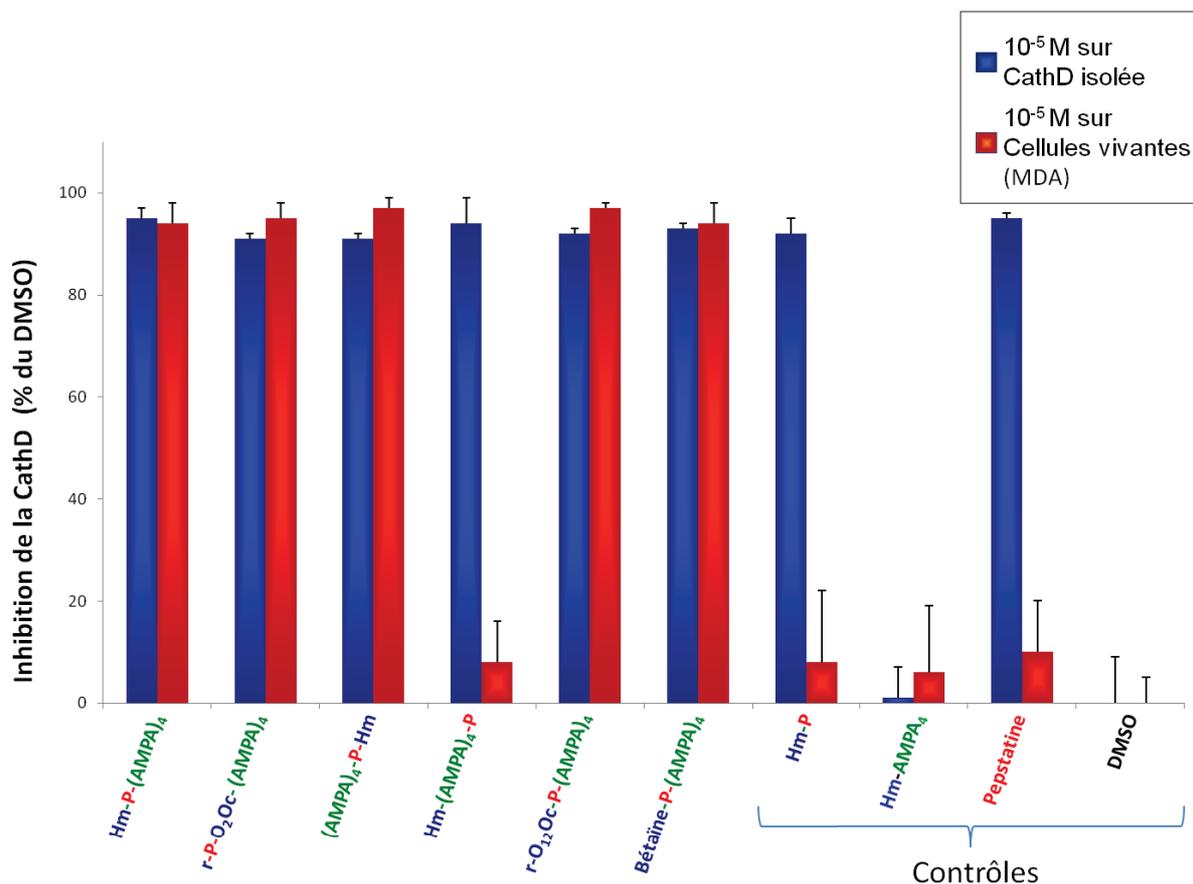


Figure 75 : Inhibition de la CathD isolée et intracellulaire par les conjugués différant par l'ordre des composantes ou leur partie hydrophile à 10⁻⁵M

Comme attendu, le conjugué $\text{Hm}-(\text{AMPA})_4\text{-P}$ (**21**), ne franchissant pas la membrane cellulaire, n'est pas cytotoxique sur cellules MDA-MB-231 à 10^{-5} M (Figure 76). Le conjugué $r\text{-P-O}_2\text{Oc}-(\text{AMPA})_4$, (**22**) comportant la chaîne de type PEG, O_2Oc comme espaceur, présente une cytotoxicité similaire à celle du conjugué de référence. Ce résultat confirme la possibilité d'utiliser un espaceur entre le vecteur et la pepstatine sans interférer avec l'activité biologique. Cependant, et de façon surprenante, le conjugué possédant une organisation inversée $(\text{AMPA})_4\text{-P-Hm}$ (**20**) vs JMV4463 n'est pas toxique. Ce résultat suggère que malgré sa capacité à franchir la membrane cellulaire, le conjugué n'est pas co-localisé avec la CathD. Le vecteur doit donc obligatoirement se situer en position C-ter du conjugué pour pouvoir jouer son rôle.

D'autre part, la modification de la partie hydrophile n'a pas amélioré son adressage à la CathD (composés **23** et **24**). En particulier le composé **23** contenant l' $\text{O}12\text{Oc}$, une chaîne PEG plus longue que l' $\text{O}2\text{Oc}$, présente une cytotoxicité moins importante que le conjugué de référence.

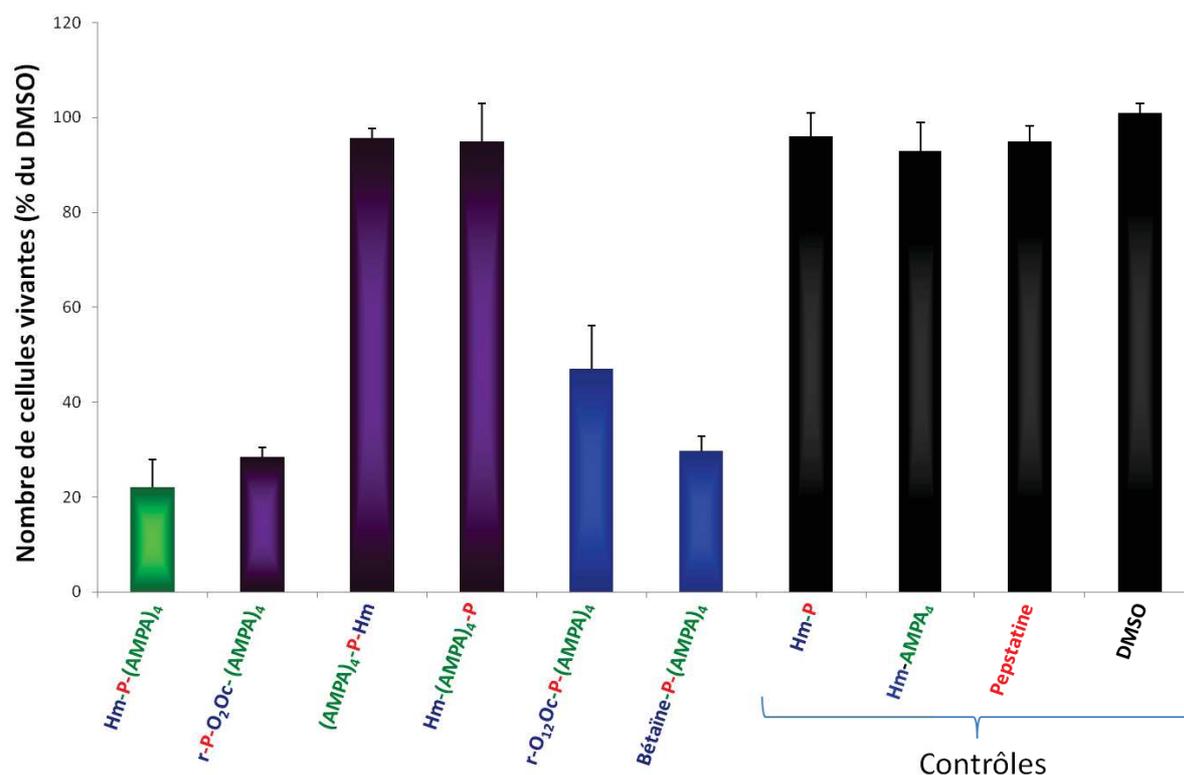
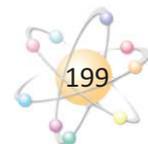


Figure 76 : Cytotoxicité des conjugués différant par l'ordre des composantes ou leur partie hydrophile à 10^{-5} M sur des cellules MDA-MB-231



IV) Etude *in vivo* du JMV4463

Une étude du JMV4463 *in vivo* a été menée sur trois groupes de souris femelles nude (nu/nu-) de 6 semaines. Chaque groupe était constitué de 7 souris auxquelles ont été greffées $2,5 \times 10^6$ cellules MDA-MB-231. Le premier groupe est le groupe témoin, traité avec du DMSO 10% dans du liquide physiologique. Le second groupe a été traité avec le conjugué **1** (JMV 4463) à une dose de 18 mg/kg, et le troisième groupe a été traité à 36 mg/kg. Après apparition des tumeurs, les souris ont été traitées par injection intra-tumorale deux fois par semaine pendant 48 jours. Le volume tumoral a été déterminé en utilisant la formule $V = 4/3 * \pi * (a/2 * b/2 * c/2)$, avec a, b et c étant les diamètres de la tumeur. A la fin de l'étude, les souris sont sacrifiées et leurs organes sont prélevés et pesés.

Deux données sont donc mesurées dans cette étude : l'évolution du volume de la tumeur en fonction du temps et de la dose de conjugué injecté, mais également l'impact de ce traitement sur le poids de la souris et de ses organes.

a. Evolution du volume tumoral

Le volume tumoral des souris contrôle a augmenté de manière régulière (Figure 77) pour atteindre un volume de 2250 mm^3 au bout de 7 semaines d'expérimentation. Les souris traitées à 18 mg/kg avec le JMV4463 voient leur volume tumoral augmenter jusqu'à la 5^{ème} semaine, après quoi celui-ci diminue pour atteindre en 7^{ème} semaine un volume de 1500 mm^3 . Le volume observé pour le groupe contrôle est donc 1,5 fois plus élevé en fin de traitement.

Pour les souris traitées à 36 mg/kg de JMV4463, le volume tumoral augmente jusqu'à la 5^{ème} semaine, cependant il reste inférieur à celui observé pour les deux autres groupes de souris. Après la 5^{ème} semaine, le volume de la tumeur diminue jusqu'à disparition totale en 7^{ème} semaine. Durant l'expérience, le volume de la tumeur de ce groupe n'a pas dépassé 1300 mm^3 .

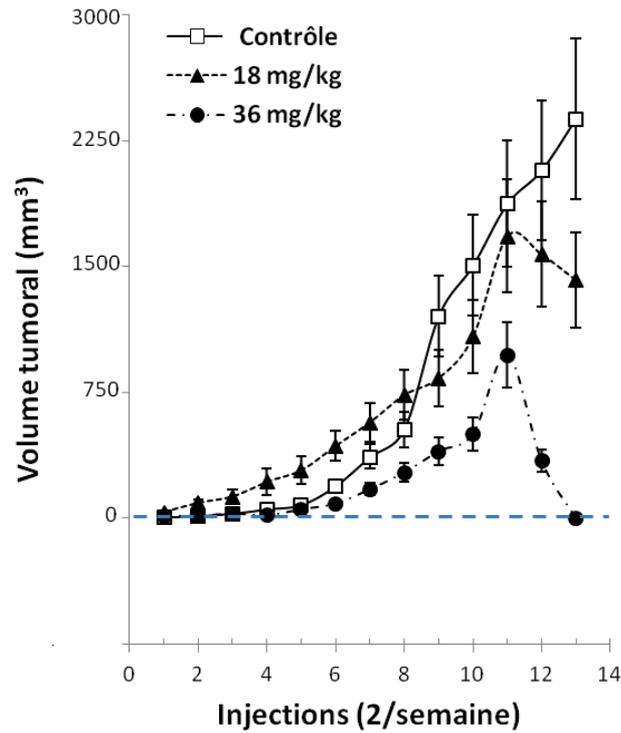


Figure 77 : Evolution du volume tumoral en fonction du temps et du traitement

b. Impact des traitements sur les souris

L'objectif était ici d'évaluer le retentissement d'un traitement répété par le JMV4463 sur les principaux organes. Après les 7 semaines de traitement, les souris sont sacrifiées, les organes prélevés et pesés. Leur poids moyen est comparé à ceux du groupe contrôle et sont résumés dans le tableau 21.

Tableau 21 : poids moyen des organes des trois groupes de souris

Groupe (traitement)	Poids des organes (g)				
	Cœur	Foie	Poumon	Rein	Rate
1 (contrôle)	0.12 +/- 0.02	1.22 +/- 0.13	0.19 +/- 0.04	0.39 +/- 0.03	0.16 +/- 0.05
2 (18 mg/kg)	0.12 +/- 0.02	1.35 +/- 0.20	0.17 +/- 0.03	0.39 +/- 0.03	0.22 +/- 0.07
3 (36 mg/kg)	0.14 +/- 0.03	1.41 +/- 0.29	0.19 +/- 0.02	0.41 +/- 0.08	0.22 +/- 0.13

Lors d'une chimiothérapie, des pertes de poids importantes peuvent être observées et associées à une mauvaise tolérance. Dans notre étude, le traitement par le conjugué JMV4463 semble ne pas avoir de retentissement significatif sur le poids des souris, et l'augmentation des doses semble bien supportée.

Cependant, lors du sacrifice des souris des groupes 2 et 3, la présence d'une masse grasseuse a été observée à la place de la tumeur. Les souris du groupe 1 ne présentant pas de masse grasseuse, il peut être déduit qu'elle est engendrée par le traitement avec le composé JMV4463 (Figure 78).

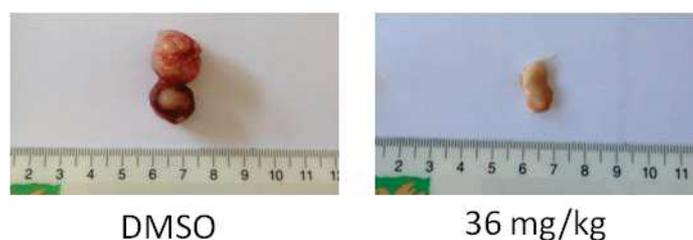


Figure 78 : Aspect de la masse tumorale et du corps grasseux obtenus respectivement après traitements par du DMSO ou 36 mg/kg de JMV4463

La tumeur prélevée dans une souris du groupe 1 est très vascularisée, avec une structure dense et un volume assez important. Ces différentes caractéristiques sont typiques des tissus tumoraux. Le prélèvement effectué dans une souris du groupe 3 en revanche, ne montre aucune vascularisation, possède une structure et un aspect souple et malléable et un volume plus petit. Les premières coupes histologiques effectuées sur ce tissu sont révélées avec un colorant (oil red o), spécifique des corps lipidiques. Ce tissu est coloré en rouge après incubation avec l'oil red o alors que la tumeur ne l'est pas. D'autres études histologiques sont actuellement en cours afin de déterminer la composition exacte de ce tissu.

Conclusions et perspectives

Suite aux résultats encourageants obtenus avec le JMV4463, ce projet avait pour but de développer de nouveaux vecteurs basés sur l'oligomérisation de mimes contraints de dipeptides analogues au DBT et à l'AMPA, mais également d'effectuer une étude des relations structure / activité du JMV4463.

La première partie de ce travail a donc porté sur le développement de nouveaux vecteurs pseudopeptidiques. Certains ont pu être synthétisés et testés pour leur capacité à franchir la membrane cellulaire et à adresser la pepstatine à la CathD intra-cellulaire. C'est le cas des oligomères LBD_4 , m -AMPA $_4$, p -AMPA $_4$, AMBA $_4$, AMCA $_4$, Br-AMPA $_4$ et diMeO-AMPA $_4$. Les analogues de l'AMPA en série pyrrole (AMPyrA), indole (AMIA) et diOH-AMPA ont été synthétisés mais à ce jour en quantité insuffisante pour envisager la synthèse des tétramères et conjugués respectifs. Leur synthèse à plus grande échelle doit être initiée prochainement (Figure 79).

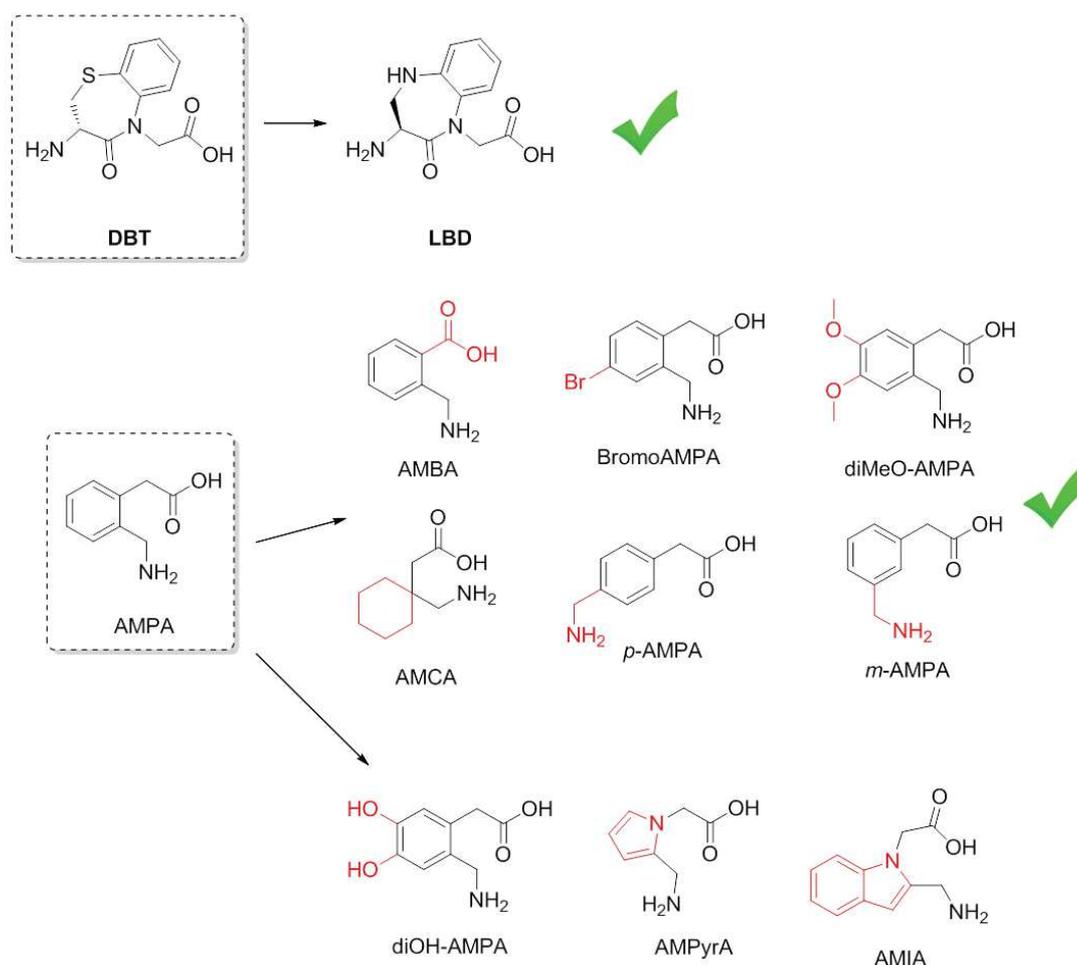


Figure 79 : Bilan des synthèses organiques

D'un point de vue chimique, l'étude du pyrrole a été longue et non triviale, notamment en raison de la polymérisation du dérivé 2-aminométhylpyrrole ainsi que son instabilité dans le TFA concentré. Cependant, au vu des derniers résultats obtenus, la synthèse du tétramère de l'AMPyrA devrait pouvoir être réalisée sur une résine clivable en milieu basique (par exemple une résine HMBA clivable avec NH_3). De plus, l'utilisation d'une résine devrait permettre de limiter les réactions de polymérisation grâce notamment à l'effet de pseudo-dilution. Enfin, en préactivant l'acide à coupler avant de le mettre en présence de l'aminométhylpyrrole porté par la résine, la réaction de couplage peptidique devrait être favorisée par rapport à la polymérisation. Ceci pourrait donc permettre de synthétiser le tétramère souhaité. D'autre part, d'autres dérivés de l'AMPyrA pourront être synthétisés grâce à la réaction de Clauson-Kaas compatible avec n'importe quel acide aminé pour former le noyau pyrrolique (Schéma 70).

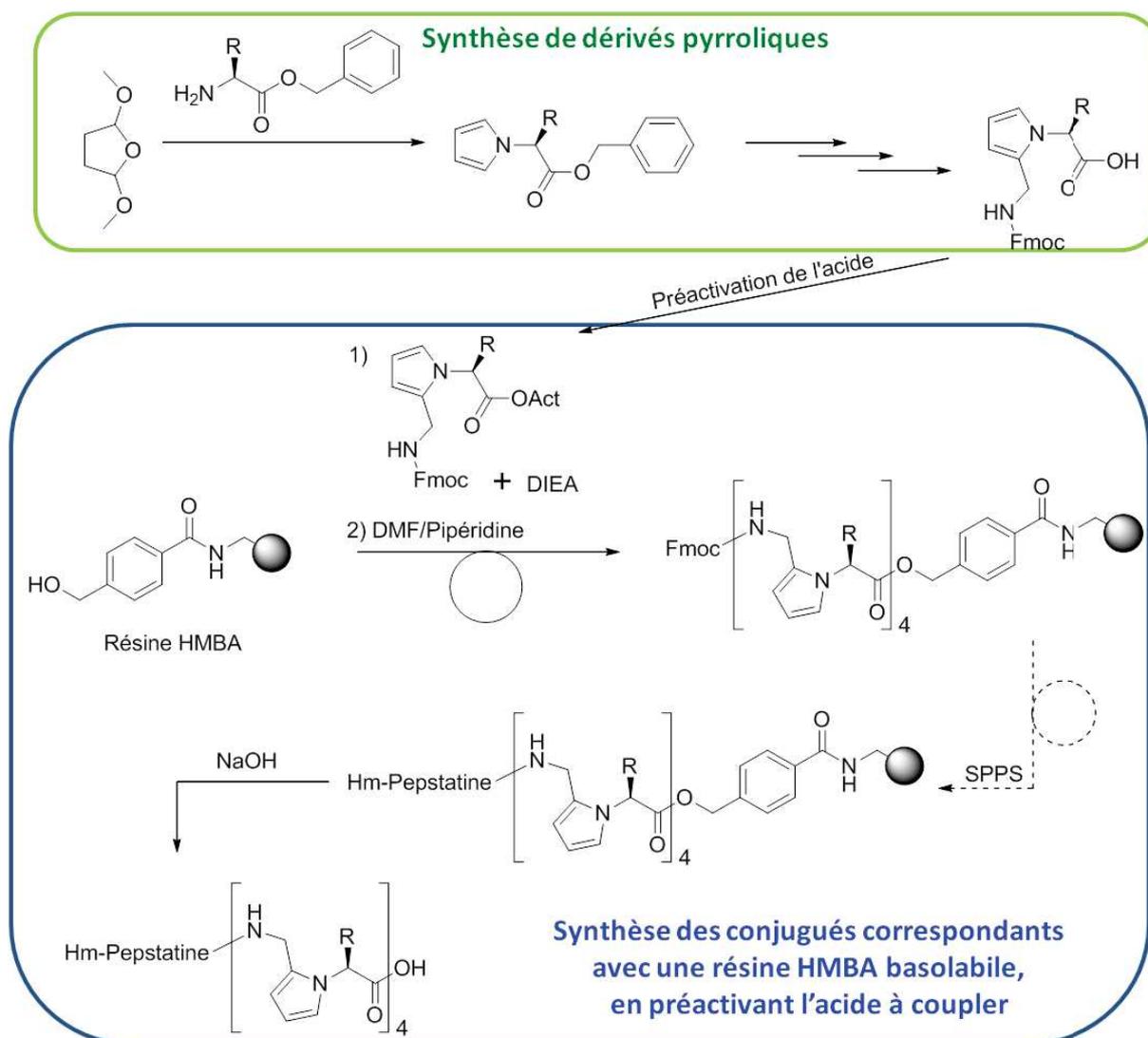


Schéma 70 : Perspectives de synthèse pour les dérivés pyrroliques

Le dérivé de l'AMPA bromé pourra lui aussi être modifié en envisageant par exemple l'introduction de divers substituants (hétéro)aromatiques par le biais d'un couplage palladocatalysé de Suzuki-Myaura (Schéma 71).

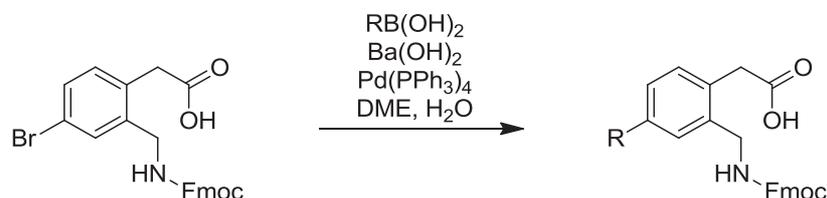


Schéma 71 : Réaction de Suzuki-Myaura sur le Br-AMPA

Dans une seconde partie de ce travail de thèse, l'étude des relations structure-activité du JMV4463 a été réalisée, en étudiant plusieurs paramètres : i/ la nature du vecteur, ii/ la mutation des résidus statine, iii/ la nature de la chaîne hydrophile, et iv/ la position de chaque élément constitutif au sein du conjugué.

Cette étude a mis en évidence le rôle majeur de l'activité catalytique de la CathD intracellulaire dans la prolifération des cellules du cancer du sein et l'importance cruciale du vecteur AMPA₄. Il a été montré également qu'il était possible de supprimer l'un des deux résidus statine du fragment pepstatine, ce qui permettrait une synthèse chimique plus économique (Schéma 72).

L'internalisation des différents conjugués synthétisés dans les cellules a été observée pour tous les vecteurs sélectionnés, mais leur activité antiproliférative semble strictement dépendante de la structure du vecteur et de sa position. Nous avons ainsi démontré que le tétramère AMPA₄ possède un mode d'action unique, dont le mécanisme n'a pas encore été élucidé et qui permettrait au conjugué d'empêcher la protéolyse de substrats critiques impliqués dans la prolifération cellulaire via l'inhibition de la cathepsine D. Pour une meilleure compréhension de ce mécanisme d'action singulier du JMV4463, il semble important à ce stade d'envisager d'une part des études biophysiques de ses interactions avec la membrane cellulaire et par ailleurs une étude approfondie de la voie endocytaire empruntée par le conjugué. De plus, les autres vecteurs testés se sont tous montrés capables de franchir la membrane cellulaire. Ils pourraient donc tout à fait être utilisés à d'autres fins que pour cibler la CathD.

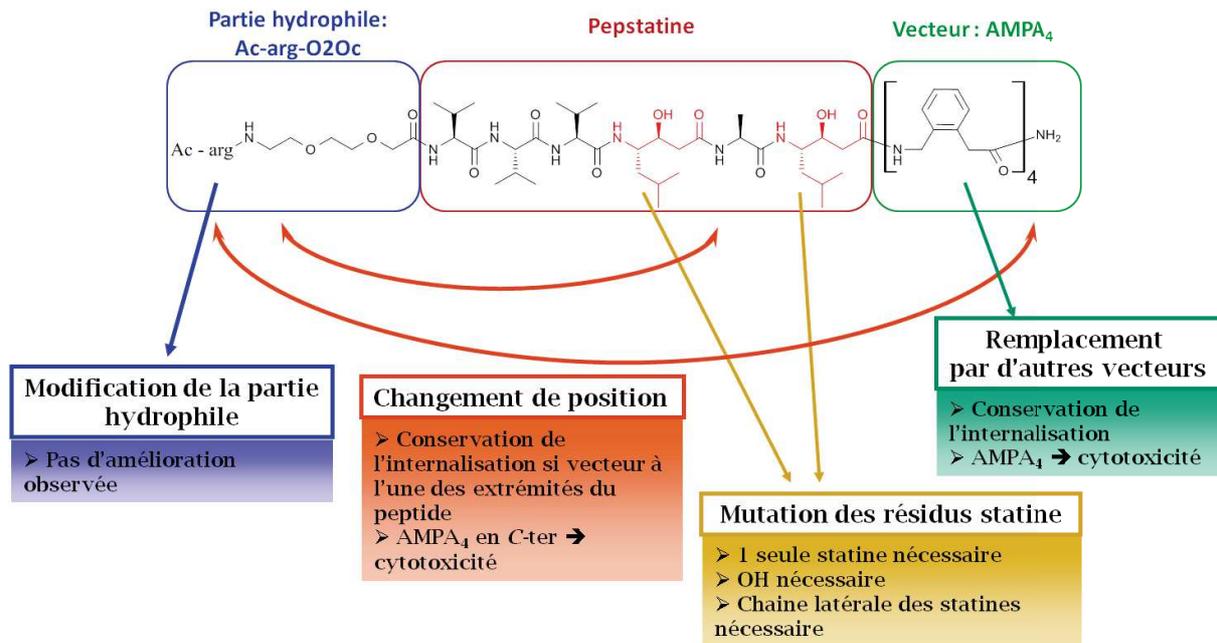


Schéma 72 : Résumé des résultats obtenus lors de l'étude des relations structure / activité du conjugué JM4463

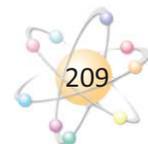
Il faut noter que des formes actives mais pas complètement matures de la CathD (48kDa) sont présentes dans les endosomes et contribuent probablement à la prolifération cellulaire. Il est possible que grâce au vecteur AMPA₄, le JM4463 puisse reconnaître plus efficacement ces formes immatures de CathD et / ou se localiser plus efficacement dans le compartiment contenant la ou les formes de CathD impliquées.

L'étude *in vivo* confirme les effets antiprolifératifs du JM4463. Si le traitement à 18 mg/kg inhibe la croissance tumorale, le traitement à 36 mg/kg empêche la croissance des tumeurs et entraîne leur disparition après 48 jours de traitement sans retentissement sur le poids de la souris.

Les résultats obtenus avec le conjugué **1** (JM4463) sont très encourageants et méritent d'être approfondis. Pour cela, de nouvelles études *in vivo* sont envisagées. Ces travaux seront réalisés avec des lignées cellulaires du cancer du colon HCT-116 et deux modes d'administration vont être comparés (intra péritonéal et intra tumoral). Ceci permettra de compléter et de valider l'effet antiprolifératif du JM4463 *in vivo*.



PARTIE EXPERIMENTALE



I) Généralités

Les produits commerciaux utilisés ont été achetés chez Iris Biotech, Merck, Sigma Aldrich, FluoroChem, NeoMPS, Riedel-de Haën, Carlo Erba, VWR Prolabo ou Acros Organics et ont été utilisés sans purification supplémentaire. La résine Fmoc Rink amide AM-PS (100-200 mesh, 0,45 mmol/g) vient de Iris Biotech. Les solvants utilisés pour les analyses HPLC et LC-MS sont de pureté analytique.

Les composés organiques ont été purifiés par chromatographie flash sur gel de silice. Les conjugués issus des synthèses sur support solide ont été purifiés par HPLC préparative en phase inverse, manuellement ou de façon automatisée.

a. RMN

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés à 400 et 100 MHz, respectivement, à l'aide d'un spectromètre Brüker Advance 400. Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en parties par million (ppm) relativement au signal des résidus de protons non deutérés ou du/des carbone(s) (isotope ^{13}C) des solvants. La multiplicité des signaux est indiquée par une ou plusieurs lettres minuscules : s (singulet), d (doublet), dd (doublet dédoublé), t (triplet), q (quadruplet) et m (multiplet). Les constantes de couplage sont rapportées en hertz (Hz). Des analyses 2D de type COSY, HMBS et HSQC ont régulièrement été réalisées pour confirmer les structures mais ne seront pas présentées dans ce manuscrit.

b. HPLC analytique

Les échantillons ont été préparés dans un mélange eau/acétonitrile (1/1). Les échantillons non solubles dans ce mélange ont été dissous dans du DMSO ou du MeOH. L'HPLC utilisée est un modèle Waters de type Alliance. Toutes les analyses ont été faites en utilisant une colonne Chromolith RP C18 VWR, 50 mm x 4.6 mm. Un gradient allant de 0% de solvant A dans B à 100% de solvant A (Solvant A : ACN/0,1% TFA et solvant B : $\text{H}_2\text{O}/0,1\%\text{TFA}$) en 3 minutes à $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a été utilisé. La détection a été faite à 214 et 254 nm.



c. HPLC préparative

Les produits testés en biologie ont été purifiés par HPLC préparative sur un appareil Merck muni d'une colonne Delta Pack C18 (100 x 40mm, 15 μm , 100 Å) à une longueur d'onde de 214 nm, à un débit de 28 mL/min selon un gradient d'éluion variable de X% A (eau/0,1% TFA) à X+30% B (acétonitrile /0,1% TFA) en 30 min.

d. LC-MS

Les échantillons ont été préparés dans un mélange eau/acétonitrile (1/1). Les échantillons non solubles dans ce mélange ont été dissous dans du DMSO ou du MeOH. Le système LC-MS utilisé est constitué d'une HPLC Waters Alliance 2690, couplée à un spectromètre ZQ Waters-Micromass (ESI+). Toutes les analyses ont été faites en utilisant une colonne monolithique Onyx Phenomenex RP C18, 25 mm x 4.6 mm. Un gradient de 0% à 100 % de B dans A en 3 minutes à 3mL.min⁻¹ a été utilisé, avec B : ACN/0,1% acide formique et A : H₂O/0,1% acide formique. Les spectres de masse ont été obtenus à un débit de 100-500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Les données ont été obtenues dans un mode de balayage à intervalles de 0,1s. 10 scans ont été cumulés pour obtenir le spectre final.

e. LC-MS préparative

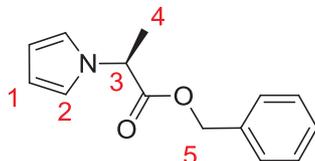
Les produits testés en biologie ont été purifiés alternativement par LC-MS préparative sur un appareil d'autopurification HPLC/MS Waters couplé à un détecteur UV-visible ainsi qu'un détecteur SQ (quadripôle simple) muni d'une colonne Atlantis HILIC Silica à un débit de 20 mL/min selon un gradient d'éluion variable de X% A (eau/0,1% TFA) à X+10% B ou X+15% B (acétonitrile/0,1% TFA) et à un débit de 20 mL/min en 10 min. Le spectrogramme est obtenu selon un « scan » de masse m/z allant de 100 à 1000.

f. Chromatographie flash automatique

Les chromatographies « flash » sont réalisées sur colonne de gel de silice Merck G 0,04-0,063 mm comme phase stationnaire. Elles sont réalisées à l'aide d'un appareil Biotage (Isolera One). La colonne est conditionnée dans le solvant le moins polaire et le produit brut est déposé en solution dans un mélange cyclohexane/AcOEt ou cyclohexane/DCM ou en dépôt solide. La purification s'effectue sous pression à l'aide d'une phase mobile plus ou moins polaire, composée d'un mélange de solvants qui peuvent être le cyclohexane, l'AcOEt, le DCM ou le méthanol et selon un gradient d'éluion allant du moins au plus polaire.

II) Synthèse du dérivé de l'AMPA en série pyrrole

a. Synthèse du 2-(1H-pyrrol-1-yl)propanoate de benzyle 6



Protocole :

Le diméthoxytétrahydrofurane **7** (1,8 mL ; 13,9 mmol ; 1 éq) est dissous dans de l'eau (17 mL) et le mélange est porté à reflux pendant 2 heures. La solution est ensuite refroidie à TA, puis le DCM (25 mL), la H-Ala-OBn (3 g ; 13,9 mmol ; 1 éq) et AcONa (2,7 g ; 32,7 mmol ; 2,35 éq) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est mis à l'abri de la lumière au moyen d'un papier aluminium. Le mélange ainsi obtenu est agité pendant 20h à TA. Une fois la réaction terminée, du Na₂CO₃ solide est ajouté en excès dans le milieu. La phase organique est séparée dans une ampoule à décanter et la phase aqueuse est extraite trois fois avec du DCM. Les 4 phases organiques sont rassemblées, lavées 2 fois avec une solution saturée de NaCl, séchées sur sulfate de sodium, filtrées et évaporées. Le produit obtenu est purifié par chromatographie flash automatique (0% à 20% d'AcOEt dans le cyclohexane).

Rendement : 77%

Formule brute : C₁₄H₁₅NO₂



Masse molaire : 229,27 g.mol⁻¹

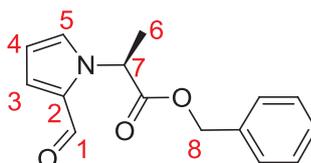
RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 1.76 (d, 3H, *J* = 7.3 Hz, H₄) ; 4.82 (q, 1H, *J* = 7.3 Hz, H₃) ; 5.18 (s, 2H, H₅) ; 6.23 (t, 2H, *J* = 2 Hz, H₁) ; 6.79 (t, 2H, *J* = 2 Hz, H₂) ; 7.30 (m, 2H, H_{aro}) ; 7.36 (m, 3H, H_{aro}).

RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 18.2 (C₄) ; 57.0 (C₅) ; 67.1 (C₃) ; 108.7 (C₁) ; 119.7 (C₂) ; 128.0 (CH_{aro}) ; 128.4 (CH_{aro}) ; 128.6 (CH_{aro}) ; 135.4 (C_{quat, aro}) ; 171.1 (CO)

HPLC, temps de rétention : 1,77 min

MS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ = 230,2

b. Synthèse du 2-(2-formyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanoate de benzyle 5



Protocole :

Le dérivé pyrrolique **6** (200 mg ; 0,87 mmol ; 1 éq), POCl₃ (87 μL ; 0,96 mmol ; 1,1 éq), le DMF anhydre (260 μL ; 2,61 mmol ; 3 éq) et le DCM anhydre (180 μL) sont introduits dans un ballon sous N₂. Le mélange est agité à environ -5°C pendant 6h. NaOAc (470 mg ; 3,48 mmol ; 4 éq) et de l'eau sont alors ajoutés au milieu et celui-ci est agité pendant 2h à TA. La phase aqueuse est ensuite extraite 3 fois par du DCM. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées pour donner un mélange de produits formylés en α et β de l'azote sur le pyrrole. Le composé formylé en α est purifié par chromatographie flash automatique sur gel de silice (10% à 30 % d'AcOEt dans le cyclohexane) pour donner le composé **5** sous forme d'huile jaunâtre.

Rendement : 72%

Formule brute : C₁₅H₁₅NO₃

Masse molaire : 257,28 g.mol⁻¹



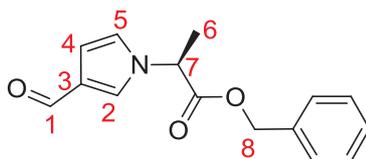
RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.76 (d, 3H, *J* = 7.3 Hz, **H₆**) ; 5.18 (d, 2H, *J* = 3.5 Hz, **H₈**) ; 5.95 (q, 1H, *J* = 7.5 Hz, **H₇**) ; 6.32 (dd, 1H, *J*₁ = 2.7 Hz, *J*₂ = 4 Hz, **H₄**) ; 6.99 (dd, 1H, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 4 Hz, **H₃**) ; 7.18 (m, 1H, **H₅**) ; 7.34 (m, 5H, **H_{aro}**) ; 9.53 (d, 1H, *J* = 1 Hz, **H₁**).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 17,8 (**C₆**) ; 55.5 (**C₇**) ; 67.2 (**C₈**) ; 110.3 (**C₄**) ; 125.5 (**C₃**) ; 128.0 (**C_{aro}**) ; 128.3 (**C_{aro}**) ; 128.6 (**C_{aro}**) ; 128.9 (**C_{aro}**) ; 131.7 (**C_{aro}**) ; 135.5 (**C_{aro}**) ; 171.0 (**CO**) ; 179.7 (**CHO**)

HPLC, temps de rétention : 1,64 min

MS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ = 258,1

c. Synthèse du 2-(3-formyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanoate de benzyle 10



Protocole :

Ce composé est un produit secondaire obtenu lors de la synthèse du composé **5** sous la forme d'une huile jaunâtre.

Formule brute : C₁₅H₁₅NO₃

Masse molaire : 257,28 g.mol⁻¹

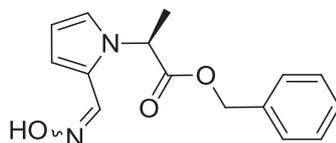
RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.76 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz, **H₆**) ; 4.84 (q, 1H, *J* = 7 Hz, **H₇**) ; 5.18 (s, 2H, **H₈**) ; 6.65 (dd, 1H, *J*₁ = 1.5 Hz, *J*₂ = 3 Hz, **H₂**) ; 6.76 (m, 1H, **H₄**) ; 7.27 (m, 2H, **H_{aro}**) ; 7.35 (m, 2H, **H_{aro}**) ; 7.40 (t, 1H, *J* = 2 Hz, **H₅**) ; 9.74 (s, 1H, **H₁**).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 18,16 (**C₆**) ; 57.6 (**C₇**) ; 67.6 (**C₈**) ; 108.3 (**C₄**) ; 122.7 (**C₂**) ; 126.9 (**C_{aro}**) ; 128.2 (**C_{aro}**) ; 128.2 (**C_{aro}**) ; 128.6 (**C_{aro}**) ; 128.7 (**C_{aro}**) ; 134.9 (**C_{aro}**) ; 170.0 (**CO**) ; 185.4 (**CHO**)

HPLC, temps de rétention : 1,51 min

MS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ = 258,1

d. Synthèse du 2-(2-((hydroxyimino)méthyl)-1H-pyrrol-1-yl)propanoate de benzyle 12



Protocole :

Le pyrrole carbaldéhyde **5** (500 mg ; 1,94 mmol, 1 éq) est dissous dans du MeOH (15 mL). NaOAc (195 mg ; 2,37 mmol, 1,22 éq) et NH₂OH.HCl (163 mg ; 2,33 mmol, 1,2 éq) sont ajoutés dans le ballon. Le mélange est agité à TA pendant 3h. Le méthanol est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu obtenu est dissous dans de l'eau. Cette phase aqueuse est extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées, évaporées. Le produit solide est obtenu sous forme de mélange des diastéréoisomères *E* et *Z*.

Rendement : 95 %

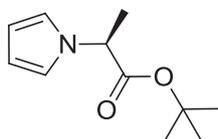
Formule brute : C₁₅H₁₆N₂O₃

Masse molaire : 272,30 g.mol⁻¹

HPLC, temps de rétention : 1,50 min et 1,59 min (*E* et *Z*)

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 273,2 (*E* et *Z*)

e. Synthèse du 2-(1H-pyrrol-1-yl)propanoate de tert-butyle 16



Protocole :

Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour la synthèse du composé **6**, en utilisant 4,64 mmol (0,6 mL) de diméthoxytétrahydrofurane **7** pour former le composé **16** sous forme d'huile brune. Le produit a été directement utilisé dans l'étape suivante.



Rendement : 77%

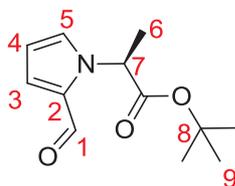
Formule brute : C₁₁H₁₇NO₂

Masse molaire : 195,26 g.mol⁻¹

HPLC, temps de rétention : 1,71 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 196,1

f. Synthèse du 2-(2-formyl-1H-pyrrol-1-yl)propanoate de tert-butyle **17**



Protocole :

Le protocole est le même que celui utilisé pour la synthèse du composé **5**, en utilisant 3,59 mmol (700 mg) de pyrrole **16** pour former le composé **17** sous forme d'huile jaunâtre.

Rendement : 41%

Formule brute : C₁₂H₁₇NO₃

Masse molaire : 223,27 g.mol⁻¹

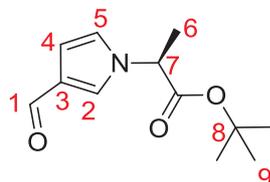
RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.45 (s, 9H, H₉) ; 1.72 (d, 3H, J = 7.4 Hz, H₆) ; 5.78 (q, 1H, J = 7.4 Hz, H₇) ; 6.31 (dd, 1H, J₁ = 2.7 Hz, J₂ = 4 Hz, H₄) ; 6.98 (dd, 1H, J₁ = 1.7 Hz, J₂ = 4 Hz, H₃) ; 7.18 (m, 1H, H₅) ; 9.53 (s, 1H, H₁).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 17,7 (C₆) ; 27.9 (C₉) ; 56.0 (C₇) ; 82.2 (C₈) ; 110.0 (C₄) ; 125.3 (C₃) ; 128.6 (C₅) ; 131.7 (C₂) ; 170.3 (COOtBu) ; 179.6 (C₁)

HPLC, temps de rétention : 1,53 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 224,1

g. Synthèse du 2-(3-formyl-1*H*-pyrrol-1-yl)propanoate de tert-butyle 17-β



Protocole :

Ce composé est un produit secondaire obtenu lors de la synthèse du composé **17** sous la forme d'une huile jaune foncé.

Formule brute : C₁₂H₁₇NO₃

Masse molaire : 223,27 g.mol⁻¹

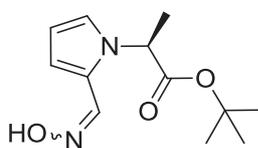
RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.45 (s, 9H, H₉) ; 1.75 (d, 3H, *J* = 7.4 Hz, H₆) ; 4.72 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz, H₇) ; 6.69 (dd, 1H, *J*₁ = 1.9 Hz, *J*₂ = 3 Hz, H₂) ; 6.79 (t, 1H, *J* = 2.7 Hz, H₄) ; 7.44 (t, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₅) ; 9.80 (s, 1H, H₁).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 18.2 (C₆) ; 27.9 (C₉) ; 58.4 (C₇) ; 83.0 (C₈) ; 108.2 (C₂) ; 122.6 (C₄) ; 126.8 (C₃) ; 128.1 (C₅) ; 169.4 (COOtBu) ; 185.5 (C₁)

HPLC, temps de rétention : 1,40 min

MS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ = 224,1

h. Synthèse du 2-(2-((hydroxyimino)méthyl)-1*H*-pyrrol-1-yl)propanoate de tert-butyle 18



**Protocole :**

Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour la synthèse du composé **12**, en utilisant 1,78 mmol (330 mg) de pyrrole **17**. Le composé **18** est obtenu sous la forme d'un solide beige.

Rendement : 96 %

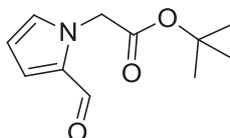
Formule brute : C₁₂H₁₈N₂O₃

Masse molaire : 238,28 g.mol⁻¹

HPLC, temps de rétention : 1,42 min et 1,52 min (E et Z)

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 239,2 (E et Z)

i. Synthèse du 2-(2-formyl-1H-pyrrol-1-yl)acétate de tert-butyle
22

**Protocole :**

Le pyrrole-2-carboxaldéhyde **21** (1 g ; 10,5 mmol ; 1 éq) est dissous dans 10 mL de DMF et le mélange est placé à 0°C. NaH (417 mg ; 17,4 mmol ; 1,65 éq) est alors ajouté doucement. Lorsque le dégagement gazeux cesse, le bromoacétate de tert-butyle (1,98 mL ; 13,5 mmol, 1,3 éq) est ajouté en solution dans 5 mL de DMF. Le mélange est agité à TA pendant la nuit. Le DMF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans un mélange eau / AcOEt pour extraction. La phase aqueuse est extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, lavées quatre fois par une solution saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées. Le composé **22** est obtenu sous forme d'huile jaune orangé et n'a pas nécessité de purification.

Rendement : 95%

Formule brute : C₁₁H₁₅NO₃

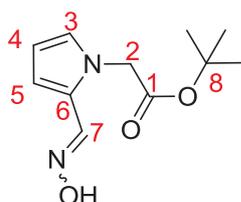
Masse molaire : 209,24 g.mol⁻¹



HPLC, temps de rétention : 1,34 min

MS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ = 210,1

j. Synthèse du 2-(2-((hydroxyimino)méthyl)-1H-pyrrol-1-yl)acétate de tert-butyle **23**



Protocole :

Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour la synthèse du composé **12**, en utilisant 2,39 mmol (500 mg) de pyrrole **22**. Le composé **23** est obtenu sous la forme d'un solide marron clair.

Rendement : 99 %

Formule brute : $C_{11}H_{16}N_2O_3$

Masse molaire : 224,26 $g \cdot mol^{-1}$

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 1.43, (s, 9H, **CH₃**) ; 4.93 (s, 2H, **H₂**) ; 6.13 (t, 1H, $J = 3.2$ Hz, **H₄**) ; 6.87 (dd, 1H, $J_1 = 1.7$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, **H₃**) ; 7.08 (dd, 1H, $J_1 = 1.7$ Hz, $J_2 = 3.7$ Hz, **H₅**) ; 7.27 (s, 1H, **H₇**) ; 11.19 (s, 1H, **OH**) .

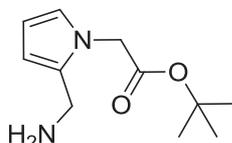
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 28.1 (**CH₃**) ; 49.2 (**C₂**) ; 82.0 (**C₈**) ; 108.6 (**C₄**) ; 117.3 (**C₅**) ; 124.2 (**C₆**) ; 125.6 (**C₃**) ; 135.3 (**C₇**) ; 168.4 (**C₁**).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour $[C_{11}H_{16}N_2O_3]^+$: $[M+H]^+$ 225,1239 ; trouvée : $[M+H]^+$ 225,1239

HPLC, temps de rétention : 1,28 min et 1,37 min (E et Z)

MS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ = 225,2 (E et Z)

a. Synthèse du 2-(2-(aminométhyl)-1*H*-pyrrol-1-yl)acétate de tert-butyle 24



Protocole :

L'oxime **23** (535 mg ; 2,4 mmol, 1 éq) et le Pd/C (55 mg) sont introduits dans 15-20 mL de MeOH. Le mélange est placé sous agitation et du H₂ est mis à buller dans la suspension. Après 2h de réaction à TA, le mélange est filtré sur célite et la solution obtenue est évaporée, pour obtenir le produit souhaité sous forme d'huile foncée, directement utilisé dans l'étape suivante.

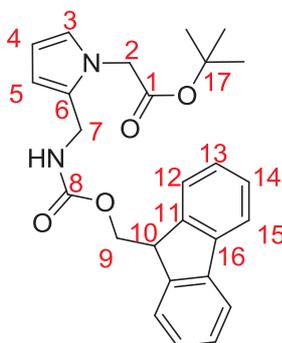
Formule brute : C₁₁H₁₈N₂O₂

Masse molaire : 210,27 g.mol⁻¹

HPLC, temps de rétention : 0,78 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 211.2

b. Synthèse du 2-(2-((((9*H*-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl)amino)méthyl)-1*H*-pyrrol-1-yl)acétate de tert-butyl 25



**Protocole :**

L'aminométhylpyrrole **24** (2,4 mmol ; 1 éq) et Na₂CO₃ (763 mg ; 7,2 mmol ; 3 éq) sont dissous dans un mélange eau/dioxane (20 mL / 20 mL) et placés à 0°C. Fmoc-OSu (891 mg ; 2,64 mmol ; 1,1 éq) est ajouté au mélange dans 20 mL de dioxane. Le mélange est alors placé sous agitation à TA pendant la nuit. Le dioxane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est lavée deux fois par AcOEt et est ensuite acidifiée à pH 3 par une solution de KHSO₄ 1M. Elle est alors extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrée et le solvant est évaporé. Le produit obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (0% à 30 % d'AcOEt dans le cyclohexane) pour obtenir le produit souhaité **26** sous forme de solide beige.

Rendement : 39 % (pour deux étapes)

Formule brute : C₂₆H₂₈N₂O₄

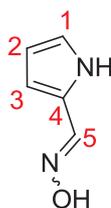
Masse molaire : 432,51 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.51, (s, 9H, CH₃) ; 4.25 (t, 1H, J = 7 Hz, H₁₀) ; 4.39 (d, 2H, J = 4.9 Hz, H₇) ; 4.44 (d, 2H, J = 7 Hz, H₉) ; 4.61 (s, 2H, H₂) ; 5.19 (s, 1H, NH) ; 6.20 (d, 2H, J = 2.4 Hz, H₄ et H₅) ; 6.68 (t, 1H, J = 2.2 Hz, H₃) ; 7.36 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H₁₃) ; 7.45 (t, 2H, J = 7.5 Hz, H₁₄) ; 7.64 (d, 2H, J = 7.6 Hz, H₁₂) ; 7.82 (d, 2H, J = 7.4 Hz, H₁₅).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 28.0 (CH₃) ; 37.0 (C₇) ; 47.3 (C₁₀) ; 49.1 (C₂) ; 65.9 (C₉) ; 82.8 (C₁₇) ; 108.2 (C₄) ; 109.8 (C₅) ; 120.0 (C₁₅) ; 123.2 (C₃) ; 125.1 (C₁₂) ; 127.1 (C₁₃) ; 127.7 (C₁₄) ; 128.8 (C₆) ; 141.3 (C₁₆) ; 143.9 (C₁₁) ; 156.0 (C₈) ; 168.5 (C₁).

HPLC, temps de rétention : 2,07 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 433,2

c. Synthèse du 1H-pyrrole-2-carbaldéhyde oxime 27

**Protocole :**

Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour la synthèse du composé **12**, en utilisant 2,63 mmol (250 mg) de pyrrole **21**. Le composé **27** est obtenu sous forme de solide beige.

Rendement : quantitatif

Formule brute : C₅H₆N₂O

Masse molaire : 110,11 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 6.12 (s, 1H, H₂) ; 6.57 (s, 1H, H₃) ; 6.90 (s, 1H, H₁) ; 7.28 (s, 1H, H₅) ; 11.15 (s, 1H, OH) ; 11.17 (s, 1H, NH).

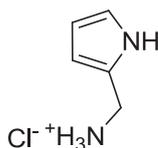
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 109.0 (C₂) ; 114.5 (C₃) ; 121.5 (C₁) ; 124.4 (C₄) ; 137.7 (C₅).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₅H₇N₂O]⁺: [M+H]⁺ 111,0558 ; trouvée : [M+H]⁺ 111,0559

HPLC, temps de rétention : 0,67 min et 0,71 min (E et Z)

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 110,5 (E et Z)

d. Synthèse du chlorure de (1H-pyrrol-2-yl)méthanaminium 28

**Protocole :**

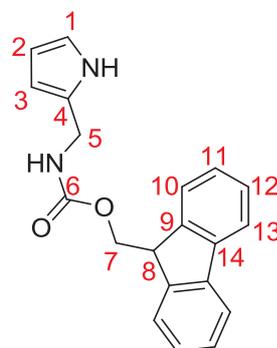
L'oxime **27** (100 mg ; 0,91 mmol ; 1 éq), l'acide chlorhydrique (167 μL ; 5,46 mmol ; 6 éq) et le Pd/C (20 mg) sont introduits dans 15-20 mL de MeOH. Le mélange est placé sous agitation et du H₂ est mis à buller dans la suspension. Après 2h de réaction à TA, le mélange est filtré sur célite et la solution obtenue est évaporée, pour obtenir le produit souhaité sous forme de solide foncé, directement utilisé dans l'étape suivante.

Formule brute : C₅H₈N₂,HCl

Masse molaire : 96,13 + 36,46 g.mol⁻¹



e. Synthèse du (9*H*-fluoren-9-yl)méthyl((1*H*-pyrrol-2-yl)méthyl)carbamate **26**



Protocole :

Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour la synthèse du composé **25**, en utilisant 0,91 mmol de pyrrole **28**. Le composé **26** est obtenu sous la forme d'un solide beige.

Rendement : 80 % (pour deux étapes)

Formule brute : C₂₀H₁₈N₂O₂

Masse molaire : 318,37 g.mol⁻¹

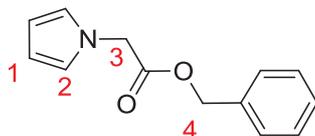
RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 4.21 (t, 1H, *J* = 6.6 Hz, H₈) ; 4.27 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, H₅) ; 4.44 (d, 2H, *J* = 7.1 Hz, H₇) ; 5.23 (s, 1H, NH) ; 6.02 (s, 1H, H_{pyrrole}) ; 6.09 (s, 1H, H_{pyrrole}) ; 6.72 (s, 1H, H₁) ; 7.30 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, H₁₁) ; 7.40 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, H₁₂) ; 7.57 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, H₁₀) ; 7.76 (d, 2H, *J* = 6.8 Hz, H₁₃).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 38.0 (C₅) ; 47.3 (C₈) ; 66.9 (C₇) ; 106.7 (C₂) ; 107.8 (C₃) ; 118.3 (C₁₃) ; 120.0 (C₁) ; 125.0 (C₁₀) ; 127.1 (C₁₁) ; 127.8 (C₁₂) ; 129.5 (C₄) ; 141.4 (C₁₄) ; 143.8 (C₉) ; 157.6 (C₆).

HPLC, temps de rétention : 1,77 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 319,2

f. Synthèse du 2-(1*H*-pyrrol-1-yl)acétate de benzyle **82**



Protocole :

Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour la synthèse du composé **6**, en utilisant 11,59 mmol (1,53 g) de diméthoxytétrahydrofurane **7**. Le composé **82** est obtenu sous la forme d'une huile jaune foncé.

Rendement : 99%

Formule brute : C₁₃H₁₃NO₂

Masse molaire : 215,25 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 4.80 (s, 2H, H₃) ; 5.06 (s, 2H, H₄) ; 5.91 (t, 2H, J = 2.10 Hz, H₁) ; 6.65 (t, 2H, J = 2.1 Hz, H₂) ; 7.26 (m, 5H, H_{aro}).

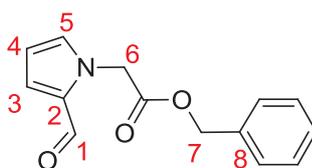
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 50.3 (C₂) ; 66.7 (C₄) ; 108.5 (C₁) ; 122.5 (C₂) ; 128.5 (C_{aro}) ; 128.6 (C_{aro}) ; 129.0 (C_{aro}) ; 136.3 (C_{quat, ar}) ; 167.7 (CO)

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₁₃H₁₄NO₂]⁺ : [M+H]⁺ 216,1025 ; trouvée : [M+H]⁺ 216,1026

HPLC, temps de rétention : 1,87 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 216,1

g. Synthèse du 2-(2-formyl-1*H*-pyrrol-1-yl)acétate de benzyle **29**



**Protocole :**

Méthode A : Réaction de formylation de Villsmeier selon le protocole décrit pour la synthèse du composé **5**, en utilisant 11,12 mmol (2,39 g) du pyrrole **82**. **Rendement** : 62%

Méthode B : Réaction de N-alkylation selon le protocole décrite pour la syntèse du composé **22**, en utilisant le bromoacétate de benzyle en remplacement du bromoacétate de tert-butyle sur 3,16 mmol (300 mg) de pyrrole **21**. **Rendement** : 72%

Le composé **29** est obtenu sous la forme d'une huile jaunâtre.

Formule brute : $C_{14}H_{13}NO_3$

Masse molaire : $243,26 \text{ g.mol}^{-1}$

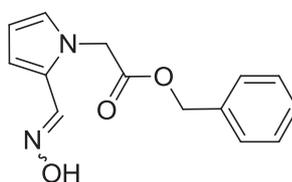
RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 5.07 (s, 2H, **H**₇) ; 5.10 (s, 2H, **H**₆) ; 6.17 (dd, 1H, $J_1 = 2.5 \text{ Hz}$, $J_2 = 4 \text{ Hz}$, **H**₄) ; 6.98 (dd, 1H, $J_1 = 1.7 \text{ Hz}$, $J_2 = 4 \text{ Hz}$, **H**₃) ; 7.20 (m, 1H, **H**₅) ; 7.26 (m, 5H, **H**_{aro}) ; 9.38 (s, 1H, **H**₁).

RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 50.3 (**C**₆) ; 66.7 (**C**₇) ; 110.1 (**C**₄) ; 124.8 (**C**₃) ; 128.4 (**C**_{aro}) ; 128.7 (**C**_{aro}) ; 129.0 (**C**_{aro}) ; 131.9 (**C**₂) ; 133.6 (**C**₅) ; 136.2 (**C**₈) ; 169.0 (**CO**) ; 180.3 (**CHO**)

HPLC, temps de rétention : 1,68 min

MS (ESI) : $m/z [M+H]^+ = 244,1$

h. Synthèse du 2-(2-((hydroxyimino)méthyl)-1H-pyrrol-1-yl)acétate de benzyle **30**

**Protocole :**

Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour la synthèse du composé **12**, en utilisant 2,18 mmol (530 mg) de pyrrole **29**. Le composé **30** est obtenu sous la forme d'un solide blanc cassé.

Rendement : 98 %



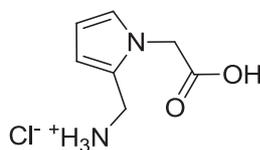
Formule brute : C₁₄H₁₄N₂O₃

Masse molaire : 258,27 g.mol⁻¹

HPLC, temps de rétention : 1,72 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 259,0 (E et Z)

i. Synthèse du chlorure de (1-(carboxyméthyl)-1*H*-pyrrol-2-yl)méthanaminium 31



Protocole :

Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour la synthèse du composé **28**, en utilisant 1,7 mmol (440 mg) de pyrrole **30**. Le composé **31** est obtenu sous la forme d'un solide brun.

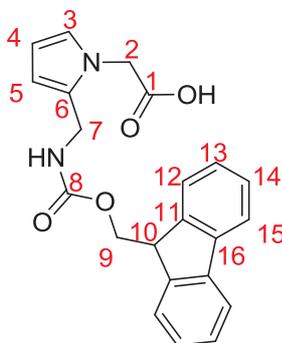
Formule brute : C₇H₁₀N₂O₂.HCl

Masse molaire : 154,17 + 36,46 g.mol⁻¹

HPLC, temps de rétention : 0,78 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 155,8

j. Synthèse de l'acide 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl) amino)méthyl)-1H-pyrrol-1-yl) acétique
32



Protocole :

Le protocole utilisé est le même que celui utilisé pour la synthèse du composé **26**, en utilisant 1,7 mmol de pyrrole **31**. Le composé **32** est obtenu sous la forme d'un solide beige.

Rendement : 38 % (pour deux étapes)

Formule brute : C₂₂H₂₀N₂O₄

Masse molaire : 376,41 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 4.10 (d, 2H, *J* = 4.7 Hz, H₇) ; 4.21 (t, 1H, *J* = 7 Hz, H₁₀) ; 4.28 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, H₉) ; 4.73 (s, 2H, H₂) ; 5.91 (d, 2H, *J* = 2.2 Hz, H₄ et H₅) ; 6.68 (m, 1H, H₃) ; 7.32 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, H₁₃) ; 7.42 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, H₁₄) ; 7.70 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, H₁₂) ; 7.89 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, H₁₅).

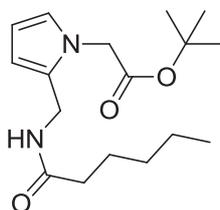
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 36.3 (C₇) ; 47.2 (C₁₀) ; 48.2 (C₂) ; 66.0 (C₉) ; 107.0 (C₄) ; 108.4 (C₅) ; 120.6 (C₁₅) ; 123.2 (C₃) ; 125.7 (C₁₂) ; 127.5 (C₁₃) ; 128.1 (C₁₄) ; 130.5 (C₆) ; 141.2 (C₁₆) ; 144.4 (C₁₁) ; 156.5 (C₈) ; 171.1 (C₁).

HPLC, temps de rétention : 2,05 min

MS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ = 377,2



k. Synthèse du 2-(2-(hexanamidométhyl)-1H-pyrrol-1-yl)acétate de tert-butyle 34



Protocole :

Dans 5 mL de DMF anhydre sont introduits successivement l'acide hexanoïque (56 μL ; 0,45 mmol ; 1 éq), l'EDCI (85,5 mg ; 0,45 mmol ; 1 éq), le HOBT (68,3 mg ; 0,45 mmol ; 1 éq), la DIEA (22 μL ; 1,35 mmol ; 3 éq) puis le composé **24** (94 mg ; 0,45 mmol ; 1 éq) juste préparé. Le mélange est agité à TA pendant la nuit. Le DMF est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est dissous dans du DCM. Cette phase organique est lavée deux fois avec une solution de KHSO_4 (1M), une fois avec une solution de NaHCO_3 (sat) puis une fois par une solution saturée de NaCl. Elle est ensuite séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée sous vide pour donner le composé **34** sous la forme d'un solide blanc. Celui-ci a immédiatement été utilisé pour faire un test de stabilité dans le TFA.

Formule brute : $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$

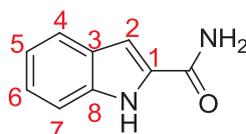
Masse molaire : $308,42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

HPLC, temps de rétention : 1,70 min

MS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ = 309,2$

III) Synthèse du dérivé de l'AMPA en série indole

a. Synthèse du 1H-indole-2-carboxamide 43



Protocole :

L'acide 1*H*-indole-2-carboxylique (3,22 g ; 20 mmol ; 1 éq) est dissous dans 40 mL de THF et le mélange est placé sous atmosphère inerte (N₂) à -5°C. Le SOCl₂ (2,6 mL ; 35,6 mmol ; 1,8 éq) est ajouté au mélange dans 5 mL de THF goutte à goutte grâce à une ampoule d'addition, pendant 15 min. Le mélange est ensuite agité sous N₂ à 50°C pendant 4h puis à TA pendant 2h. Le solvant est évaporé sous vide et le solide obtenu est dissous dans 40 mL de THF. Une solution de DCM saturée en NH₃ est versée à -10°C sur la solution du chlorure d'acyle formé. Le mélange est agité à TA pendant la nuit. Le précipité formé est alors filtré sur fritté, rincé deux fois avec 20 mL d'eau et une fois avec 20 mL d'Et₂O pour obtenir le composé **43** sous la forme d'un solide blanc.

Rendement : 90%

Formule brute : C₉H₈N₂O

Masse molaire : 160,17 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 7.02 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, H₅) ; 7.14 (s, 1H, H₂) ; 7.17 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, H₆) ; 7.43 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₇) ; 7.59 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₄) ; 8.06 (s, 1H, NH₂) ; 11.63 (s, 1H, NH).

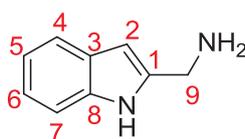
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 103.8 (C₂) ; 112.7 (C₇) ; 120.1 (C₅) ; 122.0 (C₄) ; 123.7 (C₆) ; 127.6 (C₃) ; 132.3 (C₁) ; 137.0 (C₈) ; 163.3 (CO).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₉H₉N₂O]⁺: [M+H]⁺ 161,0715 ; trouvée : [M+H]⁺161,0716

HPLC, temps de rétention : 1,18 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 161,2

b. Synthèse du (1*H*-indol-2-yl)méthanamine **42**

**Protocole :**

LiAlH₄ (1,6 g ; 42,1 mmol ; 2,33 éq) est mis en suspension dans 65 mL de THF sous N₂. L'indole **43** (2,89 g ; 18,06 mmol ; 1 éq) est ajouté à 0°C par petites portions. Une fois le dégagement gazeux



terminé, le mélange est placé à reflux pendant la nuit. Le matin, le mélange est placé dans un bain de glace et 3 mL d'eau dans 5 mL de THF sont ajoutés doucement. Le mélange est agité 1h à 0°C, puis 2h à TA. Le mélange obtenu est filtré sur célite, le précipité filtré est rincé avec 20 mL de THF puis deux fois 20 mL d'AcOEt. Le filtrat est ensuite séché sur MgSO₄, filtré et évaporé pour donner le composé **42** sous forme de solide blanc.

Rendement : 64%

Formule brute : C₉H₁₀N₂

Masse molaire : 146,19 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 3.85 (s, 2H, H₉) ; 6.23 (s, 1H, H₂) ; 6.94 (t, 1H, J = 7.2 Hz, H₅) ; 7.02 (t, 1H, J = 7.5 Hz, H₆) ; 7.32 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H₇) ; 7.44 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H₄) ; 10.93 (s, 1H, NH).

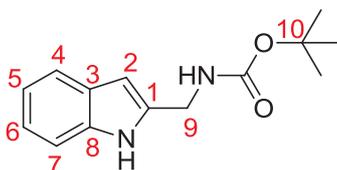
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 39.8 (C₉) ; 98.0 (C₂) ; 111.3 (C₇) ; 119.0 (C₅) ; 119.8 (C₄) ; 120.6 (C₆) ; 128.6 (C₃) ; 136.5 (C₁) ; 143.0 (C₈).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₉H₈N]⁺: [M+H-NH₃]⁺ 130,0657 ; trouvée : [M+H-NH₃]⁺ 130,0658

HPLC, temps de rétention : 0,93 min

MS (ESI) : m/z [M+H-NH₃]⁺ = 130.0

c. Synthèse du ((1H-indol-2-yl)méthyl)carbamate de tert-butyle **45**



Protocole :

L'aminométhyle indole **42** (400 mg ; 2,65 mmol ; 1 éq) est dissous dans un mélange eau/dioxane (8mL/8mL). La triéthylamine (410 µL ; 2,92 mmol ; 1,1 éq) est ensuite ajoutée et le mélange est placé à 0°C. Boc₂O (637 mg ; 2,92 mmol ; 1,1 éq) dans 4 mL de dioxane est alors ajouté goutte à goutte puis le mélange est placé à TA pendant 4h. Le dioxane est évaporé sous pression



réduite et la solution aqueuse obtenue est diluée dans un peu d'eau. Cette phase aqueuse est extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de NaCl, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées sous vide pour donner le composé **45** sous forme d'un solide beige.

Rendement : 96%

Formule brute : C₁₄H₁₈N₂O₂

Masse molaire : 246,30 g.mol⁻¹

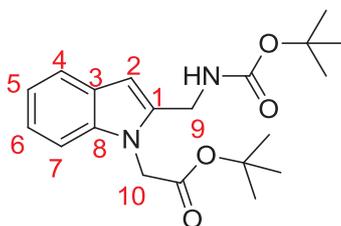
RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.40 (s, 9H, CH₃) ; 4.29 (d, 2H, J = 6.1 Hz, H₉) ; 4.98 (s, 1H, NH) ; 6.24 (s, 1H, H₂) ; 7.00 (t, 1H, J = 7.2 Hz, H₅) ; 7.09 (t, 1H, J = 7.3 Hz, H₆) ; 7.26 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H₇) ; 7.47 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H₄) ; 8.79 (s, 1H, NH).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 28.4 (CH₃) ; 38.2 (C₉) ; 80.2 (C₁₀) ; 100.5 (C₂) ; 111.0 (C₇) ; 119.7 (C₅) ; 120.4 (C₄) ; 122.0 (C₆) ; 127.8 (C₃) ; 136.4 (C₁) ; 137.0 (C₈) ; 157.3 (CO).

HPLC, temps de rétention : 1,98 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 247,2

d. Synthèse du 2-(2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)méthyl)-1H-indol-1-yl)acétate de tert-butyle **46**



Protocole :

L'indole **45** (100 mg ; 0,41 mmol ; 1 éq) est dissous dans 5 mL de DMF puis le K₂CO₃ (112 mg ; 0,81 mmol ; 2 éq) et le bromoacétate de tert-butyle (73 µL ; 0,49 mmol ; 1,2 éq) sont ajoutés. Le mélange est agité à TA pendant 3 jours. Le mélange est ensuite chauffé à 70°C pendant 24h, puis 2 éq de K₂CO₃ sont ajoutés. Après 24h de chauffage supplémentaire, 1 éq de BrCH₂COOtBu est ajouté. Après 20h de plus, 1 éq de BrCH₂COOtBu est ajouté pour compléter la réaction. Après une nuit de



chauffage, le DMF est évaporé sous pression réduite. Le mélange obtenu est repris dans de l'eau et la phase aqueuse est extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées sous vide. Le produit obtenu a été purifié par chromatographie flash sur gel de silice (0% à 40% d'AcOEt dans le cyclohexane) pour donner le produit **46** sous forme d'un solide beige.

Rendement : 62%

Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$

Masse molaire : $360,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

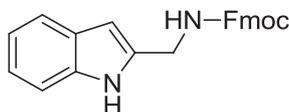
RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 1.35 (s, 9H, $\text{CH}_{3,\text{tBu}}$) ; 1.38 (s, 9H, $\text{CH}_{3,\text{tBu}}$) ; 4.36 (d, 2H, $J = 5.1 \text{ Hz}$, H_9) ; 4.67 (s, 2H, H_{10}) ; 4.86 (s, 1H, NH) ; 6.37 (s, 1H, H_2) ; 7.02 (m, 1H, H_5) ; 7.10 (m, 2H, H_6 et H_7) ; 7.48 (d, 1H, $J = 7.7 \text{ Hz}$, H_4).

RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 28.0 (CH_3) ; 28.4 (CH_3) ; 37.3 (C_9) ; 45.9 (C_{10}) ; 79.8 (C_{tBu}) ; 82.7 (C_{tBu}) ; 102.7 (C_2) ; 108.8 (C_7) ; 120.1 (C_5) ; 120.8 (C_4) ; 122.2 (C_6) ; 127.6 (C_3) ; 136.2 (C_1) ; 137.8 (C_8) ; 155.6 (CO_{Boc}) ; 168.0 (CO).

HPLC, temps de rétention : 2,34 min

MS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ = 361,2$

e. Synthèse du ((1*H*-indol-2-yl)méthyl) carbamate de (9*H*-fluorén-9-yl)méthyle **47**



Protocole :

L'aminométhylindole **42** (100 mg ; 0,685 mmol ; 1 éq) et Na_2CO_3 (110 mg ; 1,028 mmol ; 1,5 éq) sont dissous dans un mélange eau/dioxane (2,5 mL / 2,5 mL) et placés à 0°C. Fmoc-OSu (254 mg ; 0,753 mmol ; 1,1 éq) est ajouté au mélange dans 1,5 mL de dioxane. Le mélange est alors placé sous agitation à TA pendant la nuit. Le dioxane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est



extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et le solvant est évaporé pour obtenir le produit souhaité sous forme de solide beige.

Rendement : quantitatif

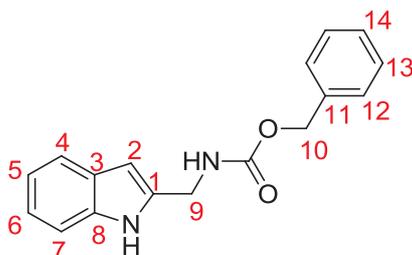
Formule brute : $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$

Masse molaire : $368,43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

HPLC, temps de rétention : 2,45 min

MS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ = 369,2$

f. Synthèse du ((1*H*-indol-2-yl)méthyl)carbamate de benzyle **49**



Protocole :

L'aminométhylindole **42** (1 g ; 6,64mmol ; 1 éq) et Na_2CO_3 (1,05 g ; 9,95 mmol ; 1,5 éq) sont dissous dans un mélange eau/dioxane (20 mL / 20 mL) et placés à 0°C . Z-OSu (1,82 g ; 7,30 mmol ; 1,1 éq) est ajouté au mélange dans 10 mL de dioxane. Le mélange est alors placé sous agitation à TA pendant la nuit. Le dioxane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et le solvant est évaporé pour obtenir le produit souhaité **49** sous forme de solide beige.

Rendement : quantitatif

Formule brute : $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$

Masse molaire : $280,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 4.36 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz, **H₉**) ; 5.08 (s, 2H, **H₁₀**) ; 6.24 (s, 1H, **H₂**) ; 6.95 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, **H₅**) ; 7.03 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, **H₆**) ; 7.36 (m, 6H, **H₇ H₁₂ H₁₃ H₁₄**) ; 7.44 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, **H₄**) ; 7.79 (t, 1H, *J* = 5.9 Hz, **NH-Boc**) ; 10.91 (s, 1H, **NH**).

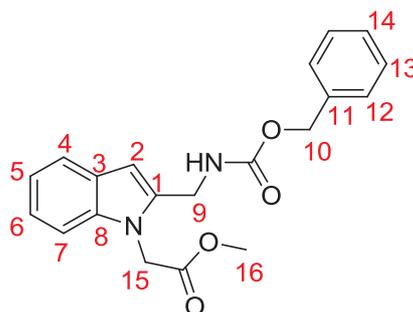
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 38.5 (**C₉**) ; 66.0 (**C₁₀**) ; 99.3 (**C₂**) ; 111.6 (**C₇**) ; 119.3 (**C₅**) ; 120.0 (**C₄**) ; 121.1 (**C₆**) ; 128.3 (**C_{aro}**) ; 128.8 (**C_{aro}**) ; 136.6 (**C₈**) ; 137.6 (**C₁₁**) ; 137.8 (**C₁**) ; 156.8 (**CO**).

HRMS (ESI+) *m/z* calc. pour [C₁₇H₁₇N₂O₂]⁺: [M+H]⁺ 281,1290 ; trouvée : [M+H]⁺ 281,1293

HPLC, temps de rétention : 1,92 min

MS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ = 281,2

g. Synthèse du 2-(2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)méthyl)-1H-indol-1-yl)acétate de méthyle 50



Protocole :

L'indole **49** (100 mg ; 0,36 mmol ; 1 éq) est dissous dans 5 mL d'ACN avec le K₂CO₃ (148 mg ; 0,72 mmol ; 2 éq), le BrCH₂COOMe (678 μL ; 1,78 mmol ; 5 éq) et le KI (3 mg ; 0,019 mmol ; 0,05 éq). Le mélange est agité à reflux (90°C) pendant 24h. Après refroidissement à TA, le mélange est dilué dans de l'eau et de l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est extraite trois fois avec AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées sous vide. Une petite partie du résidu obtenu a été purifié par chromatographie flash sur gel de silice (10% à 30% d'AcOEt dans le cyclohexane) pour la caractérisation de l'intermédiaire 50, obtenu sous forme de solide blanc. Le reste a été utilisé tel quel pour l'étape de saponification suivante.

Formule brute : C₂₀H₂₀N₂O₄

Masse molaire : 352,38 g.mol⁻¹



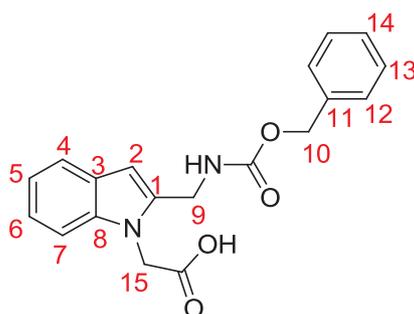
RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 3.69 (s, 3H, H₁₆) ; 4.55 (d, 2H, J = 5.3 Hz, H₉) ; 4.91 (s, 2H, H₁₅) ; 5.15 (s, 3H, NH et H₁₀) ; 6.50 (s, 1H, H₂) ; 7.14 (t, 1H, J = 7.0 Hz, H₅) ; 7.22 (m, 2H, H₆ et H₇) ; 7.35 (m, 5H, H₁₂ H₁₃ H₁₄) ; 7.59 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₄).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 37.5 (C₉) ; 44.8 (C₁₆) ; 52.6 (C₁₅) ; 67.0 (C₁₀) ; 103.1 (C₂) ; 108.8 (C₇) ; 120.4 (C₅) ; 120.9 (C₄) ; 122.5 (C₆) ; 127.6 (C_{aro}) ; 128.1 (C_{aro}) ; 128.2 (C_{aro}) ; 128.6 (C_{aro}) ; 136.0 (C₁) ; 136.3 (C₁₁) ; 137.8 (C₈) ; 156.1 (COOBn) ; 169.4 (COOMe).

HPLC, temps de rétention : 2,02 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 353,1

h. Synthèse de l'acide 2-(2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)méthyl)-1H-indol-1-yl)acétique **51**



Protocole :

L'indole **50** (0,36 mmol) est dissous dans un mélange NaOH 1M / dioxane (5mL/5mL). Le mélange est agité à TA pendant 3h puis est acidifié par ajout de HCl (2M). La phase aqueuse est extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées sous vide. Le mélange récupéré a été purifié par chromatographie flash sur gel de silice (AcOEt + 1% AcOH / cyclohexane + 1% AcOH : 50/50) pour donner le composé **51** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 50% pour 2 étapes

Formule brute : C₁₉H₁₈N₂O₄

Masse molaire : 338,36 g.mol⁻¹



RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 4.36 (d, 2H, *J* = 5.8 Hz, **H₉**) ; 4.97 (s, 2H, **H₁₅**) ; 5.06 (s, 2H, **H₁₀**) ; 6.34 (s, 1H, **H₂**) ; 7.01 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, **H₅**) ; 7.10 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, **H₆**) ; 7.37(m, 6H, **H₇ H₁₂ H₁₃ H₁₄**) ; 7.49 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, **H₄**) ; 7.83 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, **NH**).

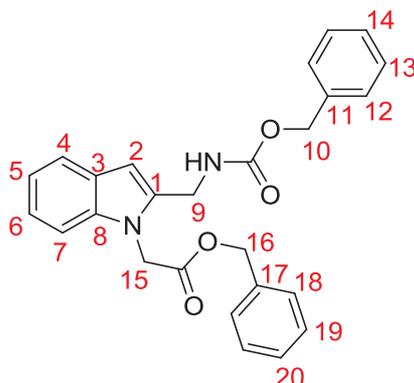
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 37.2 (**C₉**) ; 44.2 (**C₁₅**) ; 66.0 (**C₁₀**) ; 101.0 (**C₂**) ; 110.0 (**C₇**) ; 119.8 (**C₅**) ; 120.3 (**C₄**) ; 121.5 (**C₆**) ; 127.6 (**C_{aro}**) ; 128.2 (**C_{aro}**) ; 128.3 (**C_{aro}**) ; 128.8 (**C_{aro}**) ; 137.6 (**C₁₁**) ; 137.9 (**C₈**) ; 138.7 (**C₁**) ; 156.6 (**NHCOOBn**) ; 171.0 (**COOBn**).

HRMS (ESI+) *m/z* calc. pour [C₁₉H₁₉N₂O₄]⁺: [M+H]⁺ 339,1345 ; trouvée : [M+H]⁺ 339,1343

HPLC, temps de rétention : 1,82 min

MS (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ = 339,2

i. Synthèse du 2-(2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)méthyl)-1H-indol-1-yl)acétate de benzyle **52**



Protocole :

L'indole **49** (100 mg ; 0,36 mmol ; 1 éq) est dissous dans 5 mL d'ACN avec le K₂CO₃ (99 mg ; 0,72 mmol ; 2 éq), le BrCH₂COOBn (284 μL ; 1,78 mmol ; 5 éq) et le KI (3 mg ; 0,019 mmol ; 0,05 éq). Le mélange est agité à reflux (90°C) pendant 24h. 3,5 éq de BrCH₂COOBn sont ajoutés pour compléter la réaction. Après 24h de chauffage supplémentaire, le mélange est refroidi à TA, puis est dilué dans de l'eau et de l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse est extraite trois fois avec AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées sous vide. Le produit a été purifié par chromatographie flash sur gel de silice (10% à 30% d'AcOEt dans le cyclohexane) pour donner le composé **52** sous la forme d'un solide beige.

Rendement : 65%

Formule brute : C₂₆H₂₄N₂O₄

Masse molaire : 428,48 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 4.25 (d, 2H, *J* = 5.9 Hz, H₉) ; 4.93 (s, 2H, H₁₀) ; 5.04 (s, 2H, H₁₆) ; 5.10 (s, 2H, H₁₅) ; 6.26 (s, 1H, H₂) ; 7.02 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₅) ; 7.09 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, H₆) ; 7.34 (m, 11H, H₇ H₁₂ H₁₃ H₁₄ H₁₈ H₁₉ H₂₀) ; 7.49 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₄) ; 7.80 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH).

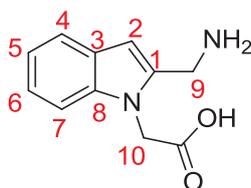
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 37.1 (C₉) ; 45.0 (C₁₅) ; 66.1 (C₁₀) ; 66.8 (C₁₆) ; 101.7 (C₂) ; 110.1 (C₇) ; 120.1 (C₅) ; 120.5 (C₄) ; 121.8 (C₆) ; 127.7 (C_{aro}) ; 128.3 (C_{aro}) ; 128.6 (C_{aro}) ; 128.9 (C_{aro}) ; 129.0 (C_{aro}) ; 136.2 (C₁₇) ; 137.6 (C₁₁) ; 138.0 (C₈) ; 138.7 (C₁) ; 156.7 (NHCOOBn) ; 169.5 (COOBn).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₂₆H₂₅N₂O₄]⁺: [M+H]⁺ 429,1814 ; trouvée : [M+H]⁺ 429,1816

HPLC, temps de rétention : 2,31 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 429,1

j. Synthèse de l'acide 2-(2-(aminométhyl)-1H-indol-1-yl)acétique **38**



Protocoles :

Méthode A : l'indole **46** (451 mg ; 1,25 mmol) est dissous dans 5 mL de TFA. Le mélange est agité à TA pendant 3h. Le TFA est évaporé sous pression réduite (seul puis en co-évaporation avec du DCM). Le résidu est repris dans H₂O/ACN puis est lyophilisé pour donner le composé **38** avec un rendement brut de 87% (produit pur à 60% par HPLC) sous forme d'un solide beige.

Méthode B : l'indole **51** (60 mg ; 0,18 mmol ; 1 éq) est dissous dans 15 mL de MeOH en présence de Pd/C (10 mg). H₂ est mis à buller dans la solution et le mélange est agité à TA pendant 2h30. Le mélange est ensuite filtré sur célite et le filtrat obtenu est évaporé sous pression réduite. Le



résidu obtenu est repris dans H₂O/ACN puis est lyophilisé pour donner le composé **38** avec un rendement de 64% sous forme d'un solide beige.

Méthode C : l'indole **52** (1,72 g ; 4,02 mmol ; 1 éq) est dissous dans 15 mL de MeOH en présence de Pd(OH)₂/C (640 mg). H₂ est mis à buller dans la solution et le mélange est agité à TA pendant 2 fois 11h. Le mélange est ensuite filtré sur célite et le filtrat obtenu est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans H₂O/ACN puis est lyophilisé pour donner le composé **38** avec un rendement de 48% sous forme d'un solide beige.

Formule brute : C₁₁H₁₂N₂O₂

Masse molaire : 204,23 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 4.22 (s, 2H, H₉) ; 4.63 (s, 2H, H₁₀) ; 6.55 (s, 1H, H₂) ; 7.03 (t, 1H, J = 7.5 Hz, H₅) ; 7.16 (t, 1H, J = 7.4 Hz, H₆) ; 7.36 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H₇) ; 7.49 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H₄) ; 9.02 (s, 2H, NH₂).

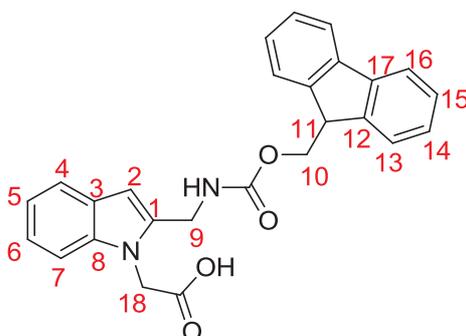
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 34.8 (C₉) ; 49.6 (C₁₀) ; 103.4 (C₂) ; 110.4 (C₇) ; 119.8 (C₅) ; 120.8 (C₄) ; 122.2 (C₆) ; 126.9 (C₃) ; 133.8 (C₁) ; 137.8 (C₈) ; 171.2 (CO).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₁₁H₁₃N₂O₃]⁺: [M+H]⁺ 205,0977 ; trouvée : [M+H]⁺ 205,0979

HPLC, temps de rétention : 0,97 min

MS (ESI) : m/z [M+H-NH₃]⁺ = 188.1

k. Synthèse de l'acide 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl)amino)méthyl)-1H-indol-1-yl)acétique **37**



**Protocole :**

L'indole **38** (79 mg ; 0,39 mmol ; 1 éq) et Na₂CO₃ (45 mg ; 0,43 mmol ; 1,1 éq) sont dissous dans un mélange eau/dioxane (12 mL / 12 mL) et placés à 0°C. Fmoc-Cl (110 mg ; 0,43 mmol ; 1,1 éq) est ajouté au mélange dans 6 mL de dioxane. Le mélange est alors placé sous agitation à TA pendant la nuit. Le dioxane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est lavée deux fois par AcOEt et est ensuite acidifiée à pH 3 par une solution de KHSO₄ 1M. Elle est alors extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé pour obtenir le produit souhaité sous forme de solide beige.

Rendement : 12%**Formule brute :** C₂₆H₂₂N₂O₄**Masse molaire :** 426,46 g.mol⁻¹**RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm):** 4.25 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, H₁₁) ; 4.36 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, H₁₀ et H₉) ; 5.02 (s, 2H, H₁₈) ; 6.33 (s, 1H, H₂) ; 7.03 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, H₅) ; 7.11 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₆) ; 7.35 (m, 3H, H₁₄ et H₇) ; 7.43 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, H₁₅) ; 7.51 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, H₄) ; 7.72 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, H₁₃) ; 7.90 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz, H₁₆).**RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm):** 37.1 (C₉) ; 44.9 (C₁₈) ; 47.2 (C₁₁) ; 66.0 (C₁₀) ; 101.2 (C₂) ; 109.9 (C₇) ; 119.9 (C₅) ; 120.3 (C₄) ; 120.6 (C₁₆) ; 121.6 (C₆) ; 125.7 (C₁₃) ; 127.6 (C₁₄) ; 127.6 (C₃) ; 128.1 (C₁₅) ; 137.9 (C₈) ; 138.7 (C₁) ; 141.2 (C₁₇) ; 144.4 (C₁₂) ; 156.6 (CO_{Fmoc}) ; 170.9 (COOH).**HRMS** (ESI+) *m/z* calc. pour [C₂₆H₂₃N₂O₄]⁺: [M+H]⁺ 427,1658 ; trouvée : [M+H]⁺ 427,1657**HPLC**, temps de rétention : 2,23 min**MS** (ESI) : *m/z* [M+H]⁺ = 427,1



IV) Dérivés de l'AMPA substitués

a. Synthèse du 2-(2-bromo-4-méthoxyphényl)acétate de méthyle 56



Protocole :

L'acide 2-(2-bromo-4-méthoxyphényl)acétique (100 mg ; 0,41 mmol ; 1 éq) est dissous dans 5 mL de MeOH et H₂SO₄ (33 µL ; 0,612 mmol ; 1,5 éq) est ajouté. Le mélange est agité à 60 °C pendant 4h. Le méthanol est ensuite évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris dans l'eau et le milieu est neutralisé par ajout de Na₂CO₃. La phase aqueuse est extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées sous vide pour donner le composé **56** sous la forme d'un solide blanc.

Rendement : quantitatif

Formule brute : C₁₀H₁₁BrO₃

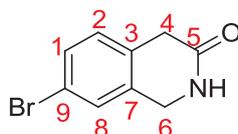
Masse molaire : 259,10 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 3.68 (s, 3H, H₁) ; 3.70 (s, 2H, H₂) ; 3.72 (s, 3H, H₉) ; 6.79 (dd, 1H, J₁ = 2.8 Hz, J₂ = 8.2 Hz, H₅) ; 7.10 (d, 1H, J = 2.8 Hz, H₇) ; 7.15 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H₄).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 40.5 (C₂) ; 52.0 (C₁) ; 55.4 (C₉) ; 113.6 (C₅) ; 118.0 (C₇) ; 125.1 (C₈) ; 126.2 (C₃) ; 131.9 (C₄) ; 159.3 (C₆) ; 171.3 (COOMe).

HPLC, temps de rétention : 1,91 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 259,0 et 261,0

b. Synthèse du 7-bromo-1,2-dihydroisoquinolin-3(4H)-one 59**Protocole :**

L'acide polyphosphorique (2,6 g ; 27,03 mmol ; 5,3 éq) est placé dans un ballon à 130°C. Le 4-bromophénylacétonitrile (1 g ; 5,1 mmol ; 1 éq) est ajouté dans le ballon et le mélange est agité pendant 5 min. Le paraformaldéhyde (420 μL ; 5,61 mmol ; 1,1 éq) est ensuite ajouté petit à petit. Le mélange est agité pendant 48 h à 130 °C, durant lesquelles 2 fois 1 éq de paraformaldéhyde ont été ajoutés pour compléter la réaction. Un mélange d'eau et de glace est ensuite versé dans le ballon, ainsi que Na_2CO_3 pour arriver à pH 8. La phase aqueuse est extraite trois fois par DCM. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées sous pression réduite. Le mélange obtenu est purifié par chromatographie flash sur gel de silice (0% à 15% de MeOH dans le DCM) pour donner le composé **59** sous forme d'un solide beige.

Rendement : 41%

Formule brute : $\text{C}_9\text{H}_8\text{BrNO}$

Masse molaire : 226,07 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

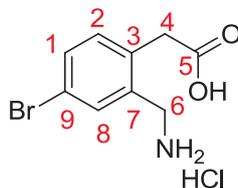
RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3.54 (s, 2H, H_4) ; 4.48 (s, 2H, H_6) ; 6.68 (s, 1H, NH) ; 7.05 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_2) ; 7.33 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_8) ; 7.39 (dd, 1H, $J_1 = 8.1$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, H_1).

RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 36.1 (C_4) ; 45.0 (C_6) ; 120.4 (C_3) ; 128.5 (C_8) ; 129.4 (C_2) ; 130.7 (C_1) ; 130.8 (C_7) ; 133.0 (C_9) ; 171.3 (C_5).

HPLC, temps de rétention : 1,42 min

MS (ESI) : m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ = 226,1 et 228,1

c. Synthèse du chlorhydrate de l'acide 2-(2-(aminométhyl)-4-bromophényl) acétique **58**



Protocole :

L'isoquinolinone **59** (1 g ; 4,42 mmol) est dissoute dans 15 mL de HCl (6N). Le mélange est porté à reflux (100°C) pendant la nuit. Après refroidissement à TA, le milieu est dilué dans de l'eau. La phase aqueuse est lavée trois fois par du DCM puis est lyophilisée pour donner le composé **58** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 85%

Formule brute : C₉H₁₀BrNO₂, HCl

Masse molaire : 244,09 + 36,46 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 3.67 (s, 2H, H₄) ; 3.92 (s, 2H, H₆) ; 7.15 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₂) ; 7.42 (dd, 1H, J₁ = 8.1 Hz, J₂ = 2.2 Hz, H₁) ; 7.63 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H₈) ; 8.36 (s, 3H, NH₃⁺) ; 12.54 (s, 1H, OH).

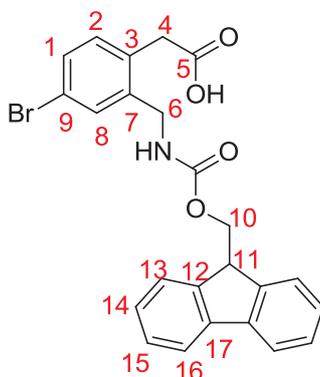
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 38.3 (C₄) ; 39.4 (C₆) ; 120.7 (C₉) ; 131.7 (C₁) ; 132.4 (C₈) ; 133.6 (C₂) ; 134.2 (C₇) ; 136.2 (C₃) ; 172.8 (C₅).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₉H₁₁NO₂Br]⁺: [M+H]⁺ 243,9973 ; trouvée : [M+H]⁺ 243,9978

HPLC, temps de rétention : 0,98 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 244,0 et 246,0

d. Synthèse de l'acide 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)méthyl)amino)méthyl)-4-bromophényl)acétique **62**



Protocole :

Le Bromo-AMPA **58** (1,07 g ; 3,81 mmol ; 1 éq) et Na₂CO₃ (1,01 g ; 9,54 mmol ; 2,5 éq) sont dissous dans un mélange eau/dioxane (100 mL / 100 mL) et placés à 0°C. Une solution de Fmoc-Cl (1,09 g ; 4,19 mmol ; 1,1 éq) dans le dioxane (50 mL) est ajoutée au mélange. Le mélange est alors placé sous agitation à TA pendant la nuit. Le dioxane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est lavée deux fois par AcOEt et est ensuite acidifiée à pH 3 par une solution de KHSO₄ 1M. Elle est alors extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrée et le solvant est évaporé pour obtenir le produit souhaité **62** sous forme de solide beige.

Rendement : 92%

Formule brute : C₂₃H₂₀BrNO₄

Masse molaire : 466,32 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 3.67 (s, 2H, H₄) ; 4.21 (d, 2H, J = 5.7 Hz, H₆) ; 4.25 (t, 1H, J = 6.8 Hz, H₁₁) ; 4.34 (d, 2H, J = 7.0 Hz, H₁₀) ; 7.18 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H₂) ; 7.34 (t, 2H, J = 7.3 Hz, H₁₄) ; 7.42 (m, 1H, H₁ H₈ H₁₅) ; 7.71 (d, 2H, J = 6.6 Hz, H₁₃) ; 7.89 (m, 3H, H₁₃ NH).

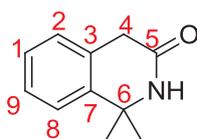
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 38.0 (C₄) ; 41.5 (C₆) ; 47.2 (C₁₁) ; 66.1 (C₁₀) ; 120.5 (C_{aro}) ; 120.6 (C_{aro}) ; 125.6 (C₁₃) ; 127.6 (C_{aro}) ; 128.1 (C_{aro}) ; 130.1 (C₃) ; 130.5 (C₈) ; 133.1 (C_{aro}) ; 133.3 (C₂) ; 141.2 (C_{aro}) ; 141.3 (C₇) ; 144.3 (C_{aro}) ; 156.7 (CO_{Fmoc}) ; 172.6 (C₅).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₂₃H₂₁NO₂Br]⁺: [M+H]⁺ 466,0654 ; trouvée : [M+H]⁺ 466,0658

HPLC, temps de rétention : 2,12 min

MS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ = 466,0 et 468,0

e. Synthèse de la 1,1-diméthyl-1,2-dihydroisoquinolin-3(4H)-one 64



Protocole :

L'acide polyphosphorique (15,6 g ; 103,3 mmol ; 12 éq) est placé dans un ballon à 130°C. Le phénylacétonitrile (1 g ; 8,5 mmol ; 1 éq) est ajouté dans le ballon et le mélange est agité pendant 5 min. L'acétone (1,25 mL ; 17,1 mmol ; 2 éq) est ensuite ajoutée petit à petit. Le mélange est agité pendant 4 h à 130 °C, durant lesquelles 2 fois 2 éq d'acétone ont été ajoutés pour compléter la réaction. Un mélange d'eau et de glace est ensuite versé dans le ballon, ainsi que Na₂CO₃ pour arriver à pH 8. La phase aqueuse est extraite trois fois par DCM. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le mélange obtenu est purifié par Soxhlet avec de l'éther de pétrole pour donner le composé **64** sous forme d'un solide beige.

Rendement : 79%

Formule brute : C₁₁H₁₃NO

Masse molaire : 175,23 g.mol⁻¹

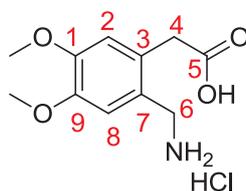
RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.43 (s, 6H, CH₃) ; 3.54 (s, 2H, H₄) ; 7.02 (d, 2H, J = 6.8 Hz, H₂) ; 7.16 (m, 3H, H₁ H₈ H₉) ; 7.87 (s, 1H, NH).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 31.0 (CH₃) ; 36.0 (C₄) ; 56.2 (C₆) ; 123.6 (C_{aro}) ; 127.1 (C_{aro}) ; 127.3 (C_{aro}) ; 128.0 (C₂) ; 130.4 (C₃) ; 140.1 (C₇) ; 171.3 (C₅).

HPLC, temps de rétention : 1,35 min

MS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ = 176,2

f. Synthèse du chlorhydrate de l'acide 2-(2-(aminométhyl)-4,5-diméthoxyphényl) acétique 66



Protocole :

La 6,7-diméthoxy-1,2-dihydroisoquinolin-3(4H)-one (979 mg ; 4,72 mmol) est dissoute dans 15 mL de HCl (6N). Le mélange est porté à reflux (100°C) pendant la nuit. Après refroidissement à TA, le milieu est dilué dans de l'eau. La phase aqueuse est lavée trois fois par du DCM puis est lyophilisée pour donner le composé **66** sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 91%

Formule brute : C₁₁H₁₅NO₄,HCl

Masse molaire : 225,24 + 36,46 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 3.58 (s, 2H, H₄) ; 3.64 (s, 3H, CH₃) ; 3.66 (s, 3H, CH₃) ; 3.85 (s, 2H, H₆) ; 6.79 (s, 1H, H₂) ; 7.03 (s, 2H, H₈) ; 8.04 (s, 3H, NH₃⁺).

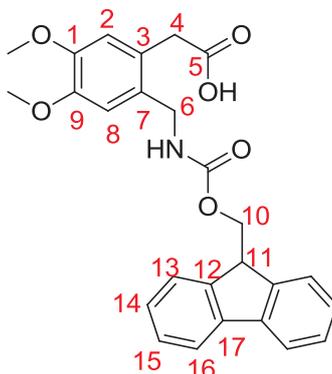
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 38.4 (C₄) ; 40.0 (C₆) ; 56.2 (CH₃) ; 114.3 (C₈) ; 115.0(C₂) ; 125.3 (C₇) ; 127.2 (C₃) ; 148.1 (C₉) ; 149.1 (C₁) ; 173.6 (C₅).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₁₁H₁₆NO₄]⁺: [M+H]⁺ 226,1079 ; trouvée : [M+H]⁺ 226,1073

HPLC, temps de rétention : 0,86 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 226,2

g. Synthèse de l'acide 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl)amino)méthyl)-4,5-diméthoxyphényl)acétique **67**



Protocole :

Le diMeO-AMPA **58** (1,13 g ; 4,3 mmol ; 1 éq) et Na₂CO₃ (1,14 g ; 10,75 mmol ; 2,5 éq) sont dissous dans un mélange eau/dioxane (50 mL / 50 mL) et placés à 0°C. Fmoc-Cl (1,22 g ; 4,73 mmol ; 1,1 éq) est ajouté au mélange dans 30 mL de dioxane. Le mélange est alors placé sous agitation à TA pendant la nuit. Le dioxane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est lavée deux fois par AcOEt et est ensuite acidifiée à pH 3 par une solution de KHSO₄ 1M. Elle est alors extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé pour obtenir le produit souhaité **67** sous forme de solide beige.

Rendement : quantitatif

Formule brute : C₂₆H₂₅NO₆

Masse molaire : 447,48 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 3.62 (s, 2H, H₄) ; 3.71 (s, 3H, CH₃) ; 3.73 (s, 3H, CH₃) ; 4.14 (d, 2H, J = 5.7 Hz, H₆) ; 4.22 (t, 1H, J = 6.5 Hz, H₁₁) ; 4.32 (d, 2H, J = 6.8 Hz, H₁₀) ; 6.82 (s, 1H, H₂) ; 6.88 (s, 2H, H₈) ; 7.31 (t, 2H, J = 7.2 Hz, H₁₄) ; 7.41 (t, 2H, J = 7.6 Hz, H₁₅) ; 7.70 (d, 2H, J = 6.8 Hz, H₁₃) ; 7.89 (d, 2H, J = 7.3 Hz, H₁₆).

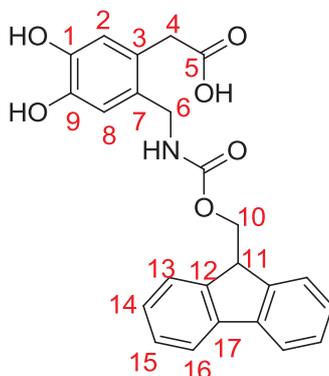
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 38.0 (C₄) ; 41.7 (C₆) ; 47.2 (C₁₁) ; 56.0 (CH₃) ; 56.1 (CH₃) ; 65.9 (C₁₀) ; 112.9 (C₈) ; 115.0 (C₂) ; 120.6 (C₁₆) ; 125.6 (C₁₃) ; 125.7 (C₃) ; 127.5 (C₁₄) ; 128.1 (C₁₅) ; 130.7 (C₇) ; 141.2 (C₁₇) ; 144.4 (C₁₂) ; 147.9 (C₁ C₉) ; 156.6 (CO_{Fmoc}) ; 173.3 (C₅).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₂₆H₂₆NO₆]⁺: [M+H]⁺ 448,1760 ; trouvée : [M+H]⁺ 448,1757

HPLC, temps de rétention : 1,89 min

MS (ESI) : m/z $[M+Na]^+ = 470,0$

h. Synthèse de l'acide 2-(2-((((9H-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl)amino)méthyl)-4,5-dihydroxyphényl)acétique **68**



Protocole :

Le Fmoc-diMeO-AMPA **67** (760 mg ; 1,7 mmol ; 1 éq) est dissous dans 60 mL de DCM à 0°C. BBr₃ (1M dans DCM ; 5,1 mL ; 5,1 mmol ; 3 éq) est ajouté et le mélange est agité à TA pendant la nuit. 3,5 éq de BBr₃ supplémentaires sont ajoutés au mélange. 4h plus tard, le DCM est évaporé. Le résidu est repris dans l'eau et l'acidité est neutralisée par ajout de Na₂CO₃. La phase aqueuse est extraite trois fois par DCM. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé pour obtenir le produit souhaité **68** sous forme de solide beige.

Rendement : 35%

Formule brute : C₂₄H₂₁NO₆

Masse molaire : 419,43 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 3.35 (s, 2H, H₄) ; 3.94 (d, 2H, J = 5.4 Hz, H₆) ; 4.11 (t, 1H, J = 6.5 Hz, H₁₁) ; 4.17 (d, 2H, J = 6.8 Hz, H₁₀) ; 6.48 (s, 1H, H₂) ; 6.59 (s, 2H, H₈) ; 7.22 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H₁₄) ; 7.31 (t, 2H, J = 7.4 Hz, H₁₅) ; 7.52 (s, 1H, NH) ; 7.59 (d, 2H, J = 7.2 Hz, H₁₃) ; 7.78 (d, 2H, J = 7.2 Hz, H₁₆) ; 8.65 (s, 2H, OH).

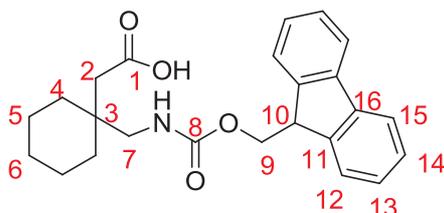
RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 37.8 (C₄) ; 41.7 (C₆) ; 47.3 (C₁₁) ; 66.1 (C₁₀) ; 116.5 (C₈) ; 118.3 (C₂) ; 120.7 (C₁₆) ; 124.0 (C₃) ; 125.8 (C₁₃) ; 127.6 (C₁₄) ; 128.2 (C₁₅) ; 129.1 (C₇) ; 141.3 (C₁₇) ; 144.5 (C₁₂ C₉) ; 156.7 (CO_{Fmoc}) ; 173.7 (C₅).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₂₄H₂₂NO₆]⁺ : [M+H]⁺ 420,1447 ; trouvée : [M+H]⁺ 420,1448

HPLC, temps de rétention : 1,82 min

MS (ESI) : m/z [M+Na]⁺ = 442,1

i. Synthèse de l'acide 2-(1-((((9H-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl)amino)méthyl)cyclohexyl)acétique **73**



Protocole :

L'acide 2-(1-(aminométhyl)cyclohexyl)acétique (200 mg ; 1,17 mmol ; 1 éq) et Na₂CO₃ (152 mg ; 1,44 mmol ; 1,2 éq) sont dissous dans un mélange eau/dioxane (5 mL / 5 mL) et placés à 0°C. Fmoc-OSu (437 mg ; 1,3 mmol ; 1,1 éq) est ajouté au mélange dans 5 mL de dioxane. Le mélange est alors placé sous agitation à TA pendant la nuit. Le dioxane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est lavée deux fois par AcOEt et est ensuite acidifiée à pH 3 par une solution de KHSO₄ 1M. Elle est alors extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé pour obtenir le produit souhaité **73** sous forme de solide beige.

Rendement : 99%

Formule brute : C₂₄H₂₇NO₄

Masse molaire : 393,48 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 1.36 (m, 10H, H₄ H₅ H₆) ; 2.20 (s, 2H, H₂) ; 3.12 (d, 2H, J = 5.7 Hz, H₇) ; 4.22 (t, 1H, J = 6.1 Hz, H₁₀) ; 4.29 (d, 2H, J = 6.3 Hz, H₉) ; 7.18 (s, 1H, NH) ; 7.22 (t, 2H, J = 7.7 Hz, H₁₃) ; 7.31 (t, 2H, J = 7.4 Hz, H₁₄) ; 7.59 (d, 2H, J = 7.2 Hz, H₁₂) ; 7.78 (d, 2H, J = 7.2 Hz, H₁₅).

RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 21.5 (C₅ ou C₆) ; 26.0 (C₆ ou C₅) ; 32.7 (C₄) ; 37.2 (C₃) ; 47.3 (C₁₀ C₇) ; 65.8 (C₉) ; 120.6 (C₁₅) ; 125.7 (C₁₂) ; 127.5 (C₁₃) ; 128.1 (C₁₄) ; 141.2 (C₁₆) ; 144.4 (C₁₁) ; 157.2 (C₈) ; 173.6 (C₁).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₂₄H₂₈NO₄]⁺ : [M+H]⁺ 394,2018 ; trouvée : [M+H]⁺ 394,2016

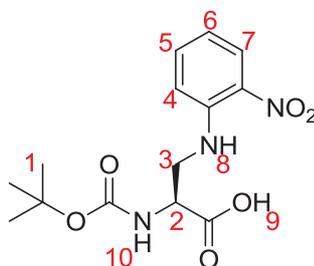


HPLC, temps de rétention : 2,20 min

MS (ESI) : m/z $[M+H]^+ = 394,2$

V) Synthèse du dérivé du DBt en série benzodiazépine

a. Synthèse de l'acide (S)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-3-((2-nitrophényl)amino)propanoïque 78



Protocole :

Le Boc-L-Dap-OH (3 g ; 14,7 mmol ; 1 éq), le fluoronitrobenzène (1,54 mL ; 14,7 mmol ; 1 éq) et l'hydrogénocarbonate de sodium (3,7 g ; 44,1 mmol ; 3 éq) sont dissous dans un mélange H₂O/EtOH (35 mL / 35 mL). Le mélange réactionnel est placé sous agitation à reflux pendant 20h. L'EtOH est alors évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse obtenue est lavée deux fois par de l'éther, puis est acidifiée à pH 3 par ajout de KHSO₄ 1M. La solution obtenue est extraite trois fois par de l'AcOEt. Les phases organiques sont ensuite lavées par de la saumure, séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées pour obtenir le produit souhaité sous forme d'un solide orange.

Rendement : 69%

Formule brute : C₁₄H₁₉N₃O₆

Masse molaire : 325,32 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 1.32 (s, 9H, H₁) ; 3.50 (m, 1H, H_{3a}) ; 3.72 (m, 1H, H_{3b}) ; 4.20 (m, 1H, H₂) ; 6.70 (t, 1H, J = 7.3 Hz, H₈) ; 7.06 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H₁₀) ; 7.31 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H₄) ; 7.54 (t, 1H, J = 7.4, H₆) ; 8.04 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H₇) , 8.19 (t, 1H, J = 6 Hz, H₅) ; 12.92 (s, 1H, H₉).



RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 28.5 (C₁) ; 43.5 (C₃) ; 53.0 (C₂) ; 78.9 (C_{quat, tBu}) ; 114.8 (C₄) ; 116.2 (C₆) ; 126.8 (C₇) ; 131.9 (C-NO₂) ; 137.2 (C₅) ; 145.2 (C_{aro-NHR}) ; 156.0 (COOtBu) ; 172.5 (COOH).

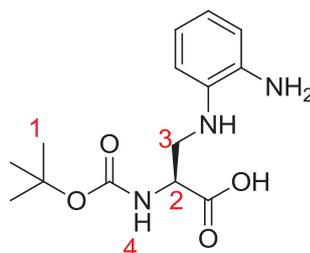
HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₁₄H₂₀N₃O₆]⁺: [M+H]⁺ 326,1352 ; trouvée : [M+H]⁺ 326,1348

Pf : 143,8°C

HPLC, temps de rétention : 1,51 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 326,2

b. Synthèse de l'acide (S)-3-((2-aminophényl)amino)-2-((tert-butoxycarbonyl)amino) propanoïque 77



Protocole :

Le composé nitré **78** (3,3 g ; 10,15 mmol ; 1éq), et le Pd/C (330 mg) sont introduits dans 30 mL de MeOH. Le mélange est placé sous agitation et du H₂ est mis à buller dans la suspension. Après 4h de réaction, le mélange est filtré sur célite et la solution obtenue est évaporée, pour obtenir le produit souhaité sous forme d'un solide marron.

Rendement : quantitatif

Formule brute : C₁₄H₂₁N₃O₄

Masse molaire : 295,33 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 1.36 (s, 9H, H₁) ; 3.3 (m, 2H, H₃) ; 4.14 (q, 1H, J = 5.9 Hz, H₂) ; 6.51 (m, 4H, H_{aro}) ; 7.12 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H₄)

RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 28.7 (C₁) ; 45.3 (C₃) ; 53.5 (C₂) ; 78.7 (C_{quat, tBu}) ; 110.9 (CH_{aro}) ; 115.0 (CH_{aro}) ; 118.1 (CH_{aro}) ; 118.2 (CH_{aro}) ; 135,7 (C_{quat, aro}) ; 136.2 (C_{quat, aro}) ; 156.0 (COOtBu) ; 173.3 (COOH)



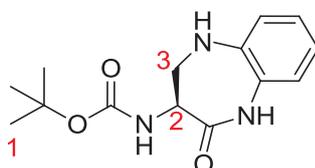
HRMS (ESI+) m/z calc. pour $[C_{14}H_{22}N_3O_4]^+$: $[M+H]^+$ 296,1610 ; trouvée : $[M+H]^+$ 296,1609

Pf : 83,2°C

HPLC, temps de rétention : 1,08 min

MS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ = 296,2

c. Synthèse du (S)-(2-oxo-2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzo[b][1,4]diazépin-3-yl)carbamate de tert-butyle **76**



Protocole :

Le composé non cyclisé **77** (2,99 g ; 10,15 mmol ; 1 éq) est dissous dans le DMF (65 mL), puis le BOP (4,53 g ; 10,15 mmol ; 1 éq) et l'hydrogénocarbonate de sodium (6,22 g ; 50,75 mmol ; 5 éq) sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 24h à TA. Une fois la réaction terminée, le DMF est évaporé sous vide. L'huile obtenue est dissoute dans AcOEt et cette phase organique est lavée trois fois par une solution de $NaHCO_3$ saturée puis deux fois par une solution saturée de NaCl. Elle est ensuite séchée sur $MgSO_4$, filtrée puis évaporée pour obtenir le produit souhaité sous forme de solide marron.

Rendement : 97%

Formule brute : $C_{14}H_{19}N_3O_3$

Masse molaire : 277,32 $g \cdot mol^{-1}$

RMN- 1H (400 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ ppm): 1.38 (s, 9H, H_1) ; 3.38 (m, 2H, H_3) ; 4.16 (m, 1H, H_2) ; 5.61 (d, 1H, $J = 5.7$ Hz, NH) ; 6.74 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, H_{aro}) ; 6.85 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, H_{aro}) ; 6.92 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H_{aro}) ; 9.70 (s, 1H, NH).

RMN- ^{13}C (100 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ ppm): 28.1 (C_1) ; 51.8 (C_2 et C_3) ; 78.3 ($C_{quat, tBu}$) ; 119.2 (CH_{aro}) ; 119.5 (CH_{aro}) ; 122.4 (CH_{aro}) ; 124.9 (CH_{aro}) ; 126.4 ($C_{quat, aro}$) ; 139.8 ($C_{quat, aro}$) ; 155.0 ($COOtBu$) ; 171.1 (CO_{cycle})

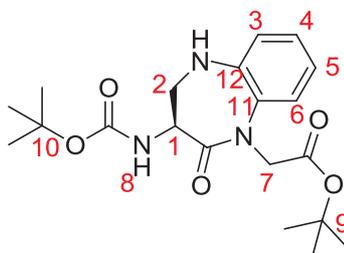
HRMS (ESI+) m/z calc. pour $[C_{14}H_{19}N_3O_3Na]^+$: $[M+Na]^+$ 300,1324 ; trouvée : $[M+Na]^+$ 300,1319

Pf : 86,2°C

HPLC, temps de rétention : 1,23 min

MS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ = 278,4

d. Synthèse du (S)-2-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-oxo-2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzo[b][1,4]diazépin-1-yl)acétate de tert-butyle 75



Protocole :

La benzodiazépine **76** (2,74 g ; 9,88 mmol ; 1 éq) est dissoute dans du THF anhydre (70 mL), placée sous flux d'azote et refroidie à -80°C. LiHMDS (1M dans THF ; 9,88 mL ; 9,88 mmol ; 1 éq) est ajouté goutte à goutte et le mélange est agité à -80°C pendant 1h. BrCH₂COOtBu (1,72 mL ; 11,86 mmol ; 1,2 éq) est ensuite ajouté goutte à goutte puis le mélange réactionnel est agité pendant 4h à TA. Puis, de l'AcOEt est ajouté au mélange. La phase organique est séparée, lavée une fois par une solution de KHSO₄ 1M, deux fois par de l'eau et une fois par de la saumure. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄, filtrée et évaporée. Le résidu obtenu est dissous dans un peu de cyclohexane et est filtré sur silice, en utilisant comme éluant un mélange AcOEt/CyHex (30/70) pour obtenir le produit souhaité sous forme de solide jaune foncé.

Rendement : 70%

Formule brute : C₂₀H₂₉N₃O₅

Masse molaire : 391,46 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 1.39 (s, 9H, CH_{3-tBu}) ; 1.45 (s, 9H, CH_{3-tBu}) ; 3.40 (dd, 1H, J₁ = 9.8 Hz, J₂ = 11.2 Hz, H_{2a}) ; 3.92 (dd, 1H, J = 9.8 Hz, H_{2b}) ; 4.27 (d, 1H, J = 17.9 Hz, H_{7a}) ; 4.50 (d, 1H, J = 17.6 Hz, H_{7b}) ; 4.61 (m, 1H, H₁) ; 5.59 (d, 1H, J = 8 Hz, H₈) ; 6.86 (d, 1H, J = 8 Hz, H₆) ; 6.97 (t, 1H, J = 7.6, H₅) ; 7.08 (m, 2H, H_{3,4})

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 28.0 (CH₃) ; 28.8 (CH₃) ; 50.1 (C₇) ; 51.8 (C₂) ; 55.7 (C₁) ; 79.9 (C₁₀) ; 82.2 (C₉) ; 122.1 (C₆) ; 122.8 (C₅) ; 123.4 (C₄) ; 127.4 (C₃) ; 133.1 (C₁₁) ; 140.7 (C₁₂) ; 154.9 (CO_{Boc}) ; 167.8 (CO_{ester}) ; 170.7 (CO_{cycle})

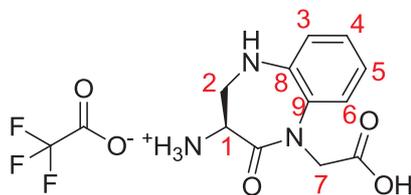
HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₂₀H₃₀N₃O₅]⁺: [M+H]⁺ 392,2185 ; trouvée : [M+H]⁺ 392,2181

Pf : 67,5°C

HPLC, temps de rétention : 1,74 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 392,2

e. Synthèse du trifluoroacétate de (S)-1-(carboxyméthyl)-2-oxo-2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzo[b][1,4]diazépin-3-aminium 74



Protocole :

La benzodiazépine **75** (500 mg ; 1,28 mmol) est dissoute dans du TFA (5 mL) et placée sous agitation magnétique pendant 4h. Le TFA est évaporé sous pression réduite et en effectuant 4 co-évaporations avec de l'éther. Le produit est précipité dans l'éther puis centrifugé et rincé 3 fois avec ce même solvant. Le produit est ensuite séché sous vide.

Rendement : 71%

Formule brute : C₁₃H₁₄F₃N₃O₅

Masse molaire : 349,26 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 3.40 (t, 1H, *J* = 10.3 Hz, H_{2a}) ; 3.69 (dd, 1H, *J*₁ = 5.9 Hz, *J*₂ = 10.3 Hz, H_{2b}) ; 4.05 (m, 1H, H₁) ; 4.10 (d, 1H, *J* = 17.7 Hz, H_{7a}) ; 4.57 (d, 1H, *J* = 17 Hz, H_{7b}) ; 6.93 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, H₅) ; 6.97 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H₆) ; 7.08 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₄) ; 7.16 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H₃)

RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 49.8 (C₁) ; 51.9 (C₇) ; 53.5 (C₂) ; 121.6 (C₆) ; 122.0 (C₅) ; 123.8 (C₃) ; 127.5 (C₄) ; 132.5 (C₉) ; 141.5 (C₈) ; 169.2 (CO_{cycle}) ; 170.8 (CO_{ester})

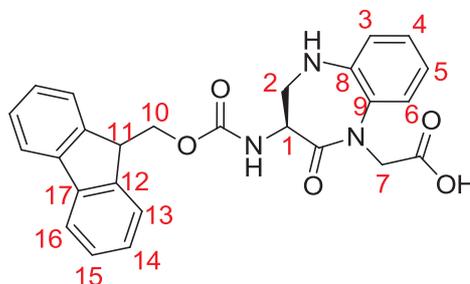
HRMS (ESI+) m/z calc. pour [C₁₁H₁₄N₃O₃]⁺: [M+H]⁺ 236,1030 ; trouvée : [M+H]⁺ 236,10

Pf : 203,6°C

HPLC, temps de rétention : 0,49 min

MS (ESI) : m/z [M+H]⁺ = 236,2

f. Synthèse de l'acide (S)-2-(3-(((9H-fluoren-9-yl)méthoxy)carbonyl)amino)-2-oxo-2,3,4,5-tétrahydro-1H-benzo[b][1,4]diazépin-1-yl) acétique 81



Protocole :

Le sel de TFA **74** (150 mg ; 0,43 mmol ; 1 éq) et Na₂CO₃ (69 mg ; 0,65 mmol ; 1,5 éq) sont dissous dans un mélange eau/dioxane (4 mL / 4 mL) et placés à 0°C. Fmoc-OSu (158 mg ; 0,47 mmol ; 1,1 éq) est ajouté au mélange dans 2 mL de dioxane. Le mélange est alors placé sous agitation à TA pendant 12 h. une fois la réaction terminée, le dioxane est évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse est lavée deux fois par AcOEt et est ensuite acidifiée à pH 3 par une solution de KHSO₄ 1M. Elle est alors extraite trois fois par AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄, filtrées et le solvant est évaporé pour obtenir le produit souhaité sous forme de solide beige.

Rendement : Quantitatif



Formule brute : $C_{26}H_{23}N_3O_5$

Masse molaire : 457,48 g.mol⁻¹

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 3.43 (t, 1H, $J = 10.5$ Hz, **H₂**) ; 3.55 (dd, 1H, $J_1 = 6.3$ Hz, $J_2 = 10.0$ Hz, **H₂**) ; 4.15 (d, 1H, $J = 16.9$ Hz, **H₇**) ; 4.20 (d, 1H, $J = 6.4$ Hz, **H₁₁**) ; 4.26 (td, 2 H, $J_1 = 8.6$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, **H₁₀**) ; 4.34 (m, 1H, **H₁**) ; 4.55 (d, 1H, $J = 17.1$ Hz, **H₇**) ; 6.99 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, **H₅**) ; 7.02 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, **H₃**) ; 7.11 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, **H₄**) ; 7.19 (dd, 1H, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, **H₆**) ; 7.32 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz, **H₁₄**) ; 7.41 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, **H₁₅**) ; 7.64 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, **NH**) ; 7.71 (t, 2H, $J = 8.9$ Hz, **H₁₃**) ; 7.88 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, **H₁₆**).

RMN-¹³C (100 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 47.0 (**C₁₁**) ; 50.9 (**C₁**) ; 51.3 (**C₇**) ; 54.6 (**C₂**) ; 66.3 (**C₁₀**) ; 120.6 (**C₁₆**) ; 122.0 (**C₃**) ; 122.6 (**C₅**) ; 123.5 (**C₆**) ; 125.7 (**C₁₃**) ; 127.2 (**C₄**) ; 127.6 (**C₁₄**) ; 128.1 (**C₁₅**) ; 134.0 (**C₉**) ; 141.2 (**C₁₇**) ; 141.3 (**C₈**) ; 144.2 (**C₁₂**) ; 144.3 (**COOH**) ; 156.0 (**CO_{Fmoc}**) ; 170.8 (**CO_{cycle}**).

HRMS (ESI+) m/z calc. pour $[C_{26}H_{24}N_3O_5]^+$: $[M+H]^+$ 458,1716 ; trouvée : $[M+H]^+$ 458,1714

Pf : 108,3°C

HPLC, temps de rétention : 1,57 min

MS (ESI) : m/z $[M+H]^+$ = 458,1

VI) Synthèse peptidique sur support solide

a. Protocoles

Les conjugués présentés dans ce manuscrit ont été synthétisés en suivant les protocoles décrits ci-après. Les résines Rink Amide utilisées possèdent une charge allant de 0,3 à 0,5 mmol/g de sites et sont protégées par un groupement Fmoc. Une étape préalable de déprotection est donc nécessaire avant d'effectuer le premier couplage. Une fois synthétisés et clivés de la résine, les conjugués ont été purifiés par HPLC préparative ou LC-MS préparative.



i. Réacteurs et préparation du support solide

Les réactions sur support solide ont été effectuées dans des réacteurs en verre ou dans des seringues munis d'un fritté. Un support solide sec (issu du pot ou intermédiaire séché) doit être conditionné dans un solvant préalablement à toute synthèse. La solvataion est effectuée par agitation de la résine pendant 15-30 min dans du DMF ou du DCM ou le solvant utilisé pour la réaction suivante.

ii. Etapes de lavage

Une étape de lavage est effectuée après chaque étape de déprotection, ainsi que chaque étape de couplage peptidique. Pour ce faire, la résine est lavée trois fois par du DMF, trois fois par du MeOH et trois fois par du DCM.

iii. Etapes de déprotection

Les étapes de déprotection du Fmoc sont réalisées avant chaque couplage peptidique. La résine est mise en suspension dans une solution de DMF/Pip (80/20 v/v). Le mélange est agité 30 min à TA puis la résine est filtrée. La résine est mise une seconde fois en présence du mélange DMF/Pip (80/20 v/v) durant 30 min puis elle est lavée comme décrit précédemment.

Lors des déprotections du Fmoc fixé sur un AMPA, une solution différente est utilisée : DBU/Pip/DMF (2/2/46, v/v/v).

iv. Couplages peptidiques

Les étapes de couplage peptidique sont réalisées manuellement dans des seringues munies d'un fritté. 3 éq de résidu à coupler, protégé par un groupement Fmoc, et 4 éq de DIEA sont dissous dans du DMF et ajoutés à la résine dans la seringue, suivi par 3 éq d'agent de couplage (HBTU). Celle-ci est agitée durant 3h à TA, puis la résine est filtrée et lavée.

**v. Test TNBS**

Ce test permet de détecter la présence de fonctions amines primaires libres. Dans un petit tube en verre quelques billes de résine sont introduites puis sont ajoutées successivement une goutte d'une solution à 10% de DIEA dans le DMF puis une goutte d'une solution 1M de TNBS dans le DMF. Après 1min d'agitation la couleur des billes est observée (incolore si négatif, rouge si positif). Après une étape de couplage, si le test est positif, un second couplage est lancé afin de compléter la réaction.

vi. Microclivage

Ce test permet de vérifier l'avancement d'une réaction sur support. Quelques billes de résine sont introduites dans un tube en verre puis sont soumises à un clivage TFA comme décrit ci-dessous. Au bout d'une heure, la résine est éliminée par filtration puis le mélange de clivage est évaporé sous courant d'azote. Le résidu est repris dans un mélange eau/MeCN (50/50) puis analysé par HPLC et LC-MS.

vii. Dosage du Fmoc

De 5 à 10 mg de résine sèche sont pesés précisément et placés dans un tube. 400 μ L de DCM et 400 μ L de pipéridine sont ajoutés. La suspension est homogénéisée et placée à TA pendant 1h. Le contenu du tube est filtré dans une seringue munie d'un fritté dans une éprouvette de 10 mL. Le tube puis la seringue sont rincés avec 1,8 mL de MeOH puis du DCM jusqu'à atteindre 10mL dans l'éprouvette.

Une seconde solution ainsi qu'une solution témoin sans résine sont préparées selon le même procédé.

La DO des deux solutions obtenues est mesurée à 301 nm après avoir fait le zéro avec la solution témoin. La mesure des DO est effectuée sur un appareil Genesys scanning. La charge de la résine est calculée en faisant la moyenne des résultats obtenus pour les deux solutions, avec la formule suivante : $\text{Charge} = (\text{Absorbance} * V) / (\epsilon * m_{\text{résine}})$. Le volume est exprimé en mL, la masse de résine est exprimée en g, et la charge en mmol/g de résine.

viii. Clivage de la résine Rink amide (AM-PS)

Les conjugués sont clivés de la résine et déprotégés en la traitant trois fois 30 minutes dans une solution de TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5 v/v/v). La résine est ensuite filtrée et rincée avec du DCM. Les solutions de TFA et de DCM sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Les conjugués sont précipités dans de l'éther. Les suspensions obtenues sont centrifugées. Les culots sont lavés à l'éther deux fois, dissous dans un mélange eau/MeCN (50 :50) puis lyophilisés.

b. Caractéristiques des bioconjugués 1 à 26

Tous les conjugués testés ont une pureté > 95 %, sauf le conjugué 13 avec une pureté de 60 %. L'impureté qui coélué lors des purifications correspond au conjugué 13 ayant subi une déméthylation sur un des groupements méthoxy du tétramère.

Bioconjugués	N°	HPLC (t _r , min)	Formule brute et MW (g.mol ⁻¹)	MS (m/z)	Rdt (%)
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(AMPA)₄-NH₂	1	1.37	C ₈₄ H ₁₂₆ N ₁₆ O ₁₇ 1632.04	[M+2H] ²⁺ , 817.1 [M+3H] ³⁺ , 544.9	30
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(AMPA)₂-NH₂	2	1.25	C ₆₆ H ₁₀₈ N ₁₄ O ₁₅ 1337.67	[M+H] ⁺ , 1337.9 [M+2H] ²⁺ , 669.5 [M+3H] ³⁺ , 446.8	16
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(AMPA)₃-NH₂	3	1.33	C ₇₅ H ₁₁₇ N ₁₅ O ₁₆ 1484.84	[M+2H] ²⁺ , 743.0 [M+3H] ³⁺ , 495.8	15
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(AMPA)₅-NH₂	4	1.42	C ₉₃ H ₁₃₅ N ₁₇ O ₁₈ 1779.20	[M+2H] ²⁺ , 890.1 [M+3H] ³⁺ , 593.8	23
Iva-(Val)₂-Sta-Ala-Sta- Pénétratine-NH₂	5	1.59	C ₁₄₁ H ₂₃₂ N ₃₈ O ₃₁ S 2987.65	[M+3H] ³⁺ , 996.0 [M+4H] ⁴⁺ , 747.3	2
Iva-(Val)₂-Sta-Ala-Sta- (Arg)₈-NH₂	6	1.37	C ₈₅ H ₁₆₅ N ₃₉ O ₁₇ 2005.47	[M+2H] ²⁺ , 1003.9 [M+3H] ³⁺ , 669.4	1.4
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(DBT)₄-NH₂	7	1.48	C ₉₂ H ₁₃₀ N ₂₀ O ₂₁ S ₄ 1980.40	[M+2H] ²⁺ , 990.4 [M+3H] ³⁺ , 660.6	25
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(LBD)₄-NH₂	8	1.61	C ₉₂ H ₁₃₄ N ₂₄ O ₂₁ 1912.19	[M+2H] ²⁺ , 957.0 [M+3H] ³⁺ , 638.2	6

Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(mAMPA)₄-NH₂	9	1.24	C ₈₄ H ₁₂₆ N ₁₆ O ₁₇ 1632.04	[M+2H] ²⁺ , 816.9 [M+3H] ³⁺ , 544.7	1.8
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(pAMPA)₄-NH₂	10	1.24	C ₈₄ H ₁₂₆ N ₁₆ O ₁₇ 1632.04	[M+2H] ²⁺ , 816.8 [M+3H] ³⁺ , 544.8	3
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(AMBA)₄-NH₂	11	1.65	C ₈₀ H ₁₁₈ N ₁₆ O ₁₇ 1575.89	[M+2H] ²⁺ , 789.1 [M+3H] ³⁺ , 526.2	30
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(Br-AMPA)₄-NH₂	12	1.99	C ₈₄ H ₁₂₂ Br ₄ N ₁₆ O ₁₇ 1947.58	[M+2H] ²⁺ , 974.2 [M+3H] ³⁺ , 649.8	2
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(diMeO-AMPA)₄- NH₂	13	1.59	C ₉₂ H ₁₄₂ N ₁₆ O ₂₅ 1872.20	[M+2H] ²⁺ , 937.2 [M+3H] ³⁺ , 625.2	11
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(AMCA)₄-NH₂	14	2.07	C ₈₄ H ₁₅₀ N ₁₆ O ₁₇ 1656.19	[M+2H] ²⁺ , 828.7 [M+3H] ³⁺ , 553.1	5
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-γLeu- Ala-γLeu-(AMPA)₄-NH₂	15	1.41	C ₈₄ H ₁₂₆ N ₁₆ O ₁₅ 1600.00	[M+2H] ²⁺ , 800.6 [M+3H] ³⁺ , 534.1	26
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-γAla- Ala-γAla-(AMPA)₄-NH₂	16	1.62	C ₇₈ H ₁₁₄ N ₁₆ O ₁₅ 1515.84	[M+2H] ²⁺ , 758.4	20
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-γAla-(AMPA)₄-NH₂	17	1.50	C ₈₁ H ₁₂₀ N ₁₆ O ₁₆ 1573.93	[M+2H] ²⁺ , 787.7 [M+3H] ³⁺ , 525.5	10
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-γAla- Ala-Sta-(AMPA)₄-NH₂	18	1.53	C ₈₁ H ₁₂₀ N ₁₆ O ₁₆ 1573.93	[M+2H] ²⁺ , 787.7 [M+3H] ³⁺ , 525.6	11
Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃- ChaSta-Ala-γAla-(AMPA)₄- NH₂	19	1.61	C ₈₄ H ₁₂₄ N ₁₆ O ₁₆ 1613.98	[M+2H] ²⁺ , 808.0 [M+3H] ³⁺ , 538.8	15. 5
Ac-(AMPA)₄-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-O₂Oc-arg-NH₂	20	1.73	C ₈₄ H ₁₂₆ N ₁₆ O ₁₇ 1632.04	[M+2H] ²⁺ , 817.2 [M+3H] ³⁺ , 544.9	4.2
Ac-arg-O₂Oc-(AMPA)₄- (Val)₃-Sta-Ala-Sta-NH₂	21	1.40	C ₈₄ H ₁₂₆ N ₁₆ O ₁₇ 1632.04	[M+2H] ²⁺ , 817.0 [M+3H] ³⁺ , 544.8	3.5
Ac-arg-(Val)₃-Sta-Ala-Sta- O₂Oc-(AMPA)₄-NH₂	22	1.56	C ₈₄ H ₁₂₆ N ₁₆ O ₁₇ 1632.04	[M+2H] ²⁺ , 817.1 [M+3H] ³⁺ , 545.0	18
Ac-arg-O₁₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(AMPA)₄-NH₂	23	1.39	C ₈₁ H ₁₂₂ N ₁₃ O ₁₆ 2086.55	[M+2H] ²⁺ , 1044.1 [M+3H] ³⁺ , 696.4	25
Betaine-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-(AMPA)₄-NH₂	24	1.36	C ₈₁ H ₁₂₂ N ₁₃ O ₁₆ 1533.91	[M+2H] ²⁺ , 767.0 [M+3H] ³⁺ , 511.7	15



Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta- Ala-Sta-NH₂	25	1.04	C ₄₈ H ₉₀ N ₁₂ O ₁₃ 1043.30	[M+H] ⁺ , 1043.7 [M+2H] ²⁺ , 522.3	18
Ac-arg-O₂Oc-(AMPA)₄-NH₂	26	1.47	C ₅₀ H ₆₄ N ₁₀ O ₉ 949.10	[M+H] ⁺ , 949.6 [M+2H] ²⁺ , 475.2	52

VII) Tests biologiques

a. Généralités

Les cellules MDA-MB-231 ont été achetées chez ATCC (American Type Culture Collection) et ont été mises en culture dans le DMEM, en présence de 10% de sérum fœtal bovin, 100 U.mL⁻¹ de pénicilline et 100 µg.mL⁻¹ de streptomycine à 37°C. Les conjugués testés ont été mis en solution à 1 mM dans le DMSO. Pour les tests, ces solutions ont été diluées avec un milieu sans sérum pour aboutir aux concentrations de 10⁻⁵ M ou 10⁻⁸ M.

b. Tests d'inhibition de la CathD

L'activité de la CathD est mesurée par des expériences FRET (Förster resonance energy transfer). Un fluorophore (EDANS) et un quencher (DABCYL) sont couplés en *N*-ter et *C*-ter d'un peptide substrat possédant un site de clivage optimal pour la CathD. Lorsque le peptide est intact, du fait de sa proximité l'émission d'énergie du fluorophore est capturée par le quencher. Après clivage du peptide par la CathD, le quencher s'éloigne et devient moins capable d'absorber l'énergie émise par le fluorophore, entraînant une augmentation de la fluorescence qui est mesurée. Le substrat utilisé (DABCYL-βAla-Arg-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Asp(EDANS)-NH₂) a été synthétisé en suivant les protocoles standards de synthèse sur support. Cette séquence est décrite comme étant clivable par la CathD, mais pas par les autres cathepsines.²¹¹

Dans le cadre des tests sur enzyme isolée, 250 ng de CathD humaine purifiée sont incubés dans un tampon citrate 0,1 M (pH 3,5) en présence de conjugué à une concentration de 10⁻⁵ M ou 10⁻⁸

²¹¹ PE Scarborough, BM Dunn, K Guruprasad, C Topham, TL Blundell, GR Richo, GE Conner ; *Exploration of subsite binding specificity of human cathepsin D through kinetics and rule-based molecular modeling* ; Protein Sci. ; **1993** ; 2 ; 264-276.



M pendant 30 minutes. L'inhibition est mesurée par des analyses FRET. Le peptide substrat est incubé à 5 μM à 37°C avec 20 μL de surnageant dont le pH a été ajusté à 3,5 par du tampon citrate. Après 90 min, les plaques sont lues avec un appareil PerkinElmer 1420 Victor 2, à $\lambda_{\text{exc}} = 355 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$. Les résultats sont présentés en pourcentage d'inhibition de la CathD par rapport au témoin DMSO.

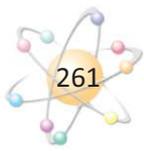
Pour les tests d'inhibition sur cellule, les composés sont incubés à 10^{-5}M avec les cellules pendant 24h. Les cellules sont ensuite lavées avec une solution de tampon phosphate (PBS) puis lysées. Le surnageant est alors utilisé pour les analyses FRET.

c. Tests de cytotoxicité

Les cellules MDA-MB-231 (5000/puits) sontensemencées dans une plaque 96-puits. Le jour suivant, les cellules sont traitées avec les conjugués (à 10^{-5}M) dans le milieu de culture DMEM, en présence de 10% de sérum fœtal bovin (FBS). Quatre jours après le traitement, les cellules sont quantifiées par des tests MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) : 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MTT pendant 4 h. Ce test MTT permet de mesurer l'activité de l'enzyme mitochondriale (la succinate déshydrogénase mitochondriale réduit le tétrazolium contenu dans le MTT en formazan). Après ces 4h, le milieu contenant le MTT est retiré et le précipité formé par le substrat transformé (le formazan) est dissout dans un mélange EtOH/DMSO (1/1 v/v). L'absorbance des solutions est alors mesurée à 540 nm.

d. Culture cellulaire pour injection de cellules cancéreuses chez la souris

Les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 sont cultivées dans une atmosphère humide, à 37°C, sous 5% CO_2 . Les cellules ont été mises en culture dans le DMEM avec 10% de sérum fœtal bovin.



e. Croissance tumorale chez la souris athymique

Des souris femelles Swiss nudes de 6 semaines (nu-/nu-) ont été élevées et soignées conformément à la recommandation du Comité d’Ethique pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire. Les cellules MDA-MB-231 ($2,5 \cdot 10^6$ / souris) ont été injectées en sous cutanée chez ces souris au niveau du flanc (hauteur de la 2^{ème} glande mammaire). Les souris ont ensuite été traitées avec le conjugué 1 (injection intratumorale : 18 mg/kg et 36 mg/kg, 2 fois par semaine pendant 48 jours) ou le vecteur seul, après l’apparition de la tumeur (34 jours après implantation sous-cutanée). Les souris ont été pesées 2 fois par semaine et le volume tumoral a été déterminé en utilisant la formule $V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{a}{2} \cdot \frac{b}{2} \cdot \frac{c}{2}\right)$, avec a, b et c étant les diamètres de la tumeur. A la fin de l’expérience, les souris ont été sacrifiées et les organes ont été prélevés et pesés.

ANNEXES

Structure–Activity Relationships of JMV4463, a Vectorized Cathepsin D Inhibitor with Antiproliferative Properties: The Unique Role of the AMPA-Based Vector

Lubomir L. Vezenkov, Clément A. Sanchez, Virginie Bellet, Vincent Martin, Marie Maynadier, Nadir Bettache, Vincent Lisowski, Jean Martinez, Marcel Garcia, Muriel Amblard, and Jean-François Hernandez*^[a]

Cathepsin D (CathD) is overexpressed and secreted by several solid tumors and stimulates their growth, the mechanism of which is still not understood. In this context, the pepstatin bioconjugate JMV4463 [Ac-arg-O₂Oc-(Val)₃-Sta-Ala-Sta-(AMPA)₄-NH₂; O₂Oc = 8-amino-3,6-dioxaoctanoyl, Sta = statine, AMPA = *ortho*-aminomethylphenylacetyl], containing a new kind of cell-penetrating vector, was previously shown to exhibit potent antiproliferative effects *in vitro* and to delay the onset of tumors *in vivo*. In this study, we performed a structure–activity relationship analysis to evaluate the significance of the inhibitor and vector moieties of JMV4463. By modifying both statine residues of pepstatin we found that the antiproliferative activi-

ty is correlated with CathD inhibition, supporting a major role of the catalytic activity of intracellular CathD in cancer cell proliferation. Replacing the vector composed of four AMPA units with other vectors was found to abolish cytotoxicity, although all of the conjugates enabled pepstatin transport into cells. In addition, the AMPA₄ vector must be localized at the C terminus of the bioconjugate. The unexpected importance of the vector structure and position for cytotoxic action suggests that AMPA₄ enables pepstatin to inhibit the proteolysis of critical CathD substrates involved in cell proliferation via a unique mechanism of action.

Introduction

Cathepsin D (CathD) is overexpressed and secreted by a number of solid tumors (breast, prostate, melanoma, colorectal cancer, glioma, etc.) and was shown to be involved in their progression and development of metastasis.^[1–6] In the clinic, elevated CathD levels are related to a poor prognosis in various cancers.^[7–11] At first recognized for its role in the degradation of proteins in lysosomes, CathD was also proposed to be responsible for more specific functions that control tissue regeneration^[12] and that regulate essential cellular processes^[13] such as the activation or regulation of various growth factors and/or the degradation of growth inhibitors,^[14–17] and the inactivation of chemokines involved in the antitumor immune response.^[18] CathD also contributes to the activation of anti-apoptotic proteins such as Aven and the induction of autophagy.^[19–24] Therefore, CathD constitutes a pertinent target in cancer; inhibition of its intracellular or extracellular proteolytic

activity could be an efficient way to help control or impede tumor growth.^[15,25–29] We previously reported that a cell-penetrating CathD inhibitor (JMV4463) exhibits potent anti-proliferative effects *in vitro* and delays tumor emergence and growth in tests with mice xenografted with breast cancer cells.^[30] Although CathD is present in all cells, the absence of observable toxicity toward normal human fibroblasts and in *in vivo* experiments indicates that targeting the overexpression of CathD in tumor cells can be considered as a selective strategy.

JMV4463 is composed of three main regions: 1) pepstatin, a potent CathD inhibitor ($K_D \sim 0.5$ nM),^[31,32] which only poorly penetrates cells by itself; 2) a tetramer of *ortho*-aminomethylphenylacetyl residues (AMPA₄), which belongs to a new class of vectors based on short oligomers of constrained dipeptide mimetics called cell-penetrating non-peptides (CPNP), which target the endolysosomal pathway;^[33] and 3) a hydrophilic moiety that improves aqueous solubility (Figure 1).

To determine the structural features required for efficient internalization and inhibition of tumor proliferation, we synthesized several analogues of JMV4463 (Table 1). In particular, we replaced the AMPA₄ vector with various cell-penetrating peptides (CPPs) and CPNPs. We also assessed the importance of the positions of the various components in the conjugate and that of the two statine residues of the pepstatin moiety.

[a] Dr. L. L. Vezenkov,⁺ C. A. Sanchez,⁺ Dr. V. Bellet,⁺ Dr. V. Martin, Dr. M. Maynadier, Dr. N. Bettache, Prof. V. Lisowski, Prof. J. Martinez, Dr. M. Garcia, Dr. M. Amblard, Dr. J.-F. Hernandez
Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM)
UMR5247 CNRS, Université de Montpellier, ENSCM, Faculté de Pharmacie
15 avenue Charles Flahault, 34093 Montpellier Cedex 5 (France)
E-mail: jean-francois.hernandez@univ-montp1.fr

[⁺] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201500457>: characterization (yields, HPLC, MS data) of conjugates 1–19, synthesis of Fmoc-LBD-OH 25, and ¹H NMR spectra of 25 and synthetic intermediates 23 and 24.



Figure 1. Structure of JMV4463, highlighting the hydrophobic, pepstatin, and AMPA₄ regions.

Results and Discussion

Design of bioconjugates 1–19

For solubility reasons, all bioconjugates except **12** and **13** contain a hydrophilic moiety composed of a D-arginine (arg) residue and a short poly(ethylene glycol) segment, 8-amino-3,6-dioxaoctanoyl (O₂Oc). For most of the conjugates this moiety was attached at the N terminus, but it was also placed at the C terminus in the reverse order (O₂Oc-arg, compound **9**) or partially moved (in compound **11**) (Table 1). Several analogues that differ from JMV4463 in the number of AMPA units (compounds **2–4** with 2, 3, and 5 units, respectively) were prepared in order to assess the optimal length required for efficient translocation and anti-proliferative activity. We also explored the significance of the position of the AMPA tetramer (AMPA₄) vector within the conjugate. A fully reversed conjugate (AMPA₄ at the N terminus, compound **9**) was prepared as well as a conjugate in which AMPA₄ was placed between the hydrophilic moiety and the inhibitor (compound **10**). The O₂Oc residue was moved as a spacer between pepstatin and the vector (compound **11**). Substitution of AMPA₄ with other vectors was also evaluated, including the highly charged and hydrophilic CPPs penetratin^[34] (**12**) and octaarginine (Arg₈)^[35] (**13**) as well as other uncharged CPNPs composed of D-benzothiazepine (DBT₄, compound **14**)^[33] or L-benzodiazepine (LBD₄, compound **15**). Finally, we explored the significance of the *ortho*-AMPA structure by preparing the corresponding analogues with the *meta*-AMPA (compound **16**) and *para*-AMPA (compound **17**) isomers. In the case of the CPP-containing bioconjugates **12** and **13**, the hydrophilic moiety was omitted because their vector moieties (penetratin, Arg₈, respectively) are themselves highly hydrophilic.

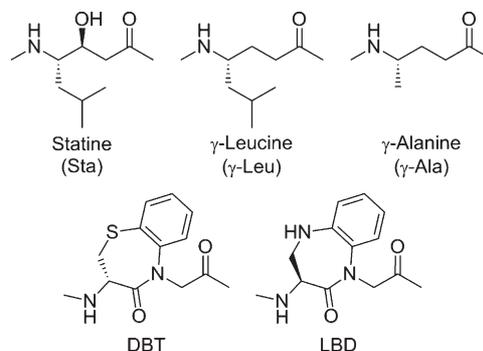


Figure 2. Structures of special residues contained in bioconjugates 1–19.

The pepstatin moiety was also modified (Figure 2). The hydroxy group of the statine residue is known to be crucial for the inhibition of aspartyl proteases like CathD. To evaluate the significance of CathD inhibition in the biological activity of JMV4463, the two statine residues of the pepstatin moiety were replaced with γ -leucine (compound **5**), a modification reported to lead to a less potent inhibitor,^[36] or with γ -alanine residues (compound **6**), which should further decrease the inhibitory activity. Such compounds should confirm the correlation between antiproliferative activity and CathD inhibition. The importance of each statine residue was also evaluated by replacing them with a γ -alanine residue (**7** and **8**). Finally, negative controls were included, which were previously shown to be non-cytotoxic.^[30] Compound **18** is composed of the hydrophilic and pepstatin moieties, but is unable to efficiently penetrate cells. Compound **19** is composed of the hydrophilic and AMPA₄ moieties and does not inhibit CathD.

Table 1. Structures of bioconjugates 1–19.

Compd	Structure	Compd	Structure
1 ^[a]	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMPA) ₄ -NH ₂	11	Ac-arg-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-O ₂ Oc-(AMPA) ₄ -NH ₂
2	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMPA) ₂ -NH ₂	12	Iva-(Val) ₂ -Sta-Ala-Sta-penetratin-NH ₂
3	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMPA) ₃ -NH ₂	13	Iva-(Val) ₂ -Sta-Ala-Sta-(Arg) ₈ -NH ₂
4	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(AMPA) ₅ -NH ₂	14	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(DBT) ₄ -NH ₂
5	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ - γ Leu-Ala- γ Leu-(AMPA) ₄ -NH ₂	15	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(LBD) ₄ -NH ₂
6	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ - γ Ala-Ala- γ Ala-(AMPA) ₄ -NH ₂	16	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(<i>m</i> AMPA) ₄ -NH ₂
7	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala- γ Ala-(AMPA) ₄ -NH ₂	17	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-(<i>p</i> AMPA) ₄ -NH ₂
8	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ - γ Ala-Ala-Sta-(AMPA) ₄ -NH ₂	18	Ac-arg-O ₂ Oc-(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-NH ₂
9	Ac-(AMPA) ₄ -(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-O ₂ Oc-arg-NH ₂	19	Ac-arg-O ₂ Oc-(AMPA) ₄ -NH ₂
10	Ac-arg-O ₂ Oc-(AMPA) ₄ -(Val) ₃ -Sta-Ala-Sta-NH ₂		

[a] Bioconjugate 1 = JMV4463.

All pepstatin conjugates containing a CPNP vector should be stable toward CathD, and no cleavage of either the vector or the hydrophilic moiety is expected before interaction of pepstatin with CathD. Indeed, the amide links between pepstatin and each surrounding moiety involve at least one non- α -amino acid residue. These conjugates should also be highly stable in cells toward any peptidase, although the Val₃ segment of pepstatin moiety could be considered as a potential cleavage site. All compounds were synthesized by standard solid-phase synthesis following the Fmoc strategy and using HBTU/DIEA for coupling, as previously described.^[30]

Inhibitory potency against purified CathD

We first assessed the inhibitory potency of the bioconjugates against purified CathD (Table 2). All compounds containing unmodified pepstatin (**1–4**, **9–18**) showed inhibitory activity similar to that of pepstatin A, as they exhibited comparable inhibition percentages at 10 μM (>90%) and 10 nM (>85%), indicating that the presence of the vectors and the hydrophilic moiety do not interfere with pepstatin recognition by the enzyme. As hypothesized, compound **5** containing two γ -leu-

cine residues in place of the two statines showed a lower inhibitory activity (~63% at 10 μM), while compound **6**, with two γ -alanine residues, exhibited almost no inhibition at the same concentration. Replacing only one statine residue by γ -alanine led to compounds **7** and **8** with inhibitory potencies similar to that of pepstatin A when tested at 10 μM . However, only compound **7** retained high inhibitory potency at 10 nM, similar to all pepstatin-containing compounds. These results indicate the important role of the first statine residue in the sequence of pepstatin for potent CathD inhibition. They are in agreement with previously published data concerning pepstatin A.^[37] Finally, IC₅₀ values were determined for representative compounds (**1**, **5–7**, **9**, and **18**) and were found to correlate with the values at 10 μM and 10 nM.

Capacity to penetrate cells: measurement of intracellular CathD activity

The ability of the compounds to penetrate cells was assessed with MDA-MB-231 tumor cells. After 24 h incubation at a concentration of 10 μM , the cells were washed, lysed, and supernatants were acidified and submitted to enzymatic tests to measure the levels of CathD inhibition (Table 2). The reported inhibition is only related to the ability of conjugates to penetrate cells, but does not indicate in which cell compartment they are localized. When comparing compounds **1–4**, which differ in the number of AMPA units present, only compounds **1** and **4** were found to potentially inhibit CathD proteolytic activity. This indicates that a minimum of four AMPA units is required to enable cell penetration. As expected, compound **5**, with two γ -leucine residues, showed low intracellular CathD inhibitory activity (~28%) in accordance with its low activity against isolated CathD, whereas compound **6**, with γ -alanine residues was found to be totally inactive. Compounds **7** and **8**, containing only one statine residue, were equally potent to **1** in inhibiting intracellular CathD activity. It is important to note that compound **8** showed >90% inhibition on living cells, although it was less potent than compounds **1** and **7** toward purified CathD at 10 nM. This suggests that the bioconjugate efficiently penetrates, allowing sufficiently high intracellular concentrations to be reached.

Overall, it is notable that the efficiency of AMPA₄ to deliver pepstatin was extremely high, as it allows a near total inhibition of the elevated CathD concentration ($\geq 50 \text{ pmol mg}^{-1}$ cellular proteins) present in these cancer cells. Compounds **9–11**, which differ from **1** by the order of their functional moieties (hydrophilic moiety, pepstatin, AMPA₄) gave disparate results. The presence of the vector at the N terminus (**9**) or at the C terminus (**11**) induced intracellular CathD inhibition similar to that of **1**. In the case of compound **11**, this result shows that it is possible to introduce a spacer between the vector and the enzyme inhibitor while maintaining intracellular delivery. However, insertion of the vector between the hydrophilic moiety and pepstatin (in **10**) abolished the activity, suggesting the inability of this bioconjugate to penetrate cells. We have shown that JMV4463 (**1**) penetrates cells via the endolysosomal pathway,^[30] but its mode of interaction with membranes and of in-

Table 2. Inhibition of proteolytic CathD activity by bioconjugates **1–19**.^[a]

Compd	IC ₅₀ [nM] ^[b]	Purified CathD Inhib. [%] ^[b]		Cell CathD Inhib. [%] ^[c]
		10 μM	10 nM	
1	2.30 ± 0.09	95 ± 2*	93 ± 1*	94 ± 4*
2	–	89 ± 7*	89 ± 1*	9 ± 19
3	–	84 ± 5*	90 ± 1*	2 ± 9
4	–	81 ± 3*	86 ± 7*	85 ± 8*
5	41.00 ± 1.76	63 ± 2*	22 ± 2	28 ± 11
6	> 10000	13 ± 5	7 ± 4	1 ± 9
7	4.40 ± 0.10	94 ± 2*	91 ± 2*	91 ± 4*
8	–	92 ± 1*	15 ± 8	96 ± 4*
9	1.10 ± 0.03	91 ± 1*	89 ± 1*	97 ± 2*
10	–	94 ± 5*	81 ± 7*	8 ± 8
11	–	91 ± 1*	88 ± 1*	95 ± 3*
12	–	90 ± 2*	85 ± 4*	91 ± 7*
13	–	93 ± 2*	80 ± 2*	85 ± 2*
14	–	92 ± 2*	88 ± 1*	98 ± 1*
15	–	94 ± 1*	90 ± 1*	78 ± 2*
16	–	92 ± 1*	90 ± 1*	98 ± 3*
17	–	92 ± 1*	86 ± 1*	93 ± 4*
18	2.80 ± 0.16	92 ± 3*	87 ± 1*	8 ± 14
19	–	1 ± 6	1 ± 4	6 ± 13
pepstatin A ^[d]	–	95 ± 1*	–	10 ± 10*
DMSO	–	0 ± 9	0 ± 8	0 ± 5

[a] The enzymatic activity of CathD was determined by FRET using a peptide substrate coupled to a fluorophore (EDANS) and a quencher (DABCYL), measured at λ 355 nm in a microtiter plate reader after 90 min incubation at 37 °C with 5 μM substrate at pH 3.5. Percent CathD inhibition is reported for bioconjugates **1–17** together with **18**, **19**, and 1% DMSO as negative controls. [b] Inhibition of CathD activity determined by incubation of isolated CathD (250 ng) with test compounds at either 10 μM or 10 nM final concentration in cell-free conditions; a 50–1 nM concentration range was used for IC₅₀ determination. [c] Inhibition of intracellular CathD: after incubation of MDA-MB-231 cells for 24 h with test compounds at 10 μM , cellular CathD activity was determined in 50 μg cellular proteins. Values are the mean \pm SD of three separate experiments; * p < 0.05 relative to DMSO control (Student t -test). [d] Data from Ref. [30].

ternalization has not yet been determined. It can be hypothesized that the highly hydrophobic AMPA₄ vector requires location at one end of the bioconjugate for efficient internalization, whereas the presence of the two neighboring moieties on both sides in compound **10** would prevent cell membrane interaction.

Finally, the ability of other vectors to translocate pepstatin into cells was evaluated. As expected, the CPPs penetratin (**12**) and polyarginine Arg₈ (**13**) enabled pepstatin to enter cells as indicated by the strong inhibition of intracellular CathD measured after cell lysis. In addition, the two CPNP vectors DBT₄ (**14**) and LBD₄ (**15**) also led to intracellular inhibition. The latter was found to be slightly less efficient (~78% inhibition for **15** instead of >94% for compounds **1** and **14**), suggesting that replacing the sulfur atom (DBT) with an NH group (LBD) led to lower penetration efficiency. Strikingly, bioconjugates **16** and **17** were found to be as efficient as compound **1** in inhibiting intracellular CathD, indicating that the *meta*- and *para*-AMPA tetramers (*m*AMPA₄ and *p*AMPA₄, respectively) are able to translocate pepstatin into cells. Interestingly, the vectors LBD₄, *m*AMPA₄ and *p*AMPA₄ have never been reported before, and the present results suggest that the family of CPNPs can be further broadened.

Toxicity toward cancer cells

The cellular toxicity of analogues at 10 μM was evaluated with MDA-MB-231 breast cancer cells after an incubation period of three days (Figure 3). As expected, bioconjugates **2**, **3**, **6**, **10** and the negative controls **18** and **19**, which were unable to inhibit intracellular CathD, were found to be non-cytotoxic. Consistent with its intermediate CathD inhibitory activity, compound **5** showed intermediate cytotoxicity. Therefore, the results obtained for compounds **1**, **5** (two γ-leucine residues), and **6** (two γ-alanine residues) showed that the antiproliferative effect of compound **1** (JMV4463) is related to intracellular CathD inhibition. For all other inhibitor conjugates shown to

enter cells (Table 2), the results highlight that their internalization does not necessarily lead to cytotoxicity.

Conjugates containing unmodified pepstatin or pepstatin with only one statine residue together with an AMPA_n (n=4,5) vector located at their C terminus (**4**, **7**, **8**, and **11**) exhibited cytotoxicity similar to that of JMV4463 (compound **1**). It is interesting to note that it was possible to introduce a spacer between the CathD inhibitor and the vector (compound **11**) without loss of activity and that only one statine residue (compounds **7** and **8**) was sufficient to induce cell toxicity. The latter result was further confirmed by comparing the activities of compounds **7** and **8** with that of **1** in a concentration–response experiment, which showed a very good superimposition of the three cytotoxicity curves (Figure 4).

However, changing the AMPA-based vector to a CPP (**12**, **13**) or a different CPNP (**14**, **15**) fully abolished cytotoxicity. More strikingly, isomers **16** and **17** were found to be non-cytotoxic, showing that the *ortho* arrangement of the AMPA aminomethyl and acetyl groups is crucial. These results might be ex-

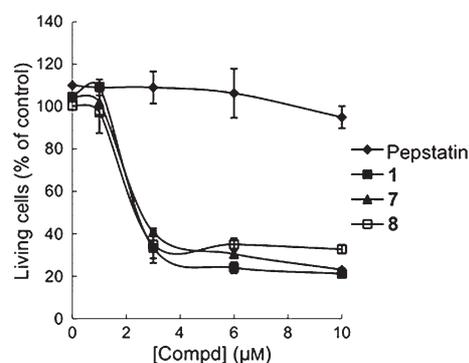


Figure 4. Viability of MDA-MB-231 breast cancer cells. Cells were treated with pepstatin (control) and with compounds **1**, **7**, and **8** for three days, all at 1, 3, 6, and 10 μM. Growth was evaluated by MTT assay as described in the Experimental Section. Values are expressed as a percentage of control cells treated with vehicle alone (1% DMSO) and are the mean ± SD of three independent experiments.

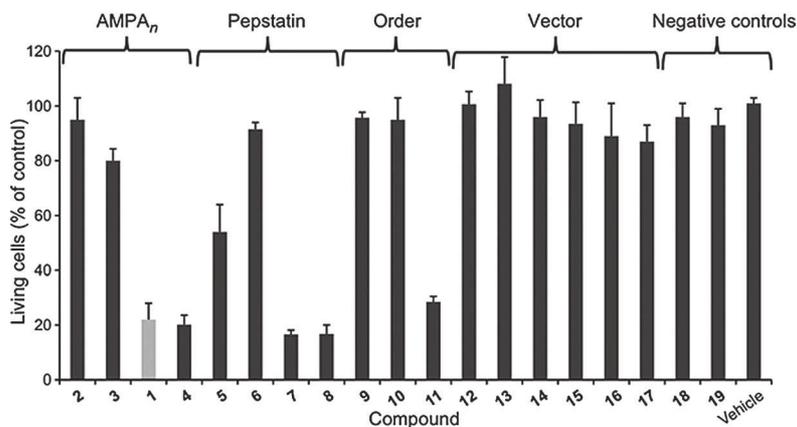


Figure 3. Cytotoxicity of compounds **1**–**19** toward MDA-MB-231 breast cancer cells. Cells were treated with each compound at 10 μM for three days, and growth was evaluated by MTT assay as described in the Experimental Section. All values are expressed as a percentage of control cells treated with vehicle alone (1% DMSO) and are the mean ± SD of three independent experiments. The different types of structural variations are indicated at top (AMPA_n: variable AMPA oligomer length, Pepstatin: substitution of statine residues, Order: order of the three functional moieties, Vector: vectors other than AMPA₄).

plained by an insufficient addressing of these conjugates to the CathD-containing compartment and/or to a rapid externalization from endosomes following endocytosis. In the case of the DBT₄-containing bioconjugate **14**, its inactivity on cell growth was unexpected, as the DBT vector was shown to very efficiently penetrate cells via the endolysosomal pathway.^[33] The reasons for this behavior are unclear, but it is clear that AMPA₄ possesses specific properties not shared by other vectors. Compound **9**, which presents a reverse composition relative to **1**, was shown to penetrate cells (Table 2), but is not cytotoxic. This result indicates that the position of the AMPA₄ vector is crucial, as already highlighted by the results obtained with the non-cell-penetrating compound **10**. Altogether, these results suggest that a restrictive and specific mode of interaction between CathD and its inhibitor occurs inside the cell compartment, which could be achieved only by bioconjugates containing the AMPA₄ vector at the C terminus.

Conclusions

This structure–activity study points to a major role of the catalytic activity of intracellular CathD in the proliferation of breast cancer cells and to the critical importance of the AMPA₄ vector. In addition, we found it possible to remove one of the two statine residues of the pepstatin moiety, allowing a more economical chemical synthesis.

Concerning the pepstatin moiety of the conjugate, its relevance in antiproliferative activity is clearly evidenced by the loss of activity resulting from substitution of both statine residues with non-hydroxylated γ -amino acids. This lends significant support to previous studies, indicating that the mitogenic activity of CathD is at least partially due to its catalytic activity either by activation of growth factor precursors or by inactivation of growth inhibitors.^[14–16] JMV4463 is an inhibitor of CathD catalytic activity with high clinical potential and is also a highly valuable tool to explore the mechanisms of cancer cell proliferation involving intracellular CathD.

The translocation of pepstatin bioconjugates into cells was enabled by all selected vectors, but their antiproliferative activity was strictly dependent on the structure of the vector and its position. It is clear that AMPA₄ possesses a unique mode of action, the mechanism of which is not yet understood. This finding suggests that the structure of AMPA₄ imparts the bioconjugate with the capacity to prevent the proteolysis of critical substrates involved in cell proliferation. CathD is considered a multifunctional enzyme, and its precursor pro-CathD undergoes several steps of maturation during cell trafficking, and several binding partners have also been identified.^[13] CathD could perform various functions during the cell trafficking. In addition, active but not fully matured forms of CathD, such as the 48 kDa form, are present in endosomes and they probably contribute to these functions. We therefore hypothesize that thanks to the AMPA₄ vector, JMV4463 can more efficiently recognize immature forms of CathD and/or localize more efficiently in the CathD-containing compartment involved in the observed effect. These hypotheses are now under investigation to understand the specific role of the vector.

Experimental Section

Synthesis of compounds 1–19

Fmoc-protected amino acid derivatives, HBTU and Fmoc Rink amide polystyrene resin (100–200 mesh, 0.46 mmol g⁻¹) were purchased from Iris Biotech. Fmoc-(3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-5-cyclohexylpentanoic acid (Fmoc-statine), Fmoc- γ Leu-OH and Fmoc- γ Ala-OH were purchased from NeomPS (Strasbourg, France). Other reagents and solvents were purchased from Riedel-de-Haën, Carlo Erba or Acros organics and used without purification. Solvents used for HPLC and LC–MS were of HPLC grade. All final compounds were purified by reversed-phase HPLC, and the purity assessed by analytical reversed-phase HPLC was found to be > 95%. Fmoc-AMPA-OH and Fmoc-DBT-OH were prepared as previously described.^[38,39] The synthesis of Fmoc-LBD-OH (compound **25**) is described in the Supporting Information.

Anchoring on Rink amide PS resin. Fmoc-Rink amide resin was conditioned for 30 min in DMF and submitted to the standard deprotection cycle, using DMF/piperidine (80:20 v/v) solution for 30 min. After washing steps, the first residue was loaded onto the resin through a standard coupling cycle.

Coupling. The coupling reaction was carried out manually in plastic syringes equipped with frits. HBTU (3 equiv) as coupling agent, DIEA (3 equiv) as base, and Fmoc-AA-OH (3 equiv) (according to resin loading) were dissolved in DMF and added to the resin. The reaction was stirred for 3 h at room temperature. The reaction was monitored by the standard TNBS test.^[40]

Deprotection. Fmoc group removal of Fmoc-protected amino acids, except Fmoc-AMPA-OH, was carried out using DMF/piperidine (80:20 v/v) solution twice for 30 min. Fmoc group removal of Fmoc-AMPA-OH was carried out using a solution of DMF/piperidine/DBU (92:4:4 v/v/v) twice for 30 min.

Washing steps were performed after each coupling and deprotection step. Once with MeOH, once with CH₂Cl₂, three times with DMF, and three times again with CH₂Cl₂.

Cleavage of Rink amide PS resin. Bioconjugates were simultaneously cleaved from resin and deprotected for 2 h in a mixture of TFA, TIS, and H₂O (95:2.5:2.5 v/v/v). After removal of the resin by filtration, the TFA was concentrated in vacuo. Compounds were precipitated by the addition of Et₂O and filtered. They were dissolved in a solution of CH₃CN/H₂O (50:50 v/v) containing 0.1% TFA and freeze dried.

Purification. All bioconjugates were purified by preparative HPLC (Waters 4000 apparatus) carried out on a C₁₈ reversed-phase column (C₁₈ Deltapak column, 100 mm × 40 mm, 15 μ m, 100 Å) with a mixture of H₂O + 0.1% TFA and CH₃CN + 0.1% TFA in gradient mode at a flow rate of 50 mL min⁻¹ with UV detection at λ 214 nm. HPLC and MS analytical data of the bioconjugates **1–19** are given in Supporting Information Table 1.

Biological evaluation

Cell culture and viability assay. Human breast MDA-MB-231 cancer cell lines were purchased from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and were allowed to grow in a humidified atmosphere at 37 °C under 5% CO₂. MDA-MB-231 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cell viability was assessed in 96-well plates by the MTT method after treatment of ad-

herent cells with compounds or with 1% DMSO (vehicle) for three days. A solution of MTT (0.5 mg mL^{-1}) was added to each well and incubated for 4 h. The MTT-formazan product was dissolved in EtOH/DMSO (50:50) and estimated by measuring absorbance at λ 540 nm in a Multiskan FC plate reader (Fisher Scientific, Illkirch, France).

CathD proteolytic activity. To detect CathD protease activity, Förster resonance energy transfer (FRET) was used. A fluorophore (EDANS) and a quencher (DABCYL) dye were coupled to the C- and N-terminal ends of a peptide substrate highly selective for CathD. On intact peptides, the emission energy of the fluorophore was captured by the quencher. Following cleavage of the substrate, the quencher is no longer able to absorb the fluorescent energy of the fluorophore, and this increase in fluorescence was measured. The FRET substrate for CathD (JMV3672, DABCYL- β Ala-Arg-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Asp(EDANS)-NH₂) was not commercially available and was synthesized according to standard procedures. The peptide sequence used was reported to be cleaved by CathD, but not by other cathepsins.^[41] In the first case, purified recombinant human CathD (250 ng) was incubated in 0.1 M citrate buffer (pH 3.5) with $10 \mu\text{M}$ and 10 nM compounds as described.^[41] In the second case, the compounds were incubated for 24 h with living cells, then cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), lysed and supernatants used for FRET analysis. The substrate (final concentration $5 \mu\text{M}$) was then incubated at 37°C with $20 \mu\text{L}$ of cell lysate supernatants at pH 3.5. After 90 min, the plate was read in a PerkinElmer 1420 Victor 2 fluorescent plate reader at $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$. The background fluorescence of the FRET substrate was later subtracted out. Results were presented as percent of inhibition of CathD activity.

Abbreviations. AMPA: *ortho*-aminomethylphenylacetyl, CathD: cathepsin D, CPNP: cell-penetrating non-peptide, CPP: cell-penetrating peptide, DABCYL: 4-[(4-(dimethylamino)phenyl)azo]benzoyl, DBT: *D*-benzothiazepine, DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, DIEA: *N,N*-diisopropylethylamine, DMF: *N,N*-dimethylformamide, DMSO: dimethyl sulfoxide, EDANS: 5-[(2-aminoethyl)amino]naphthalene-1-sulfonyl, Fmoc: 9-fluorenylmethoxycarbonyl, HBTU: *N*-[(1*H*-benzotriazol-1-yloxy)(dimethylamino)methylene]-*N*-methylmethanaminium hexafluorophosphate, LBD: *L*-benzodiazepine, MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, O₂C: 8-amino-3,6-dioxaoctanoyl, PS: polystyrene, TFA: trifluoroacetic acid, TIS: triisopropylsilane, TNBS: trinitrobenzenesulfonic acid.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS, Montpellier University, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DCM20121225739), and by the Région Languedoc-Roussillon ("Chercheur d'avenir" 2011 grant to V.L.). We also thank Pierre Sanchez (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier) for mass spectrometry analyses.

Keywords: antiproliferation • cathepsin D • cell-penetrating non-peptides • pepstatin delivery • structure–activity relationships

- [1] H. Rochefort, F. Capony, M. Garcia, V. Cavaillès, G. Freiss, M. Chambon, M. Morisset, F. Vignon, *J. Cell. Biochem.* **1987**, *35*, 17–29.
[2] I. Bartenjev, Z. Rudolf, B. Stabuc, I. Vrhovec, T. Perkovic, A. Kinsky, *Int. J. Dermatol.* **2000**, *39*, 599–602.

- [3] E. Liaudet-Coopman, M. Beaujouin, D. Derocq, M. Garcia, M. Glondu-Lassis, V. Laurent-Matha, C. Prébois, H. Rochefort, F. Vignon, *Cancer Lett.* **2006**, *237*, 167–179.
[4] C. Kirana, H. Shi, E. Laing, K. Hood, R. Miller, P. Bethwaite, J. Keating, T. W. Jordan, M. Hayes, R. Stubbs, *Int. J. Proteomics* **2012**, *2012*, 245819.
[5] P. Benes, V. Vetvicka, M. Fusek, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2008**, *68*, 12–28.
[6] F. L. Pruitt, Y. He, O. E. Franco, M. Jiang, J. M. Cates, S. W. Hayward, *Prostate* **2013**, *73*, 476–488.
[7] G. Ferrandina, G. Scambia, F. Bardelli, P. Benedetti Panici, S. Mancuso, A. Messori, *Br. J. Cancer* **1997**, *76*, 661–666.
[8] J. A. Foekens, M. P. Look, J. Bolt de Vries, M. E. Meijer van Gelder, W. L. van Putten, J. G. Klijn, *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 300–307.
[9] M. E. Fukuda, Y. Iwadate, T. Machida, T. Hiwasa, Y. Nimura, Y. Nagai, M. Takiguchi, H. Tanzawa, A. Yamaura, N. Seki, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5190–5194.
[10] T. Mima, K. Tsuta, A. M. Maeshima, M. Okada, H. Asamura, T. Kondo, H. Tsuda, *Pathol. Res. Pract.* **2012**, *208*, 534–540.
[11] Y. Chai, W. Wu, C. Zhou, J. Zhou, *Arch. Gynecol. Obstet.* **2012**, *286*, 465–471.
[12] P. Saftig, M. Hetman, W. Schmahl, K. Weber, L. Heine, H. Mossman, A. Köster, B. Hess, M. Evers, K. von Figura, *EMBO J.* **1995**, *14*, 3599–3608.
[13] Z. Khalkhali-Ellis, M. J. C. Hendrix, *Biol. Med.* **2014**, *6*, 206.
[14] P. Nirdé, D. Derocq, M. Maynadier, M. Chambon, I. Basile, M. Gary-Bobo, M. Garcia, *Oncogene* **2010**, *29*, 117–127.
[15] V. Laurent-Matha, P. F. Huesgen, O. Masson, D. Derocq, C. Prébois, M. Gary-Bobo, F. Lecaille, B. Rebière, G. Meurice, C. Oréar, R. E. Hollingsworth, M. Abrahamson, G. Lalmanach, C. M. Overall, E. Liaudet-Coopman, *FASEB J.* **2012**, *26*, 5172–5181.
[16] T. Bräulke, M. Claussen, P. Saftig, M. Wendland, K. Neifer, B. Schmidt, J. Zapf, K. von Figura, C. Peters, *Prog. Growth Factor Res.* **1995**, *6*, 265–271.
[17] C. A. Conover, D. D. De Leon, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 7076–7080.
[18] L. Hasan, L. Mazzucchelli, M. Liebi, M. Lis, R. E. Hunger, A. Tester, C. M. Overall, M. Wolf, *J. Immunol.* **2006**, *176*, 6512–6522.
[19] T. Berg, T. Gjøen, O. Bakke, *Biochem. J.* **1995**, *307*, 313–326.
[20] M. Garcia, N. Platet, E. Liaudet, V. Laurent, D. Derocq, J. P. Brouillet, H. Rochefort, *Stem Cells* **1996**, *14*, 642–650.
[21] I. M. Melzer, S. B. Fernández, S. Bösser, K. Lohrig, U. Lewandrowski, D. Wolters, S. Kehrloesser, M. L. Brezniceanu, A. C. Theos, P. M. Irueta, F. Impens, K. Gevaert, M. Zörnig, *Cell Death Differ.* **2012**, *19*, 1435–1445.
[22] Y.-S. Hah, H. S. Noh, J. H. Ha, J. S. Ahn, J. R. Hahm, H. Y. Cho, D. R. Kim, *Cancer Lett.* **2012**, *323*, 208–214.
[23] P. Montcourrier, P. H. Mangeat, G. Salazar, M. Morisset, A. Sahuquet, H. Rochefort, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 6045–6054.
[24] H. Wallin, M. Abrahamson, U. Ekström, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 17019–17029.
[25] M. Glondu, E. Liaudet-Coopman, D. Derocq, N. Platet, H. Rochefort, M. Garcia, *Oncogene* **2002**, *21*, 5127–5134.
[26] O. Masson, A. S. Bach, D. Derocq, C. Prébois, V. Laurent-Matha, S. Pattin-gre, E. Liaudet-Coopman, *Biochimie* **2010**, *92*, 1635–1643.
[27] Y. Liu, Y. Zhou, K. Zhu, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e45910.
[28] M. Maynadier, R. Farnoud, P. J. Lamy, V. Laurent-Matha, M. Garcia, H. Rochefort, *Int. J. Oncol.* **2013**, *43*, 1683–1690.
[29] O. Achour, N. Bridiau, M. Kacem, R. Delatouche, S. Bordenave-Juchereau, F. Sannier, V. Thiéry, J. M. Piot, T. Maugard, I. Arnaud, *Biochimie* **2013**, *95*, 2010–2017.
[30] M. Maynadier, L. L. Vezenkov, M. Amblard, V. Martin, C. Gandreuil, O. Vaillant, M. Gary-Bobo, I. Basile, J.-F. Hernandez, M. Garcia, J. Martinez, *J. Controlled Release* **2013**, *171*, 251–257.
[31] H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, M. Matsuzaki, M. Hamada, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 259–262.
[32] C. G. Knight, A. J. Barrett, *Biochem. J.* **1976**, *155*, 117–125.
[33] L. L. Vezenkov, M. Maynadier, J.-F. Hernandez, M.-C. Averlant-Petit, O. Fabre, E. Benedetti, M. Garcia, J. Martinez, M. Amblard, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1850–1854.
[34] A. Joliot, A. Prochiantz, *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 189–196.
[35] P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13003–13008.
[36] D. H. Rich, E. Sun, J. Singh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *74*, 762–767.

- [37] P. Majer, J. R. Collins, S. V. Gulnik, J. W. Erickson, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1458–1466.
- [38] M. Amblard, M. Calmès, V. Roques, S. Tabet, A. Loffet, J. Martinez, *Org. Prep. Proced. Int.* **2002**, *34*, 405–415.
- [39] N. Raynal, M.-C. Averlant-Petit, G. Berge, C. Didierjean, M. Marraud, C. Duru, J. Martinez, M. Amblard, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1787–1790.
- [40] W. S. Hancock, J. E. Battersby, D. R. K. Harding, *Anal. Biochem.* **1975**, *69*, 497–503.
- [41] P. E. Scarborough, K. Guruprasad, C. Topham, G. R. Richo, G. E. Conner, T. L. Blundell, B. M. Dunn, *Protein Sci.* **1993**, *2*, 264–276.

Received: October 6, 2015

Revised: November 19, 2015

Published online on December 7, 2015

Développement de vecteurs de pénétration intracellulaire pour un adressage d'inhibiteurs de la cathepsine D.

Résumé

La Cathepsine D (CathD) est une protéase lysosomale surexprimée et sécrétée par de nombreuses tumeurs solides. Cette enzyme favorise la prolifération tumorale et le processus métastatique, faisant d'elle une cible intéressante pour la thérapie anticancéreuse. Il existe un très bon inhibiteur de la CathD, la pepstatine, mais celui-ci traverse trop difficilement la membrane cellulaire pour être actif. C'est pourquoi des vecteurs de pénétration cellulaire, basés sur l'oligomérisation de mimes contraints de dipeptide, ont été développés au laboratoire. De ce travail, un bioconjugué, le JMV4463, a été développé. Composé d'un vecteur AMPA₄ (tétramère de l'acide 2-(aminométhyl)phénylacétique), de la pepstatine, et d'une partie hydrophile aidant à la solubilisation du conjugué, ce bioconjugué est capable d'entrer dans les cellules et possède une activité antiproliférative sur différentes lignées de cellules cancéreuses. Partant de ce travail, la synthèse de nouveaux vecteurs potentiels de pénétration cellulaire, oligomères de mimes contraints de dipeptide, a été réalisée. Leur capacité d'internalisation a été établie sous la forme de conjugués avec la pepstatine. Les monomères envisagés étaient des analogues des motifs AMPA et acide (S)-2-(3-amino-4-oxo-3,4-dihydrobenzo[b][1,4]thiazépin-5(2H)-yl)acétique (DBT), motif ayant également montré une importante capacité d'internalisation. Ainsi, des analogues de l'AMPA en série indole, pyrrole et cyclohexane ont été préparés. De plus, la synthèse d'analogues de l'AMPA possédant différentes substitutions a été réalisée, tels que les *mé*ta- et *para*-AMPA, un homologue inférieur ou les 4,5-diméthoxy-, 4,5-dihydroxy- et 4-bromo-AMPA. Un analogue en série benzodiazépine du DBT a également été étudié. Tous les vecteurs correspondants sont capables d'internaliser la pepstatine dans les cellules mais, de façon surprenante, aucun des conjugués n'a montré d'activité antiproliférative, indiquant un rôle essentiel du vecteur AMPA₄. Une étude des relations structure / activité du JMV4463 a confirmé que le vecteur AMPA₄ possédait un mode d'action unique mais celui-ci n'a pu être identifié à ce jour. Dans cette étude, il a également été montré qu'il était possible de simplifier la structure de la pepstatine, en remplaçant un de ses motifs statine par un motif γ -alanine, permettant un coût de production réduit. Enfin, une étude *in vivo* sur un modèle xénotreffé de souris a montré un fort potentiel anti-tumoral du conjugué JMV4463.

Mots clés : mimes contraint de dipeptide, Cathepsine D, pepstatine, vecteur, cancer, AMPA.

Development of cell penetration vectors for an intracellular cathepsin D inhibitor delivery.

Summary

Cathepsin D (CathD) is an overexpressed lysosomal protease secreted by several solid tumors. This enzyme is involved in tumor proliferation and metastasis, which makes it a promising target for cancer therapy. There exists a potent CathD inhibitor called Pepstatin, but it presents a too poor ability to cross the plasmic membrane in order to be active. To overcome this drawback, the development of cell penetrating vectors based on the oligomerization of constrained dipeptide mimetics has been undertaken in our lab. From this work, the bioconjugate JMV4463 has been developed. This bioconjugate is made of an AMPA₄ (2-(aminomethyl)phenylacetic acid) vector, the pepstatin and a hydrophilic part which increases its solubility. This bioconjugate is able to penetrate the cells and has an antiproliferative effect on different cancer cell lines. Based on this work, synthesis of new potential cell penetrating vectors, oligomers of constrained dipeptide mimetics, was performed. Their internalization ability was established as their conjugate with pepstatin. We developed analogues of AMPA scaffold and (S)-2-(3-amino-4-oxo-3,4-dihydrobenzo[b][1,4]thiazépin-5(2H)-yl)acetic acid (DBT), which showed an important internalization ability. Thus, AMPA derivatives in indole, pyrrole and cyclohexane series were prepared. Furthermore, the synthesis of AMPA analogues having different substitutions on its aromatic part was performed, such as *meta*- and *para*-AMPA, an inferior homologue or 4,5-dimethoxy-, 4,5-dihydroxy- and 4-bromo-AMPA. An analogue of DBT in the benzodiazepin series has also been studied. All the corresponding vectors were able to internalize the pepstatin into the cells. Surprisingly, none of the conjugates showed an anti-proliferative activity, indicating the essential role of the AMPA vector. A structure/activity relationships study was performed for JMV4463. The obtained results confirmed that the AMPA vector has a unique mode of action that has not been identified yet. Furthermore, it has been demonstrated that it was possible to simplify the pepstatin structure by replacing one of its statin residues by a gamma alanine, which allows decreasing the production cost. Finally, an *in vivo* study on a xenografted mouse model showed a high anti-tumour potential for the JMV4463 conjugate.

Key-words : constrained dipeptide mimetics, Cathepsin D, pepstatine, vector, cancer, AMPA.