HAL
open science

Conception, synthèse et activité biologique de vecteurs peptidiques pour le ciblage et/ou la thérapie du cancer

Fabien Thoreau

To cite this version:

Fabien Thoreau. Conception, synthèse et activité biologique de vecteurs peptidiques pour le ciblage et/ou la thérapie du cancer. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV006 . tel-01686229

HAL Id: tel-01686229

https://theses.hal.science/tel-01686229v1

Submitted on 17 Jan 2018

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.

Communauté UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie et Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Fabien THOREAU

Thèse dirigée par **Didier BOTURYN** et
codirigée par **Jean-Luc COLL**

préparée au sein des laboratoires **DCM** et **IAB**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Conception, synthèse et activité biologique de vecteurs peptidiques pour le ciblage et/ou la thérapie du cancer.

Thèse soutenue publiquement le **04 Janvier 2017**
devant le jury composé de :

Mme. Céline DOUAT
Chargée de Recherche, Université de Bordeaux, Rapporteur
Mr. Sébastien PAPOT
Professeur, Faculté des Sciences de Poitiers, Rapporteur
Mr. Ahcène BOUMENDJEL
Professeur, Université Grenoble-Alpes, Président
Mr. Frédéric DUCONGE
Chercheur CEA, CEA Orsay, Membre

REMERCIEMENTS

L'heure est venue pour moi de rédiger l'ultime chapitre de cette thèse, elle-même chapitre d'une vie. Celui des remerciements aux nombreuses personnes sans qui ces trois ans et demi auraient été impossibles, ou beaucoup moins agréables. Ça risque d'être long, mais j'aimerais n'oublier personne.

Pour commencer, je remercie l'école doctorale EDCSV qui a financé cette thèse.

Je remercie aussi les personnes qui ont accepté d'examiner ou rapporter cette thèse et qui ont composé le jury lors de la soutenance :

- *Mme. Céline Douat, Chargée de Recherche, Université de Bordeaux.*
- *Mr. Sébastien Papot, Professeur, Faculté des Sciences de Poitiers.*
- *Mr. Ahcène Boumendjel, Professeur, Université Grenoble-Alpes.*
- *Mr. Frédéric Ducongé, Chercheur CEA, CEA Orsay.*

Evidemment, je remercie mes deux directeurs de thèse, Didier Boturyn et Jean-Luc Coll, qui m'ont permis d'obtenir cette thèse.
Plus particulièrement, je remercie Didier pour sa gentillesse, la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordées, tout en restant disponible à chaque instant.
Je remercie Jean-Luc pour sa sympathie, son écoute, et tout ce qu'il a pu m'apprendre.

Je remercie l'ensemble de mes collègues biologistes de l'équipe 5, qui ont toujours bien accueilli le chimiste que je suis. En particulier, je remercie Maxime, Laetitia, Thibault, Sandrine, Morgane, Mélanie, Tao, Yoon et Véronique qui ont tous eu à un moment donné la patience et la gentillesse de m'aider pour des manips, un projet, ou ne serait-ce qu'au détour d'une conversation.

Je ne peux que remercier mes collègues chimistes (et biologistes pour faire plaisir à Mr. Benjamin L.) de l'équipe I_2BM pour leur gentillesse, leur sociabilité et leur disponibilité dont découle une ambiance de travail idéale. Je devrais presque citer tous les permanents de l'équipe qui m'ont apporté à un moment donné leurs conseils et leur expérience pour un projet, une candidature de post-doc, les répétitions de soutenance, une tactique de football, allumer/éteindre la lumière... Merci à tous, pour tout.
Merci aussi à Régine, que j'ai si souvent embêtée pour de l'administratif et qui a toujours répondu présente et avec le sourire. Merci à l'équipe BEA, nos voisins du dessous, que j'ai pu côtoyer lors des repas, des matchs de foot, ou de session wii® enflammées.
Je remercie aussi Mélissa, Mickaël et Adrien qui m'ont mis le pied à l'étrier lorsque je suis arrivé en thèse.

Une personne (mon oncle J-M. T. pour ne pas le citer) a dit :

« Fais de ta passion ton métier, et tu ne travailleras plus jamais ».

*Je pense que ce fut le cas pour moi pendant cette thèse, que j'ai adorée. Mais travailler avec des collègues c'est bien, le faire avec des amis c'est mieux. Et pour ça je ne remercierai jamais assez mes collègues thésards et post-doc : Adrien (le citadin), Dhruv (l'allégorie de la gentillesse), Marc (le fu***** Américain), Hugues (le chevelu), Noémie (la best), Fatima (la lyonnaise !), Laurent (le Lyonnais !, ou Tamalou2), Laureen (Général maman happy), Carlito (le bel Italien), Benjamin (change rien frer'enh), David (finalement il est gentil), Eugénie (l'artiste, volcan endormi), Fabien (jeunot dans l'âme), Andrew (so British), Claude (le Glaude), Joao (POR-TU-GAL !!), Claire (vegan1) et Datchi (vegan2).*
Merci pour les discussions, les rigolades et les « franches camaraderies ». Vous allez vraiment me manquer.

Enfin, il n'y a pas que le boulot dans la vie. Merci donc à tous les amis qui ont jalonné ce parcours : des historiques « copains de Paul », en passant par « les crazys du baby », les Nantais, mais aussi tous les amis que nous nous sommes faits sur Grenoble. Merci donc à la bande des infirmiers.
Plus particulièrement, un magnifique et légendaire merci à Gaëlle, Camille, Loïc et Alex, notre famille Grenobloise.

Un grand merci à ma famille et ma belle-famille. Un inconditionnel remerciement à mes parents, qui donnent la force d'avancer car ils ont toujours été là, et le seront toujours. Merci à mon frère Gaël et ma sœur Delphine, les supporter m'a certainement inculqué la patience, les côtoyer est dorénavant un plaisir et un besoin.

Pour terminer, merci à Justine, qui a fait de nombreux sacrifices pour me suivre, qui a enduré mes horaires de travail imposants, qui est un support inconditionnel et sans faille et qui surtout, rend ma vie plus belle encore.

MERCI

ABREVIATIONS *7*

INTRODUCTION..... *9*

1. La vectorisation en cancerologie.....**13**
A. Généralités sur le cancer 13
i. Genèse et développement du cancer 13
ii. Thérapies du cancer.....24
B. Principe général de la vectorisation.....27
C. Vectorisation passive et microenvironnement tumoral 29
i. L'effet EPR 29
ii. Les enzymes.....31
D. Vectorisation active : cibles tumorales et motifs de ciblage 33
i. Les systèmes de transport 33
ii. Récepteurs membranaires 40
iii. Récapitulatif des agents de ciblage pour la vectorisation.....50

2. Outils pour la vectorisation.....**51**
A. Les différentes formes/structures de vecteur 51
i. Structures « simples » : Peptides, sucres, ADN, anticorps. 51
ii. La Multivalence. 52
iii. Châssis moléculaires.....54
iv. Polymères linéaires et dendrimères 56
v. Nanoparticules 58
B. Méthode de ligation vecteur – cargo 62
i. Liaisons chimiques traditionnelles 62
ii. Ligations chimiosélectives 63

3. Exemples de vectorisation appliquée au traitement/diagnostic du cancer.. 75
A. Vecteurs en Imagerie.....75
B. Vecteurs pour la Thérapie.....77

4. Objectif des travaux de thèse 80

PARTIE I : Synthèse et activité biologique de vecteurs de double ciblage pour l'imagerie optique de la périphérie tumorale..... 83

1. Concepts et objectifs du projet..... 85
A. Ciblage simultané des récepteurs intégrines αvβ3 et NRP1.....86
i. Intégrine αvβ3 et cancer.....86
ii. Mieux exploiter l'intégrine αvβ3 grâce au double ciblage 93
iii. Le récepteur Neuropiline-1 crosstalk avec l'intégrine $\alpha v\beta_3$.....95
B. Etat de l'art du ciblage de intégrine $\alpha v\beta_3$ et/ou NRP1 101
C. Conception de vecteurs de double ciblage 104

2. Synthèses des vecteurs fluorescents 113

A. Principe de la synthèse peptidique 114
B. Incorporation de building blocks pour des réactions de ligation 115
i. Acides aminés modifiés pour la ligation éther d'oxime 116
ii. Acides aminés modifiés pour la ligation par cycloaddition de Huisgen 119
iii. Synthèse d'un châssis moléculaire comportant plusieurs acides aminés modifiés 121
C. Synthèse des vecteurs peptiques ciblant l'intégrine $\alpha v\beta_3$. 125
i. Synthèse du châssis composé de quatre oxyamines protégées. 125
ii. Synthèse des ligands c[-RXGfK-] avec une fonction aldéhyde. 126
iii. Synthèse du châssis RAFT(4-c[RXDfK])NH_2 par ligation oxime 128
iv. Synthèse des molécules RAFT(4-c[RXDfK])$Cy_{5.5}$ 130
D. Synthèse des vecteurs peptiques ciblant la Neuropiline-1 132
i. Synthèse des ligands Ahx-ATWLPPR et Ahx-LWRPTPA 133
ii. Ligands Ahx-ATWLPPR et Ahx-LWRPTPA avec une Cy5.5 134
iii. Synthèse du ligand ATWLPPR présentant une fonction aldéhyde glyoxilique 135
iv. Synthèse du châssis RAFT(4-ATWLLPR)NH_2 par ligation oxime 137
v. Synthèse du composé RAFT(4-ATWLLPR)Cy5.5 139
E. Synthèse de composés pour le double ciblage simultané des récepteur Intégrine $\alpha_v\beta_3$ et Neuropiline-1 141
i. Synthèse d'un châssis RAFT(4-acétimidate)-NHBoc-alcyne 141
ii. Synthèse d'un châssis RAFT possédant quatre ligands c[RGDfK], une fonction amine et une fonction alcyne 142
iii. Synthèse d'un châssis RAFT possédant quatre ligands c[RGDfK], une fonction alcyne et un fluorophore Cy5.5 144
iv. Synthèse du ligand ATWLPPR avec un linker PEGn-N3. 145
v. Synthèse finale des vecteurs RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEGnATWLPPR 147
vi. Synthèse du châssis RAFT(4-ATWLPPR)-PEG(n)N3 150
vii. Synthèse finale des RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEGn-RAFT(4-ATWLPPR) 153

3. Tests biologiques 159
A. In vitro 159
i. Cytométrie de flux 159
ii. Microscopie Confocale : Etude du marquage de fluorescence 172
iii. Western Blot : Etude des voies de signalisation 181
iv. In cell ELISA test. 187
v. Conclusion des tests *in vitro* 192
B. Tests in vivo et ex vivo 194
i. Imagerie optique *in vivo* 194
ii. Analyses *ex vivo* après sacrifice des souris 206
iii. Conclusion des tests *in vivo* et *ex vivo* 213
C. Conclusion des tests biologiques 214

4. Conclusion et perspectives du projet de double ciblage 217

Partie II : Application du scaffold(4-c[RGDfK]) pour des projets de diagnostic et thérapie du cancer 221

1. Exploitation du vecteur RAFT(4-c[RGDfK]) pour des applications thérapeutiques anticancéreuses. 225
A. Projet RAFT(4-c[RGDfK])porocombo : vectorisation d'un agent proapoptotique 225
i. Objectif du projet 225

ii. Synthèses 227
iii. Activité *in vitro* et *in vivo* du RAFT(4-c[RGDfK])Poro2 229
iv. Conclusion 232
B. Projet RAFT(4-c[RGDfK])-DHP : Vectorisation d'un photosensibilisateur pour la photothérapie 233
i. Objectifs du projet 233
ii. Tests biologiques 236
iii. Conclusion 239
C. Projet RAFT(4-c[RGDfK])-cryptophycine 240
i. Objectifs du projet 240
ii. Synthèses 241

2. Exploitation du vecteur RAFT(4-c[RGDfK]) pour des applications diagnostiques en cancérologie. 243
A. Synthèse et fonctionnalisation contrôlées de SiNP-RAFT(RGD) fluorescentes 243
i. Principe du projet 243
ii. Synthèses 245

3. Conclusion de la Partie ii 247

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 249

PARTIE EXPERIMENTALE 257
i. Matériel et réactifs de synthèse 259
ii. Méthodes générales de synthèse 260
iii. Protocoles des tests biologiques 290
iv. Protocoles de synthèse 261

BIBLIOGRAPHIE 295

ABREVIATIONS

Ac	Acétyl
Acim	Acetimidate
AcOEt	Acetate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ahx	Aminohexanoic acid
Alloc	Allyloxycarbonyl
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ATP	Adénosine TriPhosphate
BARAC	Biarylazacyclooctynone
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
Boc	*Tertio*-butyloxycarbonyl
BSA	Bovine Serum Albumine
CAF	Cancer Associated Fibroblast
CDR	Complementary Determining Region
CLPH	Chromatographie Liquide Haute Performance
CPP	Cell Penetrating Peptide
CuAAC	Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
DCC	*N*,*N'*-dicyclohexylcarbodiimide
DIFO	Difluorinated Octyne
DIPEA	*N*,*N*-Diisopropyléthylamine
DMF	*N*,*N*-Diméthylformamide
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
EGF	Endothelial Growth Factor
EGFR	Endothelial Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	European Medicines Agency
EPR	Enhanced Permeability and Retention
éq.	Equivalent molaire
équiv.	Équivalent molaire
ESI	Electrospray Ionisation
Et2O	Éther diéthylique
EtOH	Éthanol
FAK	Focal Adhesion Kinase
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
Fmoc	9-Fluorénylméthyloxycarbonyl
GLUT	Glucose Transporter
HBTU	(2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF1-α	Hypoxia Inducible Factor 1-α
HRE	Hypoxia responsive element
IAB	Institute for Advanced Biology
I_2BM	Ingénieurie et Interaction des BioMolécules
IC50	Concentration inhibant de 50% un paramètre
ICG	IndoCyanine Green
IR	Infrarouge
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IGF	Insulin-Like Growth Factor
i.v.	Intraveineuse
KD	Constante de dissociation
KDR	Kinase insert Domain Receptor
MAPK	Mitogene Activator Protein Kinase
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MeOH	Méthanol
MOFO	Monofluorinated octyne
MPAA	Mercaptophenylacetic acid
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
OAll	Allyl ester
PBS	Phosphate Buffer Saline
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDT	Photo Dynamic Therapy
PEG	PolyEthylene Glycol
PET	Positron Emission Tomography
PyBOP®	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RP-HPLC	Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography
RP-UHPLC	Reverse Phase Ultra High-Performance Liquid Chromatography
r.t.	Room temperature
RT	Retention Time
SASRIN	Super Acid Sensitive Resin
s.c.	**s**Sous-cutanée
siRNA	Small interfering RNA
SPAAC	Strain Promoted azide-alkyne cycloaddition
SPANC	Strain Promoted azide-nitrone cycloaddition
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
t.a.	Température ambiante
TAM	Tumor Associated Macrophage
***t*Bu**	*Tertio*-butyl
TEOS	Tétraéthylorthosilicates
TEP	Tomographie à emission de positron
TFA	Trifluoroacéeic acid
TFE	TriFluoroEthanol
TGFα	Transforming Growth Factor **α**
TGFβ	Transforming Growth Factor **β**
TIS	Triisopropylsilane
TNBS	Acide trinitrobenzènesulfonique
TNFα	Tumour Necrosis Factor α
Trt	Triphénylméthyl (ou trityl)
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Receptor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
5-Ala	5-aminolevulinic acid
^{18}F-FDG	^{18}F-FluoroDeoxyGlucose

Abréviations pour les composés

1 : R(RGD)Cy5.5 = RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5
2 : R(RAD)Cy5.5 = RAFT(4-c[RβADfK])Cy5.5
3 : Cy5.5-ATW = Cy5.5-Ahx-ATWLPPR
4 : Cy5.5-scble = Cy5.5-Ahx-LWRPTPA
5 : R(4ATW)Cy5.5 = RAFT(4-ATWLPPR)Cy5.5
6 : R(RGD)-24-ATW = RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG_{24}ATWLPPR
7 : R(RGD)-12-ATW = RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG_{12}ATWLPPR
8 : R(RGD)-12-R(ATW) = RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG_{12}RAFT(4-TWLPPR)

INTRODUCTION

Les travaux réalisés au cours de cette thèse concernent majoritairement la mise au point de molécules pour l'imagerie et la thérapie du cancer. Nous avons développé ces molécules en appliquant le principe de la vectorisation, c'est-à-dire qu'elles sont composées d'agents effecteurs, mais aussi d'éléments moléculaires de ciblage qui permettront d'atteindre spécifiquement les tumeurs plutôt que les tissus sains.

Les vecteurs que nous avons développés sont des châssis peptidiques, décorés de ligands de l'intégrine $\alpha v\beta_3$ et/ou la Neuropiline-1, qui sont des récepteurs de surface. Ces récepteurs sont surexprimés par la plupart des tumeurs solides.

Dans ce contexte nous espérons, en guise d'introduction, apporter une vue d'ensemble sur les principes biologiques qui définissent le cancer, ainsi que sur les différents éléments biologiques qui y sont liés. Ces derniers sont, *de facto*, des cibles potentiellement exploitables en vectorisation. Les cibles biologiques les plus utilisées sont énumérées, avec un accent mis sur les récepteurs puisqu'ils sont paritculièrement exploités dans notre projet de recherche.

Enfin, comme nous utilisons des vecteurs peptidiques et des réactions de ligation chimique pour mettre au point nos composés, d'autres types de vecteurs possibles sont présentés, ainsi que les principales réactions de ligation chimique utilisées pour synthétiser des biomolécules.

1.LA VECTORISATION EN CANCEROLOGIE

A.Généralités sur le cancer

i. *Genèse et développement du cancer*

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une prolifération excessive et anarchique de cellules qui échappent aux mécanismes de croissance cellulaire et d'apoptose (mort cellulaire programmée). Elles sont de plus capables d'envahir le tissu sain environnant, mais aussi d'autres organes en empruntant le système sanguin ou lymphatique. Le cancer peut exister sous de nombreuses formes : Cancers du poumon, du sein, colorectal, de l'estomac, de la prostate, du pancréas, du cerveau, de la vessie… pour n'en citer que quelques uns (Fig.1, GLOBACAN 2012).

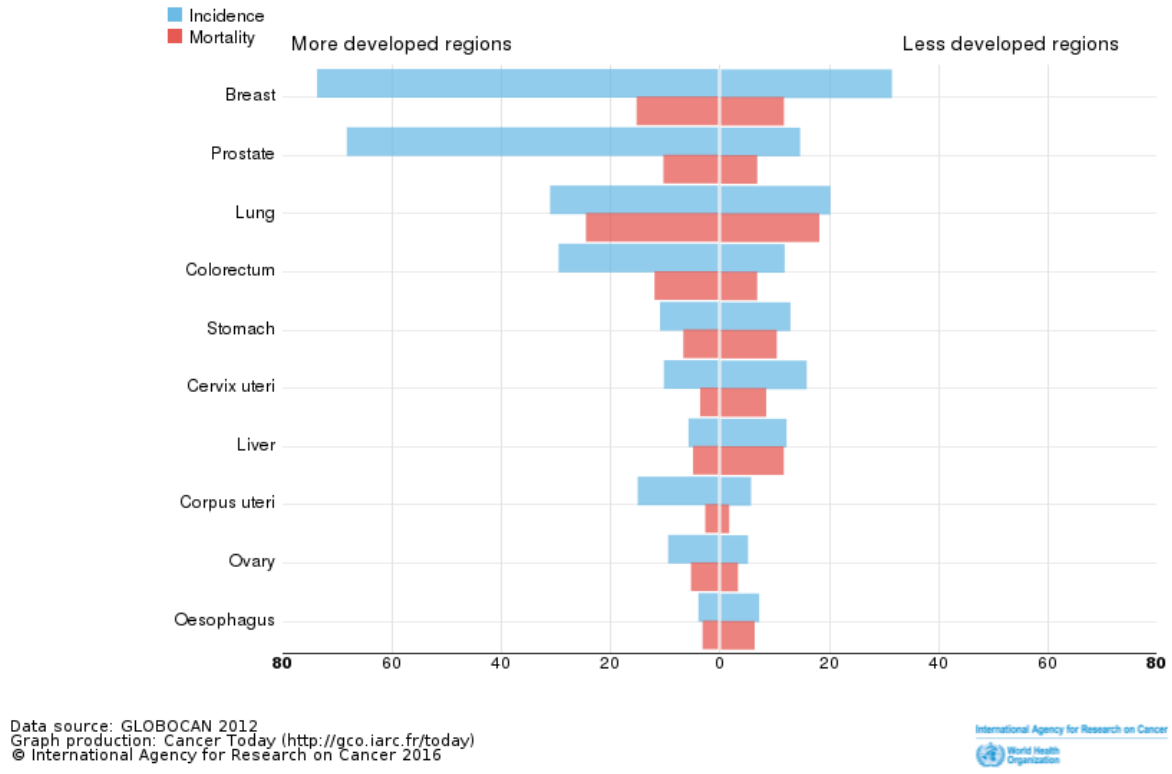


Figure 1 - Statistiques d'incidence et de mortalité des cancers dans le monde en 2012

- **Caractères spécifiques acquis par les cellules saines pour devenir tumorales**

Derrière la définition générale de « cellules immortelles et très prolifératives » utilisée pour définir le cancer, se cachent d'autres caractéristiques spécifiques qui sont progressivement acquises par les cellules pour devenir tumorales. Ces caractéristiques, issues de modifications génétiques subies au fur et à mesure du temps par les cellules, font partie d'un processus de tumorigenèse commun à de nombreux cancers. Ainsi, Hanahan et Weinberg ont identifié six critères spécifiques acquis par les cellules saines pour devenir tumorales (fig. 2).[1,2]

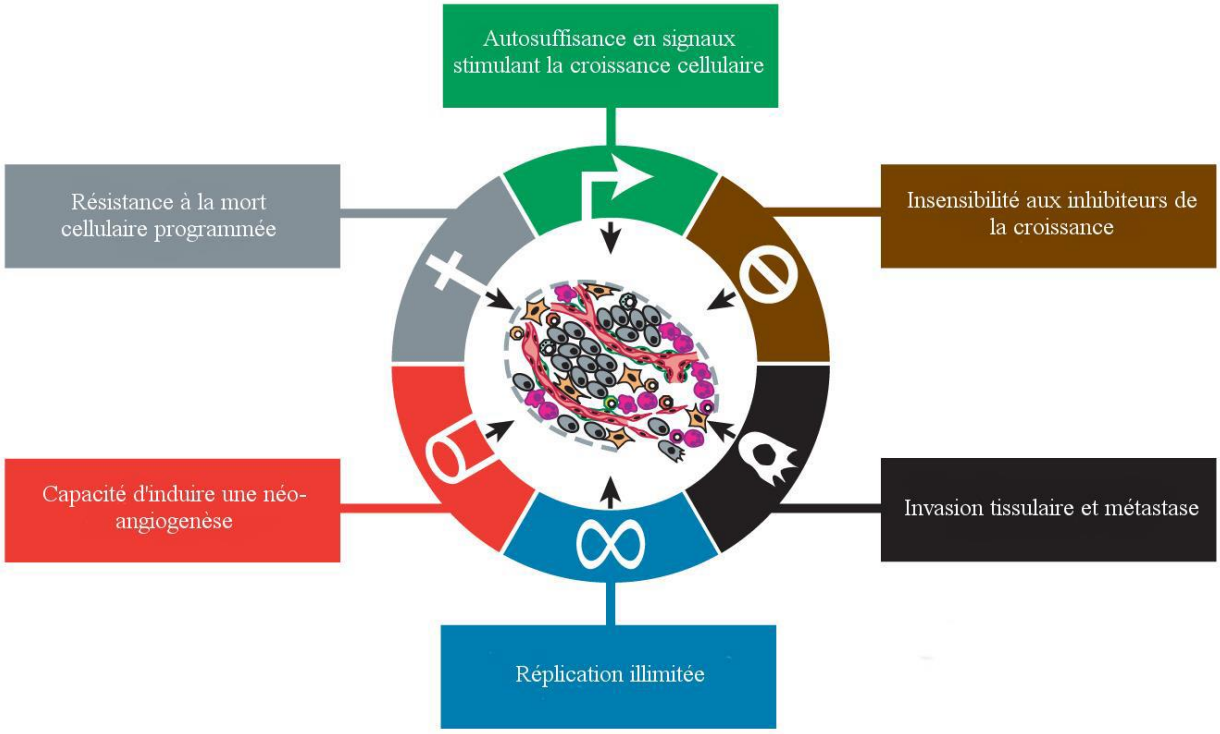


Figure 2 - Caractéristiques acquise par la cellule pour devenir tumorale (Hanahan et Weinberg

La première de ces six caractéristiques est l'autosuffisance en signaux stimulant la croissance cellulaire. En effet, si la tumeur est très proliférative, c'est en partie parce qu'elle est capable de sécréter elle-même des facteurs de croissance nécessaires à cette prolifération (tels que le « transforming growth factor » TGFα ou le « platelet-derived

growth factor » PDGF). De plus, elle surexprime certains récepteurs de ces facteurs de croissance pour y devenir hypersensible. Il y a donc un réel circuit d'autosuffisance mis en place par la tumeur. La tumeur peut aussi stimuler les cellules saines de son environnement pour les faire produire ces facteurs de croissance. Nous y reviendrons en détail plus tard.

La deuxième caractéristique est **l'insensibilité aux mécanismes de rétro-contrôle négatifs**. En effet, s'il existe des facteurs qui stimulent la prolifération tumorale, il existe aussi des gènes dits « suppresseurs de tumeurs » dont l'expression bloque la croissance tumorale. Ils permettent notamment l'expression de protéines (RB, TP53) qui régulent la progression du cycle cellulaire, et peuvent déclencher l'apoptose (mort cellulaire programmée). Mais les tumeurs semblent échapper à ces mécanismes suppresseurs. Par exemple, dans les tissus sains, le facteur TGF-β est connu pour favoriser le rôle suppresseur de la protéine RB, alors que dans le cas des tumeurs, TGF-β semble détourné de ses fonctions et agit comme activateur de prolifération. Enfin, il existe un mécanisme d'inhibition de contact chez les cellules saines en culture *in vitro* : les contacts intercellulaires permettent de détecter et ralentir la prolifération des cellules lorsque le tapis cellulaire est arrivé à confluence. Ce mécanisme est inopérant pour les cellules cancéreuses en culture. Cette observation *in vitro* est aussi valable *in vivo.* Ces exemples mettent en évidence la capacité de la tumeur à être insensible aux mécanismes de rétro-contrôle négatifs.

Les tumeurs deviennent aussi **résistantes à la mort cellulaire programmée (apoptose)**. A l'origine, l'apoptose est un processus déclenché par la cellule en cas de stress physiologique (pH acide, manque d'oxygène, nombreuses modifications génétiques) et/ou de mauvais équilibres de signaux extra et intracellulaires typiquement observés lors de la tumorigenèse. L'apoptose est donc un mécanisme qui pourrait a priori ralentir le développement de tumeurs. Malheureusement, les tumeurs qui réussissent à progresser ont une capacité de résistance à l'apoptose.

De manière simplifiée, l'apoptose dépend d'un équilibre entre facteurs pro et anti-apoptotiques. BAX et BAK sont des protéines pro-apoptotiques. Elles provoquent des pores dans la mitochondrie ce qui libère alors des protéines telles que le *cytochrome C* qui peut à son tour activer les *caspases* dont l'activité protéolytique détruit la cellule. A l'inverse, d'autres protéines comme Bcl-2 sont des régulateurs anti-apoptotiques. Ils vont se fixer sur BAX et BAK pour empêcher leur activité pro-apoptotique. Cet équilibre d'expression de protéines régulatrices est un exemple parmi d'autres qui régulent l'apoptose. La tumeur fait pencher la balance de ces protéines en sa faveur pour atténuer, voire supprimer l'apoptose de ses cellules. A noter que d'autres phénomènes comme la nécrose et l'autophagie participent aussi au contrôle de l'homéostasie tissulaire et sont fréquemment dérégulés dans les processus cancéreux.

Les cellules tumorales ont aussi acquis une réplication illimitée. Les cellules normales peuvent se répliquer un nombre limité de fois, après lesquelles elles entrent soit en senescence (cellule viables mais non proliférantes), soit en nécrose ou apoptose. Les cellules tumorales elles, peuvent continuer à se répliquer indéfiniment.

Le cinquième critère acquis et identifié comme essentiel pour la tumeur est sa capacité à induire une néo-angiogenèse. En effet, toute cellule a besoin d'un apport en nutriments et en oxygène pour son fonctionnement, ainsi qu'une évacuation des déchets et du CO_2 qu'elle rejette. Ceci est assuré par le système vasculaire. Mais dans le cas des tumeurs, leur prolifération et leur métabolisme excessifs requièrent beaucoup plus d'énergie et d'apports. Ainsi, la grande majorité des tumeurs stimule par différents moyens la création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus est appelé néo-angiogenèse. Ce dernier est actif de façon normale au moment de l'embryogenèse, puis en cas de cicatrisation ou d'inflammation chez l'adulte sain. Sinon, ce système est quiescent. *A contrario*, il est continuellement activé dans la plupart des cancers. En plus d'être largement accentué, le processus se fait de façon désordonnée et anarchique, induisant une architecture vasculaire anormale, avec une

fenestration accrue de l'endothélium voire même une absence d'endothélium dans certains segments, l'absence de péricytes (cellules musculaires lisses qui assurent l'élasticité des vaisseaux) et des flux sanguins parfois contreproductifs. Les facteurs biologiques influençant l'angiogenèse sont détaillés plus bas dans cette partie.

La dernière des six spécificités acquises par la cellule pour devenir cancéreuse est la capacité **d'invasion tissulaire et de métastase**. En effet, si la tumeur se développe et grossit, elle est aussi capable d'envahir les tissus environnants. Au-delà de cette invasion locale, elle peut aussi atteindre d'autres organes lointains par la formation de métastases. Les facteurs induisant l'invasion tissulaire sont nombreux et complexes. De façon simplifiée, nous pouvons considérer que cela met en œuvre **1)** la capacité accrue de migration des cellules *via* des modifications dans le cytosquelette des cellules ainsi que des jonctions entre les cellules et les matrices extracellulaires. Ceci implique en particulier les intégrines qui assurent l'accrochage des cellules sur les matrices. **2)** des changements dans la production/dégradation des matrices extracellulaires *via* la production de collagène(s), fibronectine, laminine… et en même temps la production de protéases qui modifient ces matrices (MMP, granzymes…). Enfin, **3)** la migration des cellules est aussi associée à une modification des jonctions intercellulaires aboutissant souvent à une diminution de la cohésion des cellules. Dans ce cas les cadhérines jouent un rôle majeur. Notamment, les E-cadherin et N-cadhérin ont été clairement identifiées comme primordiales. La première, E-cadherin, est impliquée dans l'adhésion intercellulaire. La jonction qu'elle permet avec les cellules épithéliales aide à former les couches épithéliales et y maintenir les cellules quiescentes. De ce fait, son expression a été identifiée comme un facteur antagoniste de l'invasion et de la métastase, alors que sa déplétion les favorise. *A contrario,* certaines protéines normalement associées à la migration cellulaire durant l'embryogenèse ou les inflammations se retrouvent surexprimées dans le cancer. C'est le cas de la *N-cadherin* dans de nombreuses cellules de carcinome invasif. Les processus d'invasion et de métastase seraient un ensemble d'équilibres de ce type, avec déplétion de facteur anti-métastatiques et surexpression de facteurs pro-métastatiques.

La gravité d'une tumeur réside en bonne partie dans son agressivité et sa capacité à métastaser. Ce processus, plus ou moins rapide en fonction des tumeurs, commence par la dissémination des cellules tumorales *via* le système lymphatique ou sanguin. Cette dissémination peut être active (par extravasation) ou passive (par desquamation). Elles peuvent alors voyager à travers les systèmes sanguins et/ou lymphatiques avant de s'arrêter et éventuellement ressortir des vaisseaux par extravasion (phénomène actif, qui limite heureusement la dissémination passive). Les cellules forment alors des nodules (lésions micrométastatiques) avant d'évoluer en tumeurs macroscopiques (processus de colonisation). Les tumeurs sont beaucoup plus difficiles à soigner lorsque le processus métastatique est engagé.

- <u>Caractéristiques émergentes</u>

Deux autres caractéristiques semblent acquises et bénéfiques pour les cellules cancéreuses. Mais le débat est encore ouvert quant à leur véritable implication et leur incidence sur la tumeur, comparée à celles des six autres marqueurs. L'un de ces deux critères dit « émergents » concerne le métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse. En effet, il s'avère que les cellules saines, qui se trouvent en condition d'aérobie, transforment le glucose en pyruvate *via* le processus de glycolyse, puis ce pyruvate est transformé en CO_2 au sein de la mitochondrie. En condition d'anaérobie, celle que l'on retrouve dans les cellules cancéreuses, la glycolyse est favorisée et le pyruvate n'est que peu dégradé par la mitochondrie. Cette **reprogrammation du métabolisme énergétique** est observée dans la grande majorité des tumeurs. Etonnamment, cette voie métabolique serait bien moins efficace pour synthétiser l'ATP, brique essentielle de la production et du stockage de l'énergie de la cellule. En revanche, elle pourrait favoriser la synthèse de nucléotides et acides aminés nécessaires à la production élevée de cellules par les tumeurs. Quoiqu'il en soit, ce haut taux de glycolyse nécessite un fort apport en glucose,

et ce dernier est permis par la surexpression de transporteurs de glucose (GLUT-1) qui font l'objet d'un paragraphe de cette introduction.

Cette reprogrammation du métabolisme énergétique est souvent impulsée par des protéines déjà responsables d'autres spécificités parmi les six citées précédemment. Il est donc difficile de savoir s'il faut considérer la reprogrammation du métabolisme énergétique comme l'un des critères cruciaux acquis par la cellule ou comme une conséquence de ces derniers.

L'autre critère émergent est **la résistance à la destruction immunitaire**. En effet, il a été prouvé que le système immunitaire était capable de détecter et détruire des tumeurs naissantes. Cette destruction est efficace pour les tumeurs issues de virus, mais semble aussi efficace dans certains cas de tumeurs induites sans virus. Par exemple, des tumeurs développées chez des souris immunodéficientes et implantées chez des souris immunocompétentes n'ont pas évolué en cancer. En revanche, des tumeurs développées chez des souris immunocompétentes et implantées chez d'autres souris immunocompétentes évoluent. Il semble donc que certaines tumeurs soient immunogéniques et déclenchent la réponse immunitaire qui les détruit alors que d'autres ne sont pas immunogéniques. On peut donc considérer que l'échappement à la réponse immunitaire est une spécificité importante acquise par la cellule dans son processus d'évolution pour devenir cancéreuse. Cette hypothèse fait depuis longtemps l'objet de recherches pour générer des vaccins, mais est aussi à la base de nouvelles approches thérapeutiques qui tentent de rééduquer le système immunitaire pour qu'il combatte efficacement les tumeurs (thérapies CTLA-4, PD-1, et PD-L1), et qui sont hautement prometteuses

- **Influence de l'environnement tumoral**

Il serait faux de considérer qu'une tumeur se résume à des cellules cancéreuses dotées de caractéristiques pro-tumorales. En effet, la tumeur n'agit pas seule. **L'environnement de la tumeur** (stroma), constitué en grande partie de cellules saines, joue un rôle primordial et vient rajouter un degré de complexité à la biologie du cancer. Il s'avère que les cellules cancéreuses sont capables de recruter, stimuler ou « manipuler » des *éléments cellulaires* (macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales) et des *éléments extracellulaires* (matrice extracellulaire) environnants. Les éléments ainsi stimulés agissent en retour sur la survie et les comportements prolifératifs et invasifs de la tumeur.[2–4]

L'élément extracellulaire principal de l'environnement tumoral est la matrice extra cellulaire (MEC). Elle représente un peu le ciment dans lequel évoluent les cellules de tout l'organisme (fig. 3). La MEC est composée d'une multitude d'éléments constitutifs comme des protéines et glycoprotéines (collagène, fibronectine, vitronectin, laminine, élastine…) mais aussi de nombreux facteurs de croissance (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Epithelial Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor β (TGF-β)…) qui, comme leur nom l'indique, favorisent la croissance et la mobilité cellulaires. Ainsi, dégrader la matrice extracellulaire permet de libérer de l'espace pour que les cellules progressent, mais cela libère aussi des éléments nécessaires à cette progression.

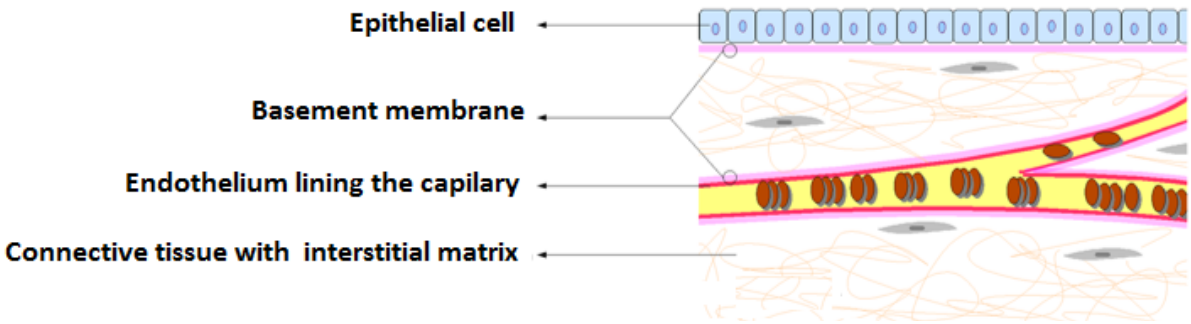


Figure 3 - Représentation de la matrice extra-cellulaire (tissu conjonctif)

Les *éléments cellulaires* de l'environnement tumoral sont les fibroblastes (dont le rôle dans les tissus sains est notamment de participer à la fabrication de la matrice extracellulaire), mais aussi les cellules endothéliales (constituant la couche interne des vaisseaux sanguins), et des cellules immunitaires telles que les macrophages (fig. 4). Mais ces cellules sont modifiées et « utilisées » par la tumeur dans son intérêt. On parle par exemple de CAF (cancer associated fibroblats) et de TAM (tumor associated macrophages) pour décrire ces cellules impliquées dans le développement de la tumeur.

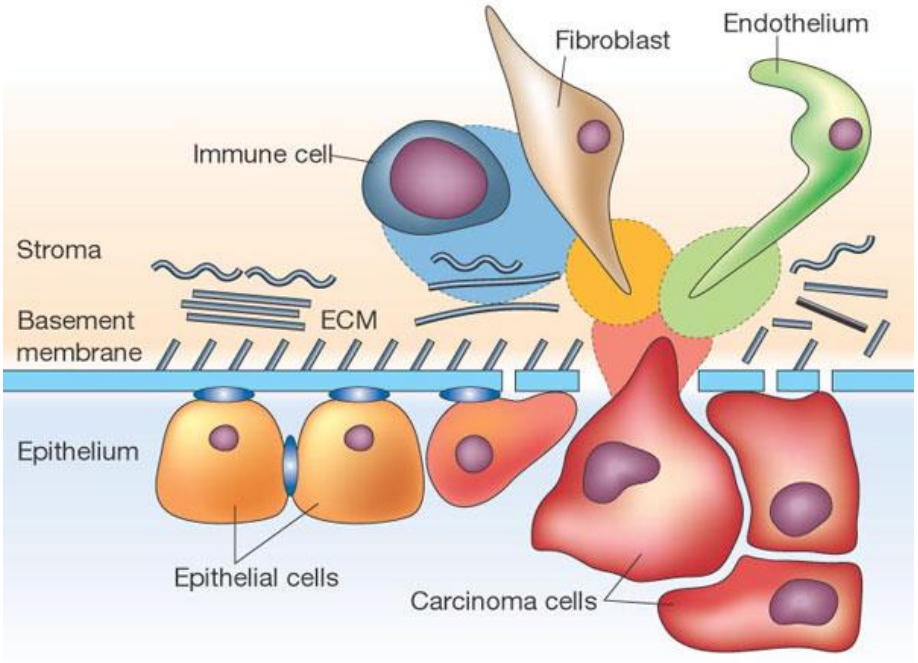


Figure 4 - Représentation des éléments cellulaires du stroma tumoral

Les relations tumeur-stroma sont complexes (fig. 5). En premier lieu, **1)** sous l'effet de l'hypoxie locale, la tumeur sécrète des facteurs pro-angiogéniques tels que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) qui stimule les cellules endothéliales (inside-out signaling). Elles créent en retour de nouveaux vaisseaux sanguins. **2)** La tumeur active aussi les fibroblastes (*via* le « Platelet Derived Growth Factor » PDGF par exemple) qui deviennent des CAF (*cancer associated fibroblast*). Elle profite alors des chémo-attractants produits par les CAF tels que HGF (Hépatocyte Growth Factor) qui favorisent

la mobilité cellulaire tumorale en se liant aux récepteurs c-Met (dont la surexpression est liée au caractère métastatique des tumeurs). Les fibroblastes produisent également des facteurs TGF-β (tumor growth factor) qui enrichissent la matrice extra cellulaire. **3)** Les macrophages associés à la tumeur (TAM) produisent des facteurs EGF et VEGF utiles à sa progression. **4)** En plus de profiter des facteurs produits par les TAM, CAF et cellules endothéliales qui l'entourent, la tumeur active ces derniers pour leur faire produire des protéinases (MMP, uPA) qui pourront dégrader la MEC. Cette dégradation libère des facteurs de croissance solubles qui lui seront bénéfiques (EGF, TGF-β) car les cellules tumorales surexpriment généralement les récepteurs associés (EGFR, TGF-βR). Cela expose aussi des sites cryptiques des protéines de la MEC, tels que le motif tri-peptidique « RGD », qui est reconnu par des récepteurs transmembranaires tels que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui est surepxrimée dans les tumeurs.

Toutes ces interactions provoquent des cascades de signalisation de l'extérieur vers l'intérieur (outside-in signaling) qui impliquent des protéines intracellulaires telles que FAK, AKT… qui stimulent la prolifération, la survie et l'invasion cellulaire.[2–4]

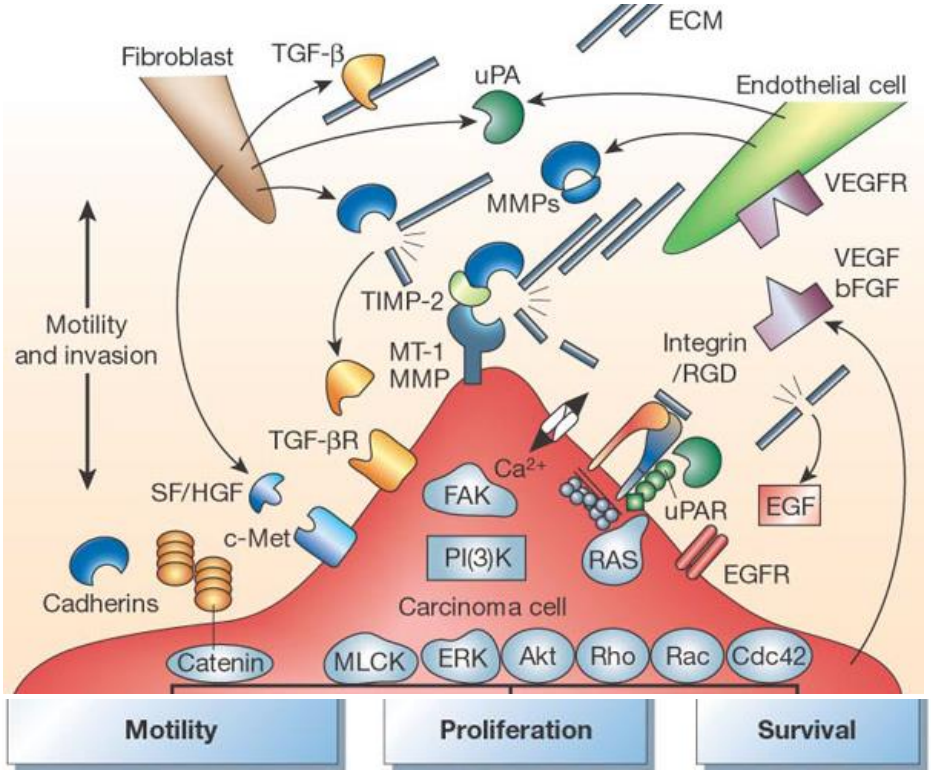


Figure 5 – Cross-talk de la tumeur avec la MEC, les cellules endothéliales et les fibroblastsnqui l'entourent.

La cellule tumorale exploite donc les cellules de son environnement pour qu'elles la stimulent en retour, mais elle bénéficie aussi de la dégradation de la matrice extracellulaire qu'elles engendrent. De plus, les TAM, CAF et cellules endothéliales peuvent aussi se réguler entre elles. Les mécanismes régissant la survie, la prolifération, la mobilité et l'invasion cellulaire sont donc très nombreux et complexes.

En résumé de cette partie, le cancer est une maladie issue de plusieurs facteurs combinés : Une tumeur auto-stimule sa croissance grâce à l'expression de facteurs, stimule une angiogenèse anarchique pour subvenir à ses besoins, échappe aux mécanismes génétiques ainsi qu'aux réponses immunitaires visant à la supprimer, présente une réplication infinie de ses cellules, échappe à l'apoptose, et développe une grande capacité d'invasion. Elle reprogramme son mécanisme énergétique et manipule son environnement sain pour se développer. Toutes ces caractéristiques peuvent être adressées pour une thérapie anticancéreuse. L'idéal serait d'en cibler plusieurs à la fois.

ii. *Thérapies du cancer*

Trois méthodes principales sont utilisées dans le traitement du cancer : La chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie. Lorsque la présentation des tumeurs le permet, la chirurgie est le traitement de choix, bien souvent le plus efficace s'il est mis en œuvre très tôt. La chirurgie sera fréquemment complétée ensuite par de la radiothérapie et/ou chimiothérapie afin de traiter des cellules tumorales résiduelles éventuellement encore présentes et éviter les rechutes.

La radiothérapie, elle, consiste à endommager le matériel génétique des cellules cancéreuses en les soumettant à des rayons X. Ce traitement peut générer des effets secondaires, puisque les rayons X sont ionisants et affecteront donc aussi les tissus sains qui y seront exposés.

Enfin, concernant la chimiothérapie, il s'agit d'administrer des molécules généralement de petite taille, qui diffusent largement dans tout le corps, et qui possèdent une activité spécifique afin de détruire aussi précisément que possible les cellules tumorales. La chimiothérapie sera donc plus à même de traiter des cancers métastatiques que la chirurgie ou la radiothérapie. Mais ces molécules toxiques peuvent aussi endommager les cellules saines et génèrent donc des effets secondaires parfois très importants. Plusieurs stratégies thérapeutiques visant différents mécanismes cellulaires existent :

La première classe d'agent thérapeutique est celle des agents alkylants, comme les sels de platine ou les cyclophosphamides. Ce sont des intercalants de l'ADN. Ils s'insèrent entre les brins d'ADN et créent des liaisons inter-brins, qui empêchent alors le processus de réplication d'ADN. Le cis-platine est un des premiers anticancéreux à avoir été utilisé en thérapie (fig.6).

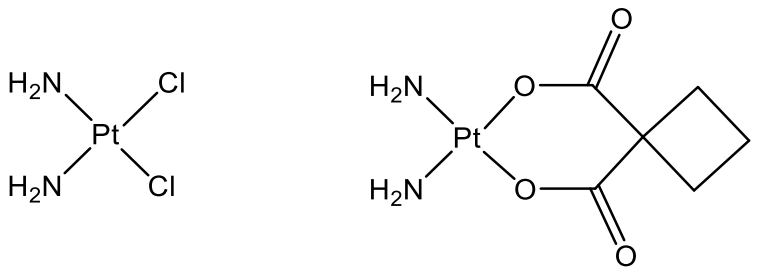


Figure 6 - Représentations du Cisplatine et du Carboplatine

Une autre cible permet d'altérer la réplication de l'ADN. Il s'agit de l'enzyme topoisomérase. Son rôle est d'intervenir auprès des double-brins d'ADN, pour induire la détorsion de leur conformation en hélice, afin de permettre la réplication. Le fait d'inhiber cette enzyme empêche donc la réplication de l'ADN resté sous forme d'hélice. La doxorubicine est l'inhibiteur de topoisomérase de référence en cancérologie (fig.7).

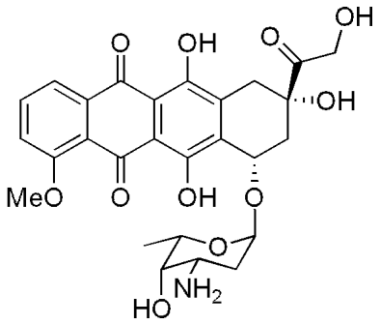


Figure 7 - Représentation de la doxorubicine

Si certaines molécules empêchent la réplication de l'ADN, d'autres empêchent sa synthèse. Il s'agit des antimétabolites. La stratégie thérapeutique consiste à remplacer les nucléotides naturels utilisés pour la synthèse d'ADN par d'autres nucléotides synthétiques similaires mais inopérants. L'autre alternative est d'utiliser des inhibiteurs d'ADN polymérase. Le 5-FU (fluorouracil) est utilisé de manière systématique pour de nombreux cancers, en tant qu'inhibiteur de thymidylate synthase (fig.8).

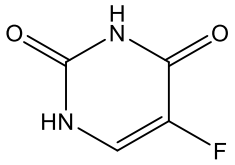


Figure 8 - Représentation du 5-florouracil

La dernière grande classe d'anticancéreux a pour objectif d'empêcher l'assemblage de tubulines en microtubules, processus nécessaire à la mitose. Cela a donc pour conséquence de stopper le cycle cellulaire. Divers alcaloïdes comme la vinorelbine ou des dérivés de taxane, dont le plus connu est certainement le taxotère (ou Docétaxel), sont utilisés contre les cancers du sein et du poumon.

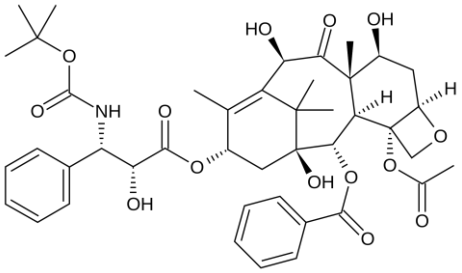


Figure 9 - Représentation du Docétaxel®

D'autres traitements existent comme la thermothérapie (augmentation locale de température pour détruire la tumeur), l'hormonothérapie (administration d'hormones pour des cancers hormonodépendants) et la photothérapie (administration de photosensibilisateurs qui créent de la chaleur ou des espèces toxiques comme des ROS suite à une exposition lumineuse). Ces traitements sont actuellement moins utilisés. Un des freins à l'utilisation des photosensibilisateurs, comme d'ailleurs un grand nombre de molécules très toxiques, concerne leur acheminement jusqu'à la tumeur. En effet, la plupart des molécules n'ont pas forcément de paramètres physicochimiques adaptés à leur administration chez l'homme et à leur accumulation spécifique dans les organes à traiter. Il est donc nécessaire de les vectoriser.

Les petites molécules ne sont pas la seule classe d'agents thérapeutiques possible. Les anticorps sont aussi très répandus. Ils peuvent être utilisés nus, grâce à leur haute spécificité, pour agir en tant qu'antagonistes de récepteurs tumoraux. Par exemple, le Cetuximab, Rituximab, Alemtuzumab, Trastuzumab, (qui ciblent respectivement les récepteurs ou cluster de différentiation EGFR, CD20, CTLA-4, CD52, ErbB2) sont une liste non exhaustive de la dizaine d'anticorps validés par la FDA et utilisés dans le traitement du cancer. Les anticorps peuvent aussi être utilisés pour leur activité immunologique, mais aussi comme systèmes vecteurs pour transporter des agents effecteurs. Ces utilisations sont mentionnées plus tard dans l'introduction (voir les chapitres 1.D.ii.f. et 3.)

B. Principe général de la vectorisation

La thérapie anticancéreuse est en constante évolution. Les premiers traitements utilisés étaient toxiques pour la tumeur mais aussi pour les tissus sains. Etant peu spécifiques, ils entrainaient de nombreux effets secondaires. L'objectif des thérapies d'aujourd'hui et de demain est d'avoir une action plus ciblée et plus spécifique des tumeurs, à la fois pour diminuer les effets secondaires, mais aussi pour en améliorer l'efficacité. On peut distinguer trois grandes classes de stratégies de ciblage.

La première concerne les petites molécules. De par leur faible taille et faible poids moléculaire, elles se distinguent par une large distribution dans tout l'organisme. Elles peuvent donc pénétrer en profondeur aussi bien dans les tissus cancéreux que dans les tissus sains. En revanche, leur action est dépendante d'une spécificité tumorale. Des exemples typiques de petites molécules sont les inhibiteurs d'enzymes tumorales. Ils diffusent dans tout l'organisme mais sont conçus pour bloquer une enzyme exprimée spécifiquement par la tumeur. L'activité inhibitrice ne sera donc effective que sur l'enzyme visée. L'inconvénient des petites molécules est qu'il est difficile d'être strictement

spécifique d'une cible unique. De plus, leur action est souvent très puissante. Le manque de sélectivité peut donc entrainer de graves effets toxiques. De plus, l'élimination des petites molécules est très rapide et leur temps d'action est donc réduit. Nous ne développerons pas plus les petites molécules dans les chapitres suivants.

Le second type de stratégie concerne le **ciblage passif**, avec l'utilisation de nanoparticules. Leur poids moléculaire et leur taille (de l'ordre de la centaine de nanomètres) leur procurent une dispersion très limitée dans l'organisme, mais un temps de circulation très élevé. Ce long temps d'élimination permet une activité prolongée (Les liposomes sont d'ailleurs très utilisés en formulation pour encapsuler des petites molécules dans le but d'augmenter leur temps d'action). Leurs propriétés physiques permettent aussi de bénéficier de l'effet EPR (Enhanced Permeability Retention) décrit dans le chapitre suivant. Comme aucun récepteur ou mécanisme tumoral n'est mis en jeu dans ce cas, on parle alors de ciblage passif. L'inconvénient des grosses molécules est qu'un temps d'élimination trop prolongé induit une toxicité, et le ciblage passif manque de spécificité vis-à-vis des tumeurs. Néanmoins, de nombreux travaux de recherche consistent à fonctionnaliser des grosses molécules par des éléments de ciblage actif.

Le **ciblage actif** est justement la troisième stratégie thérapeutique. Il s'agit d'exploiter des anomalies tumorales comme des récepteurs ou des transporteurs membranaires qui sont surexprimés à la surface des cellules tumorales alors qu'ils le sont peu ou pas du tout au niveau des cellules saines. L'utilisation de molécules (ligands, agonistes…) pouvant « reconnaître » et se lier à ces anomalies permet de cibler spécifiquement les cellules tumorales. Un agent effecteur doté d'éléments de ciblage actif va donc pouvoir circuler dans l'organisme et s'accumuler préférentiellement sur le site tumoral grâce à cette reconnaissance. Le meilleur ratio tumeur/tissu sain obtenu présente divers avantages : l'accumulation de principe actif sur son site d'action permet d'augmenter l'efficacité du traitement. La diminution d'agent thérapeutique diffusé dans les tissus sains réduit les effets secondaires. Enfin, puisqu'une plus grande quantité de composé thérapeutique atteint sa cible, les doses nécessaires à un traitement efficace sont plus faibles et les doses administrées de médicaments sont moins importantes et/ou moins fréquentes.

Dans les paragraphes suivants, nous verrons d'abord des exemples de vectorisation passive, qui exploitent l'environnement cellulaire et la physiologie du tissu tumoral (néoangiogenèse tumorale, pression interstitielle, EPR). Ensuite nous verrons des exemples de vectorisation active, avec le ciblage de différents récepteurs et transporteurs membranaires.

C. Vectorisation passive et microenvironnement tumoral

Nous avons vu précédemment que l'environnement de la tumeur était spécifique, avec un apport en oxygène restreint, un pH légèrement acide (6,0-7,0), la présence de facteurs et d'enzymes spécifiques au sein du microenvironnement tumoral et surtout, une vascularisation chaotique. Toutes ces caractéristiques du microenvironnement peuvent être exploitées pour vectoriser des composés thérapeutiques jusqu'à la tumeur grâce à un ciblage dit **passif**. Ce terme est employé pour décrire une accumulation de molécules due à leurs propriétés physiques (taille, masse moléculaire) et indépendante de mécanismes cellulaires. L'effet EPR et la présence de certaines enzymes sont particulièrement exploités.

i. *L'effet EPR*

Nous avons vu que le processus d'angiogenèse est chaotique. Les vaisseaux sanguins créés se caractérisent par une structure irrégulière et des fenestrations allant de 200 à 2000 nm de large. Ces discontinuités permettent donc à de gros objets comme des nanoparticules de pouvoir extravaser du flux sanguin vers le tissu interstitiel tumoral et de s'y accumuler si les flux sanguins les poussent à sortir de la circulation. Ceci n'est que peu ou pas possible au niveau des tissus sains présentant un réseau vasculaire

normal car les jonctions inter-cellules endothéliales sont très serrées (environ 15nm).[5] On parle, dans le cas des tumeurs, de perméabilité accrue (« enhanced permeation »). Dans les tissus normaux, le fluide extracellulaire est constamment drainé par le système lymphatique. Comme la lymphangiogenèse est peu fonctionnelle dans les tumeurs, le drainage lymphatique est peu efficace ce qui aboutit à une rétention accrue des produits dans le microenvironnement des tumeurs (« enhanced retention »). Les petites molécules (<40 KDa) qui y pénètreront seront faiblement retenues et leur concentration s'équilibrera suivant leur osmoralité dans un régime dicté par la diffusion libre des molécules à travers les matrices et les fluides. Inversement, les grosses molécules seront piégées physiquement dans les matrices fibrillaires et ne pourront donc pas diffuser librement pour être évacuées du microenvironnement tumoral.

Ce double effet, décrit par Maeda *et al*. en 1986, a été baptisé *effet EPR*, pour « Enhanced Permeability and Retention effect ».[6]

Un grand intérêt fut porté à cet effet EPR et de nombreux exemples de nanoparticules ou macromolécules (>30 kDa) exploitant ce ciblage passif ont vu le jour.[7,8] On parle de ciblage passif puisqu'ici seules des caractéristiques physiologiques et biophysiques entrent en jeu, il n'y a pas d'interaction avec des récepteurs précis. Malheureusement, bien que certains nano-médicaments aient été approuvés par la FDA, leur nombre est très restreint. En 2010, seuls le Doxil® et le Caelyx® (liposomes Pegylés de doxorubicin), le DaunoXme® (liposome de daunorubicin) et l'Abraxane® (paclitaxel lié à une protéine dAlbumine) ont été validés pour le traitement de tumeurs solides. Cela s'explique par la grande hétérogénéité des tumeurs et des patients.

ii. *Les enzymes*

Il a été démontré qu'une majorité des tumeurs solides surexpriment des protéinases par rapport aux tissus sains. Ces enzymes sont impliquées notamment dans la dégradation de la matrice extracellulaire qui libère alors des facteurs de croissance pour la tumeur, mais aussi dans la dégradation des membranes basales pour permettre la migration et l'invasion de la tumeur (progression et métastases). Ces enzymes sont généralement composées d'un site de reconnaissance qui va permettre la coupure sélective d'une séquence peptidique donnée (fig.10)[9–12]

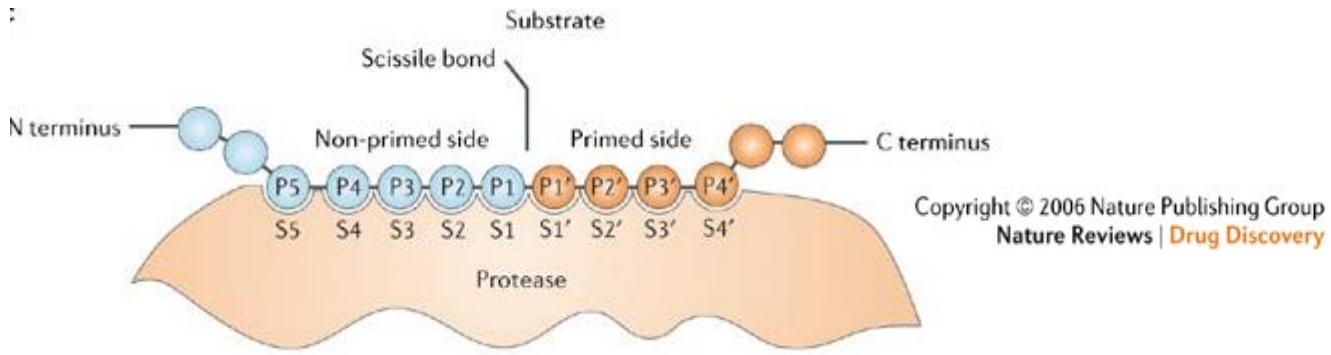


Figure 10 - Nomenclature des peptides susbtrats d'enzymes[12]

Certaines enzymes, comme la caspase, la ß-galactosidase, les cystéine protéinases (cathepsin B, L, H, S), sérine protéinases, aspartate protéinases (cathepsin D) peuvent se trouver à la surface des cellules ou être sécrétées dans certains cas, mais elles sont principalement surexprimées à l'intérieur des cellules tumorales.[10,11] Elles sont donc plutôt exploitées pour activer des prodrogues spécifiquement après internalisation par les cellules tumorales.[13–15] En revanche, des enzymes telles que les Cathepsin K et B, les métallo-protéinases matricielles (MMP, majoritairement MMP-2 et MMP-9), ou les β-glucuronidases sont surexprimées dans l'environnement tumoral et peuvent être exploitées pour cibler les tumeurs.[13,16,17] Elles peuvent aussi activer des prodrogues une fois qu'elles ont atteint le microenvironnement tumoral. On peut citer par exemple les travaux de Tietze et Roffler *et al.* qui ont synthétisé une prodrogue glucuronylée de la

duoramycin qui après coupure par la β-glucuronidase extracellulaire permet l'internalisation et l'action cytotoxique de la *duoramycin*.[18] L'équipe de Ulijn a elle exploité les MMP9 pour sélectivement provoquer le réarrangement de micelles contenant de la *doxorubicin* en fibres, qui permettent un relargage continue de la drogue.[19,20] MMP-2 peut aussi être exploitée, comme le montrent les travaux de Verhille *et al.* qui relient un photosensibilisateur à son quencher *via* un linker substrat de MMP-2.[21]

Des inhibiteurs thérapeutiques des MMP ont aussi été mis au point étant donné qu'elles présentent un rôle crucial dans le développement tumoral. Mais les MMP sont également présentes dans les tissus sains et ont un large domaine d'action. Ainsi, un ciblage trop peu spécifique d'une MMP en particulier, ou une différence d'expression trop peu marquée entre un tissu tumoral et un tissu sain peuvent entrainer d'importants effets secondaires. C'est ce qui explique que malgré un potentiel intéressant, les inhibiteurs de MMP sont peu présents en phase clinique.[22]

Il est intéressant de noter qu'il existe une stratégie alternative utilisant des enzymes : la stratégie ADEPT. Elle consiste à véhiculer des enzymes jusqu'au site tumoral en les liant à des anticorps ciblant des antigènes tumoraux. La seconde étape consiste à injecter des prodrogues qui seront activées *in situ* par les enzymes artificiellement concentrées au niveau tumoral. Les enzymes ne sont pas forcément surexprimées par la tumeur à l'origine. Mais elles permettent d'avoir une activation ciblée d'une drogue sans pour autant qu'elle soit liée à un anticorps, qui pourrait diminuer l'infiltration de la drogue à cause de sa taille.[23]

A l'image des MMPs, les enzymes tumorales sont donc des cibles très intéressantes pour le ciblage et le traitement des tumeurs, y compris pour la mise au point de molécules sophistiquées avec des effets « déclenchés ». L'exploitation des enzymes en tant que cibles nécessite d'améliorer encore la spécificité des substrats utilisés mais ce champ d'application semble très prometteur pour la mise au point de traitements « intelligents ».

D. Vectorisation active : cibles tumorales et motifs de ciblage

Nous avons étudié en première partie d'introduction de nombreuses spécificités que peuvent présenter les cellules cancéreuses. L'expression spécifique de certains éléments par la tumeur ou par son environnement peut être exploitée pour la vectorisation active de composés. On distinguera d'une part les récepteurs membranaires et les clusters de différenciation, qui sont capables d'accueillir leurs ligands pour éventuellement déclencher des cascades de signalisation, une internalisation… D'autre part il y a les transporteurs dont le rôle principal est, comme leur nom l'indique, de permettre à leur « passager » de traverser la membrane cellulaire. Dans tous les cas, en utilisant ou en mimant les molécules qui sont reconnues par les récepteurs, antigènes ou transporteurs de la tumeur, il est possible d'effectuer un ciblage actif de cette dernière. Des exemples de cibles tumorales et des motifs de ciblage associés sont présentés dans cette partie.
Nous évoquerons une liste importante mais non exhaustive des différents récepteurs tumoraux exploitables pour la vectorisation active, ainsi que leurs ligands de ciblage. Une partie d'entre eux seulement se verra consacrer un paragraphe détaillé alors qu'**un tableau regroupant plus d'exemples se trouve à la fin de ce chapitre** sur la vectorisation active.

i. *Les systèmes de transport*

Les systèmes de transport sont un peu différents des récepteurs « classiques ». Certains récepteurs peuvent être internalisés après fixation de leur ligand. Mais cela peut dépendre de plusieurs facteurs, et ce n'est pas leur rôle premier. En revanche, dans le cas des transporteurs, leur rôle principal est justement d'approvisionner la cellule en un élément précis, en le faisant traverser la membrane. Nous détaillons ici les systèmes de transport du glucose et des polyamines.

Les CPP (Cell Penetrating Peptides) seront aussi décrits dans cette partie dans la mesure où ils permettent de traverser la membrane cellulaire. Mais cela ne se fait pas de façon « biologique » *via* un système de transport, plutôt par interactions physiques non spécifiques (charges électroniques).

a. Les transporteurs de Glucose (GLUT)

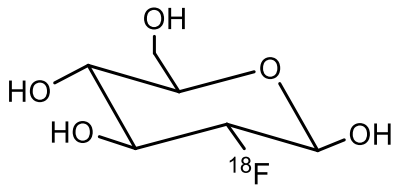


Figure 11 - ^{18}F-fluoro-desoxy-glucose

Les cellules tumorales ont un métabolisme accéléré afin de répondre à leur fort taux de croissance et de réplication. Elles ont notamment un besoin énergétique (consommation d'ATP) plus important que les cellules saines et une consommation accrue en glucose.[24] Le transport de glucose à travers les membranes cellulaires est assuré par les transporteurs de glucose (GLUT). Il existe plusieurs types de GLUT qui se retrouvent aussi bien dans les cellules saines que tumorales. Mais il a été démontré que de nombreuses cellules tumorales présentaient une dérégulation et une surexpression de transporteurs de glucose, en particulier GLUT 1 et/ou GLUT 3.[24] Si cette surexpression de GLUT est souvent liée à un mauvais pronostic vital, elle peut néanmoins servir de marqueur tumoral et être utilisée en diagnostique et suivi de traitement. En effet, la stratégie ciblant ces récepteurs GLUT est très largement utilisée en imagerie médicale, notamment en tomographie à émission de positron (TEP) avec l'utilisation du traceur radioactif ^{18}F-fluoro-desoxy-glucose (aussi appelé ^{18}F-FDG. (Fig.11)).[25] Si certaines méthodes d'imagerie apportent des informations plutôt spatiales sur les tumeurs, le ^{18}F-FDG apporte surtout des informations sur leur métabolisme. Ces récepteurs GLUT peuvent tout à fait être ciblés pour d'autres applications en cancérologie, aussi bien diagnostiques que thérapeutiques. Néanmoins, les ligands carbohydrates ont

généralement une affinité modeste pour leur récepteur lorsqu'ils sont présentés sous forme monomérique (1 mM). Une présentation multivalente de ces sucres est généralement une stratégie préférable pour obtenir de meilleures affinités.[26]

b. *Le système de transport des polyamines*

Les polyamines sont des alkylamines aliphatiques à faible poids moléculaire, impliquées dans de nombreux processus biologiques chez la plupart mammifères. Les molécules les plus connues de cette famille sont la putrécine (Put), la spermine (Spm) et la spermidine (Spd). Elles sont essentielles pour la croissance des cellules eucaryotes et leur concentration est finement régulée au sein de la cellule par un équilibre entre biosynthèse et captation/relargage de polyamines endogènes (produites par l'organisme) ou exogènes (issues de l'alimentation). Cet équilibre est en partie régulé par le *système de transport des polyamines* (STP) qui permet l'entrée et la sortie des polyamines de la cellule. Ce système est dérégulé et suractivé dans les cellules tumorales, qui présentent donc un taux plus élevé de polyamines que les cellules saines.[27,28]

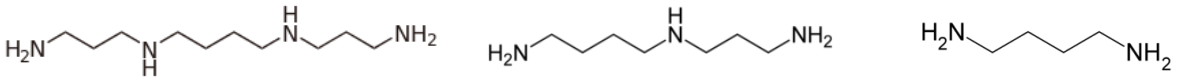


Figure 12 - Schéma de la putrécine, la spermine et la spermidine

Pour toutes ces raisons, les polyamines et leur système de transport (STP) sont devenus des cibles anticancéreuses dès les années 1990. Plusieurs approches ont vu le jour. La première consistait à bloquer la biosynthèse des polyamines par la cellule tumorale. Des inhibiteurs d'enzymes impliquées dans cette synthèse ont alors été mis au point. Malheureusement, les résultats obtenus furent mitigés, à cause du système trop sophistiqué : le fait de bloquer une seule enzyme modifie le métabolisme du transport et la cellule arrive donc à compenser l'inhibition de synthèse par un apport plus grand en

polyamines exogènes.[28,29] Le seul inhibiteur effectif, mais à trop faible toxicité lorsqu'il est utilisé seul, est le DMFO ((R. S)-2-(difluoromethyl)ornithine). Il est dorénavant utilisé en adjuvant de chimiothérapie[30] ou en chimioprévention[31].

La stratégie suivante s'est donc intéressée à l'homéostasie générale des polyamines. Le concept était de concevoir des analogues de polyamines qui seraient donc reconnus par la cellule mais ne déclencheraient pas les processus de croissance de leur alter égos naturels.[32] Les analogues de polyamines pourraient donc déplacer les polyamines naturelles tout en évitant d'augmenter l'apport exogène par le STP, résultant en une baisse globale de la concentration en polyamine dans la cellule. Les résultats sont néanmoins contrastés, avec des effets cytotoxiques et initiateurs d'apoptose observés *in vitro*. Les tests cliniques, qui restent rares, ont aussi pu révéler une toxicité pour le système nerveux[33] ou l'absence d'activité antitumorale[34] lorsque les analogues de polyamines sont utilisés seuls. Mais leur développement en tant qu'adjuvants ou agents de chimioprévention resterait intéressant.[34]

Malgré des résultats décevants en application anticancéreuse directe, les polyamines et surtout leur système de transport restent une cible intéressante pour la vectorisation d'agents effecteurs. En effet, si perturber l'homéostasie du STP est trop compliqué, le transport de polyamine n'en reste pas moins surexprimé dans les cellules tumorales donc exploitable pour accumuler des cargos de façon spécifique au niveau des tumeurs. Ainsi, de nombreux exemples utilisant des polyamines et dérivés de polyamines en tant que systèmes vecteurs existent, reliés par exemple à des composés tels que des inhibiteurs de topoisomérase II,[35] des agents alkylants (chlorambucil),[36] ou encore des chélateurs de fer.[37]

Si d'autres études, notamment cliniques, doivent être réalisées pour confirmer l'intérêt thérapeutique des polyamines et de leur STP, ce système reste intéressant pour la vectorisation de cargos.

c. *Les Cell Penetrating Peptides (CPP)*

Les CPPs (pour *Cell Penetrating Peptides*) sont de courts peptides n'excédant généralement pas 30 acides aminés, et capables de traverser les membranes cellulaires. Cette entrée dans la cellule se ferait sans nécessiter de reconnaissance par un récepteur, sans obligatoirement requérir d'énergie, et avec une toxicité très limitée. Le mécanisme d'entrée serait non spécifique et un CPP peut donc potentiellement rentrer dans n'importe quel type de cellule. La plupart des CPPs sont chargés positivement. Ce sont ces charges qui permettraient une interaction avec des composants anioniques de la membrane cellulaire. Bien que les mécanismes d'entrée ne soient pas clairement définis, trois hypothèses sont évoquées : (1) La formation d'une « micelle inverse », où le peptide se trouve au sein de la membrane cellulaire, entouré d'une couche bi-lipidique. Cet état serait transitoire et le peptide serait relâché dans la cellule par rupture de la membrane. (2) une pénétration directe (translocation adaptive), où les charges positives des Arginines pourraient interagir avec les anions phosphates des lipides qui constituent la membrane. Cette interaction pourrait alors masquer en partie les charges positives du peptide et cette « enveloppe de phospholipides » lui permettrait de progresser dans la membrane jusqu'à atteindre le cytoplasme. (3) Une entrée par endocytose.[38] Mais ces différents mécanismes sont toujours sujets à controverse.[39]

Les premiers CPPs ont été inspirés de la nature puisqu'en 1988, deux groupes décrivent indépendamment l'internalisation cellulaire de la protéine TAT (*Trans Activator of Transcription*) qui est impliquée dans la transcription du virus du VIH. Elle peut spontanément rentrer dans les cellules pour promouvoir l'expression du gène viral.[40,41] Cette protéine est constituée de 86 acides aminés, mais Vivès *et al.* ont réussi à isoler la plus petite partie de cette séquence nécessaire à la pénétration cellulaire : GRKKRRQRRRPPQ.[42] Cette séquence de 13 acides aminés, baptisée *TAT peptide,* fait partie des tous premiers CPPs, avec la *penetratin.* La *penetratin* est une séquence peptidique de 16 acides aminés (RQIKIWFQNRRMKWKK) correspondant à la troisième hélice de la protéine Antennapedia homeodomain (facteur de transcription d'une

drosophile).[43] Ces peptides confirment que l'omniprésence d'acides aminés chargés positivement comme l'arginine et la lysine sont importants pour les CPPs. Mais plus que la charge positive, ce serait la capacité de l'arginine à former des complexes bidentates avec deux anions phosphates qui expliquerait son rôle primordial (plus que les lysines) au sein des CPPs.[38,44] Cela justifie notamment que des polyarginines, des polymères de 7 à 9 acides aminés la plupart du temps (R7, R9), soient utilisés comme motifs CPP pour faire pénétrer des cargos à travers les membranes cellulaires. Le tryptophan tiendrait aussi un rôle crucial dans la capacité des CPP à traverser les membranes. Il serait impliqué, en partie *via* son caractère hydrophobe et ses possibles interactions π, dans l'insertion, l'interaction et/ou la déstabilisation de la membrane.[38,45,46] De nombreux exemples de CPP existent, dont une liste non exhaustive se trouve dans le tableau ci-dessous (fig.13).[38,47] Ces CPPs ont été utilisés pour fonctionnaliser des nanoparticules, peptides, ADN…[48–50]

Peptide	Origine	Séquence
Penetratin	Antennapedia (43-58)	RQIKIWFQNRRMKWKK
Tat peptide	Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ
pVEC	Cadherin(615-632)	LLIILRRRIRKQAHAHSK
Polyarginines	Dérivé de Tat peptide	$(R)_n$: $6<n<12$
MAP	*De novo*	KLALKLALKALKAALKLA
R_6W_3	Dérivé de penetratin	RRWWRRWRR
Tranportan	Galanine/Mastoparan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
Pep-1	HIV-reverse transcriptase / SV40 T-antigen	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV

Figure 13 - Tableau résumant les principaux peptides CPPs

Des protéines peuvent aussi servir de CPP. Le VP22 par exemple, une protéine issue du virus de l'Herpes, est capable de circuler d'une cellule à une autre tout en transportant un

cargo. David Zavaglia *et al.* ont pu former un complexe entre VP22 et un oligonucléotide antisens (anti-c-raf1) marqué par la fluorescein.[51] Le « Vectosome » formé perd sa capacité de transit intercellulaire mais est capable de pénétrer dans les cellules et de s'accumuler dans leur cytoplasme. Il présente surtout l'avantage de pouvoir relarguer l'oligonucléotide *in vivo* par simple irradiation lumineuse.

L'inconvénient de ces CPPs est qu'ils ne servent que de « chevaux de Troie » pour les cargos, et leur pénétration n'étant pas récepteur-dépendante, leur sélectivité est plus que discutable. Pour y remédier, il est souvent nécessaire d'ajouter un motif de ciblage au composé synthétisé. Une autre approche consiste à mettre au point des CPPs activables de façon enzymatique : un peptide chargé négativement est lié de façon covalente à un CPP *via* un linker substrat d'une enzyme. Les charges négatives et positives de la molécule formée interagissent et la molécule se replie sur elle-même, « masquant » les charges positives du CPP, donc sa capacité pénétrante. Après coupure enzymatique du linker, les deux peptides chargés négativement et positivement sont seulement maintenus par interactions électrostatiques (fig.14). Il est donc possible qu'ils se séparent pour redonner l'activité pénétrante du CPP.[52–54] D'autres stimulus comme le pH peuvent être utilisés.[55] On obtient alors à la fois un motif de ciblage et de pénétration cellulaire. Enfin, des CPPs bioactifs (*bioportides*), avec par exemple une activité cytotoxique, commencent à émerger.[56] Une approche combinant les propriétés cytotoxiques, de ciblage et d'internalisation des CPPs semble possible et prometteuse.

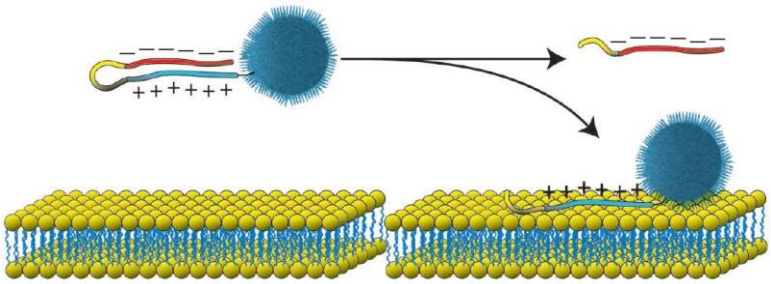


Figure 14 – Schéma d'un CPP activé après action enzymatique

ii. *Récepteurs membranaires*

La première grande famille de cibles tumorales est celle des récepteurs membranaires. Ces récepteurs sont surexprimés par les cellules tumorales, mais d'une part cette expression peut être hétérogène au sein d'une même population de cellules, et d'autre part les cellules saines peuvent aussi les exprimer. Le succès de cette approche reposera donc sur le différentiel d'expression.

a. Les récepteurs à l'acide folique

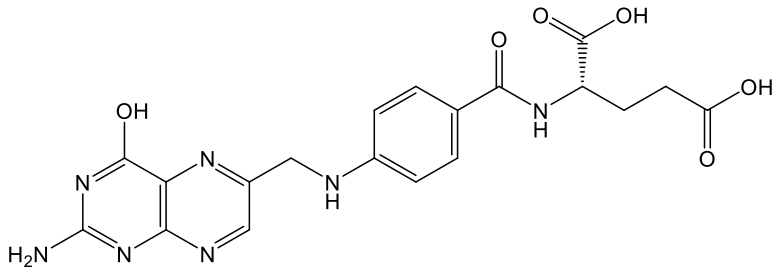


Figure 15 – Représentation de l'acide folique

L'acide folique, aussi connu sous le nom de vitamine B9, est un composé essentiel du métabolisme cellulaire, de la synthèse d'ADN et de sa réparation. Il existe trois isoformes différentes de récepteurs membranaires pour cette molécule : FR-α, FR-β et FR-γ. Si l'acide folique est tout aussi essentiel pour les cellules saines que pour les cellules tumorales, le récepteur FR-α est peu présent dans les cellules normales alors qu'il est largement surexprimé dans de nombreuses tumeurs d'origine épithéliale [57-60]. On le trouve fortement exprimé dans les cancers des ovaires, des reins, utérins, mais aussi dans les formes métastatiques de cancers du pancréas et de l'endomètre. Cette différence pourrait notamment s'expliquer par un besoin plus important des cellules tumorales en acide folique pour sustenter la synthèse accrue d'ADN. Le récepteur FR-α a une forte affinité pour l'acide folique (Kd ~ 10^{-10} M) et permet son entrée dans la cellule

via un mécanisme d'endocytose. De plus, il a été prouvé que l'acide folique gardait son caractère de ligand même après conjugaison à un composé actif *via* son carboxyl-γ. Sa surexpression tumorale et sa capacité d'internalisation en font donc un outil très intéressant pour la vectorisation. Enfin, contrairement à d'autres systèmes vecteurs qui sont envoyés dans les lysosomes pour être détruits après internalisation, l'acide folique est reconnu comme « essentiel » pour la cellule, donc l'agent effecteur qui lui est conjugué est plutôt stocké dans les endosomes ou relâché dans le cytoplasme au lieu d'être détruit.[61]

C'est pourquoi il est intéressant d'exploiter l'acide folique à la fois pour cibler les cellules tumorales et pour y faire pénétrer le composé actif. Il y a d'ailleurs de nombreux exemples d'acide folique conjugué à divers composés pour obtenir des agents anticancéreux ou d'imagerie tumorale[62]. On le retrouve dans différentes études *in vivo* sur souris, conjugué à des agents de chimiothérapie,[63,64] des photosensibilisateurs,[65] et diverses macromolécules (toxines, enzymes, liposomes, vecteur viraux pour thérapie génique), tandis que certains composés thérapeutiques et diagnostiques ont atteint le stade clinique.[66,67]

b. Le récepteur EGFR (Epithelial growth factor receptor)

Le récepteur EGFR (epidermal growth factor receptor) est lui aussi une cible tumorale importante. Il est impliqué dans la croissance, la différenciation et la migration cellulaire. Au niveau tumoral, il a été montré qu'il pouvait ralentir l'apoptose et promouvoir la prolifération, la mobilité cellulaire et l'angiogenèse.[68] Une amplification du gène EGFR et une mutation du domaine tyrosine kinase de l'EGFR ont été observés dans des cas de carcinomes, et ces modifications génétiques induiraient une bonne probabilité de réponse aux traitements anti-EGFR.[69] Ce récepteur est donc intéressant à cibler et/ou bloquer pour traiter ou imager le cancer. Néanmoins, son ligand naturel EGF possède une activité mitogène et pro-angiogénique qui sont bénéfiques au développement de la tumeur. Il faut

donc trouver des ligands de l'EGFR qui n'activeraient pas de tels processus.[70] Parmi les approches développées dans ce cadre, on trouve une multitude d'anticorps comme par exemple le Cetuximab (principalement pour le cancer colorectal) et le Panitumab, ou des inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'Erlotinib (principalement pour le cancer du poumon non à petites cellules) et le Gefitinib qui ont été approuvés par la FDA. Le Gefitinib a cependant été retiré à cause d'une absence de bénéfice en termes de survie au cours d'une phase clinique III.[71]

Les anticorps sont très spécifiques de leur cible mais peuvent présenter un haut taux d'immunogénicité s'ils sont chimériques et avoir du mal à passer les membranes biologiques pour atteindre leur cible, à cause de leur haut poids moléculaire. C'est pourquoi il est important de développer en parallèle d'autres molécules pouvant cibler l'EGFR. Au cours des dix dernières années, plusieurs ligands peptidiques ont été développés dans ce but : Le peptide GE11 (HWYGYTPQNV) a été identifié par l'équipe de J. Gu grâce à l'utilisation du phage display. Il se lie spécifiquement à EGFR avec une constante de dissociation d'environ 22 nM et est préférentiellement internalisé dans les cellules surexprimant EGFR, sans observer d'activité mitogénique (n'augmente pas la division cellulaire). GE11 s'accumule aussi *in vivo* dans les tumeurs surexprimant le récepteur EGFR.[70] Un autre ligand peptidique a été développé en utilisant cette fois un screening informatique d'une librairie de peptides basé sur la structure rayon-X du récepteur cristallisé. Le peptide D4 (LARLLT) a été identifié puis intégré dans des liposomes avant de les tester *in vitro*. Les molécules produites sont spécifiquement internalisées *in vitro* par des cellules surexprimant EGFR (lignée H1299) et montrent une accumulation *in vivo* dans des tumeurs xenogreffées jusqu'à 80h post-injection.[72] Les ligands D4 et GE11 ont été utilisés pour synthétiser notamment des traceurs radioactifs pour le PET-scan,[73] fonctionnaliser des liposomes,[72,74] des nanoparticules pour la thérapie génique[75] ou la vectorisation de paclitaxel et lonidamine.[76] En revanche, l'équipe de KA. Dawson a obtenu de meilleurs résultats en ciblant EGFR *via* des nanoparticules fonctionnalisées avec un fragment d'anticorps (sdAb) plutôt qu'avec les peptides GE11 ou D4 (internalisés de façon non spécifique)[77]

c. Le récepteur VEGFR (*Vascular* Endohtelial Growth Factor Receptor)

- **Généralités sur VEGFR et ses ligands**

Les facteurs de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) sont une famille de glycoprotéines homodimériques impliquées dans le développement du système vasculaire chez l'embryon (vasculogenèse), du système lymphatique (lymphogenèse), ainsi que dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants (angiogenèse). Chez le mammifère, cinq types de ligands VEGF ont été identifiés (fig.16). Ils se lient à un ou plusieurs récepteurs parmi les trois différents récepteurs à tyrosine kinase suivants : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Ici, nous nous intéresserons en particulier à VEGFR-2 qui est primordial pour le développement cellulaire vasculaire endothélial et donc pour l'angiogenèse tumorale.

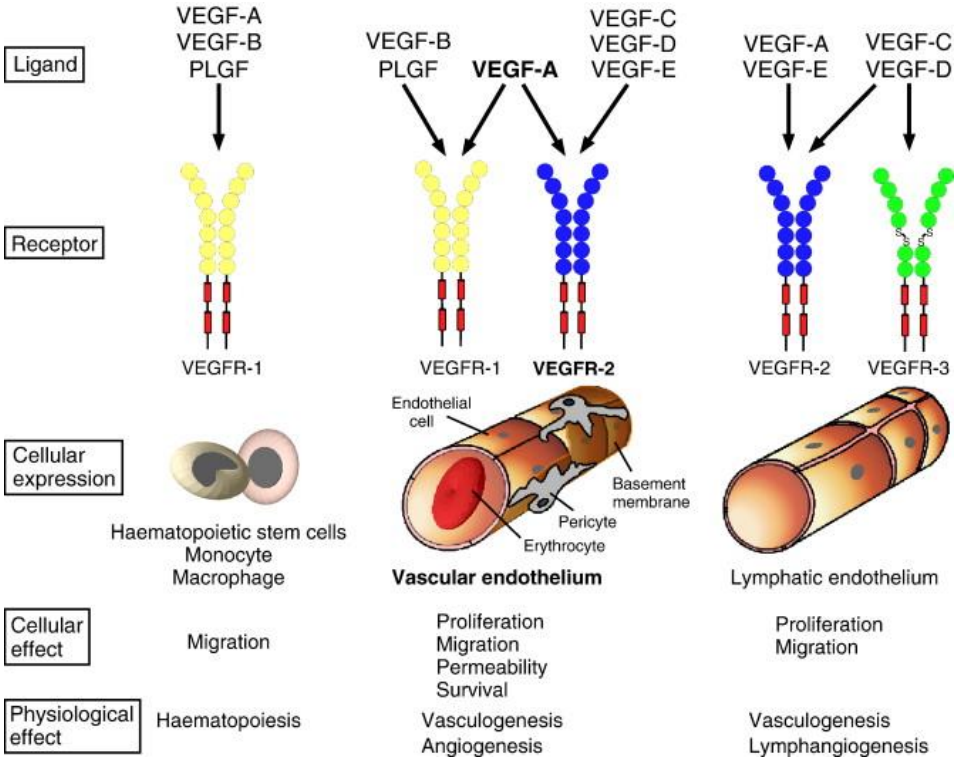


Figure 16 - Récepteurs VEGFR, leur rôle et leurs ligands VEGF[78]

Parmi les ligands VEGF possibles pour VEGFR-2, le VEGF-A est le plus important. Chez l'homme, il existe 6 isoformes de VEGF-A, dont VEGF-A_{165} est de loin la plus abondante et la plus active biologiquement (fig.17). VEGF-A_{165} est exprimé sous forme d'un homodimère de 46kDa constitué de deux mêmes sous-unités de 23kDa reliées par des liens disulfures intra et inter-chaîne.[78,79] VEGF-A_{165} est produit par les cellules vasculaires des muscles lisses, les macrophages et les cellules tumorales.

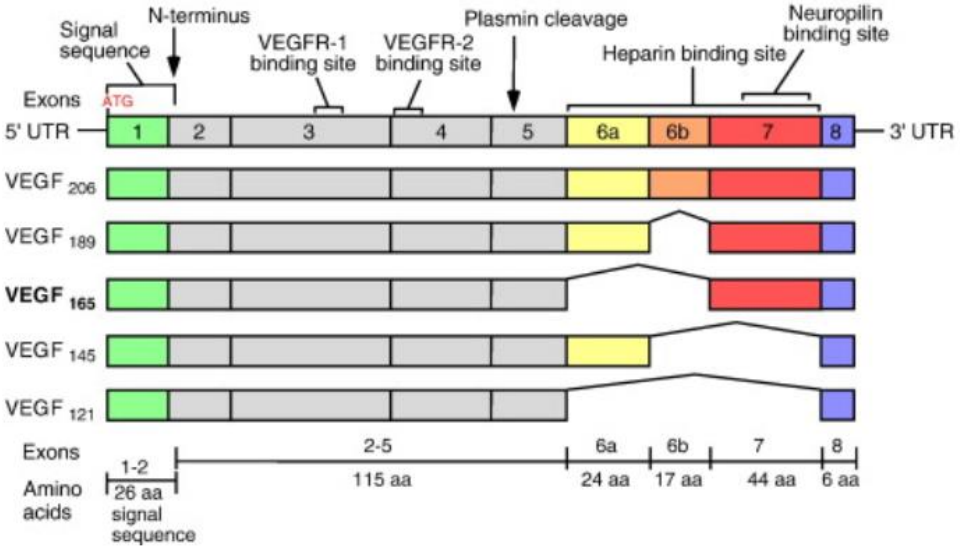


Figure 17 - Isoformes du ligand VEGF-A[78]

- **L'hypoxie stimule l'expression de VEGF-A**

Il est intéressant de noter que le promoteur du gène qui code pour le VEGF-A_{165} possède des séquences HRE (hypoxia responsive element). En effet, l'une des caractéristiques principales des tumeurs est qu'elles ont un faible apport en oxygène. Cette condition hypoxique induit la sécrétion de facteurs HIF1-α (Hypoxia Inducible Factor 1-α) par la cellule tumorale. HIF1- α se fixe sur les séquences HRE et stimule donc la transcription et la sécrétion de VEGF-A. Ce dernier peut ensuite aller se fixer sur les récepteurs VEGFR-2 des cellules vasculaires endothéliales environnantes pour promouvoir l'angiogenèse.*[78–80]*.

Il y a donc une boucle de contrôle entre la tumeur en croissance et son environnement : La tumeur en croissance est en hypoxie, cela engendre la sécrétion de facteurs favorisant l'angiogenèse, qui permet à son tour à la tumeur de croitre. Cette croissance consomme de l'oxygène et favorise alors l'apparition d'un environnement hypoxique… Le récepteur VEGFR-2 et le ligand VEGF-A_{165} sont primordiaux dans ce processus. VEGFR-2 est donc une cible de choix en oncologie.

- **Mode d'action de VEGFR2**

Le récepteur VEGFR-2 comporte une région extracellulaire constituée de 7 domaines « *immunoglobulin-like »* qui servent de points de fixation aux ligands solubles. Il comporte aussi un domaine membranaire et une courte portion intracellulaire qui présente deux domaines tyrosine kinase (fig.18).

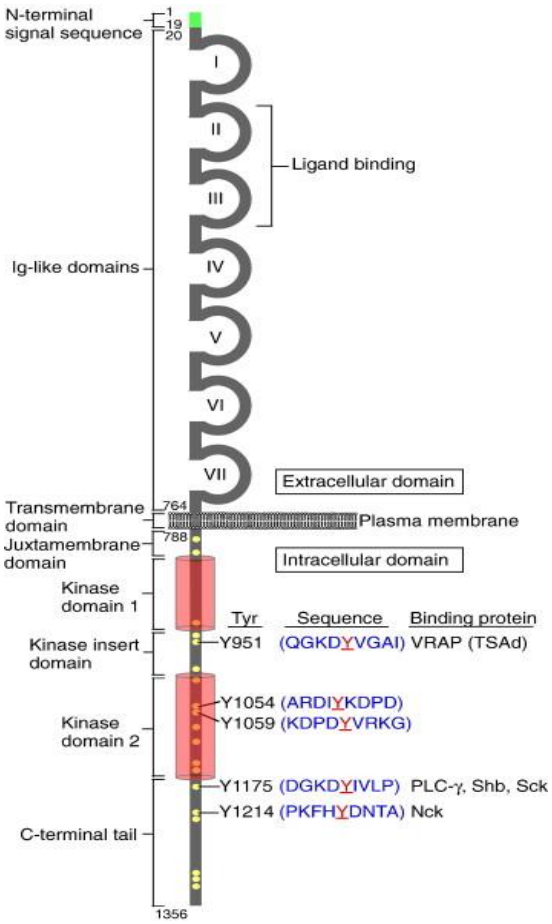


Figure 18 - Représentation de la structure de VEGFR2[86]

Lorsqu'un ligand se fixe, il induit une homo-dimérisation du récepteur et va permettre une phosphorylation des sites tyrosine (Y951, Y1054, Y1059, Y1175 et Y1214). Une fois phosphorylés, ces sites deviennent des points de fixation pour de nombreuses protéines de signalisation. C'est ainsi que la fixation du ligand VEGF-A_{165} sur VEGFR-2 déclenche des cascades de signalisation à l'origine des processus de prolifération, migration, survie et perméabilité.

- **Blocage thérapeutique de l'activité de VEGFR2**

Pour obtenir une activité anticancéreuse, on peut envisager soit de bloquer l'interaction VEGF-A / VEGFR-2 grâce à un anticorps ou une molécule antagoniste, soit bloquer directement l'activité des sites tyrosine kinase *via* des antagonistes. Par exemple, l'anticorps Bevacizumab (ou Avastin) est utilisé pour séquestrer le VEGF-A et l'empêcher d'interagir avec VEGFR-2.[81] Il a été approuvé par la FDA en combinaison avec de la chimiothérapie pour le cancer métastatique colorectal,[81] du sein[82] ou encore le cancer bronchique non à petites cellules.[83] Des anticorps directement dirigés contre VEGFR-2 peuvent aussi servir de vecteur pour des thérapies ciblées.[84] Concernant des antagonistes de sites tyrosines kinases du VEGFR-2, plusieurs exemples ont été publiés comme la *N-phenyl-N'-[4-(4-quinolyloxy)phenyl]ureas* ou le ZD6474.[85–87]

Le récepteur VEGFR-2 et son ligand VEGF-A_{165}, sont donc des cibles privilégiées et de nombreux essais cliniques réalisés en attestent.[88,89] Mais les résultats restent mitigés. Si parfois l'utilisation d'agents inhibant l'angiogenèse induite par la voie VEGFR-2 ralentit la progression tumorale et augmente la survie du patient, cet effet bénéfique n'est pas toujours observé, ou ne l'est que sur une courte période. On peut émettre plusieurs hypothèses pour expliquer ces observations : les résultats cliniques tendent à montrer que ralentir ou stopper l'angiogenèse ne serait pas une thérapie suffisante pour éradiquer la tumeur, mais que l'utiliser en combinaison avec un traitement cytotoxique serait plus utile.[89] Aussi, on peut rappeler que le blocage de l'angiogenèse induit l'hypoxie. Or,

VEGFR-2 n'est pas le seul agent pro-angiogénique stimulé par des conditions hypoxiques.[90] Ainsi, bloquer l'angiogenèse en bloquant VEGFR2 peut induire la condition hypoxique qui pourra alors stimuler d'autres récepteurs comme MET. Ces derniers pourraient *in fine* prendre le relai de VEGFR2 pour relancer l'angiogenèse. D'où un échappement thérapeutique.

Pour répondre à ces problématiques, les recherches se tournent dorénavant vers des ciblages ou des blocages de plusieurs cibles simultanément. Ainsi, en plus de bloquer VEGFR-2, des équipes proposent de bloquer le récepteur tyrosine kinase MET et son ligand HGF,[90,91] ou le récepteur tyrosine kinase EGFR.[92] Une autre possibilité serait de cibler des co-récepteurs de VEGFR-2 comme par exemple la neuropiline-1 (NRP1)

d. Neuropiline-1

La Neuropiline-1 (NRP1) est un récepteur membranaire exprimé dans de nombreuses tumeurs. Il possède une affinité pour le ligand VEGF-A165 et peut former un complexe avec VEGF-A_{165} et VEGFR-2 qui est essentiel dans l'interaction du ligand avec son récepteur.[93] NRP1 intervient aussi dans la cascade de signalisation induite par cette interaction. A ce titre, NRP1 est considéré comme un co-récepteur de VEGFR-2. NRP1 est fortement impliqué dans le processus d'angiogenèse, que ce soit seul, ou en tant que co-récepteur de VEGFR-2. Il favorise aussi la perméabilité vasculaire. Ainsi, NRP1 est une cible potentielle pour une stratégie de vectorisation et nous l'avons d'ailleurs exploité pour l'un de nos projets.

Starzec *et al.* ont découvert le ligand peptidique ATWLPPR qui est un antagoniste de l'interaction VEGF-A_{165} / NRP1.[94] Ce ligand possède une affinité pour NRP1 et peut être utilisé pour le cibler.[95] Le rôle biologique et l'intérêt de cibler NRP1 seront décrits bien plus largement en introduction de la partie I.

e. Intégrine via RGD

Le récepteur intégrine $\alpha v\beta_3$ est profondément impliqué dans le processus d'angiogenèse indispensable au développement des tumeurs, ainsi que dans leur caractère métastatique. De ce fait, l'intégrine $\alpha v\beta_3$ a été exploitée à de nombreuses reprises pour la vectorisation d'agents d'imagerie et d'anticancéreux. Cela a notamment été possible grâce à Ruoslahti *et coll.* qui ont identifié un ligand peptidique très afin de $\alpha v\beta_3$. Il contient la séquence peptidique –RGD- qui se retrouve sur la fibronectine et la vitronectine qui sont des ligands naturels de l'intégrine $\alpha v\beta_3$.[96] Il existe par exemple le peptide cyclique de synthèse Cilengitide c[-RGDf(NMe)V-] (Merck KGaA) qui a été évalué en tant qu'agent anti-angiogenique chez des patients atteints de cancers de la tête et du cou, de la prostate, de glioblastome ou de mélanome métastatique. Le traitement a été stoppé en phase III mais a confirmé l'intérêt de l'intégrine $\alpha v\beta_3$ comme cible potentielle pour le traitement des glioblastomes.[97] Le rôle de ce récepteur et de ses ligands seront plus largement détaillés dans l'introduction de la partie I.

f. Les antigènes, ou clusters de différenciation (CD)

Les clusters de différenciation (ou CD) sont des antigènes présents à la surface des cellules du système immunitaire. Ils déterminent le type cellulaire et la fonction de la cellule qui les exprime. Ils sont notamment impliqués dans les phénomènes de reconnaissance entre les anticorps et les cellules immunitaires (lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK, macrophages…).

Bien que les cellules du système immunitaire représentent la principale défense de notre organisme contre les maladies, elles peuvent elles aussi devenir cancéreuses. Les cancers du système immunitaire sont appelés lymphomes. Ils touchent les lymphocytes B (qui produisent les anticorps) et les lymphocytes T (qui attaquent les cellules considérées comme étrangères). On peut citer en exemple les lymphomes non-

Hodgkiniens (NHL) ou les leucémies lymphocytaires chroniques. La majorité des lymphomes se développent dans les ganglions lymphatiques (un de leurs organes producteurs), mais il arrive que le lymphome se déclare dans d'autres organes.

Un certain nombre de clusters de différentiation (CD) ont été identifiés de manière spécifique à la surface de lymphocytes cancéreux, et leur présence a pu être liée à celle de la maladie.[98–100] On peut citer les antigènes CD20 (lymphome non-hodgkinien), CD33 (ascite maligne), CD52 (leucémies lymphoïdes chroniques), CD40, CD25, CD137…[101] Les CD apparaissent donc comme des cibles intéressantes pour la détection et le traitement de lymphomes. Et comme ce sont des antigènes, ils peuvent être reconnus par des anticorps. Ainsi, plusieurs anticorps monoclonaux ciblant CD20, CD33 ou CD52 ont été mis sur le marché dans les années 2000.[100,102,103]

L'avantage d'utiliser un anticorps comme élément de ciblage est qu'il peut avoir un effet thérapeutique en plus. Cela s'explique par la capacité intrinsèque des anticorps à déclencher une réponse immunitaire. En effet, les anticorps, après avoir reconnu les clusters de différenciation puis s'y être fixés, peuvent déclencher la cascade du complément. Elle consiste en une succession de réactions complexes qui aboutissent à la formation d'un pore dans la membrane cellulaire qui permet l'entrée massive d'eau dans la cellule pour la détruire.[104]

L'autre processus pouvant entrainer la lyse de la cellule est la fixation de cellules immunitaires (NK ou macrophages) sur l'anticorps. En effet, les cellules NK (natural killer) ont un récepteur (CD16) qui reconnait une partie du domaine Fc de l'anticorps. Les NK peuvent s'y fixer et libérer alors de la perforine qui va détruire la cellule.

Une dernière possibilité est d'utiliser l'anticorps en tant qu'inhibiteur. En effet, en se fixant à un récepteur, il peut prendre la place de son ligand habituel et bloquer ainsi la transduction d'un signal.

Le défaut des anticorps réside principalement dans leur complexité de fabrication, leur grande taille qui peut défavoriser la biodistribution du principe actif, ainsi que leur fonctionnalisation rendue compliquée car peu sélective à cause des nombreuses

fonctions *amine* et *cystéine* présentes sur l'anticorps. Néanmoins, des méthodes de fonctionnalisation sélectives émergent.[105]

iii. *Récapitulatif des agents de ciblage pour la vectorisation*

Cible	Elément de ciblage	Référence
Récepteur		
FR-α	Acide folique	[58], [62], [66]
Intégrine $\alpha v\beta_3$	Peptide : Motif –RGD-	[96], [97]
Neuropilin-1	Peptide : ATWLPPR	[94], [95]
EGFR	Peptides : GE11, D4, Anticorps : cetuximab, I.T.K. : erlotinib, Gefitinib	[68], [71], [70], [72]
VEGFR2	Anticorps : Bevacizumab I.T.K. : ZD6474, N-pheny …	[81], [86,87]
Aminopeptidase N	Peptide : NGR	[106,107][108],[109],
GRPR	Peptide : BB2 (Bombesin)	[110], [111,112], [113]
Cluster de différenciation		
CD44	Acide hyaluronique	[114], [115], [116], [117]
CD20	Anticorps : Rituximab	[101]
CD33	Anticorps : Gemtuzumab ozogamicin	[101]
CD52	Anticorps : Alemtuzumab	[101]
Transporteurs		
STP	Polyamines (spermine, spermidine…)	[28], [35], [37]
GLUT (glucose	Fluoro-DéoxyGlucose (FGD)	[25]
Transferin receptor (TfR)	Transferin Peptide : THRPPMWSPVWPGGG	[118–120]
Cell Penetrating Peptide		
	TAT (GRKKRRQRRRPPQ)	[38]
	Penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK)	[38]
	MAP (KLALKLALKALKAALKLA)	[38]

Tableau 1 - Liste non exhaustive d'agents de ciblage pouvant être utilisés en vectorisation

2. OUTILS POUR LA VECTORISATION

A. Les différentes formes/structures de vecteur

Nous avons vu précédemment de nombreuses cibles tumorales, qui peuvent être visées *via* différents types de ligands tels que des peptides, anticorps, petites molécules… Mais il existe différents moyens d'exploiter ces ligands. On peut les lier directement au cargo que l'on veut transporter jusqu'à la tumeur. Mais on peut aussi les lier à une plateforme ou un objet moléculaire qui permettra de présenter plus de ligands pour un même cargo (pour un meilleur ciblage) ou bien d'encapsuler un grand nombre de molécules effectrices pour augmenter le ratio *cargo délivré/récepteur ciblé*. Nous allons voir dans cette partie les différentes formes que peuvent prendre les vecteurs, plateformes ou objets moléculaires.

i. *Structures « simples » : Peptide, sucres, ADN, anticorps.*

La première possibilité de vecteur est « la plus simple ». Il s'agit de relier directement le ligand de ciblage à l'agent effecteur (toxique, agent de contraste…) pour le mener jusqu'à sa cible. Ainsi, de nombreux exemples existent avec des effecteurs liés à un peptide[121], un sucre[122], un anticorps[105], une polyamine[123], à l'acide folique[124]... pour ne citer qu'eux.

L'avantage de procéder ainsi est que la synthèse est la plus simple possible. Les deux éléments, effecteur et de ciblage, sont reliés par une méthode de ligation dont certains exemples sont donnés dans la partie 2.B de cette introduction. La taille minimale de ces molécules permet d'éviter la rétention rénale (bien que d'autres facteurs puissent entrer en compte pour la favoriser). L'inconvénient est que le rapport *effecteur délivré / récepteur*

visé est de 1/1. Ainsi, si on cible des récepteurs peu exprimés et/ou rapidement saturés, la quantité de molécules délivrées sera limitée. Enfin, les systèmes « simples » sont plus à même d'avoir un poids moléculaire et une taille faibles, et être constitués d'éléments facilement reconnaissables par l'organisme (peptide, sucre…). Ces facteurs peuvent faciliter la reconnaissance donc la prise en charge de ces molécules par l'organisme afin de les évacuer. *A contrario*, cycliser une molécule, synthétiser un peptide en série D plutôt qu'en série L, remplacer les liaisons amides, réaliser des prodrogues ou protéger les molécules par divers systèmes d'encapsulation peuvent être des moyens d'augmenter la stabilité des composés. Ils rendent néanmoins la synthèse et parfois la biodistribution plus compliquées. Nous n'irons pas plus loin dans le détail des vecteurs simples.

ii. *La Multivalence.*

Pour augmenter l'affinité et parfois la spécificité d'un vecteur pour son récepteur, il est possible d'augmenter le nombre de ligands présentés par une seule et même molécule vectrice. En effet, en augmentant le nombre d'interactions ligand-récepteur, cela permet parfois d'augmenter grandement les constantes d'association, notamment parce que cette présentation multiple permet plusieurs mécanismes d'interaction (fig.19). Ces derniers dépendent du type de ligand, de sa géométrie de présentation ainsi que du type de récepteur.

Le premier type d'interaction est l'effet chélate (Fig.19a). Il s'agit de contacts multiples et simultanés entre plusieurs copies d'un ligand et un récepteur qui présente plusieurs sites de liaison identiques pour ce ligand. Cet effet est très présent dans les interactions entre les lectines et leurs ligands polysaccharidiques. Le second effet est le « statistical rebinding » (fig.19b). Comme son nom l'indique, il s'agit simplement d'une augmentation de probabilité qu'un ligand se lie à son récepteur grâce à une concentration locale en ligand accrue. Les différentes unités d'un ligand multivalent peuvent se lier

successivement au même récepteur. Le troisième effet est le « clustering » (fig.19c). La présentation de plusieurs ligands dans un espace restreint pousse les récepteurs à se rapprocher et se concentrer dans une zone plus confinée. Ce clustering de ligands est facilité par la fluidité de la bicouche lipidique et peut parfois induire le phénomène d'endocytose permettant l'internalisation des récepteurs et des ligands.[125]

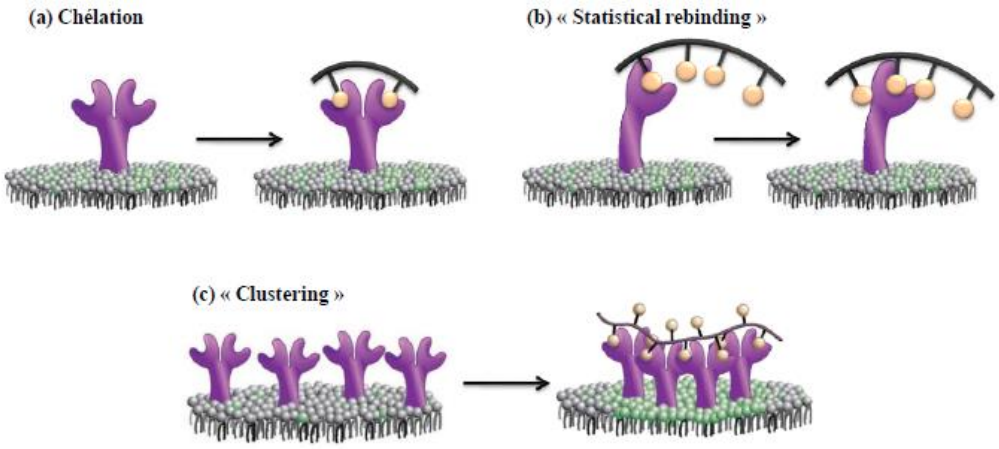


Figure 19 – Schéma des différents mécanismes de l'effet de multivalence

Certains types de vecteurs décrits par la suite (polymères, nanoparticules, châssis moléculaires) permettent d'exploiter ce phénomène de multivalence.

iii. *Châssis moléculaires*

Les châssis moléculaires sont des constructions moléculaires qui permettent d'orienter les ligands de manière spécifique dans l'espace, et de leur imposer une architecture plus ou moins rigide. Ces châssis permettent aussi une présentation multivalente des ligands. On peut citer l'exemple des cyclodextrines (fig.20), qui sont des polysaccharides cycliques (6 à 8 unités glucose). Il est possible de fonctionnaliser les positions hydroxyles des sucres par des ligands. Mais les fonctions hydroxyles étant identiques, il est difficile de les différencier pour les modifier de manière régiosélective. La molécule effectrice, elle, peut être fixée sur le châssis cyclodextrine ou peut être encapsulée dans son cœur hydrophobe (si la molécule à vectoriser est hydrophobe).[126,127]

Les calixarènes, formés par polymérisation de phénol et de formaldéhyde (4 à 8 unités), sont similaires aux cyclodextrines en termes de structure. Ils sont en général plus faciles à modifier chimiquement, mais leur capacité d'encapsulation se limite à des molécules de faible poids moléculaire (<1kDa).[128]

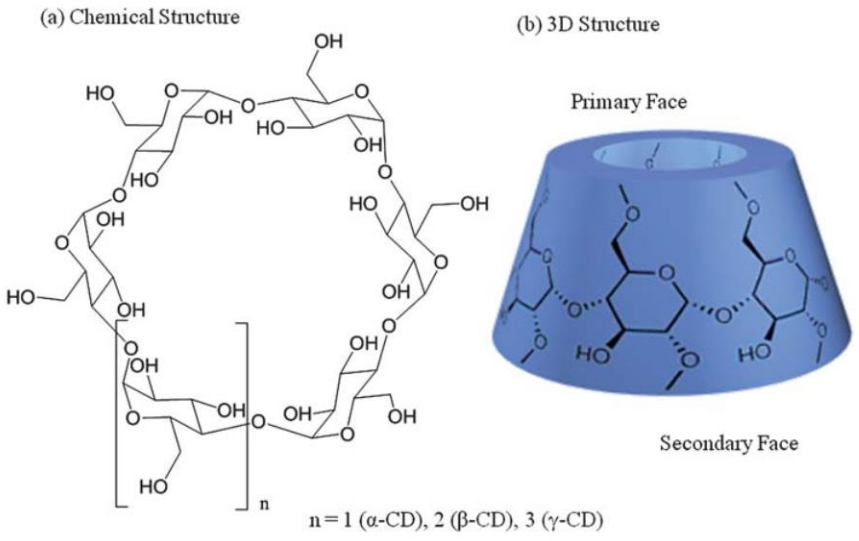


Figure 20 Structure of cyclodextrines[129]

Des châssis peptidiques peuvent aussi être utilisés. Par exemple, un cyclodécapeptide a été largement utilisé par notre équipe au cours des quinze dernières années. Il s'agit là aussi d'une molécule cyclique rigide, qui permet d'orienter différents effecteurs dans l'espace, avec une possible distinction de faces (fig.21). L'utilisation de building blocs et la fonctionnalisation post synthèse supportée ont permis de synthétiser de nombreux composés thérapeutiques et d'imagerie (entre autres applications).[130,131] La synthèse de ce châssis est évoquée dans la PARTIE I de ce manuscrit. Les 2,5-dikétopipérazines (issus de l'assemblage de deux lysines) sont un autre exemple de châssis peptidique.[132]

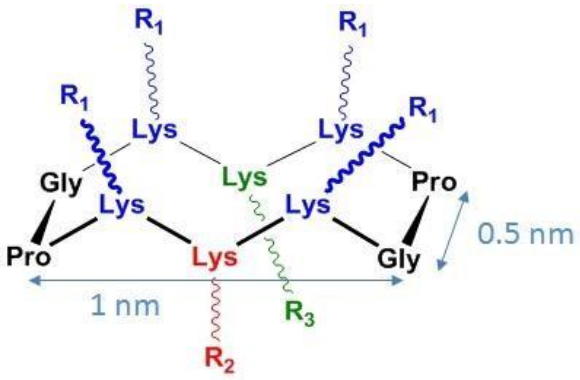


Figure 21 - Châssis cyclodécapeptidique

Des molécules organiques polycycliques, des porphyrines, adamantanes ont aussi été utilisés en tant que châssis.

iv. *Polymères linéaires et dendrimères*

La chimie des polymères est un domaine en pleine croissance, notamment en ce qui concerne la vectorisation. Le polymère peut être naturel ou synthétique. C'est une molécule dont la synthèse est souvent basée sur une réaction en chaîne, puisqu'elle est constituée d'une répétition d'un ou plusieurs motifs liés entre eux (méthyl méthacrylate, éthylène glycol, acide lactique, styrène, lysine…). Les polymères (polyacrylamide, polystyrène, polylysine…) ont donc un grand intérêt en termes de multivalence puisqu'il est possible d'avoir une multitude de ligands sur une même molécule. Par exemple, des polymères présentant des ligands RGD[133], ou une combinaison d'agents anticancéreux (Camptothecin et peptide BH3) et de ligands de ciblage (LRHR)[134] ont été synthétisés. Contrairement aux châssis précédemment cités, les polymères sont en général peu rigides, et cette propriété peut leur permettre de mieux s'adapter à leur cible. En revanche, cette flexibilité peut aussi augmenter l'entropie de l'interaction ligand-récepteur. C'est donc l'équilibre entre adaptabilité/flexibilité et entropie générée qui dictera l'interaction. Les autres avantages des polymères sont leur grande capacité de charge en ligands et/ou composés actifs, ainsi que leur possible origine naturelle (ex : le chitosane ou la cellulose) qui peut éviter un caractère immunogène. Le Polyéthylène Glycol (PEG) par exemple, bien que synthétique, est très largement utilisé pour son caractère furtif (non immunogène) et sa bonne solubilité. Enfin, côté ingénierie, il est possible de concevoir les polymères dans le but d'obtenir un relargage étalé dans le temps grâce à une dégradation progressive enzymatique, thermique, lumineuse...[135–137]

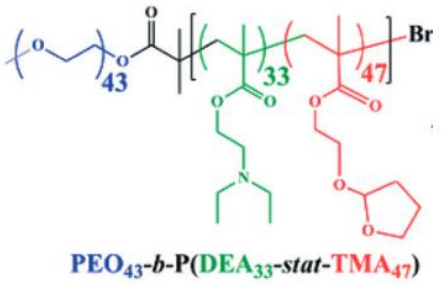


Figure 22 - Exemple d'une structure polymère

Les principaux défauts des polymères sont leur synthèse qui peut s'avérer difficile à contrôler, ainsi que la difficulté des analyses qui en découlent. En cas de masse et de taille élevées, ils peuvent bénéficier de l'effet EPR mais cela peut aussi jouer en leur défaveur en terme de biodisponibilité.

Les dendrimères sont une autre forme de polymères. Ils sont faits à partir de molécules que l'on fait réagir entre elles en plusieurs étapes (ou générations) pour former une arborescence. A chaque génération, on fait réagir des molécules qui pourront greffer au moins deux nouvelles molécules à la génération suivante. L'élongation est donc poly-directionnelle et la structure obtenue est plutôt sphérique. A ce titre, les dendrimères sont parfois considérés comme des nanoparticules (évoquées plus bas). Après plusieurs générations de réactions, on peut terminer le cycle en fonctionnalisant par des ligands ou des effecteurs (fig.23). Leur synthèse peut s'avérer compliquée quand le nombre de générations est trop élevé.

Figure 23 – Schéma de Dendrimère

Les polymères peuvent aussi être décorés par des châssis moléculaires comme des cyclodextrines pour combiner les effets de rigidité locale et de souplesse générale, ainsi que la multivalence.[129]

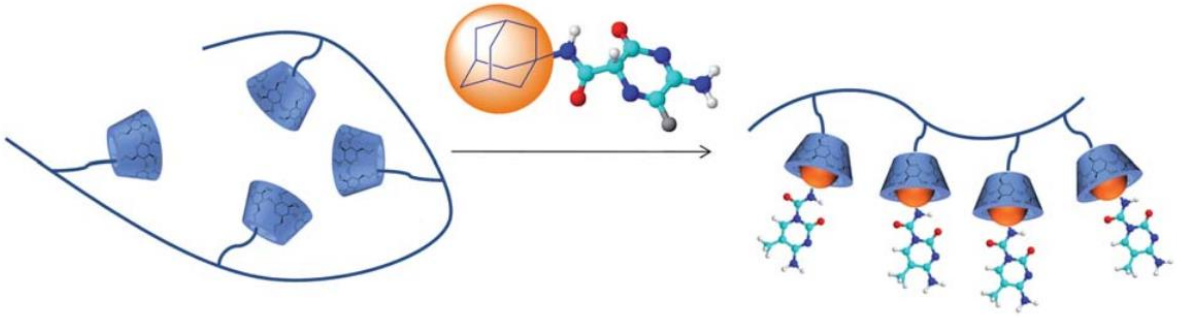


Figure 24 - Polymer de cyclodextrines, en interaction avec des adamantyl 5-FU[129]

Certaines chaînes de polymères peuvent s'auto-assembler en solution pour former des structures supramoléculaires, comme des sphères ou des pelotes. Ces structures peuvent se former et/ou se détruire suite à un ou plusieurs stimulis (pH, ultrason, température, enzyme). Si de telles structures polymères sont chargées en composé d'intérêt, de façon covalente ou non covalente, ils permettent alors un relargage plus ou moins contrôlé de ce composé. Ce type de structures est évoqué dans le paragraphe suivant.

v. *Nanoparticules*

Nous avons vu avec les polymères et les châssis moléculaires des vecteurs plus ou moins contraints et rigides qui permettent d'exposer des ligands et/ou agents effecteurs de manière multivalente. Ces vecteurs sophistiqués permettent d'avoir une plus grande quantité d'agents effecteurs qu'un assemblage classique « ligand-effecteur ». Mais il est possible d'augmenter encore la quantité d'agents transportés en les encapsulant à l'intérieur d'objets moléculaires Ainsi, la synthèse et l'ingénierie d'objets moléculaires – majoritairement sphériques - pour la vectorisation est en véritable expansion.[138–140] Cela permet à la fois d'avoir une grande surface à fonctionnaliser mais aussi d'exploiter dans certains cas la cavité qui se trouve à l'intérieur de la sphère, pour augmenter de manière très significative le chargement en composé d'intérêt. Il est aussi possible de former des cages, des tubes... Ces composés sont regroupés sous le terme "nanoparticules", que Daniels définit comme « regroupant les entités, architectures, et particules d'ingénierie qui ont pour point commun une taille comprise entre quelques nanomètres (~5nm) et quelques centaines de nanomètres (~200nm) ».[141]

Le terme général « nanoparticules », regroupe de nombreux types de composés chimiques (fig.25). On peut citer d'abord les nanoparticules inorganiques et les nanoparticules organiques (polymères et micelles), qui sont des « sphères pleines »,

fonctionnalisées de manière covalente ou par absorption. Ensuite, il y a les émulsions et liposomes, qui présentent une vésicule synthétique, dans laquelle des composés peuvent être encapsulés. Enfin, il y a les nanotubes de carbone :

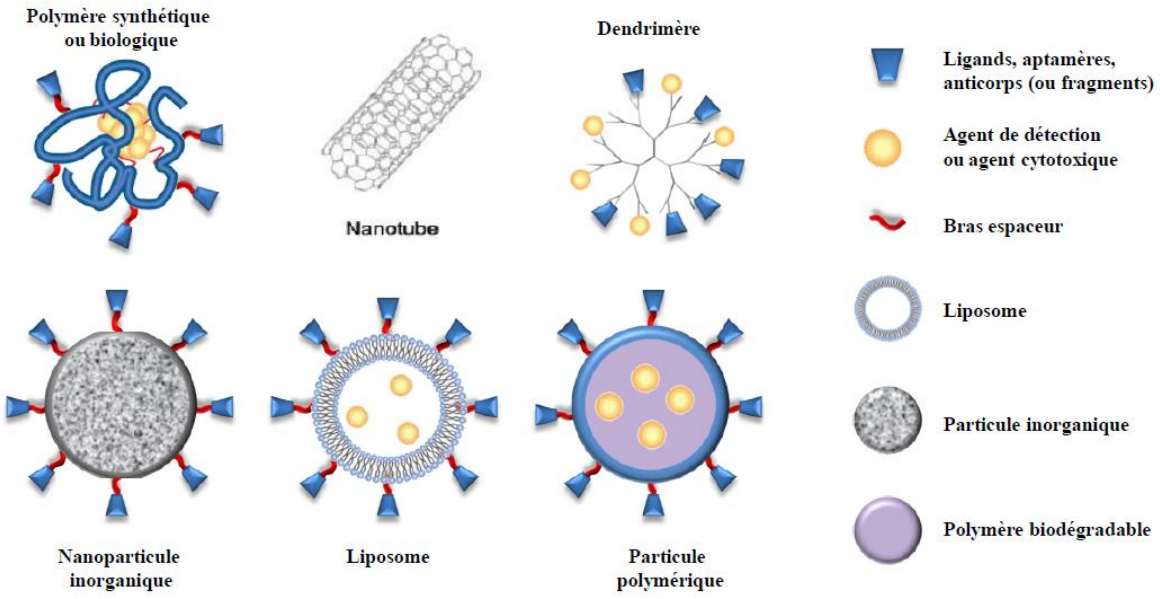


Figure 25 – Exemples de nano-vecteurs utilisés en thérapie cancéreuse [174,177]

Pour les particules inorganiques, on note principalement l'utilisation de particules de silice, d'or, d'oxyde de fer, et de Quantum Dots (composés en partie de métaux conducteurs comme le Zn ou le Cd).[142–144] Ces structures présentent l'avantage d'avoir une grande surface disponible pour les décorer de ligands, tout en conservant une grande stabilité. Les propriétés intrinsèques des métaux peuvent être exploitées pour des applications IRM, thérapie photothermique, imagerie[145,146].

Les défauts inhérents aux particules inorganiques résident dans leur coût, leur devenir dans l'organisme (élimination et toxicité en question), et le fait qu'on ne puisse charger que leur surface (dans certaines particules de silice par exemple, il est tout de même possible d'exploiter les pores qu'elles renferment). Leur taux de fonctionnalisation et l'orientation des ligands est difficile à contrôler, d'autant plus lorsqu'il est question de fonctionnalisation mixte, avec plusieurs types de ligands ou d'effecteurs.

Les « sphères pleines organiques » rassemblent les nanoparticules de polymère et les micelles. Comme évoqué précédemment, les polymères linéaires peuvent s'auto-assembler de manière non covalente pour former une pelote sous l'impulsion de forces électrostatiques et interactions hydrophiles et hydrophobes. On parle de nanoparticules polymériques (fig.26). Lorsque le polymère est amphiphile (à la fois hydrophile et hydrophobe), il peut s'auto-organiser de manière à former une micelle : Les molécules de polymères s'assemblent en une sphère, avec leur partie hydrophile orientée vers l'extérieur et formant la coque de la sphère, tandis que les parties hydrophobes sont orientées vers l'intérieur de la sphère et forment son cœur hydrophobe (fig. 26).
Les nanoparticules polymériques et micelles sont des objets dont la surface peut être décorée avec des ligands de ciblage, mais qui peuvent aussi être chargés[147–149] avec des agents effecteurs (dans le cas des pelotes de polymère) ou être encapsulés (dans le cas des micelles).[150–152] Il est donc possible de transporter plus de composés qu'avec les particules inorganiques puisqu'on ne se limite pas uniquement à l'exploitation de la surface de l'objet, mais aussi à son volume. De plus, les molécules transportées par la particule peuvent être libérées grâce à un stimulus (oxydation, réduction, pH, température, lumière, vibrations, magnétisme) provoquant la détérioration de la capsule.[153,154] Les composés encapsulés peuvent aussi être libérés de façon passive.

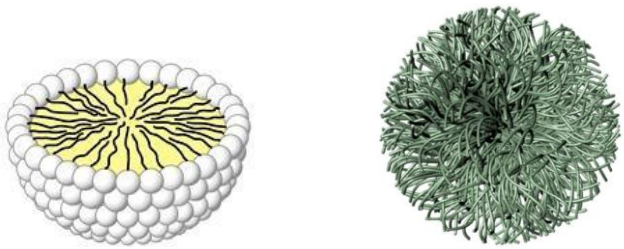


Figure 26 – Micelle et nanoparticule polymérique (Sechi, targeted therapy…)

Ces systèmes d'encapsulation augmentent significativement la quantité de drogue transportée, mais leur structure induit forcément une stabilité moindre comparée aux particules inorganiques et autres vecteurs vus précédemment. En plus des problèmes d'homogénéité, d'orientation, de nombre ou de densité de ligands qu'elles ont en commun avec les particules inorganiques, les micelles et particules polymériques présentent le risque d'avoir une « fuite » non désirée de leur contenu. Ce paramètre doit être contrôlé.

Les liposomes sont semblables aux micelles, mais ils présentent en plus une cavité, une vésicule synthétique qui doit sa présence à la formation d'une bicouche amphiphile. Les molécules amphiphiles sont disposées en tête-à-queue, avec des parties hydrophiles pointant vers l'extérieur et vers l'intérieur. Il y a donc formation d'un domaine hydrophobe délimité par deux couches hydrophiles, ainsi qu'une cavité hydrophile centrale (fig.27). Les liposomes, grâce à cette cavité, sont les vecteurs pouvant transporter le plus d'agents effecteurs. Mais une fois de plus, cet avantage de « drug loading » se fait au détriment d'une stabilité généralement plus faible.

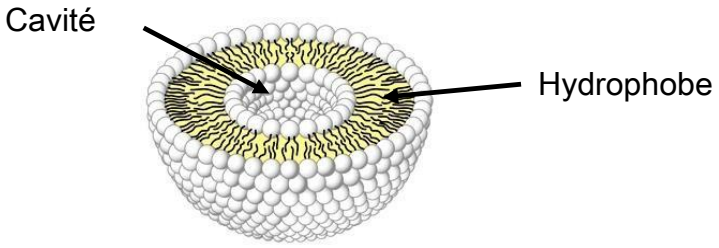


Figure 27 – Schéma d'un liposome

Les vecteurs supramoléculaires ne sont pas tous sphériques. En effet, il est possible de former des cages, des tétraèdres, des tubes... Parmi eux, les nanotubes de carbone sont particulièrement représentés. Composés de feuillets de graphène, ils sont très robustes. Mais leur apparente toxicité est un frein à leur utilisation. Il apparait que les nanotubes fonctionnalisés pourraient être moins toxiques que leurs homologues non modifiés, mais le débat reste très ouvert.[155,156]

B. Méthode de ligation vecteur – cargo

Dans le but de concevoir des molécules thérapeutiques efficaces, nous avons vu de nombreuses spécificités cancéreuses exploitables, ainsi que plusieurs exemples de vecteurs permettant d'augmenter le nombre de ligands présentés ou la quantité d'agents effecteurs transportés. Le dernier concept primordial pour la synthèse de telles molécules est la conjugaison des différents éléments entre eux pour ne former qu'un seul et même assemblage moléculaire. En effet, plusieurs réactions chimiques sont nécessaires pour lier les ligands et l'agent thérapeutique au vecteur. Les liaisons formées doivent être le plus stable possible en milieu physiologique (ou devenir instables mais de façon contrôlée pour libérer un produit actif de manière ciblée). Elles doivent aussi être orthogonales entre elles pour simplifier la synthèse de molécules complexes. Il existe deux types de liaisons chimiques : les ligations chimiques traditionnelles et les chimiosélectives.

i. *Liaisons chimiques traditionnelles*

Les exemples typiques de liaisons chimiques traditionnelles sont le lien ester et surtout le couplage amide, qui fait intervenir une fonction acide carboxylique et une fonction amine terminale. Ce couplage est largement utilisé pour la synthèse de peptides. Comme certains acides aminés portent des fonctions réactives en position latérale (alcool, amine, acide), l'utilisation de groupes protecteurs est nécessaire pour que la réaction ait lieu uniquement entre les fonctions désirées. Ces groupes protecteurs requièrent une ou plusieurs étapes de déprotection pour obtenir le produit final désiré. De nombreux groupements protecteurs orthogonaux ont été mis au point pour faciliter la modification des molécules.[157]

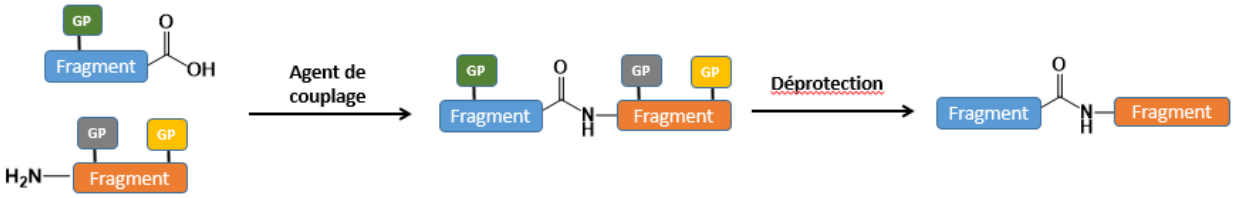


Figure 28 - Principe de couplage amide entre deux fragments protégés

Si la liaison amide est très présente dans la nature, elle n'en reste pas moins compliquée à mettre en œuvre en synthèse organique. Ainsi, des agents de couplage tels que le PyBOP, ou le HBTU sont nécessaires pour la synthèse de peptides.[158] De plus, la présence de groupements protecteurs peut entrainer des problèmes de solubilité. Et malgré leur présence, il peut s'avérer difficile de conjuguer des biomolécules à cause de conditions de ligations trop peu spécifiques ou incompatibles. Par exemple, il est difficile de contrôler la conjugaison avec une protéine car cette dernière présente de nombreuses fonctions amine et acide réactives. Un couplage peptide-oligonucléotide est, lui, rendu compliqué par la déprotection en milieu acide du peptide, dans lequel les oligonucléotides sont instables.

ii. *Ligations chimiosélectives*

Pour faciliter l'assemblage de biomolécules, il existe une alternative aux méthodes de couplages traditionnelles. Il s'agit des réactions chimiosélectives. Comme son nom l'indique, une réaction chimiosélective met en jeu deux fonctions chimiques ayant une réactivité réciproque et spécifique. Deux éléments portant ces fonctions complémentaires réagiront entre eux uniquement *via* ces dernières. Ainsi, ces méthodes permettent généralement de s'affranchir de groupements protecteurs et présentent de bons rendements sans nécessiter d'agents de couplage. Les réactions rapides et effectives en milieu aqueux sont privilégiées. Certaines réactions sont possibles et spécifiques en présence de cellules, mais aussi dans les cellules, *in vitro* et *in vivo*. On parle dans ce cas de réactions bioorthogonales plutôt que chimiosélectives.[159,160]

Deux catégories de ligations chimiosélectives se dégagent : celles aboutissant à un lien natif (comme les liens ester ou amide) et celles donnant lieu à un lien non-naturel.[161]

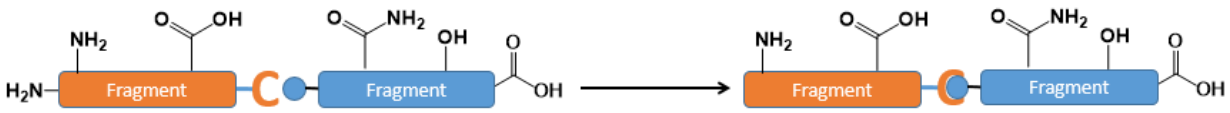


Figure 29 - Principe de la ligation chimiosélective

a. Ligation native

Plusieurs réactions chimiosélectives aboutissent à un lien natif. La première à avoir été mise au point par Kent *et al.* fut baptisée la « Native Chemical Ligation » (NCL). Il s'agit d'une réaction entre une fonction thioester et un résidu cystéine en position *N*-terminale d'un peptide.[162]

Raines *et coll.* se sont inspirés de ce concept de « capture/réarrangement » et de la réaction de Staudinger pour mettre au point la méthode « Traceless Staudinger Ligation » (fig.30). Cette réaction fait intervenir dans un premier temps un azoture et un ester de phosphinothiol qui forment un intermédiaire iminophosphorane. Un réarrangement S -> N shift aboutit ensuite à un lien natif.[163]

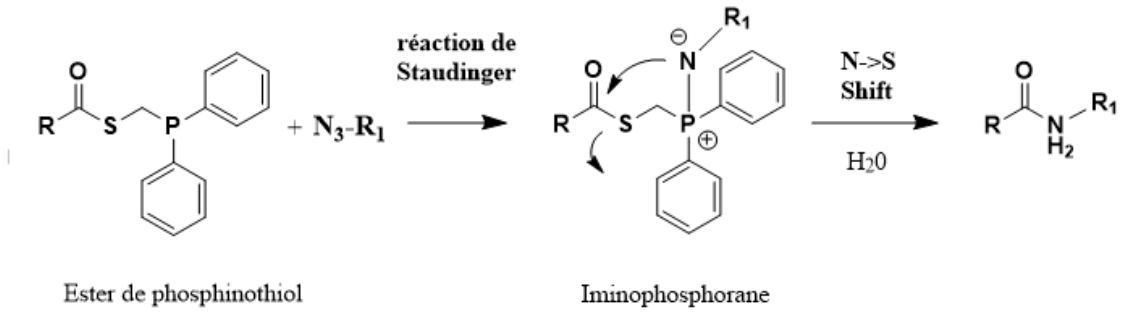


Figure 30 - Principe de la "Traceless Staudinger Reaction"

Une dernière réaction mettant en œuvre un S->N shift a été décrite quasi simultanément par deux équipes : Melnyk *et al.*, et Liu *et al.*.[164,165] Les premiers ont nommé cette méthode SEA car c'est aussi l'abréviation du groupement *bis(2-sulfanylethyl)amido* qu'ils utilisent en position C-terminale d'un des partenaires et qui réagit avec le résidu cystéine de l'autre partenaire (fig.31). Le groupement SEA peut se trouver sous forme fermée, avec un pont disulfure (SEA^{off}), ce qui permet de bloquer momentanément sa réactivité, pour permettre l'introduction d'autres acides aminés. Après ouverture du groupement SEA par réduction du pont disulfure (SEA^{on}), le groupement SEA^{on} peut effectuer un N->S shift intramoléculaire pour donner un thioester. Cette réaction réversible est favorisée en milieu acide. A pH 7, le lien amide est majoritaire, mais cela n'empêche pas la formation intramoléculaire du thioester qui peut ensuite subir une réaction (réversible) de transthioestérification avec la fonction thiol du partenaire cystéine. Le nouveau thioester formé subit ensuite un S->N shift pour former un lien amide natif stable. L'ajout de MPAA (mercaptophenylacetic acid) permet d'accélérer la réaction en augmentant les possibilités de réactions de transthioestérification. Cela n'engendre pas de produit secondaire puisque les transthioestérifications sont réversibles, contrairement au lien natif formé.[164]

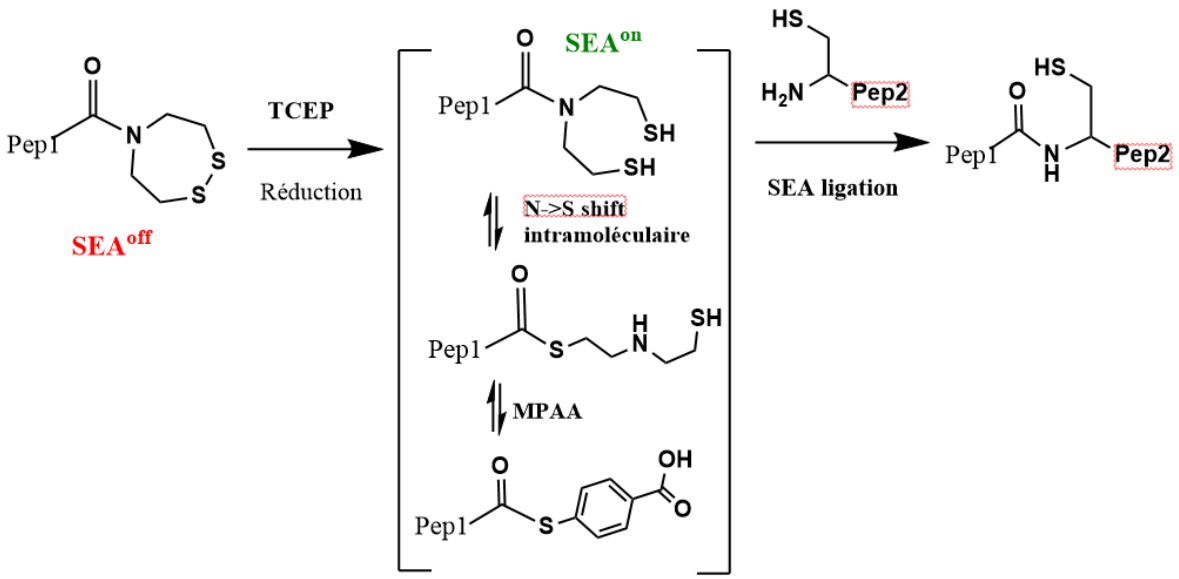


Figure 31 - Principe de la SEA Ligation

Enfin, des groupements sélénocarboxyle et thioacide ont été introduits sur la partie C-terminale pour réagir avec un azoture partenaire, et le groupe de J. Bode fait réagir un cétoacide avec une hydroxylamine (ligation KAHA) pour obtenir un lien natif (fig.32).[166,167] Ils ont également mis au point des versions utilisant des hydroxylamines cycliques (dérivées de sérines).[168]

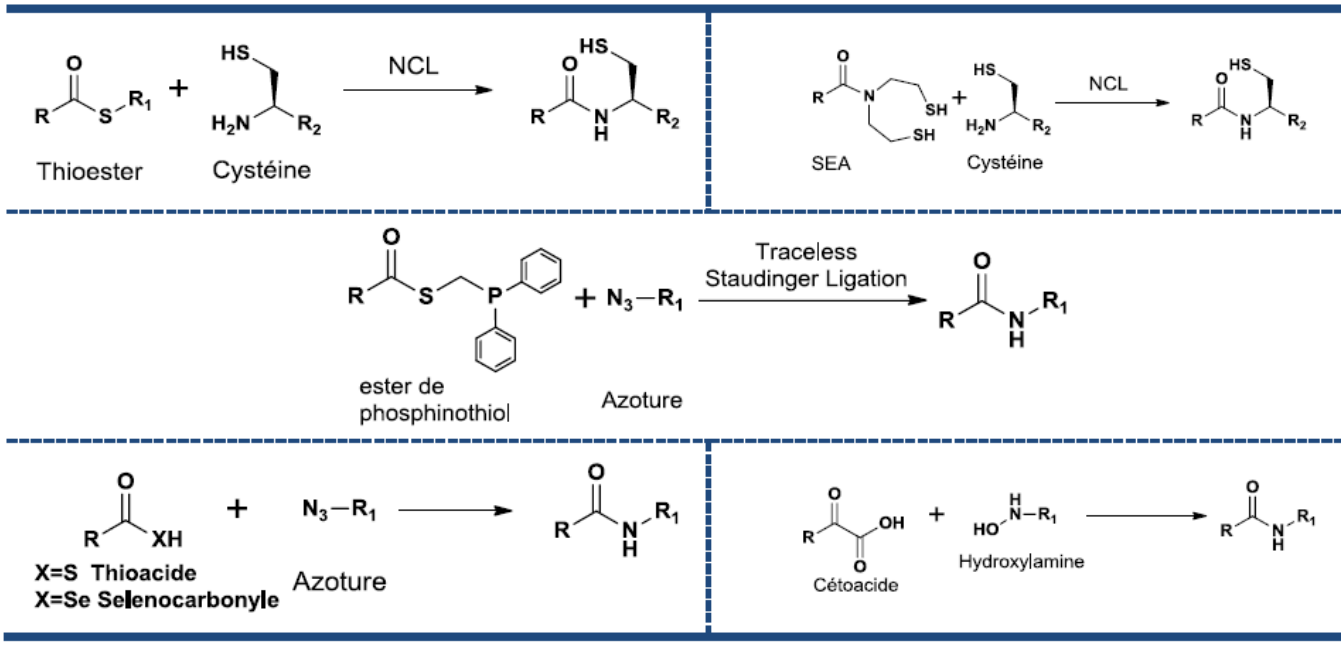


Figure 32 - Principales ligations chimiosélectives formant un lien natif

b. Ligations par lien non-naturel

Au cours des vingt dernières années, de nombreuses réactions de ligation non-naturelles ont vu le jour. L'objectif étant de tendre vers des réactions très rapides, chimiosélectives, et compatibles avec des conditions douces, voire physiologiques (pH neutre, température…).

- **Cycloadditions**

La plus célèbre d'entre elles, communément appelée réaction « click », a été développée par Meldal[169] et Sharpless.[170] Il s'agit d'une cycloaddition 1-3 dipolaire entre un alcyne et un azoture (fig.42, p.66). La catalyse de la réaction par le cuivre I permet d'isoler un lien triazole 1,4 disubstitué (alors que la version non catalysée donne les isomères 1-4 et 1-5 en proportions égales). Cette réaction est orthogonale vis-à-vis de très nombreuses fonctions chimiques. Elle peut être réalisée dans des conditions douces (milieu en partie aqueux, 37°C) et donner de bons rendements. Pour ce faire, il est préférable d'utiliser du cuivre II (ex : $CuSO_4$) que l'on réduit *in situ* avec de l'ascorbate de sodium, ainsi qu'un ligand du cuivre qui va faciliter la solubilité du métal, et stabiliser sa forme réduite cuivre I. Là aussi, beaucoup de ligands du cuivre ont été décrits. Ces ligands présentent généralement des fonctions amine substituées ou cycliques. Les plus répandus sont le THPTA, le TBTA et les bathophénantrolines (fig.33).[171] Alors que le cuivre est toxique pour l'organisme, des équipes ont développé des ligands qui permettent de réaliser la cycloaddition catalysée au cuivre *in vivo* sans toxicité apparente.[172,173] Aussi, une molécule « all in one » présentant à la fois un azoture, un système de ligands triazoles et un fluorophore a été mise au point pour du marquage *in vivo*.[174]

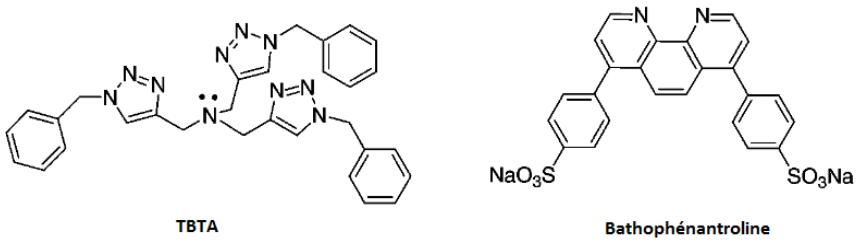


Figure 33 - exemples de ligands du cuivre

La réaction de cycloaddition dipolaire 1-3 catalysée au cuivre I (CuAAC pour copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) marqua une grande avancée dans le domaine de la chimie. Mais quelques années après la popularisation de cette réaction, un nouveau

cap fut franchi. En effet, il est maintenant possible de réaliser une cycloaddition 1-3 entre un alcyne et un azoture sans nécessiter de catalyse au cuivre. Il faut pour cela utiliser un alcyne contraint. Cette nouvelle réaction fut baptisée SPAAC pour strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (Fig.42, p.66). Une fois encore, de nombreux exemples d'alcynes contraints ont été développés (DIFO, MOFO, BARAC…).[160] Et cette réaction a été popularisée par Bertozzi *et al.* qui l'ont utilisée *in vivo* dès 2004.[175]

La cycloaddition entre un alcyne contraint et une nitrone (SPANC) a été utilisée par Van Delft *et coll.* pour la double fonctionnalisation d'une sérine en position amine terminale (fig. 34).[176] En effet, l'oxydation de la sérine permet de former un aldéhyde glyoxylique. Ce dernier peut réagir avec une N-propargylhydroxylamine pour former une nitrone arborant une fonction alcyne en β de l'azote. La nitrone peut alors réaliser une cycloaddition avec l'alcyne contraint d'un premier partenaire, tandis que l'alcyne vrai permettra une cycloaddition avec la fonction azoture d'un second partenaire.

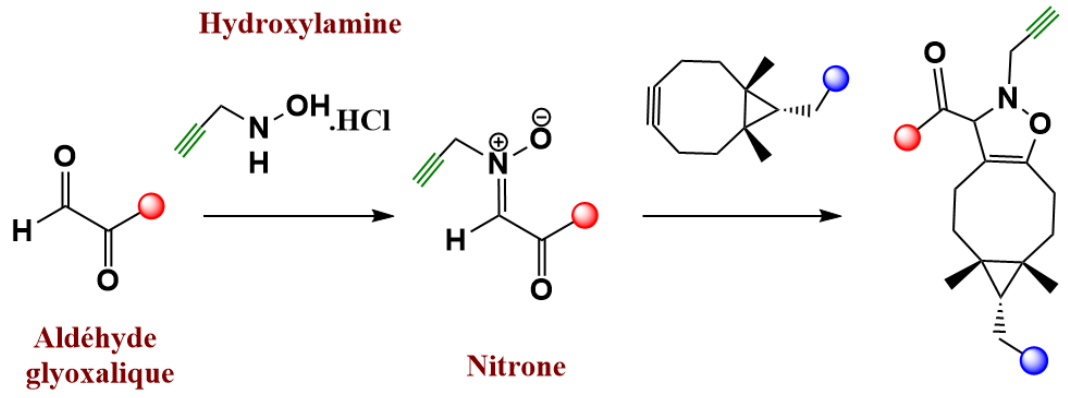


Figure 34 - Double ligation aldéhyde-hydroxylamine puis SPANC

Les alcènes également sont utiles en ligation. Les diènes et diénophiles sont impliqués dans les fameuses réactions de Diels Alder, qui peuvent être neutres, normales ou inverses.[177] Par exemple, la tétrazine réagit avec le trans-cyclooctène (alcène contraint) selon une *réaction de Diels-Alder à demande inverse en electron* (le Diène est substitué par des groupements électroattracteurs) suivie d'une *rétro Diels-Alder* (fig.35). La

constante de vitesse de cette réaction (13000 M^{-1} s^{-1}) en fait la plus rapide des réactions bioorthogonales à ce jour.[160,178]

Un autre alcène contraint, l'oxanorbornadiène réagit avec un azoture *via* une cycloaddition suivie d'une rétro Diels-Alder pour former un triazole (fig.36).[160]

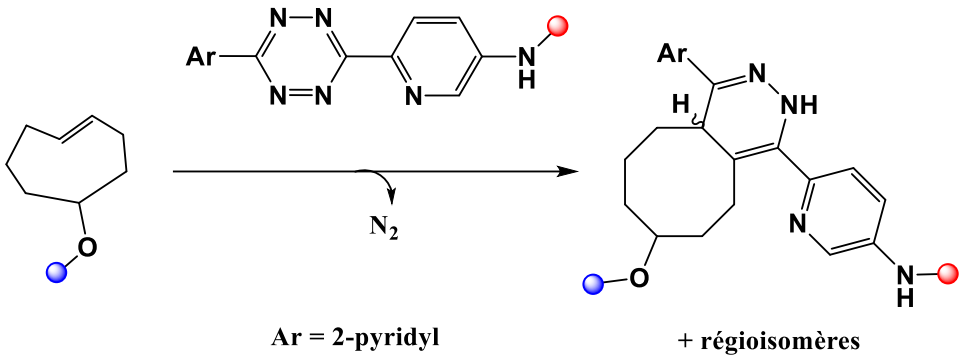


Figure 35 - Réaction du trans-cyclooctène avec la tétrazine[160]

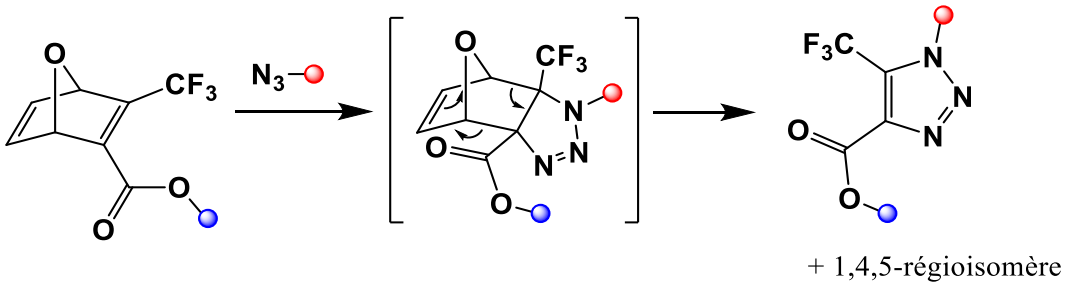


Figure 36 - Réaction d'un norbornène avec un azoture[160]

D'autres dipôles que l'azoture peuvent être utilisés pour les réactions de cycloaddition (fig.37). Des alcènes contraints peuvent réagir avec un oxide de nitrile[179] ou un nitrosocarbonyl[180] (généré *in situ* à partir d'un acide hydroxamique en présence de catalyseur CuI, ou thermiquement par retro [4+2] de diméthylanthracène). Un alcène terminal peut, lui, réagir avec une nitrilimine,[181] ou avec un composé diazoïque (de façon sélective malgré la présence d'azoture).[182]

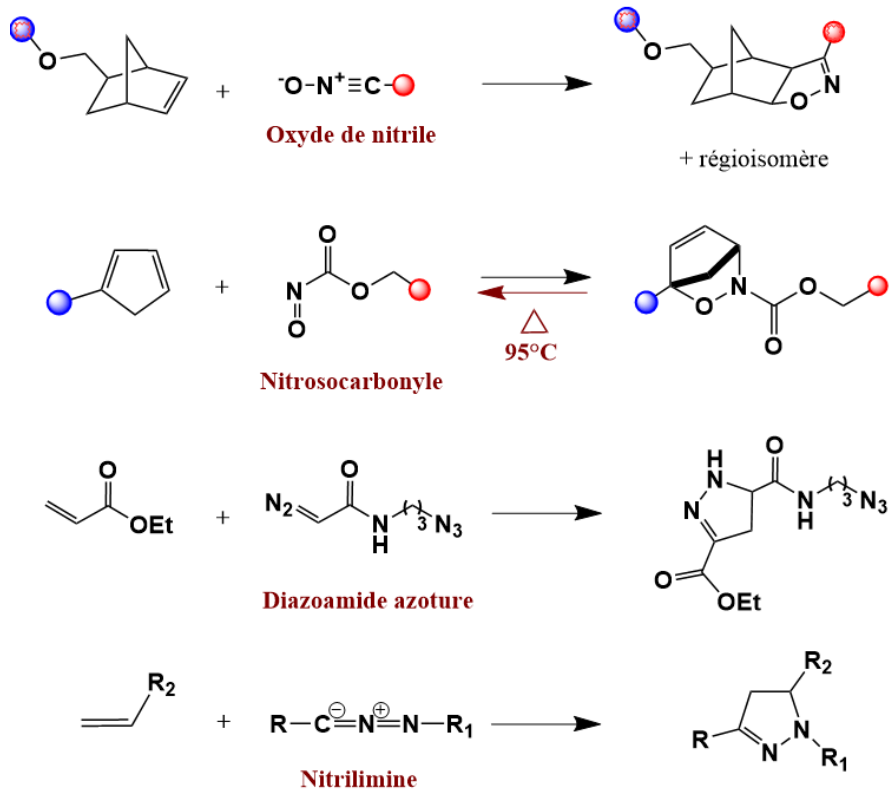


Figure 37 - Exemples de dipôles impliqués dans des ligations

Enfin, la réaction avec une sydnone est la plus rapide des réactions mettant en jeu un alcyne contraint (fig.38). Cette réaction a été découverte par Taran *et coll.* grâce à un ingénieux système de screening : Un anticorps A est fixé sur support et un anticorps B porte un Tag fluorescent. Un substrat de l'anticorps A est décoré par un dipôle parmi les 11 sélectionnés pour l'étude, tandis que le substrat de l'anticorps B est doté d'un dipolarophile parmi 8 sélectionnés (fig.39). Les 88 réactions possibles sont testées en présence de 31 métaux différents. Une analyse de la fluorescence résiduelle après réaction puis rinçage (sur le principe d'un test ELISA) permet d'isoler les réactions effectives. Après des études plus poussées sur la cinétique et la biocompatibilité des

réactions, ce travail impressionnant a permis d'identifier la réaction entre une sydnone et un alcyne contraint.[183] Cette réaction a été étudiée plus en détail par la suite, révélant le potentiel des 4-Halogéno-sydnones (4-chloro-sydnone réagit 10 fois plus rapidement qu'un azoture avec le bicyclo-[6.1.0]-nonyne (BCN)).[184]

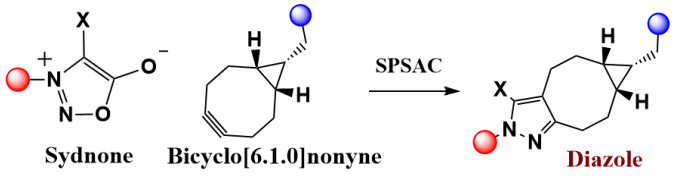


Figure 38 - Ligation via une fonction sydnone

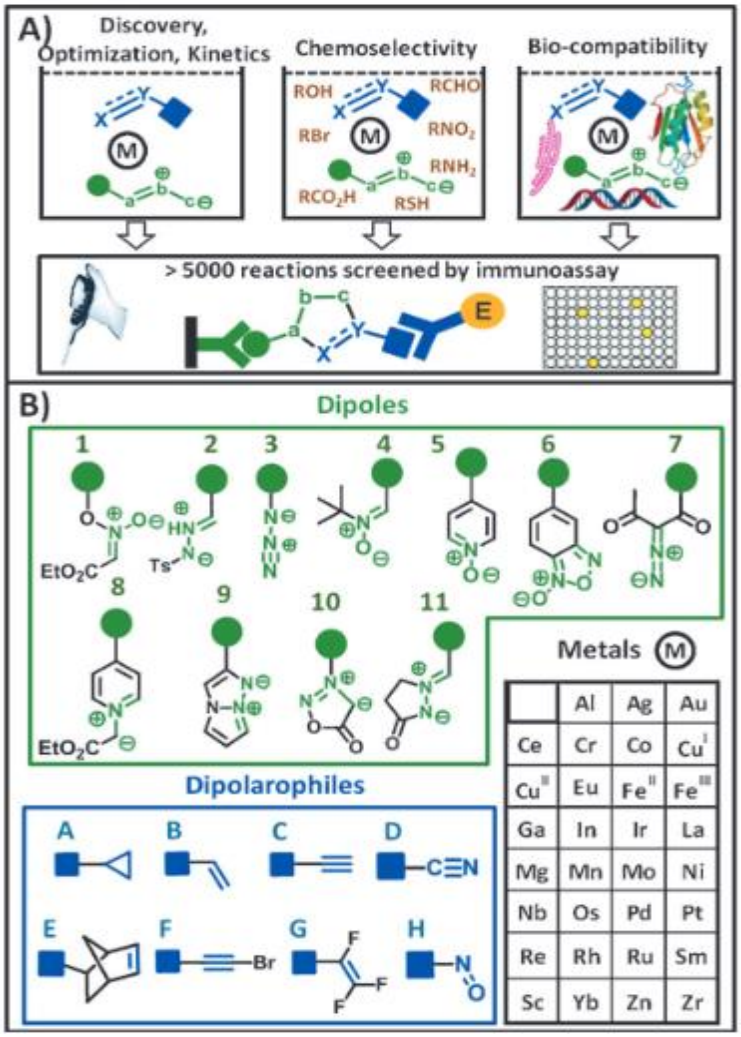


Figure 39 - Extrait de publication représentant le screenin de ligation chimiosélecive

- **Ligations carbonyles**

Des réactions impliquant des carbonyles sont aussi très utilisées (fig.40). Leur condensation (souvent catalysée en milieu acide) avec des fonctions amines primaires nucléophiles conduit à des liens imines qui peuvent être réduits *in-situ* pour former un lien amide stable. La présence d'hétéroatomes donneurs d'électrons en position α de l'amine (atome d'oxygène pour une fonction hydroxylamine, atome d'azote pour la fonction hydrazone) permet de stabiliser la liaison formée avec le carbonyle (liens oxime et hydrazone respectivement). La liaison est donc moins susceptible de s'hydrolyser. Comme les liens oxime et hydrazone sont stables à pH physiologique et assez simples à mettre en place, ils sont couramment utilisés pour la conjugaison de biomolécules.[185] Les fonctions 1,2-aminothiol d'une sérine terminale peuvent aussi se condenser avec un carbonyle à pH acide (4-5) pour former un lien thiazolidine. Cette méthode a notamment été utilisée par Neri *et coll.* pour fonctionnaliser des anticorps.[186] Enfin, certains carbonyles comme l'α-oxo aldéhyde sont particulièrement réactifs et utilisés en bioconjugaison.[187]

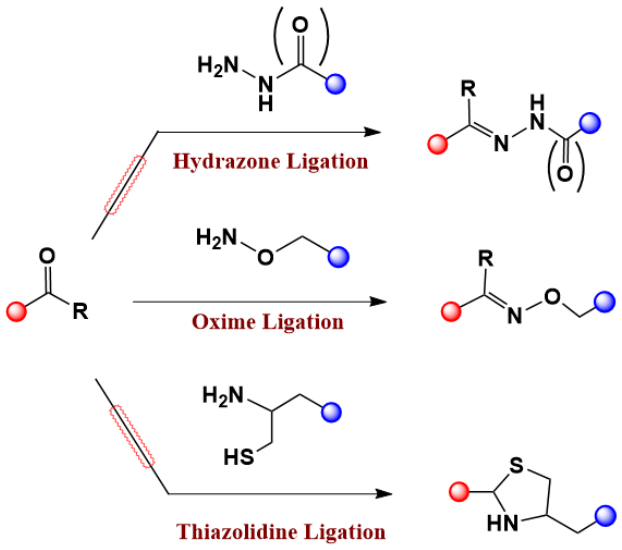


Figure 40 - Ligations avec une fonction carbonyle[188]

- **Reaction avec les thiols**

Les fonctions thiols sont très utilisées en bioconjugaison. Elles ont l'inconvénient de pouvoir former des ponts disulfures dans certaines conditions (basique, oxydative), mais elles ont aussi l'avantage d'être présentes sur de nombreuses molécules biologiques (protéines, anticorps). Comme elles sont toutefois moins présentes que des amines libres, elles permettent une fonctionnalisation plus sélective des biomolécules. De plus, les thiols offrent de nombreuses possibilités de ligation : ils peuvent réagir avec un maléimide suivant une addition de mickaël, avec un alcène ou un alcyne en condition thermique ou radicalaire,[189,190] sur un α halo-carbonyle en effectuant une addition nucléophile, en s'additionnant sur un allènamide,[191] mais aussi par substitution nucléophile d'un pont disulfure activé[192] ou sur un 3-arylpropriolonitrile. Ce groupement arylpropiolonitrile a été développé par Wagner *et coll.* qui l'ont utilisé en combiné avec une fonction maléimide au sein d'un même réactif baptisé MAPN (fig.41). Ce réactif a permis la fonctionnalisation « thiol to thiol » d'un anticorps : Les différentes vitesses de réaction du thiol envers le maléimide et le 3-arylpropionitrile permettent une fonctionnalisation sélective du réactif MAPN par un premier réactif thiol avant de faire réagir le MAPN modifié sur les fonctions thiol de l'anticorps pour obtenir un lien très stable.[193,194] Enfin, le thiol d'une fonction 1,2-aminothiol, présente notamment sur les serines en position N-terminale, réagit avec un 2-cyanobenzothiazole (fig.41). Rao *et coll.* ont pu exploiter cette ligation *in vivo*.[195]

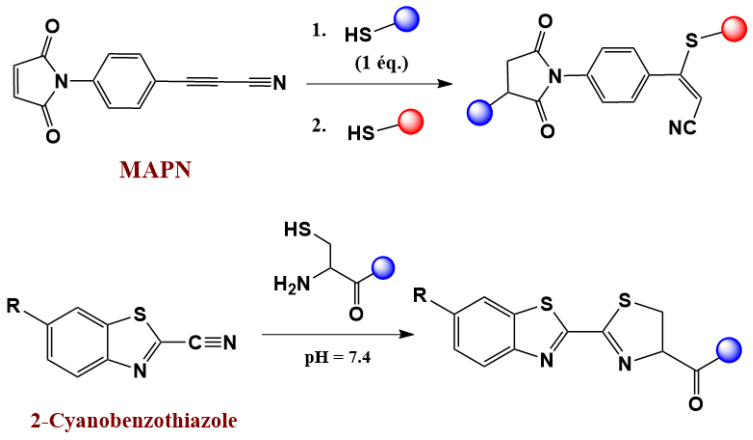


Figure 41 – Ligations impliquant les réactifs MAPN et 2-cyanobenzothiazole

Certaines ligations chimiosélectives sont plus utilisées que d'autres. Les principales ligations utilisées de nos jours sont regroupées dans le tableau suivant (fig.42)

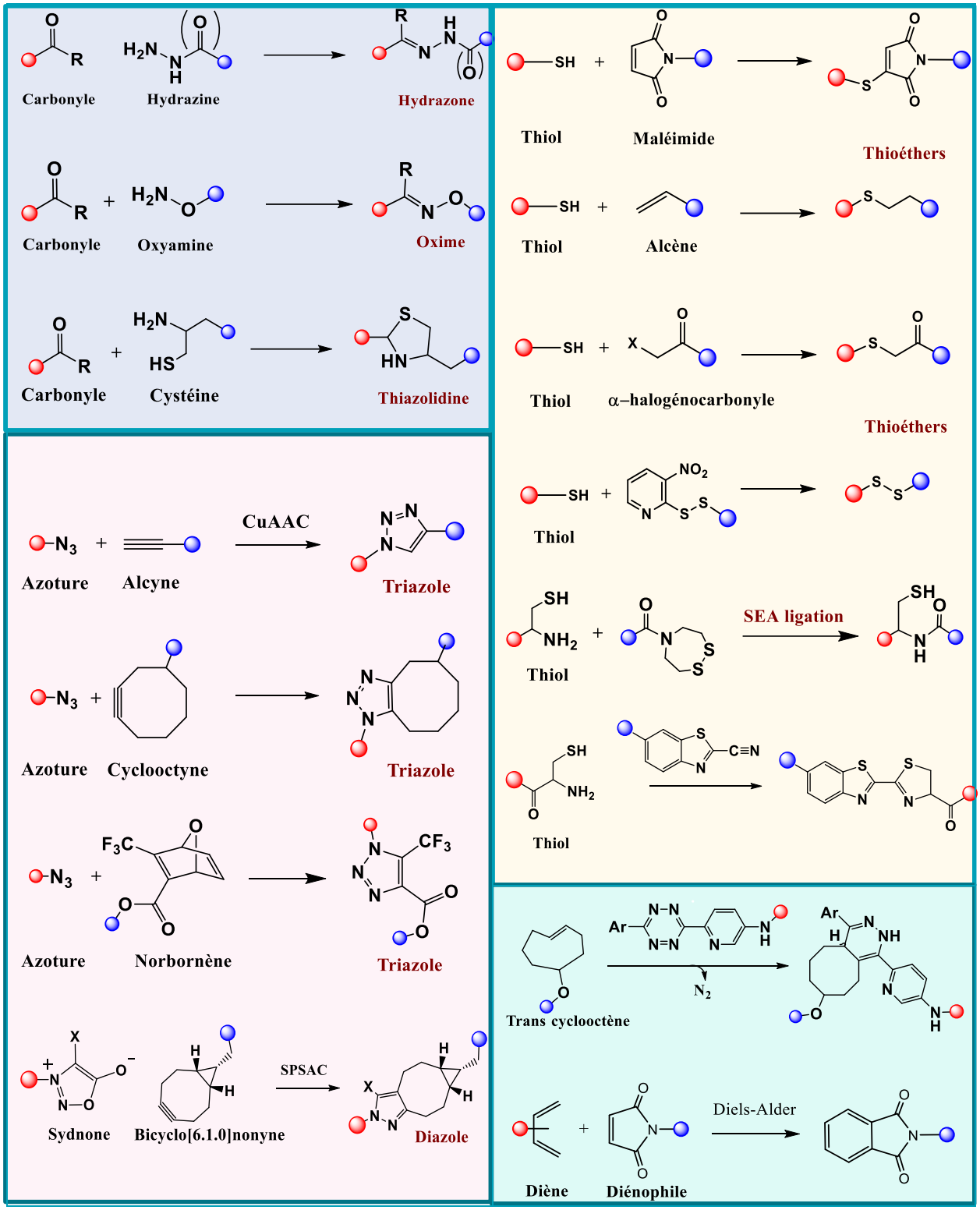


Figure 42 - Schéma des principales ligations chimiosélectives

3. EXEMPLES DE VECTORISATION APPLIQUEE AU TRAITEMENT/DIAGNOSTIC DU CANCER

Dans notre introduction sur la vectorisation en cancérologie, nous avons vu plusieurs exemples de cibles tumorales et de ligands qui leur étaient associés, différents types de vecteurs possibles, ainsi que les principales réactions de ligation utilisées pour assembler les ligands, le vecteur et les effecteurs. Dans cette partie, nous évoquerons des exemples concrets de vecteurs qui combinent en un seul composé des ligands, vecteurs et réactions chimiques décrits dans les chapitres précédents. Nous nous concentrerons sur les principaux composés d'imagerie et de thérapie approuvés par la FDA et utilisés de nos jours sur les patients. Tous ces exemples sont non exhaustifs.

A. Vecteurs en imagerie

En imagerie, les cibles tumorales sont exploitées pour vectoriser des agents de contraste (fluorophore, radionucléides...) jusqu'à la tumeur. Etant des molécules naturellement émettrices de rayonnements lumineux ou nucléaires, les agents de contraste n'ont généralement pas besoin d'être libérés de leur vecteur pour pouvoir émettre et permettre d'obtenir un signal. Ainsi, les molécules présentes sur le marché sont des vecteurs assez basiques où l'agent effecteur est directement lié au ligand de la cible tumorale. L'exemple le plus probant étant le 18-FDG ([^{18}F]fluoro-2-deoxy-D-glucose), qui est utilisé en routine pour des applications en imagerie PET dans les hôpitaux. Les autres vecteurs du marché sont basés sur le même principe mais ciblent d'autres récepteurs (ex : le [^{18}F]FDOPA qui est utilisé pour les tumeurs du cerveau).[196,197] Pour l'imagerie SPECT, le ^{99m}Tc est très utilisé. Il est par exemple lié à un anticorps IMMU-4 pour cibler l'antigène carcinoembryonic (CEA) dans des cas de tumeur colorectale, ou lié au peptide *depreotide* pour cibler les récepteurs à somatostatine (SSTR) pour détecter

des nodules pulmonaires. L'Indium ^{111}In est aussi beaucoup utilisé, vectorisé *via* des anticorps (^{111}In-Capromab pendetide) ou des peptides (^{111}In-pentetreotide) pour cibler respectivement le carcinome de la prostate ou certaines tumeurs neuroendocrines (neuroblastome, carcinome medulaire thyroidien).

Pour l'IRM, la technique peut être effective sans injecter d'agent de marquage. Mais il est possible d''améliorer le contraste grâce à des composés présentant de longs temps de relaxation. Les complexes de Gadolinium sont les composés de référence. Il en existe une dizaine qui ont été approuvés par l'agence européenne de médecine. Un seul est autorisé dans l'ensemble des pays de l'UE, il s'agit du gadoversetamide (OptiMARK).[198] Ces agents de contraste IRM sont simplement constitués du métal sous forme complexée. Il n'existe donc pas, à ce jour, de vecteur spécifique d'une cible tumorale qui soit autorisé. Mais certaines nanoparticules décorées de ligands RGD et de ^{19}F ou de Gd pour la détection de l'angiogenèse sont en phase clinique.[199]

Pour l'imagerie optique, les deux principaux agents de contraste utilisés en clinique sont l'indocyanine green (ICG) et le 5-aminolevulinic acid (5-Ala).[200] Le premier est un fluorophore non ciblé qui, une fois injecté, peut éventuellement s'accumuler dans les tumeurs grâce à leur vascularisation spécifique et bénéficier de l'effet EPR en se liant à des protéines sériques.[201] Le second est une prodrogue qui après métabolisation intracellulaire donne une protoporphyrine IX (PpIX) fluorescente. Il s'accumule dans les gliomes et tissus épithéliaux. Il est autorisé depuis 2007.[202] Ces deux agents ont obtenu l'AMM pour différentes applications spécifiques (fonction hépatique, DMLA, PDT…) mais ils sont depuis peu de temps aussi testés pour la chirurgie guidée par imagerie. A ce jour, aucun vecteur ciblé n'a obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour l'imagerie optique. Malgré tout, ce domaine de recherche est en pleine expansion. Des récentes études cliniques et autorisations de mise sur le marché d'appareils de détection (caméras) ont été publiées[203] et accordées.[204] Et de nombreuses études *in vivo* sur l'animal ont été réalisées pour des composés ciblant des marqueurs tumoraux.[205–207] La première étude ayant atteint les tests cliniques sur l'homme concerne le ciblage des récepteurs d'acide folique pour véhiculer de la FITC. Elle date de 2010 seulement.[208]

La mise au point de nouveaux vecteurs dirigés contre des marqueurs tumoraux est vraiment nécessaire pour le développement de l'imagerie optique pour l'aide à la chirurgie. Ce domaine est en forte croissance, avec des études cliniques *in vivo* qui se multiplient, et des avancées technologiques décisives qui permettent d'avoir des systèmes d'imagerie (caméras et moniteurs) précis et portatifs. Ces avancées tendent à démocratiser l'utilisation de l'imagerie optique et l'un des objectifs de ma thèse est justement de développer les outils chimiques qui pourraient accompagner cette progression.

B. Vecteurs pour la thérapie

Concernant les agents thérapeutiques, l'utilisation de vecteurs se démocratise peu à peu, avec une forte tendance à l'utilisation de liposomes et surtout d'anticorps. Comme évoqué précédemment, les anticorps présentent une forte sélectivité pour leur cible. Ils peuvent être utilisés comme agonistes/antagonites et peuvent aussi être exploités pour leur propriétés immunitaires. Mais ils peuvent aussi être fonctionnalisés et servir de vecteur. En effet, il y a actuellement une trentaine d'ADC (antibody drug conjugate) en phase clinique et deux ADC ont été récemment approuvés par la FDA. Il s'agit du Kadcyla et de l'Adcetris.[209] Le Kadcyla est composé d'*emtansine* (un inhibiteur de microtubule), relié par un linker thioéther à un anticorps (Trastuzumab) dirigé contre le récepteur HER2, surexprimé dans certains cancers du sein (HER2+).

L'Adcetris® présente l'agent antimitotique *auristatine E*, relié à l'anticorps Brentuximab qui cible les antigènes CD30, exprimés par les lymphômes Hodgkiniens et les lymphômes anaplasiques à larges cellules.[210] Ici, l'auristatine est liée à l'anticorps *via* un lien peptidique présentant un motif Valine-Citrulline substrat de la Cathepsin B. Cela permet de libérer la toxine en intracellulaire, après internalisation par la cellule tumorale (fig.43).[210]

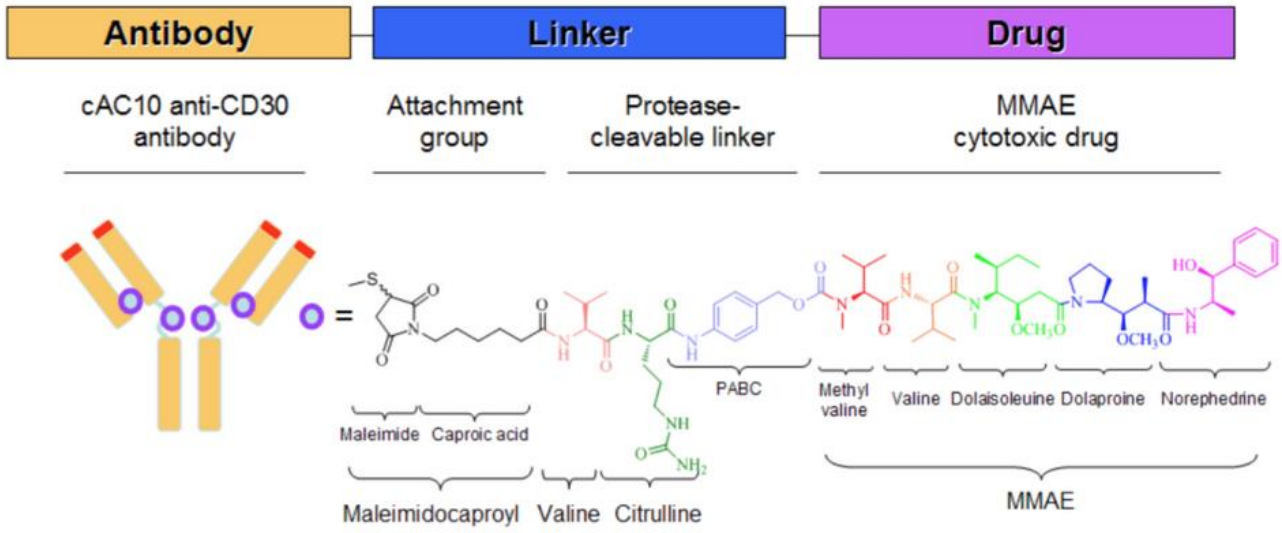


Figure 43 - schéma du composé Adcetris[210]

D'autres anticorps approuvés par la FDA sont liés non pas à une drogue, mais à un radioisotope pour une utilisation en radiothérapie. On peut citer le Zevalin® (Yttrium 90 ibrituomab tiuxetan) et le Bexxar® (Iodine 131-tositumomab) qui ciblent tous deux les antigènes CD20 pour le traitement de lymphomes non Hodgkiniens.[209,211]

Quelques liposomes ont été validés par la FDA en combinaison d'autres thérapies.
Il y a le DOXIL® (Janssen Products) qui est un liposome recouvert de fonctions méthoxypolyéthylène glycol renfermant de la Doxorubicine hydrochloride (fig44).[212]
Ce liposome ne présente pas de ciblage actif mais plutôt passif. Sa structure permet de protéger la doxorubicine et donc d'améliorer son temps de circulation et son efficacité. Il est recommandé dans des cas de tumeurs ovariennes et myélome multiples.
Il y a également l'ONIVYDE® (Merrimack Pharmaceuticals), un liposome d'*irinotecan* qui est un inhibiteur de topoisomérase I. Ce liposome lipidique est lui aussi recouvert de polyéthylène glycol. Il est indiqué dans le traitement du cancer pancréatique métastatique.

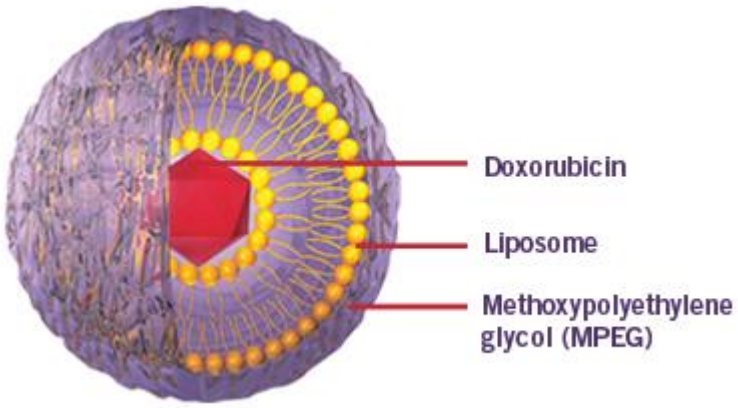


Figure 44 – Représentation schématique du DOXIL®

En conclusion de cette partie, on constate qu'en imagerie comme en thérapie anticancéreuses, les vecteurs ciblés commencent à faire leur apparition pour le traitement des patients. Leur nombre reste actuellement très limité mais les premières molécules approuvées par la FDA et l'EMA posent les jalons d'une nouvelle génération de traitements. De nombreux essais cliniques sont en cours et il semble indubitable que la cancérologie de demain sera résolument tournée vers des traitements ciblés, personnalisés et « intelligents ».

4. OBJECTIF DES TRAVAUX DE THESE

Le thème central de cette thèse est la synthèse de vecteurs permettant un ciblage précis et sélectifs des tumeurs. Pour cela, nous exploitons un châssis peptidique largement utilisé dans notre laboratoire et baptisé « RAFT » pour « Regioselectively Adressable Functionnalised Template » (fig.45). Il permet la combinaison de plusieurs éléments de ciblage et/ou effecteurs sur une seule et même molécule.[130,131,213]

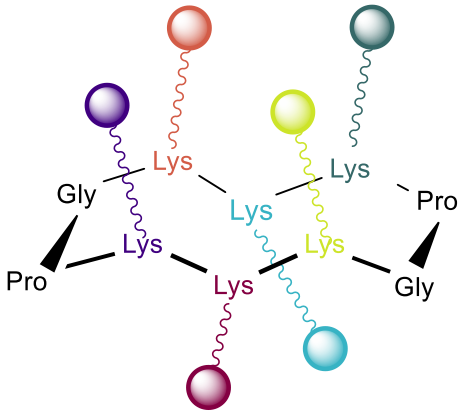


Figure 45 - Représentation d'un châssis peptidique "RAFT" fonctionnalisé par six éléments différents

Ainsi, pour le projet principal de cette thèse, nous avons mis à profit les caractéristiques du RAFT pour combiner deux types de ligands de ciblage sur un même vecteur, et ce de façon multivalente. Cette approche novatrice de **ciblage simultané** de deux récepteurs tumoraux a pour but de rendre les vecteurs plus spécifiques des tumeurs. Combinés à un fluorophore pour l'imagerie optique, ces vecteurs servent à imager la périphérie tumorale de façon plus précise. A terme, ils pourraient être utilisés en clinique pour mieux guider le geste chirurgicale lors de l'exérèse d'une tumeur.

La collaboration des laboratoires I_2BM et IAB a permis de mener à bien ce projet, depuis le design et la synthèse des molécules jusqu'aux tests biologiques *in vitro* et d'imagerie optique *in vivo* (Fig. 46. 1) Ce sujet est traité dans la **Partie I** du manuscrit.

Le second chapitre présente, à travers de multiples collaborations, l'exploitation des capacités de ciblage et de vectorisation du châssis RAFT(4-c[RGDfK]) pour diverses applications en imagerie et/ou thérapie. Ainsi, le RAFT(4-c[RGDfK]) a été couplé à un agent proapoptotique (BAX), à l'agent cytotoxique cryptophycine ou encore à un photosensibilisateur pour de la thérapie. Nous l'avons aussi fonctionnalisé avec du DOTA dans le but de vectoriser du ^{68}Ga pour une application en PET-scan. Des tests cliniques sur l'homme sont en cours. Enfin, des polymères ou des nanoparticules de silice ont été fonctionnalisés par le RAFT(c-[RGDfK]) pour étudier l'impact de telles structures pour le ciblage et l'imagerie des tumeurs. L'ensemble de ces projets sont rassemblés dans la **Partie II** (Fig. 46. 2).

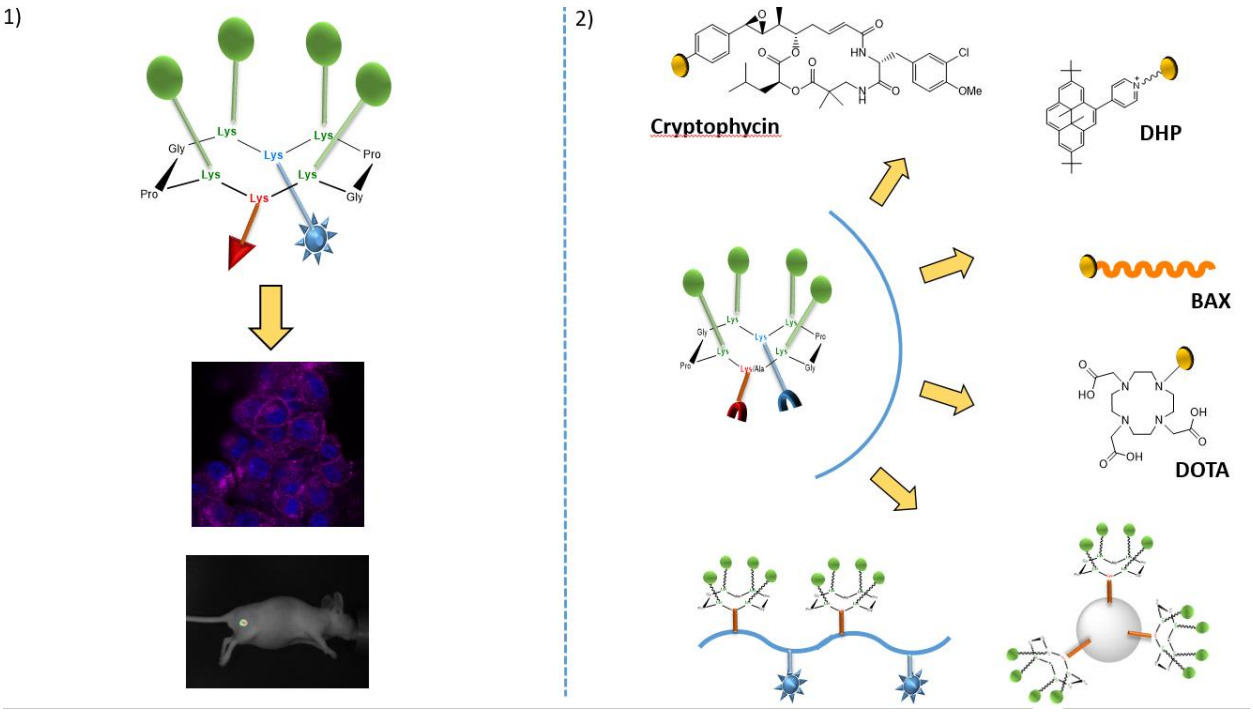


Figure 46 - Schéma des différents projets de thèse

PARTIE I :

Synthèse et activité biologique de vecteurs de double ciblage pour l'imagerie optique de la périphérie tumorale

1. CONCEPTS ET OBJECTIFS DU PROJET

Afin de développer des molécules d'imagerie optique plus efficaces et précises pour l'aide à la chirurgie des tumeurs, nous avons envisagé de mettre au point des vecteurs capables de détecter simultanément deux cibles surexprimées à la périphérie des tumeurs. Par périphérie tumorale nous entendons les cellules cancéreuses se trouvant aux limites de la tumeur, mais aussi et surtout les cellules endothéliales néoangiogéniques. En nous appuyant sur l'historique du laboratoire, nous avons décidé d'exploiter les récepteurs intégrine $\alpha v\beta_3$ et Neuropiline-1. Le rôle de ces récepteurs ainsi que l'intérêt de leur ciblage simultané sont détaillés dans la partie 1.A.

L'état de l'art des composés exploitant ces deux mêmes récepteurs ainsi que le design de nos molécules sont détaillés dans les parties 1.B et 1.C

A. Ciblage simultané des récepteurs intégrines αvβ3 et NRP1

i. *Intégrine αvβ3 et cancer*

- **Rôle de l'Intégrine αvβ$_3$ dans l'angiogénèse tumorale**

Parmi les multiples processus biologiques liés à l'apparition et au développement d'une tumeur solide, l'angiogenèse (ou néoangiogenèse) est assurément l'un des plus fréquents et des plus connus.[214–216] Il s'agit de la création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants. Elle est différente de la vascularisation qui crée de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un angioblaste sur un noyau naissant, suite à une différenciation cellulaire de cellules du mésoderme. La vascularisation et l'angiogenèse sont des processus normaux et même vitaux. Ils sont notamment utilisés lors du développement du fœtus qui utilise dans un premier temps la vascularisation pour créer un réseau primaire de cellules endothéliales vasculaires. Dans un second temps, l'angiogenèse prend le relai pour créer un réseau secondaire de petits vaisseaux, à partir des vaisseaux déjà établis.

Si ce processus est donc normal et régulé dans certains cas, il est au contraire anormalement activé et dérégulé dans des cas de maladies inflammatoires et de nombreux cancers qui présentent une forme d'angiogenèse pathologique. Les cellules endothéliales habituellement dormantes et non prolifératives chez l'adulte se retrouvent stimulées par des facteurs pro-angiogeniques sécrétés par la tumeur (facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF), facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF), facteur de nécrose tumorale α (TNF-α)…). Les cellules endothéliales environnantes à la tumeur deviennent alors prolifératives et créent des nouveaux vaisseaux sanguins au cours d'une angiogenèse désordonnée (ce qui explique en partie l'effet EPR avec une architecture du réseau sanguin plus chaotique, et plus espacée que

dans les tissus sains). Les nouveaux vaisseaux pénètrent dans la tumeur afin qu'elle puisse recevoir les nutriments et l'oxygène nécessaires à sa croissance.

Les cellules endothéliales sont impliquées dans le processus d'angiogenèse par l'intermédiaire de récepteurs membranaires présents à leur surface. Parmi eux, les intégrines ont un rôle crucial. Ce sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques impliqués dans l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire (MEC) mais aussi dans la transduction de signaux de la MEC vers la cellule pour réguler en retour la morphologie, l'adhésion, la migration, l'invasion, la prolifération et la survie des cellules endothéliales. Alors que de nombreux types d'intégrines existent, il a été démontré que $\alpha v\beta_3$ était particulièrement surexprimée par les cellules endothéliales angiogeniques des tissus cancéreux et s'avère être une cible de choix pour la vectorisation de composés en cancérologie.[216]

- **Structure de l'intégrine $\alpha v\beta_3$**

Les intégrines, récepteurs transmembranaires hétérodimériques, sont composées de deux sous-unités α et β non covalentes. Il existe chez les vertébrés 18 sous unités α et 8 sous-unités β. Néanmoins, seules 24 combinaisons de ces sous-unités existent, avec des propriétés d'affinité et des distributions tissulaires différentes.[217] Campbell et Humphries décrivent ce récepteur comme ressemblant à « une grosse tête et deux jambes », où la « tête » contient le site de reconnaissance des ligands et le point de contact des deux sous-unités. La majeure partie des deux sous-unités est extracellulaire, mais toutes deux traversent la membrane plasmique pour finir dans le cytoplasme. La courte partie cytoplasmique facilite la signalisation induite lors de l'accroche d'un ligand, ce qui déclenche le recrutement et l'activation de kinases et autres intermédiaires de signalisation.

La partie extracellulaire de la sous-unité α de l'intégrine est composée de 4 ou 5 éléments (fig.47) : Il y a un « seven-bladed β-*propeller* » qui est un enchaînement d'acides aminés

regroupés sous forme d'une hélice à 7 pales (cf. en marron). Il constitue en quelques sortes la « tête » de la sous-unité α et est impliqué dans la reconnaissance du ligand. Entre les « pales » 2 et 3 de cette hélice, peut parfois se trouver un domaine supplémentaire (appelé α-I domain) composé d'environ 200 acides aminés, et placé au-dessus de l'hélice (cf. en violet). Ce domaine supplémentaire α-I est fortement impliqué dans la reconnaissance de ligands pour les intégrines qui le possèdent. Mais seules 9 des 18 sous-unités α en possèdent un. Les 3 ou 4 pales restantes de l'hélice β peuvent accueillir un ion Ca^{2+} impliqué dans le possible accrochage d'un ligand. Sous l'hélice β, se trouvent trois éléments (cf en jaune) avec des structures similaires dénommées « Ig-like » (immunoglobulin-like domain) car présentant des repliements β-sandwich. Il s'agit des domaines « thigh », « Calf-1 » et « Calf-2 ». Le linker reliant l'hélice au domaine « thight » ainsi que le linker reliant le domaine « tight » au domaine « calf-1 » sont très flexibles, permettant un repliement de l'intégrine lorsqu'elle est en présence de son récepteur (fig.49).

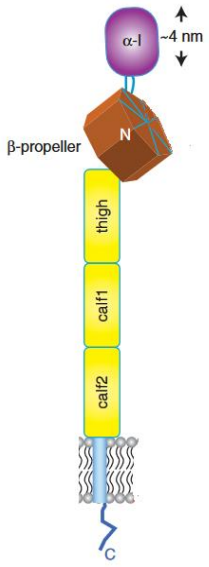


Figure 47 – Schéma de la sous-unité alpha de l'intégrine

La partie extracellulaire de la sous-unité β possède 7 domaines flexibles et en complexe interaction. Elle est composée d'un domaine β-1 (rouge) inséré dans un domaine hybride (violet), lui-même inséré dans un domaine Plexin-semaphorin-integrin (PSI) (bleu). Le domaine β-1 est impliqué dans la reconnaissance de ligand par l'intégrine quand cette dernière ne possède pas de domaine α-I sur sa sous-unité α. A la suite de ces trois domaines, on trouve 4 modules « EGF-like » (EGF1 à EGF4) riches en cystéine, puis une queue β.[217,218]

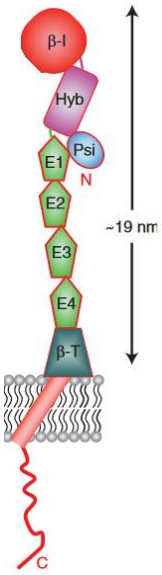


Figure 48 - Schéma de la sous-unité béta de l'intégrine

Les intégrines ne peuvent être actives que lorsque les deux sous-unités α et β sont associées. Des études basées sur des rayons X de la structure cristallisée de l'intégrine αxβ2 révèlent que l'intégrine seule se trouverait sous une conformation repliée et que l'interaction avec le ligand se ferait lorsque le récepteur est sous forme active dépliée (fig.49).[217,219]

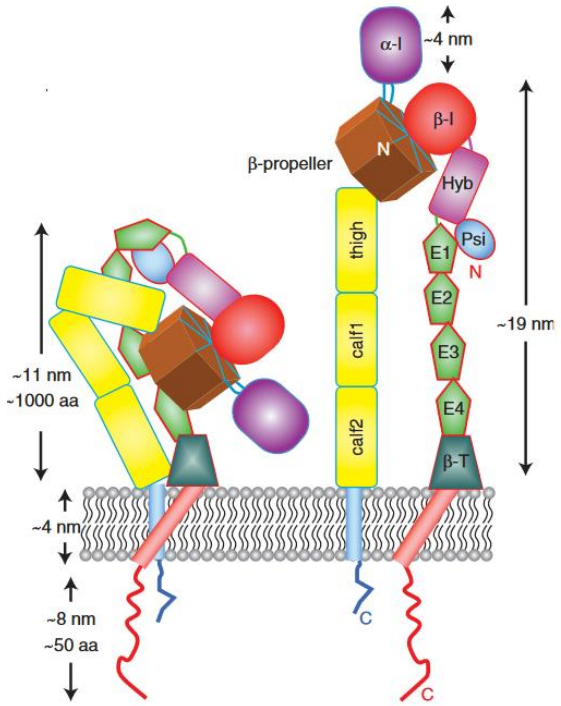


Figure 49 - Schéma de conformations repliée et dépliée (active) de l'intégrine

- **Cascade de signalisation de l'intégrine αvβ$_3$**

Les intégrines, grâce à leur domaine extracellulaire, peuvent réagir à l'environnement extracellulaire et changer de conformation pour transmettre cette information de l'extérieur de la cellule vers son intérieur (outside-in signalisation). En effet, l'intégrine αvβ$_3$ est liée à des protéines d'ancrage sur le cytosquelette (Talin, Actine, Vinculin, Tensin…) et peut donc transmettre une information mécanique. Le passage sous forme active de l'intégrine αvβ$_3$ induit l'assemblage du cytosquelette, qui peut en retour agir sur la conformation de l'intégrine et déclencher des cascades de signalisation. *[220,221]* Comme la majorité des intégrines, αvβ$_3$ n'a pas d'activité kinase propre. En revanche, elle est associée à des protéines comme FAK (kinase d'adhésion focale) ou ILK (Kinase Liées à l'Intégrine) qui lui permettent d'activer des signaux de transduction de manière indirecte (fig. 50)

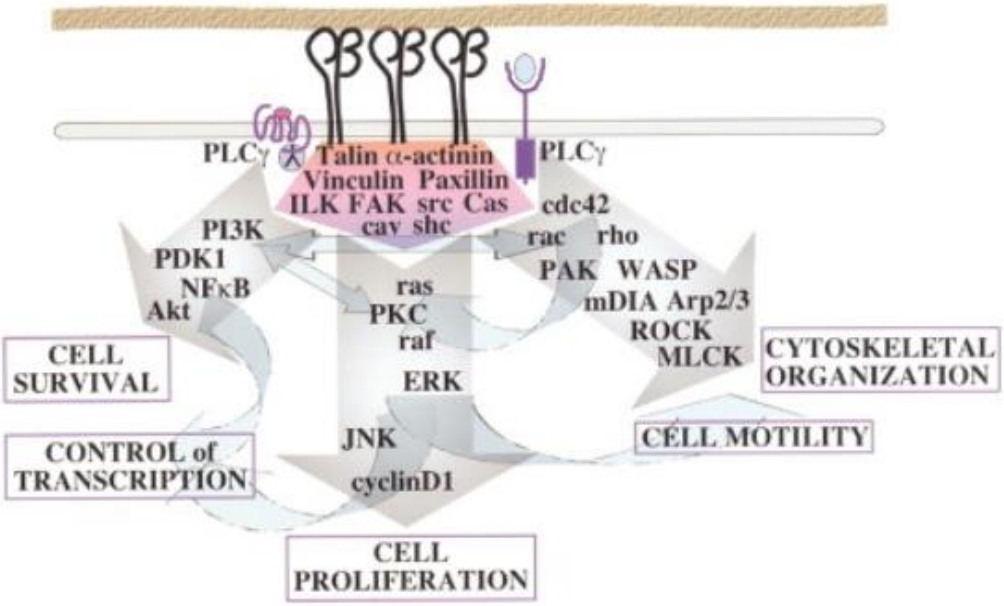


Figure 50 - Schéma des voies de signalisation activées par l'intégrine via son interaction avec des protéines kinases qui lui sont associées (FAK, ILK) ou des protéines d'ancrage au cytosquelette (Talin, Vinculin…).[220]

Par exemple, ILK sert de relais pour activer la phosphorylation de la protéine Akt (liée à la survie cellulaire), tandis que FAK active Src et sa cascade en avale pour activer la mobilité cellulaire (fig 51).[222] Enfin, une action combinée avec des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) peut activer la voie de signalisation MAPK (Protéine Kinase Activatrice de la Mitogénèse) qui stimule la prolifération cellulaire, notamment par l'activation de Erk.[223]

Les protéines FAK, Src, Akt, Erk ou ILK sont autant d'éléments dont l'activation peut témoigner d'une activité de l'intégrine $\alpha v\beta_3$. Il est donc important de les étudier lorsqu'on utilise des ligands de l'intégrine $\alpha v\beta_3$, notamment pour évaluer la réponse de la cellule suite à son interaction avec le ligand.

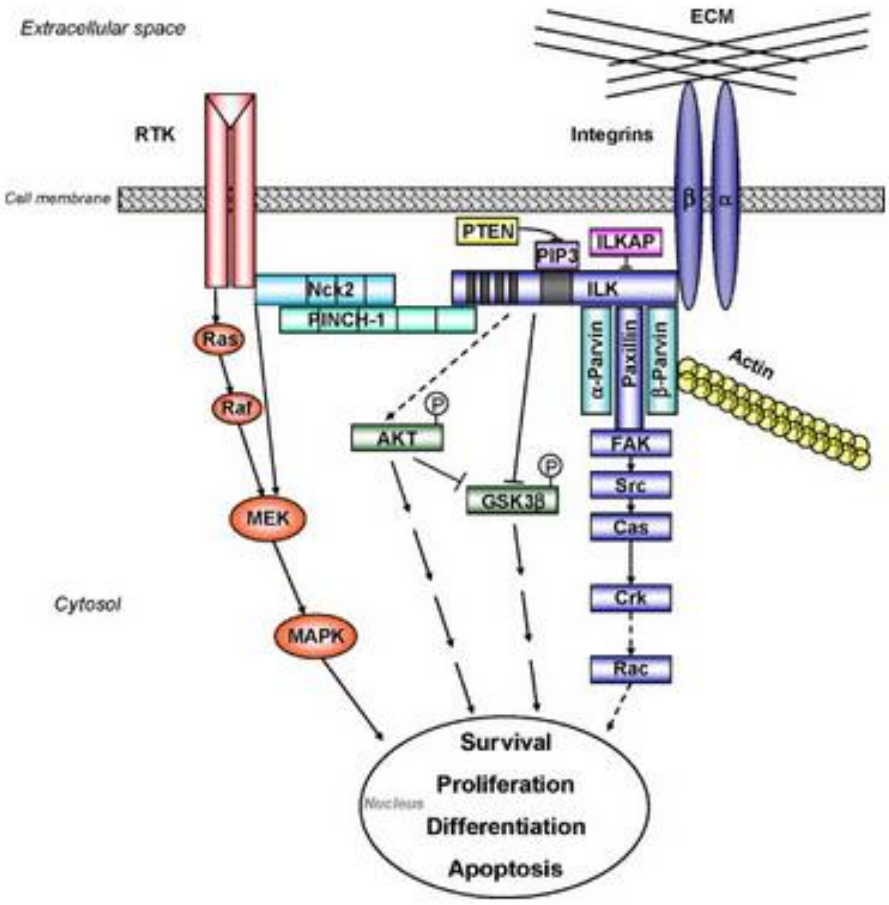


Figure 51 - Différentes voies de signalisation intracellulaires déclenchées par l'intégrine via les protéines FAK, ILK ou son interaction avec des RTK pour promouvoir la survie, la migration et la prolifération cellulaire.

- **Intégrine $\alpha v\beta_3$, cellules endothéliales & cancer**

Nous avons vu que, de par leurs domaines extra et intra cellulaires qui s'influencent réciproquement, les intégrines peuvent subir d'importants changements de conformation suite à un stimulus et déclencher des cascades de signalisation complexes induisant la survie, la prolifération, la différenciation, l'adhésion cellulaire, la migration ou encore l'invasion. Les mêmes mécanismes de signalisation sont exploités par la tumeur pour promouvoir sa survie, son invasion et pour manipuler son microenvironnement afin qu'il lui fournisse les ressources nécessaires à sa croissance et sa dispersion métastatique.[216]

Parmi les intégrines existantes, $\alpha v\beta_3$ est peu exprimée dans les cellules endothéliales dormantes mais est largement surexprimée par les cellules endothéliales en prolifération, que l'on retrouve dans les cas d'inflammation et d'angiogénèse tumorale[215,224,225]. Ainsi, la forte expression d'intégrine $\alpha v\beta_3$ a été associée à une progression tumorale et à l'apparition de métastases dans des cas de mélanome, cancer du pancréas, de la prostate, des poumons, des ovaires et du col de l'utérus.[216] Ces caractéristiques font de l'intégrine $\alpha v\beta_3$ une cible de choix pour directement perturber la progression tumorale voire éradiquer la maladie, mais elle est aussi une cible intéressante pour vectoriser des principes actifs jusqu'aux tumeurs. L'utilisation de ligands ou d'anticorps pour cibler les intégrines $\alpha v\beta_3$ et vectoriser des principes actifs jusqu'à la tumeur a d'ailleurs été largement décrite et a prouvé son efficacité. De plus, de par son rôle dans l'angiogenèse et dans la croissance tumorale, l'intégrine $\alpha v\beta_3$ est en général d'avantage exprimée en périphérie de la tumeur plutôt qu'en son centre. Toutes ces raisons nous ont poussés à exploiter cette cible dans notre projet de vecteurs pour l'imagerie de la périphérie tumorale.

ii. *Mieux exploiter l'intégrine $\alpha v\beta_3$ grâce au double ciblage*

L'intégrine $\alpha v\beta_3$ est une cible tumorale très intéressante à exploiter, tant en thérapie qu'en imagerie. Néanmoins, cibler uniquement l'intégrine $\alpha v\beta_3$ pourrait s'avérer insuffisant.

En effet, des approches thérapeutiques visant à bloquer l'intégrine $\alpha v\beta_3$ afin de stopper la néovascularisation ont été réalisées, notamment avec le Cilengitide®. Mais les résultats sont très mitigés : si l'angiogénèse est parfois ralentie ou stoppée suite au blocage de l'intégrine $\alpha v\beta_3$, il arrive aussi qu'aucun effet ne soit observé.[226,227] Voire même dans certains cas, l'angiogenèse est accélérée. Cela pourrait s'expliquer par un effet-dose contradictoire (inhibition pour une certaine dose et augmentation pour une dose plus faible ou plus forte), ou par l'activation d'autres récepteurs comme VEGFR2 ou la Neuropiline-

1. En effet, l'intégrine $\alpha v\beta_3$ collabore et communique avec d'autres récepteurs. En cas de blocage de l'intégrine, les cascades de signalisation induites pourraient pousser les autres récepteurs à prendre en charge l'angiogenèse et la croissance cellulaire en modifiant leur taux d'expression ou leurs signalisations. Il serait donc intéressant de les bloquer en même temps que l'intégrine.

Cette stratégie de double ciblage peut aussi avoir un intérêt en imagerie. Lors de travaux précédents, notre laboratoire avait déjà exploité les intégrines $\alpha v\beta_3$, avec la synthèse de vecteurs cyclodécapeptidiques arborant quatre ligands cycliques cRGD pour le ciblage. Le vecteur transportait un fluorophore Cyanine 5 pour une application en imagerie optique. Les résultats furent très encourageants, puisque l'étude fut poussée jusqu'en clinique vétérinaire. Les vecteurs fluorescents ont été administrés à des chats atteints de tumeurs spontanées, afin de faciliter leur détection et leur chirurgie. Sur les 12 chats opérés, tous ont survécu, et les tumeurs ont été totalement retirées.[228] Néanmoins, même si l'image obtenue était satisfaisante, son contraste peut certainement être encore amélioré. Cela signifie qu'il faut augmenter la sélectivité de la sonde et pour cela, il est envisageable d'ajouter un second ligand de ciblage.

Si l'intégrine $\alpha v\beta_3$ communique avec d'autres récepteurs pour promouvoir l'angiogénèse et la croissance tumorale, ces récepteurs sont des cibles tumorales supplémentaires. Et on peut aussi s'attendre à ce qu'ils soient assez proches spatialement des intégrines. Ainsi, nous pouvons envisager d'utiliser deux ligands différents pour cibler la tumeur afin d'apporter plus de sélectivité. Cela peut aussi permettre d'atteindre un plus grand spectre de tumeurs qui ne possèderaient que l'un des deux récepteurs. De plus, si les récepteurs sont proches l'un de l'autre, on peut espérer que la molécule entre en interaction avec les deux récepteurs de façon simultanée. Ainsi, en plus d'augmenter la sélectivité et donc le contraste de la sonde, le ciblage simultané pourrait augmenter l'affinité du composé pour les cellules tumorales. Enfin, le fait d'entrer en interaction avec deux récepteurs impliqués dans l'angiogenèse pourrait bloquer ce processus et avoir des effets thérapeutiques en plus des propriétés d'agent de contraste.

Bien sûr, ces hypothèses restent à confirmer. En effet, le fait de se lier à deux récepteurs cellulaires à la fois, peut augmenter l'affinité d'une molécule pour la cellule car elle « combinerait » deux constantes d'affinité (Ka + Kb). Néanmoins, il est aussi possible que l'ajout du second type ligand diminue la flexibilité de la molécule et donc augmente l'entropie de son interaction avec chacun des récepteurs (Ka'<Ka et Kb'<Kb) pour, *in fine*, diminuer l'affinité globale d'interaction de la molécule avec la cellule (Ka' + Kb' < Ka ou Kb). Dans ce cas, la combinaison de deux ligands sur une même molécule la rendrait donc moins affine que si elle ne présentait que l'un des deux types de ligands.

La perspective de pouvoir augmenter l'affinité et surtout la sélectivité des vecteurs fluorescents préalablement développés par le laboratoire a motivé l'idée de concevoir des vecteurs à double ciblage. En plus de cibler l'intégrine $\alpha v\beta_3$, nous avons décidé d'exploiter le récepteur neuropiline-1 (NRP1) avec lequel elle communique pour promouvoir l'angiogenèse.

iii. *Le récepteur Neuropiline-1 crosstalk avec l'intégrine $\alpha v\beta_3$*

- **La Neuropiline-1, co-récepteur de VEGFR2**

Il est reconnu que les facteurs de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) et en particulier VEGF-A165 sont des moteurs de l'angiogenèse pour les cellules endothéliales et cancéreuses. Ils agissent par interaction avec les récepteurs à tyrosine kinase que sont VEGFR1 et surtout VEGFR2 (ou KDR) pour déclencher des cascades de signalisation influençant la survie, la prolifération, la migration et la perméabilité cellulaire. Mais pour que cette interaction soit effective, les facteurs VEGF-A165 ont besoin à la fois de s'homodimériser et de se lier au récepteur Neuropiline-1 (NRP1). Cette interaction engendre l'homodimérisation de NRP1 qui, sous cette forme, va pouvoir s'associer au VEGFR2. Le complexe NRP1/VEGFR2 favorise alors l'interaction entre VEGF-A165 et VEGFR2, ainsi que la signalisation qui en découle (fig.52).[93,229,230]

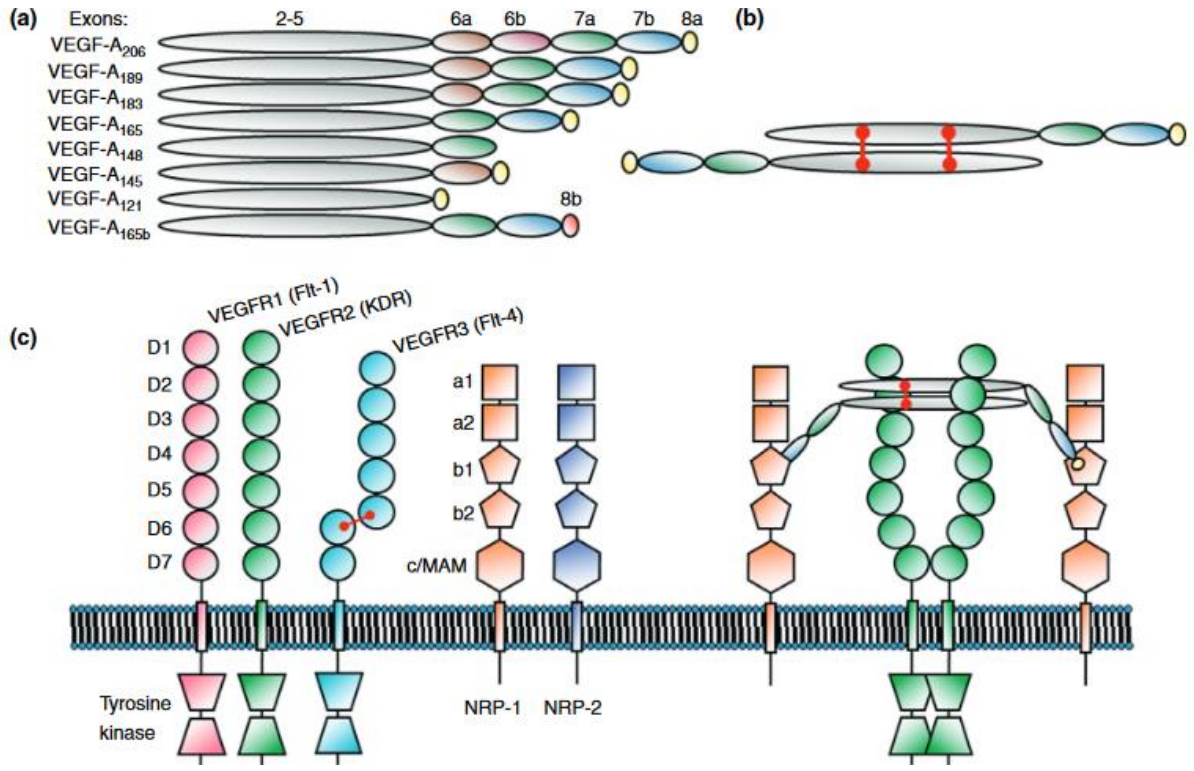


Figure 52 - (a) Différents isoformes de VEGF-A, (b) Homodimère de VEGF-A165, (c) Schéma des différents récepteurs VEGF et NRP et du complexe NRP1 / VEGFA-165/ VEGFR2.[229]

Entre d'autres termes, NRP1 est un intermédiaire de l'interaction entre VEGFA-165 et son récepteur VEGFR2 et de leurs signalisations. C'est pourquoi NRP1 est considéré comme un co-récepteur de VEGFR2 et comme étant lui aussi primordial dans les processus d'angiogénèse et de progression tumorale. Herzog *et al.* ont mis ce lien en évidence grâce à des récepteurs NRP1 mutés au niveau des acides aminés nécessaires à leur interaction avec VEGF-A165 (remplacement de Tyr-297 et Asp-320 par des Alanines). Ces mutations n'empêchent pas la formation de dimères entre les NRP1 mutants et sauvages. En revanche, ces dimères mixtes de NRP1 ont moins d'affinité avec VEGF-A165. Cela réduit voire annule la formation du complexe VEGFR2/NRP1. De fait, l'activation de VEGFR2 par VEGF-A165 s'en voit réduite, inhibant alors la migration cellulaire induite par les VEGF.[93]

Il est à noter cependant que NRP1 n'agit pas sur l'ensemble de la cascade de signalisation déclenchée par VEGF-A. Il tiendrait par exemple un rôle dans la phosphorylation de FAK Y407 induite par VEGF-A165 (impliquée dans la migration

cellulaire et la morphogenèse des vaisseaux sanguins). Mais il n'influencerait pas la phosphorylation du site Y1175 de VEGFR2 dont la cascade de signalisation active notamment la protéine ERK (prolifération).

Le récepteur NRP1 a été détecté dans plus de 98% des vaisseaux sanguins associés à des tumeurs primaires et métastatiques des poumons, du sein, et colorectal. Il est cependant moins souvent exprimé dans les tumeurs elles-mêmes.[231] Malgré tout, la surexpression de récepteurs NRP1 membranaires serait impliquée dans des cancers du cerveau, de la prostate, du sein, du colon, des poumons et dans certaines métastases.[229,232]

En résumé, le récepteur NRP1 serait une bonne cible pour le ciblage de la périphérie tumorale car il est surexprimé par les cellules endothéliales de l'environnement tumoral. Cette surexpression s'explique par le rôle primordial qu'il tient dans le processus d'angiogenèse en association avec les VEGF-A165 et leur récepteur VEGFR2.
Le ciblage de NRP1 pourrait aussi avoir un effet antiangiogénique donc thérapeutique.

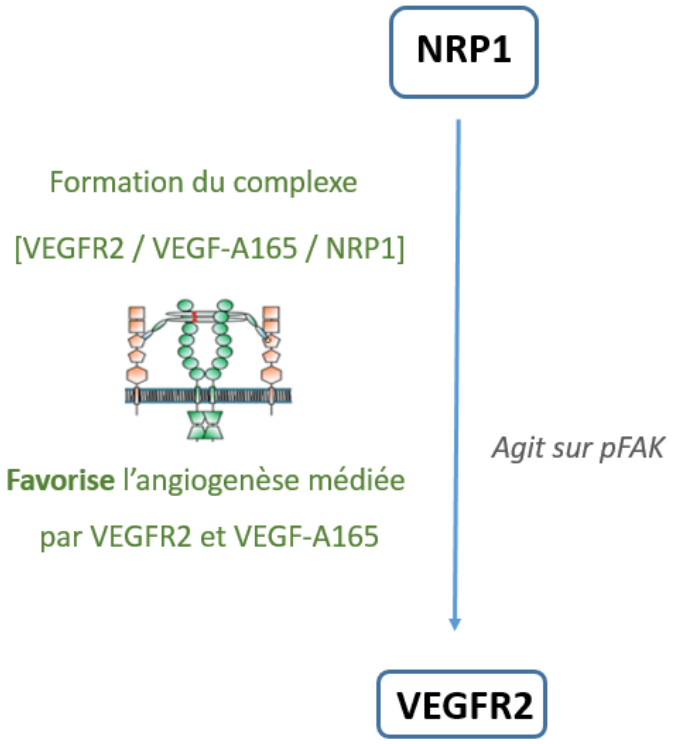


Figure 53 - NRP1 interagit avec VEGFR2 et VEGFA-165 pour faciliter leur interaction

- **L'intégrine $\alpha v\beta_3$ et la NRP1 pourraient interagir par l'intermédiaire de VEGFR2**

Nous avons vu que le récepteur NRP1 tenait un rôle fondamental dans l'angiogenèse induite par les facteurs VEGF-A165 et leur récepteur VEGFR2, grâce à un complexe tripartite. Mais VEGFR2 collabore aussi avec l'intégrine $\alpha v\beta_3$ pour réguler l'angiogénèse. Les premières études de cette relation menées par Soldi *et al.* montrent que la phosphorylation de VEGFR2 induite par VEGF est augmentée lorsque les cellules endothéliales sont cultivées en présence de vitronectine et de fibrinogène, qui sont des ligands naturels de l'intégrine $\alpha v\beta_3$. Au contraire, la phosphorylation de VEGFR2 induite par VEGF était inhibée lorsque les cellules étaient en suspension.[233]. D'autres études ont par la suite confirmé la formation d'un complexe entre VEGFR2 et l'intégrine $\alpha v\beta_3$.[230,234] La liaison d'un ligand VEGF au récepteur VEGFR2, ou celle de $\alpha v\beta_3$ avec un de ses ligands favoriserait la formation du complexe VEGFR2-Intégrine $\alpha v\beta_3$ qui augmenterait alors la phosphorylation de VEGFR2.[235] Le cross-talk entre l'intégrine $\alpha v\beta_3$ et VEGFR2 semble réciproque car le blocage ou l'activation de l'un, *via* des ligands ou des anticorps, diminue ou augmente l'activation de l'autre. Les travaux de Mahabelshwar *et al.* abondent dans ce sens puisqu'une intégrine mutante (phosphorylation de tyrosine bloquée) diminue la phosphorylation de VEGFR2 en comparaison avec l'intégrine $\alpha v\beta_3$ sauvage, et cela engendre en retour une diminution de l'activation de l'intégrine.[236]

Il apparait clairement qu'un complexe VEGFR2 / intégrine $\alpha v\beta_3$ se forme et que cette interaction, stimulée par les ligands de la matrice extracellulaire et les VEGF, joue un rôle essentiel dans l'activation des cellules endothéliales et la stimulation de l'angiogénèse induite par VEGF. Le crosstalk entre les deux récepteurs est médié par SRC.[235]

Comme NRP1 et VEGFR2 forment eux aussi un complexe au sein des cellules endothéliales pour influencer le processus d'angiogénèse, il est légitime de penser que NRP1 et l'intégrine $\alpha v\beta_3$ sont, au moins indirectement, connectés. Une proximité spatiale, à minima transitoire, entre ces deux récepteurs semble aussi être une hypothèse plausible.

Figure 54 - VEGFR2 interagit avec l'intégrine $\alpha v\beta_3$ pour promouvoir l'angiogenèse

- **La NRP1 interagit directement avec l'intégrine $\alpha v\beta_3$**

L'hypothèse d'une interaction entre NRP1 et l'intégrine $\alpha v\beta_3$ a finalement été confirmée par plusieurs publications, en particulier celles du groupe de Robinson.[237,238] Ils ont pu montrer cette relation grâce à des intégrines dont le domaine cytoplasmique β était modifié (β3-null), pour des cellules endothéliales.

En effet, il s'avère que l'interaction entre NRP1 et VEGFR2 favorise l'angiogenèse lorsque le domaine cytoplasmique β_3 de l'intégrine $\alpha v\beta_3$ est inactif, alors que NRP1 n'a que peu d'influence sur ce processus lorsque $\alpha v\beta_3$ est normal. Le domaine β_3 apparait donc comme inhibiteur de l'action de NRP1. Cela prouve qu'en plus d'être promotrice de l'angiogenèse, l'intégrine $\alpha v\beta_3$ serait aussi un régulateur. Cette polyvalence s'expliquerait par le fait qu'elle stimule l'angiogenèse en s'associant avec VEGFR2 et VEGF-A165, mais qu'elle est aussi capable d'empêcher une angiogenèse plus importante par séquestration de la NRP1, qui freine l'interaction NRP1/VEGF-A165/VEGFR2 (fig.55)

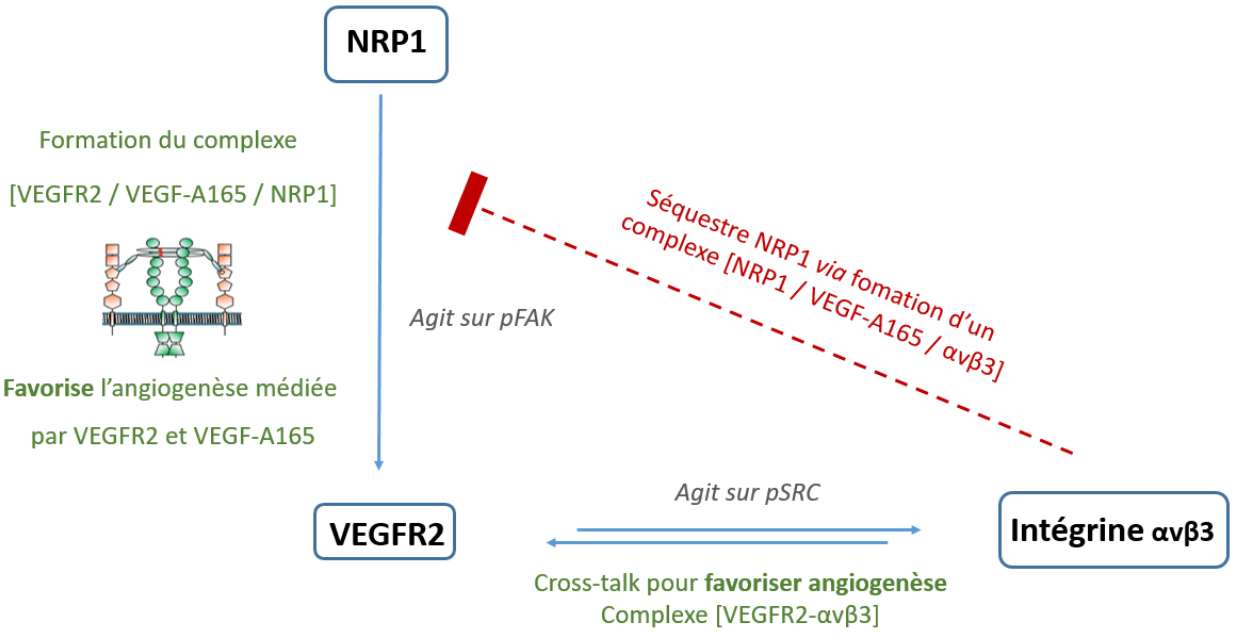


Figure 55 - Schéma des différentes interactions négatives et positives entre NRP1, VEGFR2 et intégrine αvβ$_3$

- **Intérêts du double ciblage de NRP1 et de l'intégrine αvβ$_3$**

Les études révèlent deux choses principales. La première concerne l'échec des traitements anti-angiogéniques visant l'intégrine αvβ$_3$. Une des hypothèses pour expliquer ces échecs est que d'autres facteurs prennent le relai de αvβ$_3$ pour entretenir l'angiogenèse. Mais compte tenu du rôle qu'elle exerce auprès de NRP1, il est aussi possible qu'en visant l'intégrine αvβ$_3$ on perturbe son rôle régulateur, renforçant ainsi l'angiogenèse au lieu de la bloquer. Dans ce contexte, l'idée d'un ciblage simultané de plusieurs cibles thérapeutiques (αvβ$_3$, NRP1, VEGFR2) est renforcée dans la perspective d'un traitement antiangiogénique.

L'autre élément à retenir est qu'il existe une relation très étroite et réciproque entre les quatre acteurs que sont les récepteurs VEGFR, NRP1, intégrine αvβ$_3$ et les facteurs VEGF. Et surtout, l'interaction entre αvβ$_3$ et NRP1 étant confirmée, elle valide l'hypothèse que ces deux récepteurs sont, au moins par intermittence, proches spatialement. Additionné au fait qu'ils sont surexprimés dans de nombreuses tumeurs et leurs cellules

endothéliales environnantes (donc en périphérie des tumeurs), cela confirme qu'un ciblage simultané de ces deux récepteurs serait avantageux pour délimiter précisément le contour de la tumeur lors d'une application en imagerie pour l'aide à la chirurgie.

L'ensemble de ces paramètres nous a convaincus d'exploiter simultanément l'intégrine $\alpha v\beta_3$ et la NRP1 dans notre entreprise de mise au point des vecteurs ciblés pour l'imagerie de la périphérie tumorale. Nous espérons ainsi obtenir un outil délimitant précisément le contour de la tumeur ainsi que ses fins prolongements, pour faciliter le geste chirurgical. Compte tenu des récepteurs ciblés, il n'est pas impossible que de tels vecteurs d'imagerie présentent aussi un effet antiangiogénique.

B. Etat de l'art du ciblage de intégrine $\alpha v\beta_3$ et/ou NRP1

L'intégrine $\alpha v\beta_3$ a été exploitée avec succès par de nombreux groupes pour obtenir des composés d'imagerie tumorale pour l'IRM, le PET scan ou le SPECT. Concernant l'imagerie optique, les composés sont plus rares, notamment parce que le développement de cette technique est assez récent.[239,240] Les premiers travaux relatant l'utilisation combinée d'un ligand RGD et d'un fluorophore proche infra-rouge (NIR) datent de 2004 seulement, par *Chen et al.*[241] Cela leur a permis d'étudier l'expression de l'intégrine $\alpha v\beta_3$ *in vivo* chez des souris portant des xénogreffes de glioblastomes (U87MG). Peu de temps après, des composés multivalents présentant plusieurs copies du ligand RGD furent publiés.[242,243] Notre laboratoire notamment, a développé un châssis peptidique présentant quatre ligands RGD permettant de vectoriser un agent de contraste Cy5 jusqu'à la tumeur, le but étant d'utiliser l'imagerie optique pour en faciliter l'exérèse.[131] La molécule en question a été testée avec succès en clinique vétérinaire sur 12 chats présentant des tumeurs spontanées.[228] Des tests *in vivo* fructueux ont été réalisés par

d'autres groupes.[244–246] Les bons résultats obtenus lors de toutes ces études prouvent l'intérêt de l'intégrine $\alpha v\beta_3$ et de son ligand RGD (et dérivés) pour l'imagerie optique. Les chercheurs les exploitent dorénavant dans des approches multimodales, ou en combinaison avec des ligands d'autres récepteurs tumoraux[247,248]

Le rôle de la Neuropiline-1 dans l'angiogenèse a été confirmé récemment. Les méthodes d'imagerie, toutes techniques confondues, exploitant cette cible sont assez rares. On note tout de même quelques exemples d'utilisation en PET,[249] en SPECT,[250] en PDT.[251] Une seule application en imagerie optique a été publiée, avec le peptide CGNKRTR (tLyP-1) lié au fluorophore FAM.[252] L'exploitation de cette cible n'en est certainement qu'à ses débuts.

Des molécules combinant à la fois les ligands intégrine $\alpha v\beta_3$ et NRP1 ont été synthétisées. Mais seules trois études (dont deux d'une même équipe) ont été publiées, et elles concernent l'imagerie PET de glioblastome grâce aux peptides RGD et ATWLPPR greffés au sein d'une seule et même molécule.[249,253,254] Il convient de citer également le ligand iRGD qui a été utilisé par Yunpen *et al.* pour vectoriser un fluorophore.[255] On peut considérer d'une certaine manière que ce ligand, découvert par Ruoslahti *et al.* permet de cibler à la fois $\alpha v\beta_3$ et NRP1.[256] En effet, la séquence c(CRGDKGPDC) de ce peptide cyclique présente un motif RGD qui lui permet de se lier à l'intégrine $\alpha v\beta_3$. Cette interaction permettrait ensuite à des enzymes de venir couper le pont disulfure pour libérer un motif CendR. L'ouverture du peptide déstabiliserait son interaction avec $\alpha v\beta_3$ et favoriserait une nouvelle interaction avec le récepteur NRP1 *via* le motif CendR. La fixation du ligand sur NRP1 induirait alors une augmentation de la perméabilité tumorale pouvant être exploitée pour améliorer l'infiltration d'autres composés antitumoraux et même un effet antimétastatique.[257,258] Les auteurs proposent donc d'utiliser ce composé iRGD en adjuvant d'autres thérapies.[259] Le mode d'action et l'efficacité de ce ligand doivent être étudiés d'avantage, mais il constitue un argument supplémentaire pour l'exploitation simultanée des récepteurs $\alpha v\beta_3$ et NRP1.

Mise à part le cas du iRGD qui est spécifique, il n'existe actuellement, et à notre connaissance, aucune publication faisant état de molécules exploitant simultanément les récepteurs intégrine $\alpha v\beta_3$ et NRP1 pour une application en imagerie optique.

En adoptant cette stratégie, nous espérons donc obtenir des résultats inédits en termes de précision de détection tumorale, mais aussi obtenir des informations sur la possibilité, l'intérêt et les effets biologiques du ciblage simultané de l'intégrine $\alpha v\beta_3$ et de la neuropiline-1.

C. Conception de vecteurs de double ciblage

Nous voulons synthétiser des vecteurs fluorescents dirigés contre les récepteurs intégrine $\alpha v\beta_3$ et Neuropiline-1 pour une application en aide à la chirurgie. Dans cette partie, les ligands utilisés pour cibler les récepteurs intégrine $\alpha v\beta_3$ et neuropiline-1 seront détaillés, ainsi que la stratégie de ciblage et le design général des vecteurs correspondants.

- **Ciblage de l'intégrine $\alpha v\beta_3$**

Pour cibler l'intégrine $\alpha v\beta_3$, nous avons utilisé le ligand peptidique cyclique c[RGDfK]. Ce ligand, est issu de la séquence –GRGDS- découverte par Erkki Ruoslahti en 1984 comme étant le site d'adhésion de la fibronectine, protéine de la matrice extracellulaire et ligand naturel de l'intégrine $\alpha v\beta_3$.[260] Le motif -RGD- est retrouvé dans d'autres protéines de la matrice extracellulaire comme la laminine, la thrombospondine, la vitronectine ou encore le fibrinogène. Des équipes se sont ensuite penchées sur l'amélioration de l'affinité de la séquence –RGD- envers les intégrines. Le laboratoire du Prof. Hort Kessler a notamment publié le cyclopentapeptide c[RGDfV], présentant un acide aminé en série D pour faciliter la cyclisation. Ce peptide est jusqu'à 100 fois plus efficace que la séquence linéaire -GRGDS-.[261] Une seconde amélioration fut obtenue en ajoutant un méthyle sur l'amine de la Valine, pour un peptide quatre fois plus efficace.[262] Xiong *et al.* publient dans Science en 2002 [217] la structure cristalline de l'interaction entre c[RGDf-N(Me)V-] et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Il s'avère que le dernier acide aminé N(Me)V n'a pas une très grande incidence sur l'interaction. Il peut alors être remplacé par une lysine qui permettra une fonctionnalisation plus aisée du peptide, notamment pour le lier à un vecteur.

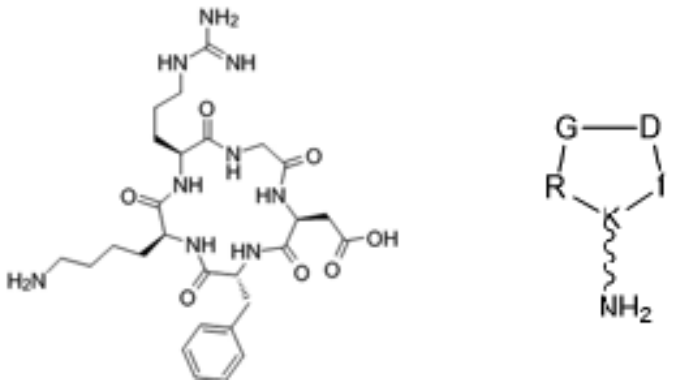


Figure 56 - Ligand c[RGDfK] et sa représentation schématique

- **Ciblage de NRP1**

Pour cibler la neuropiline-1, nous avons choisi d'utiliser la séquence peptidique ATWLPPR (A7R). Cette dernière a été identifiée par le groupe de Starzec en 2006 comme étant un inhibiteur de l'interaction entre NRP1 et VEGF-A165.[94] Ils ont prouvé que l'inhibition ne concernait que l'interaction de VEGF-A165 avec NRP1 mais pas celle avec VEGFR2. Un peptide contrôle (scramble) de séquence LWRPTPA n'a présenté aucune inhibition. Cette inhibition est possible grâce à la formation d'un complexe entre ATWLPPR et NRP1 (fig.57).[95] En plus d'être un ligand de ciblage de NRP1, le ligand A7R (fig.58) a présenté une activité antiangiogenique et antitumorale.

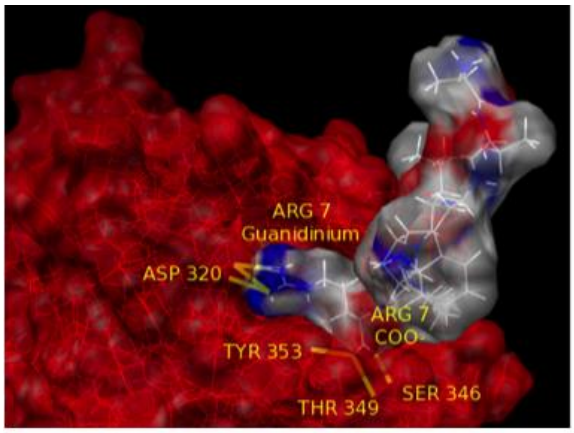


Figure 57 - Ligand ATWLPPR en interaction avec le récepteur NRP1.[95]

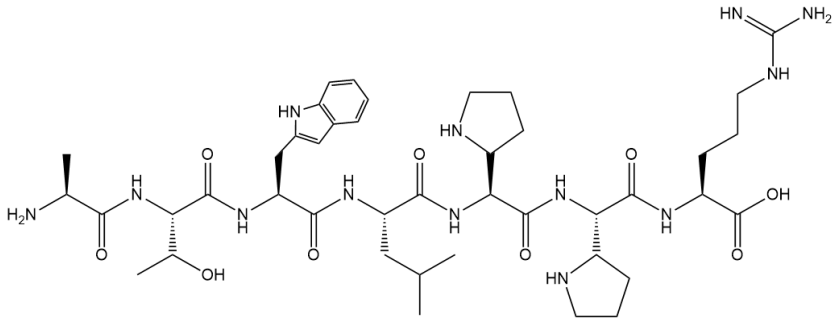


Figure 58 - Ligand ATWLPPR

- **Utilisations de la Cyanine 5.5 en tant qu'agent de contraste**

Puisque l'objectif de ce projet est d'obtenir *in fine* des marqueurs pour l'imagerie optique, nous avons choisi de greffer un fluorophore Cyanine 5.5 sur nos vecteurs (fig.59). Ce fluorophore proche infrarouge présente l'avantage d'avoir une absorption à 676nm et une émission à 702nm. Ces caractéristiques sont primordiales puisque l'excitation et surtout l'émission doivent se trouver autant que possible dans le domaine du proche infrarouge pour se trouver en dehors de la fenêtre d'absorption des tissus. Dans le cas contraire, les longueurs d'onde émises par l'agent de contraste seraient absorbées par les tissus, impactant irrémédiablement le contraste et la qualité d'imagerie.

De plus, nous avons opté pour une cyanine 5.5 présentant quatre groupements sulfate pour favoriser l'hydrophilicité et la solubilisation des composés finaux.

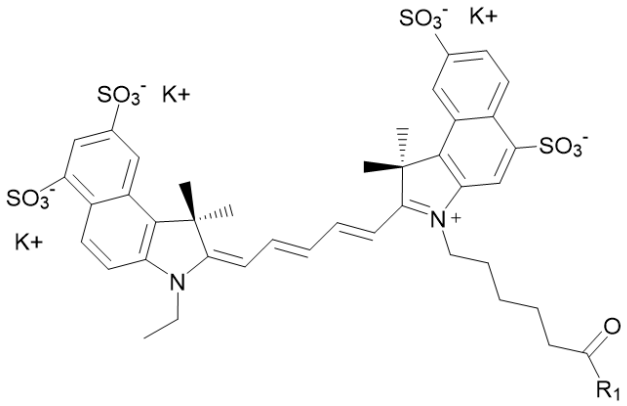


Figure 59 - Cyanine 5.5 tétrasulfate

- **Présentation multivalente des ligands et double ciblage.**

Il est reconnu qu'une molécule présentant plusieurs motifs -RGD- dans une zone restreinte augmente sensiblement son affinité pour le récepteur intégrine $\alpha v\beta_3$. Cet effet de multivalence (présenté en introduction) a notamment été exploité par notre laboratoire pour la conception de vecteurs ciblant les récepteurs intégrine $\alpha v\beta_3$. Pour ce faire, un châssis cyclodécapeptidique a été utilisé (fig. 60).[131] Cette plateforme moléculaire relativement rigide permet de présenter quatre copies d'un même ligand c[RGDfK], tout en leur imposant une certaine architecture dans l'espace. La plateforme présente d'ailleurs deux faces distinctes. La première est utilisée pour les ligands de ciblage donc, alors que la face inférieure peut être fonctionnalisée par des effecteurs tels que des fluorophores ou des agents cytotoxiques. Dans les travaux cités ci-dessus, les fonctions R_1 à R_4 (fig. 60) sont toutes identiques et sont fonctionnalisées par des ligands c[RGDfK]. Mais si les fonctions R_1 à R_4 sont différentes et orthogonales, il est possible de les fonctionnaliser indépendamment l'une de l'autre.

De même, les fonctions R_5 et R_6 peuvent être les groupements chimiques naturels de chaines latérales ou avoir été modifiées. Elles peuvent être identiques ou non, et l'une d'elle ou les deux peuvent être utilisées pour fonctionnaliser le châssis.

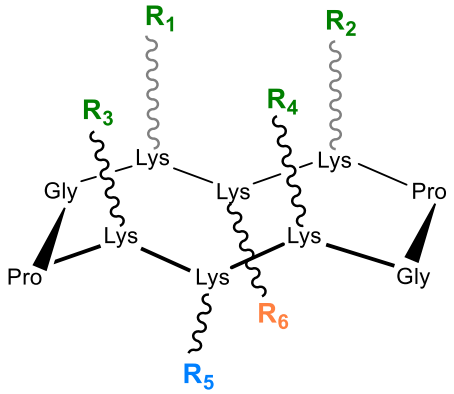


Figure 60 – Schéma générale d'un châssis cyclodécapeptidique.

L'utilisation de la multivalence ayant déjà fait ses preuves dans le ciblage de l'intégrine $\alpha v\beta_3$, nous avons décidé de conserver cette structure de base. Mais nous voulions ajouter en plus un second ligand ciblant NRP1, pour obtenir des vecteurs à double ciblage. Pour cela nous pouvions exploiter la face inférieure du décapeptide qui présente deux possibilités de fonctionnalisation grâce à la présence de deux chaînes latérales de Lysine. La première Lysine a été exploitée pour greffer le fluorophore, tandis que la seconde a permis d'accrocher le ligand ATWLPPR *via* un bras espaceur PEGn.

Nous avons aussi voulu étudier la propriété de multivalence pour le ligand ATWLPPR, d'autant plus qu'aucune étude n'a été publiée à ce sujet. Là aussi, l'utilisation d'un châssis cyclodécapeptidique décoré cette fois par quatre ligands ATWLPPR nous a permis d'étudier ce paramètre.

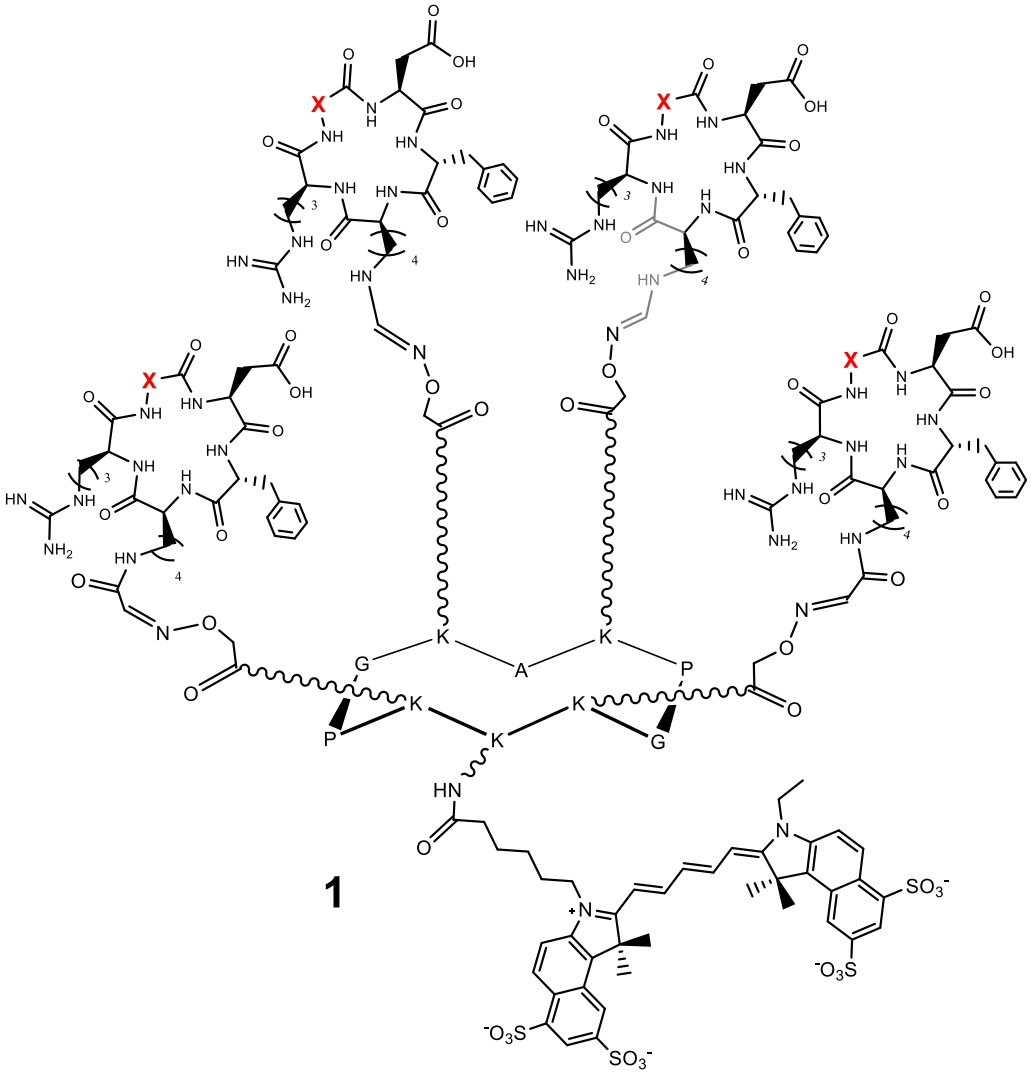
La combinaison de quatre motifs -RGD- et quatre motifs ATWLPPR en plus d'un agent de contraste a nécessité l'utilisation de deux châssis cyclodécapeptidiques, reliés par un espaceur PEGn.

Concernant la longueur des bras espaceurs PEG à utiliser, nous avons choisi de tester les PEG_{12} et PEG_{24} (environ 45 et 85 Angström). En effet, les preuves d'une communication entre NRP1 et $\alpha v\beta_3$ sont assez récentes, et les caractéristiques de cette interaction ne sont pas encore bien connues. Par exemple, on ne connait pas la distance exacte entre ces deux récepteurs. Il est même très probable qu'elle soit variable puisque les récepteurs peuvent se déplacer le long de la membrane cellulaire. Il pourrait cependant y avoir une « longueur idéale » de linker pour réussir à interagir simultanément avec les deux récepteurs. Dans un premier temps, nous avons voulu tester deux longueurs différentes pour voir si une différence serait observée.

Enfin, les composés étant amenés à être testés biologiquement, il est nécessaire de synthétiser aussi des composés contrôles. Ainsi, pour prouver que la spécificité de ciblage des vecteurs est bien due à leurs ligands c[RGDfK] et/ou ATWLPPR, nous avons utilisé les ligands c[RβADfK] et LWRPTPA comme contrôles négatifs. Ces ligands ont déjà été décrits et présentent l'avantage d'avoir une composition en acide aminés similaire aux peptides positifs.

- **Molécules objectifs du projet**

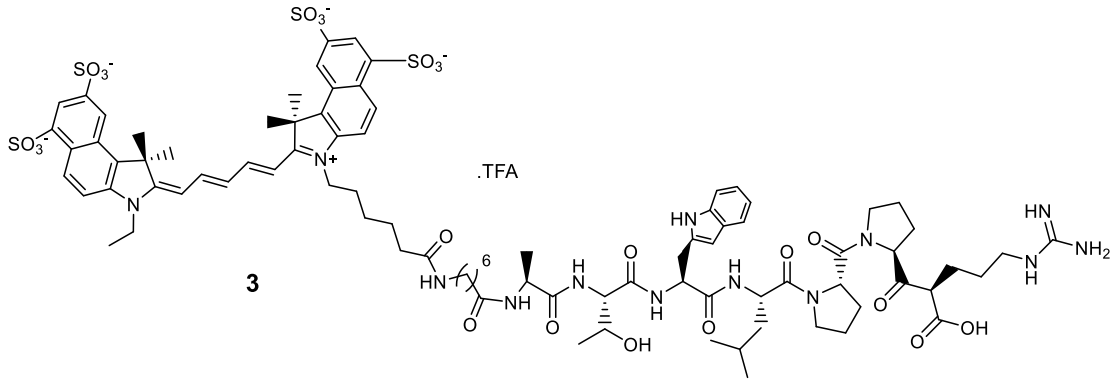
Pour réaliser nos études nous avons donc synthétisé neuf composés. La molécule **1** est un vecteur composé d'un châssis cyclodécapeptidique décoré de quatre ligands -RGD- et d'un fluorophore. Ce composé de référence pour le ciblage de l'intégrine $\alpha v\beta_3$ comporte un fluorophore différent par rapport aux composés publiés précédemment. Tout comme la molécule **2**, présentant quatre peptides –RβAD- et utilisée comme contrôle négatif (fig. 61).



1 : **X** = $-CH_2-$
2 : **X** = $-CH_2-CH_2-$

Figure 61 - RAFT(4RGD)Cy5.5 (**1**) *et RAFT(4R?AD)Cy5.5* (**2**)

Le ciblage de la Neuropiline-1 a été étudié en utilisant les composés **3**, **4** et **5**. La molécule **3** est constituée d'un ligand ATWLPPR relié au fluorophore Cy 5.5 *via* un linker acide hexanoïque (Ahx). Le composé **4** est identique mais une séquence scramble du ligand a été utilisée pour obtenir un contrôle négatif du **3**. Le composé **5** vise à étudier l'influence de la présentation multivalente de quatre ligands ATWLPPR *via* le châssis cyclodécapeptidique (fig.63).



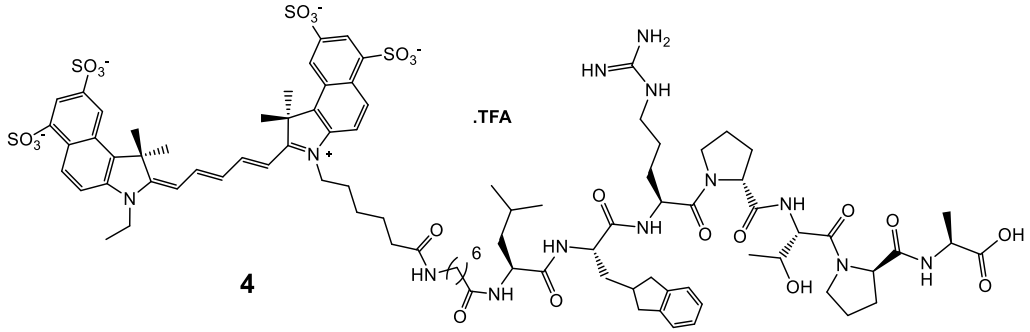


Figure 62 - Cy5.5-Ahx-ATWLPPR (**3**) *et Cy5.5-Ahx-LWRPTPA* (**4**)

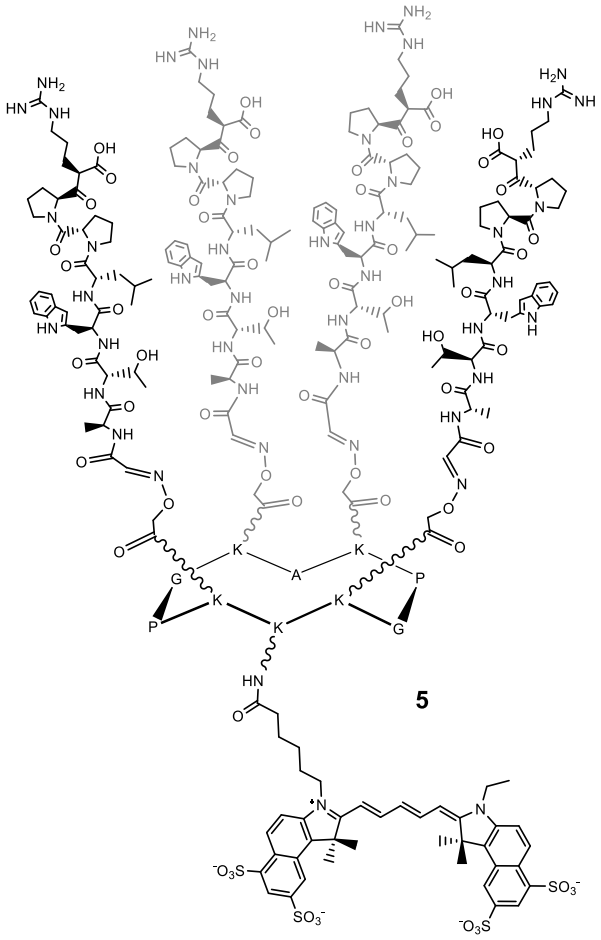


Figure 63 - RAFT(4ATWLPPR)Cy5.5 (**5**)

Pour les composés comportant deux motifs de ciblage différents, nous avons synthétisé des composés présentant les motifs -RGD- de manière multivalente (quatre ligands) et un seul ligand ATWLPPR. Ce dernier est lié au châssis *via* un linker PEG_{12} pour la molécule **6**, ou un linker PEG_{24} pour le composé **7** (fig. 64). Nous avons aussi préparé des composés avec les motifs –RGD- et ATWLPPR tous deux présentés de manière multivalente. Pour cela, un châssis avec quatre ligands -RGD- et un fluorophore a été fonctionnalisé par un second châssis portant quatre ligands ATWLPPR, reliés par un bras espaceur PEG_{12} pour la molécule **8** et PEG_{24} pour la molécule **9**.

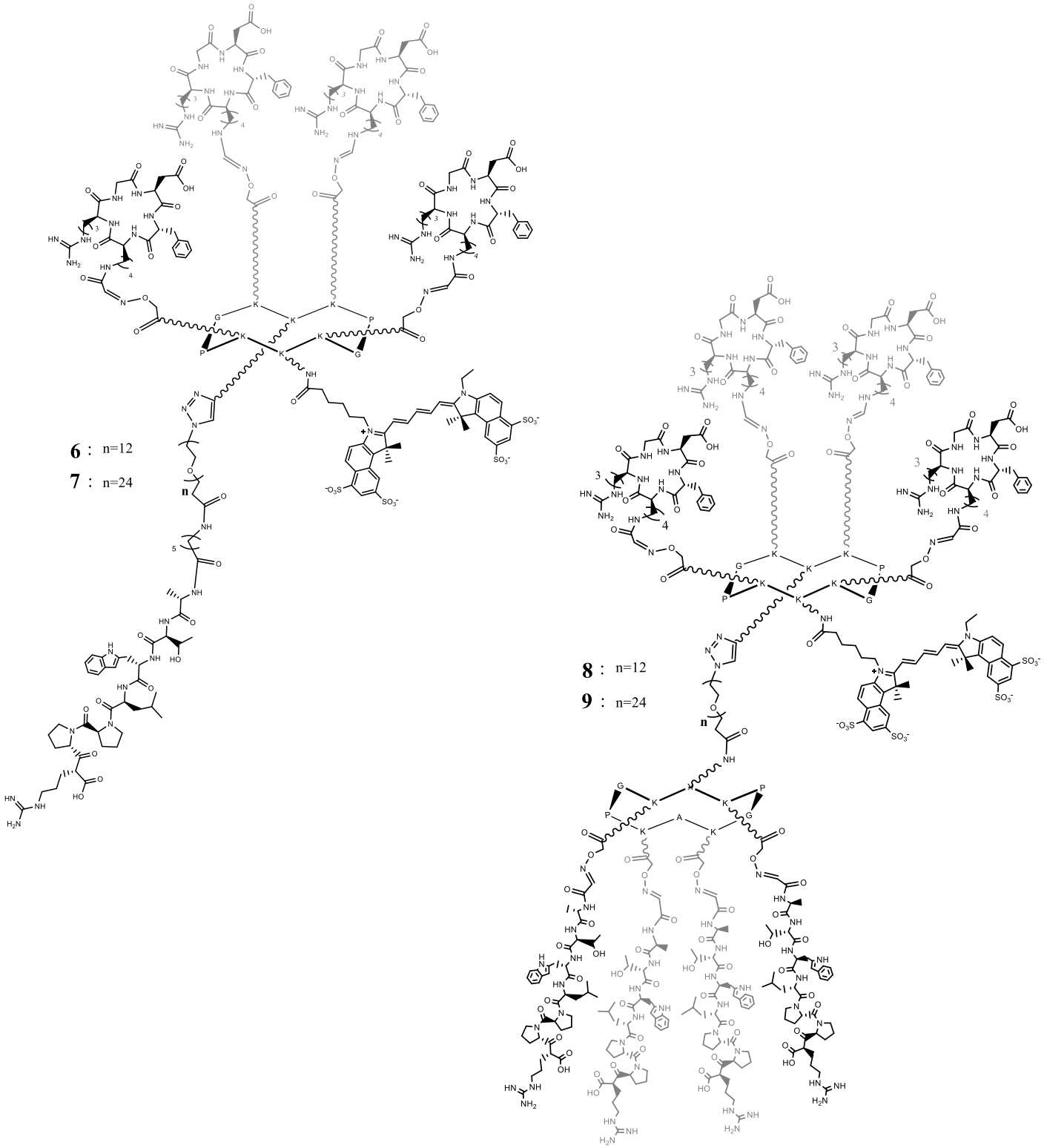


Figure 64 - RAFT(4RGD)Cy5.5 - PEGn-ATWLPPR (***6***, **7**) *et RAFT(4RGD)Cy5.5 – PEGn RAFT(4ATWLPPR)* (**8**, **9**)

2. SYNTHESES DES VECTEURS FLUORESCENTS

Le cœur de ce projet, d'un point de vue synthèse organique, est d'exploiter les caractéristiques spécifiques du châssis peptidique RAFT (Regioselectively Adressable Functionalised Template) : Il permet de combiner plusieurs ligands et agents effecteurs, grâce à des fonctions chimiques orthogonales. Ces fonctions sont présentes sur les chaînes latérales des acides aminés qui le composent. Le RAFT est obtenu *via* une synthèse peptidique supportée et en solution.

Les différents ligands et effecteurs des molécules cibles sont introduits sur le RAFT de façon chimiosélective et séquentielle. Il faut donc prévoir en amont les réactions de fonctionnalisation qui seront utilisées, et introduire en conséquence les acides aminés modifiés lors de la synthèse du RAFT. En effet, plutôt que de synthétiser le RAFT à partir d'acides aminés naturels et de le modifier par la suite, il est préférable de modifier en amont les acides aminés puis de les introduire au cours de la synthèse peptidique. Cela réduit les risques de réactions parasites et les coûts de synthèse.[130,263]

Dans ce chapitre, la procédure générale de synthèse peptidique est abordée ainsi que la préparation des acides aminés modifiés par des fonctions chimiosélectives, des châssis moléculaires RAFT, et des ligands peptidiques nécessaires à la synthèse des différentes molécules.

A. Principe de la synthèse peptidique

Tous les châssis peptidiques précurseurs ont été préparés par synthèse peptidique sur support solide (SPPS). Cette méthode est largement plébiscitée pour la synthèse de peptides mais aussi de petites protéines.[264] Elle consiste à greffer dans un premier temps un acide aminé à un support solide insoluble *via* sa fonction C-terminale (fig. 65). Le support en question est typiquement constitué de billes de polymère possédant des bras espaceurs fonctionnalisés pour accueillir le premier acide aminé. Une fois le greffage sur support solide réalisé, la fonction N-terminale de l'acide aminé est déprotégée afin de pouvoir le coupler avec un second acide aminé protégé en N-terminal, suivant une réaction de couplage peptidique classique. Des cycles répétés de déprotection/couplage permettent ainsi d'ajouter des acides aminés au fur et à mesure pour obtenir le peptide désiré.

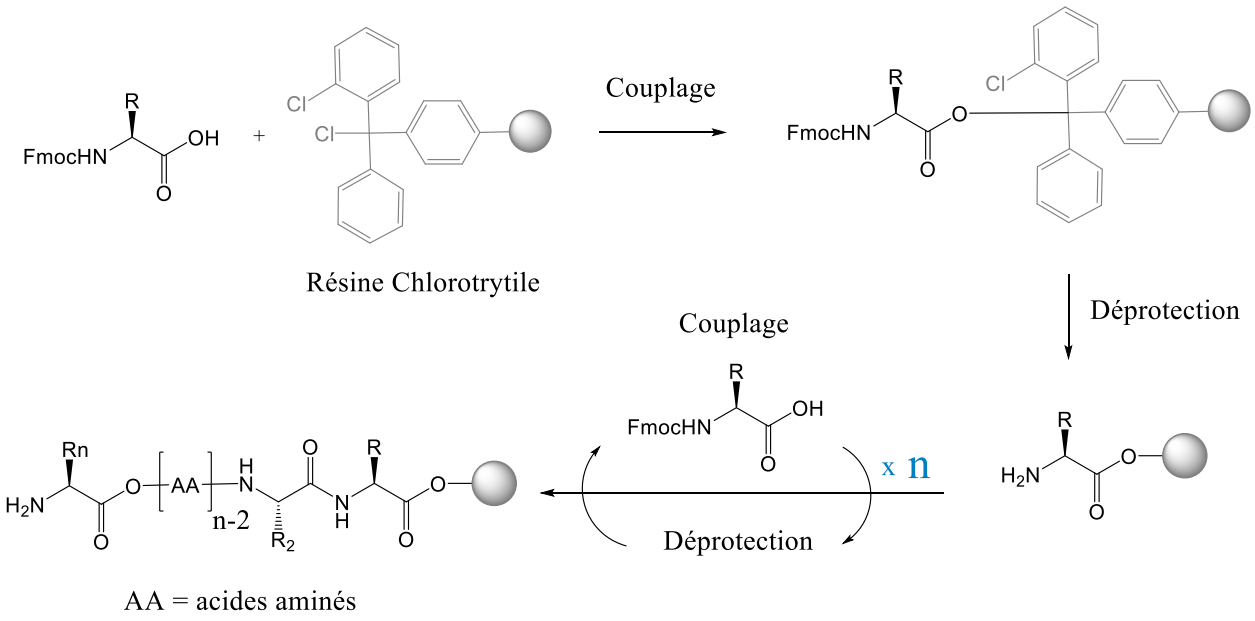


Figure 65 - Schéma d'une synthèse peptidique

Comme le support solide est non miscible aux phases liquides, il permet de s'affranchir des étapes d'isolation et de purification en les remplaçant par de simples lavages/filtrations. Cela facilite d'ailleurs l'utilisation de réactifs en excès donc l'obtention de meilleurs rendements. Les fonctions latérales des acides aminés sont elles aussi protégées pour ne pas interférer.

Il existe deux grandes stratégies en SPPS : les stratégies Boc/Bzl et Fmoc/*t*-Bu. En effet, il faut un groupement protecteur pour les fonctions N-terminal (Boc ou Fmoc) et un second groupement protecteur orthogonal au premier, pour les chaines latérales (Bzl ou *t*-Bu). Par exemple, le groupement Fmoc (fluorénylméthoxycarbonyle) est éliminé en présence de pipéridine alors que les groupements Boc ou *t*-Bu sont éliminés en milieu acide en présence de TFA. D'autres groupements protecteurs orthogonaux au Fmoc ont été mis au point, permettant une plus grande flexibilité dans les possibilités de modification du peptide (Alloc, Dde…). Dans notre cas, nous avons opté pour la stratégie Fmoc/*t*-Bu.

La méthode SPPS permet aussi d'introduire des acides aminés modifiés lors de la synthèse d'un peptide. Pour ce projet, nous introduisons des acides aminés comportant des fonctions chimiques qui seront utilisées pour assembler les différentes unités fonctionnelles (ligands, châssis…).

B. Incorporation de building blocks pour des réactions de ligation

Pour construire nos édifices moléculaires (**1** à **9**), nous avons préparé des châssis peptidiques comportant des fonctions chimiosélectives. Trois réactions principales ont été utilisées : la ligation éther d'oxime, la cycloaddition de Huisgen et la ligation peptidique classique. Pour les deux premières réactions, il a fallu préparer des acides aminés comportant les fonctions chimiques partenaires, avant de les introduire dans la synthèse du châssis ou des ligands.

i. *Acides aminés modifiés pour la ligation éther d'oxime*

La ligation éther d'oxime met en jeu un partenaire portant une fonction oxyamine et un partenaire carbonylé (cétone ou aldéhyde). Dans notre cas, nous avons utilisé un α -oxo aldéhyde (groupement *glyoxylyl*). Cet aldéhyde est obtenu par coupure oxydante du groupement 1,2-aminoalcool d'une sérine.

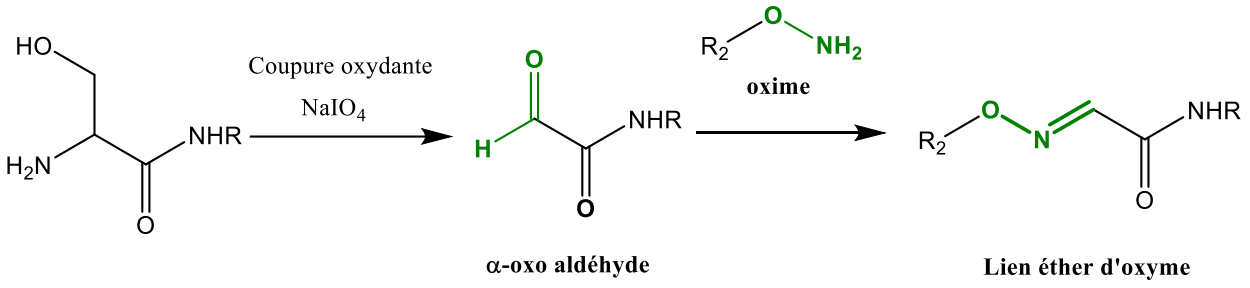


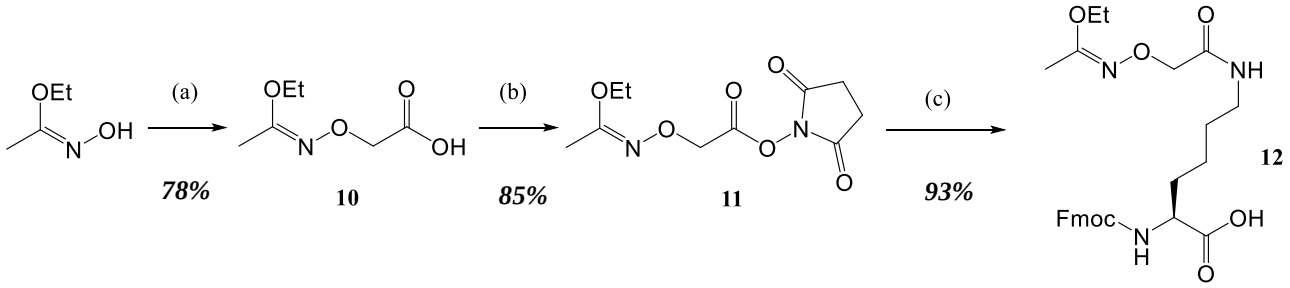
Figure 66 – Schéma d'une réaction de ligation éther d'oxime.

Grâce à l'effet mésomère donneur de l'oxygène en position α de l'azote, le lien oxime créé est plus stable vis-à-vis de l'hydrolyse que d'autres liens similaires comme les liens imines et hydrazone.[265] Le lien éther d'oxime est d'ailleurs stable dans une gamme de pH allant de 2 à 9, et également stable en conditions physiologiques. La réaction entre une oxyamine aliphatique et un aldéhyde est favorisée à pH légèrement acide (entre 4 et 5) mais peut être réalisée à pH neutre en présence de catalyseur.[266] Ces conditions renforcent la chimiosélectivité de cette réaction puisqu'à ce pH les fonctions amine terminales sont protonées, réduisant les possibilités de formation de lien imine.

Pour introduire les fonctions oxyamine et aldéhyde, nous avons choisi de modifier les chaines latérales de lysines.

- **Synthèse de dérivés Lysine avec fonction oxyamine protégée**

Pour obtenir le partenaire oxyamine, nous avons modifié une lysine par un groupement oxyamine lui-même protégé par un groupement 1-ethoxyéthylidène.[263] Habituellement, l'oxyamine est introduite sous forme d'acide 2-aminooxyacétique (Aoa-OH) protégé par un groupement Boc. Le fait est que même protégée par un Boc, l'oxyamine conserve une certaine réactivité et l'azote peut subir une acylation. Notre laboratoire a donc développé le groupement 1-ethoxyéthylidène qui s'est montré efficace et stable en condition SPPS.[263] De plus, sa déprotection en milieu acide (1% TFA) est compatible avec l'utilisation de résines chlorotrityle.



Réactifs : (a) ICH_2COOH, NaOH, H_2O ; (b) DCC, NHS, AcOEt/Dioxane (5/5) ; (c) Fmoc-Lys-OH, DIPEA, DMF

Figure 67 - Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié **12** *présentant une fonction oxyamine protégée par un groupement 1-éthoxylidène*

Pour préparer le composé **12**, nous faisons d'abord réagir l'éthyle N-hydroxyacétimidate sur l'acide iodoacétique *via* une réaction de susbtitution nucléophile (fig.67). L'acide 2-(1-éthoxyéthylidèneaminooxy)acétique **10** est obtenu avec un bon rendement proche de 80%. La fonction acide carboxylique du composé **10** est ensuite activée sous forme d'ester *N*-hydroxysuccinimique par réaction avec le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) et le N,N'-dicyclohexylcardodiimide (DCC). Le composé **11** est obtenu avec un rendement de 85%.

Enfin, l'acylation de la Fmoc-Lys-OH en utilisant le composé **11** en milieu basique permet d'obtenir le composé **12** avec un rendement de 93% après purification.

Cet acide aminé est stable en conditions SPPS (pH basique, pipéridine) et n'engendre pas de produit secondaire. En revanche, il est très sensible au TFA dilué et sa

déprotection peut être orthogonale à celle des groupements *t*-Bu et Boc (50% TFA). Par contre, pour conserver ce groupe protecteur sur nos peptides en fin de synthèse, ceux-ci sont préparés sur une résine du type chlorotrityle très sensible aux acides, et sont récupérés dans des conditions acides très douces en utilisant une solution d'acide acétique.

- **Synthèse de dérivés Lysine possédant une fonction aldéhyde masquée**

La fonctionnalisation d'un peptide par une fonction aldéhyde peut se faire *via* la coupure oxydante d'un diol. Il est par exemple possible d'utiliser un linker comportant une fonction acide tartrique pour obtenir un α-oxo aldéhyde.[267] Mais il est aussi possible de réaliser une coupure oxydante d'un α-aminoalocool.[268] C'est l'option que nous avons choisie en couplant sur une lysine une sérine qui, après déprotection et coupure oxydante au périodate de sodium, conduit à un α-oxo aldéhyde.

Pour obtenir le composé **14**, nous préparons l'ester activé d'une Boc-Ser(*t*-Bu)-OH sous forme d'ester *N*-hydroxysuccinimique, selon le même protocole que celui utilisé pour le composé **11**. L'intermédiaire **13** obtenu en ensuite mis en réaction avec une Fmoc-Lys-OH en milieu basique pour donner le composé **14** avec un rendement supérieur à 94% (fig.68). Cet acide aminé modifié est stable en conditions SPPS.[263]

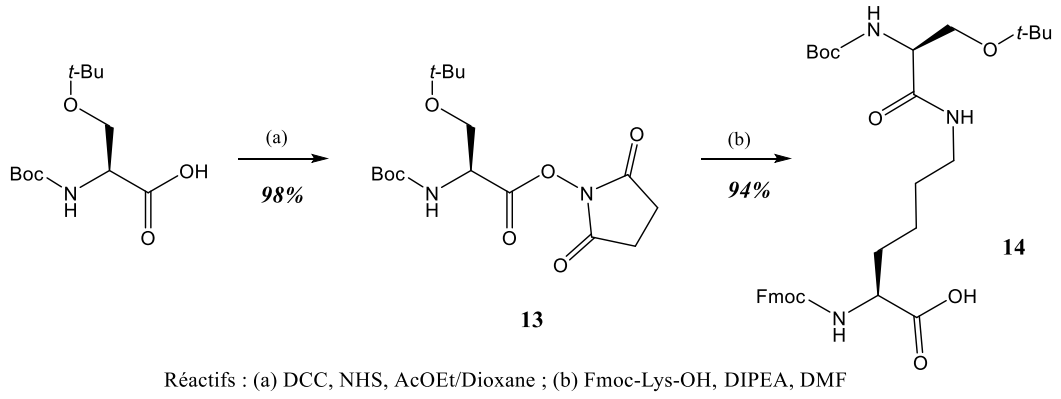


Figure 68 – Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié **14** *présentant une fonction aldéhyde masquée*

ii. *Acides aminés modifiés pour la ligation par cycloaddition de Huisgen (lien triazole)*

La cycloaddition 1,3 dipolaire (ou de Huisgen) a été découverte en 1963, mais popularisée en 2002 lorsque Meldal et Sharpless parviennent à réaliser cette réaction de façon régiosélective et en augmentant sa cinétique grâce à une catalyse au Cu^{I}. Elle met en jeu une fonction alcyne terminale et une fonction azoture. Cette réaction a été très rapidement et massivement utilisée en tant que ligation chimiosélective car, en plus d'avoir une cinétique rapide, les partenaires alcyne et azoture qu'elle met en jeu sont particulièrement inertes vis-à-vis de nombreuses fonctions chimiques, et sont stables dans les conditions classiques de synthèse de biomolécules. Ce sont les deux raisons qui nous ont poussés à utiliser cette réaction. Un autre avantage notable est que le lien triazole formé est un bioisostère du lien amide, tout en étant stable à l'hydrolyse et aux protéases.[269]

Comme décrit en introduction, il existe plusieurs sources de Cu^{I} et plusieurs ligands possibles pour stabiliser cette espèce. Il est aussi possible de réaliser cette réaction sans catalyseur en utilisant des alcynes contraints. Mais le coût et l'encombrement stérique de ces alcynes nous ont poussés à utiliser la voie catalysée au Cu^{I}, qui présente aussi l'avantage de cinétiques plus rapides.

Pour introduire les fonctions azoture et alcyne, nous avons choisi de fonctionnaliser la chaine latérale de lysines.

- **Synthèse de dérivés Lysine présentant une fonction alcyne terminale**

La fonction alcyne est introduite grâce à l'utilisation de l'acide pentinoïque. Ce dernier est activé sous forme d'ester succinimique pour former le composé **15**. L'ester activé est ensuite additionné sur une Fmoc-Lys-OH en milieu basique pour obtenir la

molécule **16** avec un rendement supérieur à 95%. Ce composé s'est montré stable en conditions SPPS.

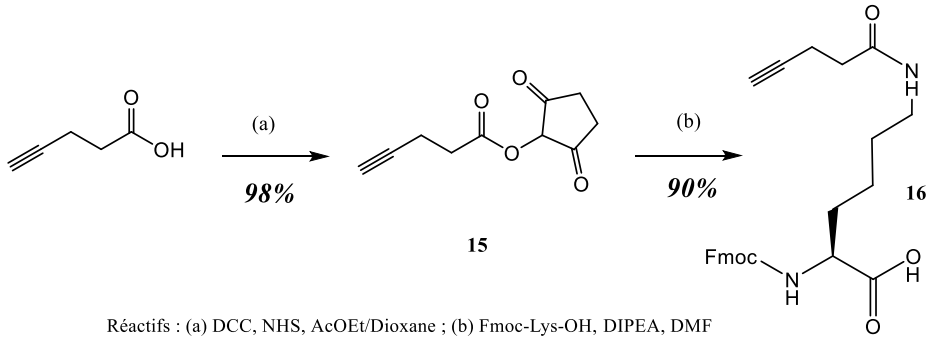


Figure 69 – Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié **16** *présentant une fonction alcyne.*

- **Synthèse de dérivés lysine présentant une fonction azoture**

Il existe plusieurs méthodes pour incorporer une fonction azoture sur un acide aminé. Il est possible par exemple de greffer un bras espaceur possédant la fonction chimique azoture, de réaliser la substitution nucléophile d'un dérivé halogéné par NaN_3,[270] ou encore utiliser un diazo transfert directement sur l'azote en position ε d'une Fmoc-Lys-OH. Cette réaction permet de transformer de manière sélective les amines primaires en azoture avec de très bons rendements. Ce diazo transfert peut être réalisé à l'aide de l'azoture de triflate ou l'azoture d'imidazole-1-sulfonyle. Le premier réactif étant instable et peu soluble en milieu aqueux, le second réactif, mis au point par Goddard-Borger *et al.* en 2007, est souvent préféré (fig.70).[271] Son mécanisme d'action a été clairement identifié par Pandiakumar *et al.* .[272] L'utilisation de ce réactif nous a permis d'isoler, en une seule étape, un dérivé Lysine comportant un azoture qui s'avère stable en conditions SPPS.

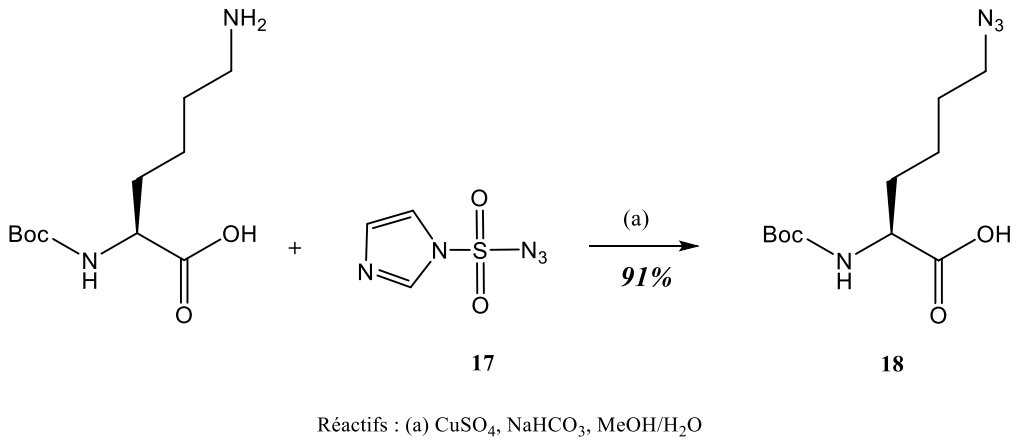


Figure 70 – Schéma de synthèse de l'acide aminé modifié **18** *présentant une fonction azoture*

Pour obtenir le composé **18**, nous avons d'abord synthétisé le réactif **17** à partir d'imidazole, de $SOCl_2$ et de NaN_3 en suivant la procédure décrite dans la littérature.[271] Une fois l'azoture d'imidazole-1-sulfanoyle **17** en main, nous pouvons l'additionner à une Fmoc-Lys-OH en présence de sulfate de cuivre en quantité catalytique. Le composé **18** est isolé avec un rendement quantitatif et une très bonne pureté (> 95%). Ce building block n'a révélé aucune dégradation en conditions SPPS. Il faut tout de même prêter attention à sa solubilité dans le DMF (risque de précipitation au cours du temps). Mais cet inconvénient est facilement contournable en diluant d'avantage l'acide aminé. Il faut aussi éviter la présence d'éléments qui pourraient réduire l'azoture (phosphines, certains sels métalliques).

iii. *Synthèse d'un châssis moléculaire comportant plusieurs acides aminés modifiés*

Pour synthétiser les châssis moléculaires, nous avons utilisé une stratégie de synthèse mixte en solution et en phase solide sur une résine 2-chlorotrytile®. Cette dernière permet de décrocher les peptides dans des conditions relativement douces. De plus, le premier acide aminé peut être accroché en milieu basique sans activation préalable : c'est la fonction carboxylate de l'acide aminé qui réalise une attaque

nucléophile sur la 2-chlorotrytile® en milieu basique. Cela limite les risques d'épimérisation. De même, la synthèse d'un peptide cyclique débute généralement par un résidu achiral comme la glycine pour diminuer le phénomène d'épimérisation qui peut avoir lieu pendant la réaction de cyclisation.

Les autres acides aminés sont ajoutés après déprotection de leur prédécesseur. Les cycles de déprotection des amines *N*-terminales sont effectués avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF. Les couplages peptidiques sont réalisés à l'aide d'agents de couplage comme le PyBOP ou le HBTU en présence d'un excès d'acide aminé (2 éq.). En fin de synthèse, le peptide est décroché du support en conditions acides compatibles avec les groupements protecteurs : conditions douces (AcOH) si le buidling block éthoxyéthylidène **12** a été utilisé, 1% TFA sinon.

La cyclisation du peptide linéaire est réalisée entre ses parties *N*-terminale et *C*-terminale en présence d'agent de couplage en milieu très dilué (5.10^{-4}) pour éviter les réactions intermoléculaires (fig.80).

La déprotection finale du peptide cyclique (châssis) est réalisée en utilisant une solution TFA/TIS/H_2O (95/2,5/2,5). Le triisopropylsilane (TIS) sert à piéger les carbocations formés lors de la déprotection, et l'eau est nécessaire à l'hydrolyse du groupement éthoxyéthylidène.

La fonction oxyamine étant très réactive, il est parfois préférable de ne pas l'isoler. Pour ce faire, il est possible de déprotéger sélectivement le groupement éthoxyéthylidène et directement l'engager dans une réaction de ligation oxime one pot dans des conditions acides relativement douces (1% TFA).

Une grande variété de châssis moléculaires peut être synthétisée, en fonction du type d'acides aminés introduits lors de la SPPS. D'une manière générale, les châssis synthétisés au cours de ce projet comportent quatre acides aminés identiques qui, après cyclisation du châssis, se retrouvent sur la même face (fig. 71). Ces quatre acides aminés sont généralement utilisés pour l'accroche des ligands présentés de façon multivalente. Un autre acide aminé modifié est introduit de manière à se trouver sur la face opposée. Les séquences Pro-Gly permettent de contraindre le peptide sous forme de β-turn. Enfin,

l'introduction de Fmoc-Lys(Boc)-OH permettra après cyclisation et déprotection d'avoir une fonction amine disponible pour une ligation amide, généralement exploitée pour introduire un effecteur.

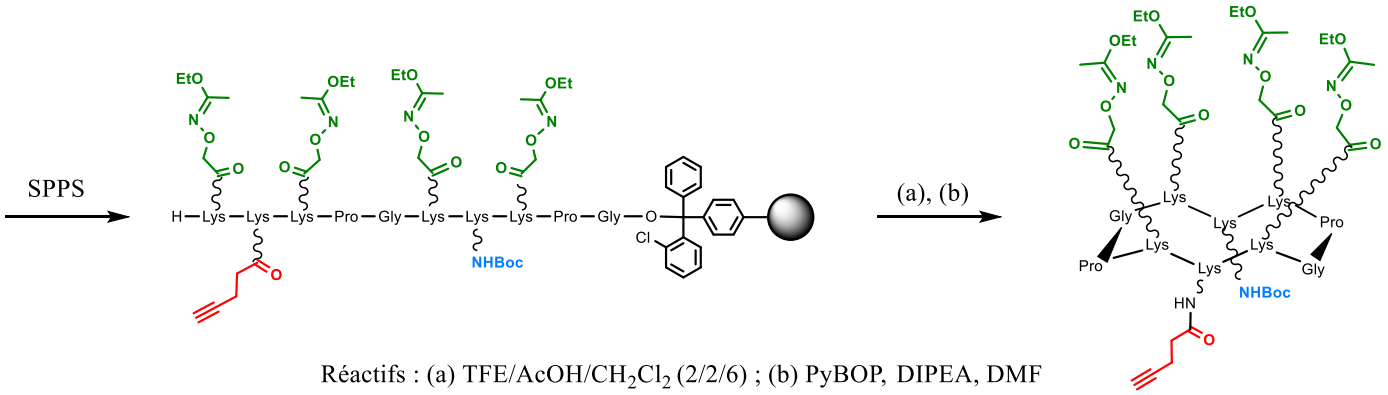


Figure 71 – Schéma de synthèse d'un châssis avec fonctions oxyamine, amine et alcyne

Le châssis peptidique est une plateforme polyvalente qui peut présenter de multiples fonctions orthogonales. Il est possible d'utiliser par exemple d'autres types de ligation telle que l'utilisation de lien thioéther.[213] Dans notre cas, les ligations par lien oxime, par CuAAC et par lien amide nous ont permis d'accéder à tous nos composés (fig. 72).

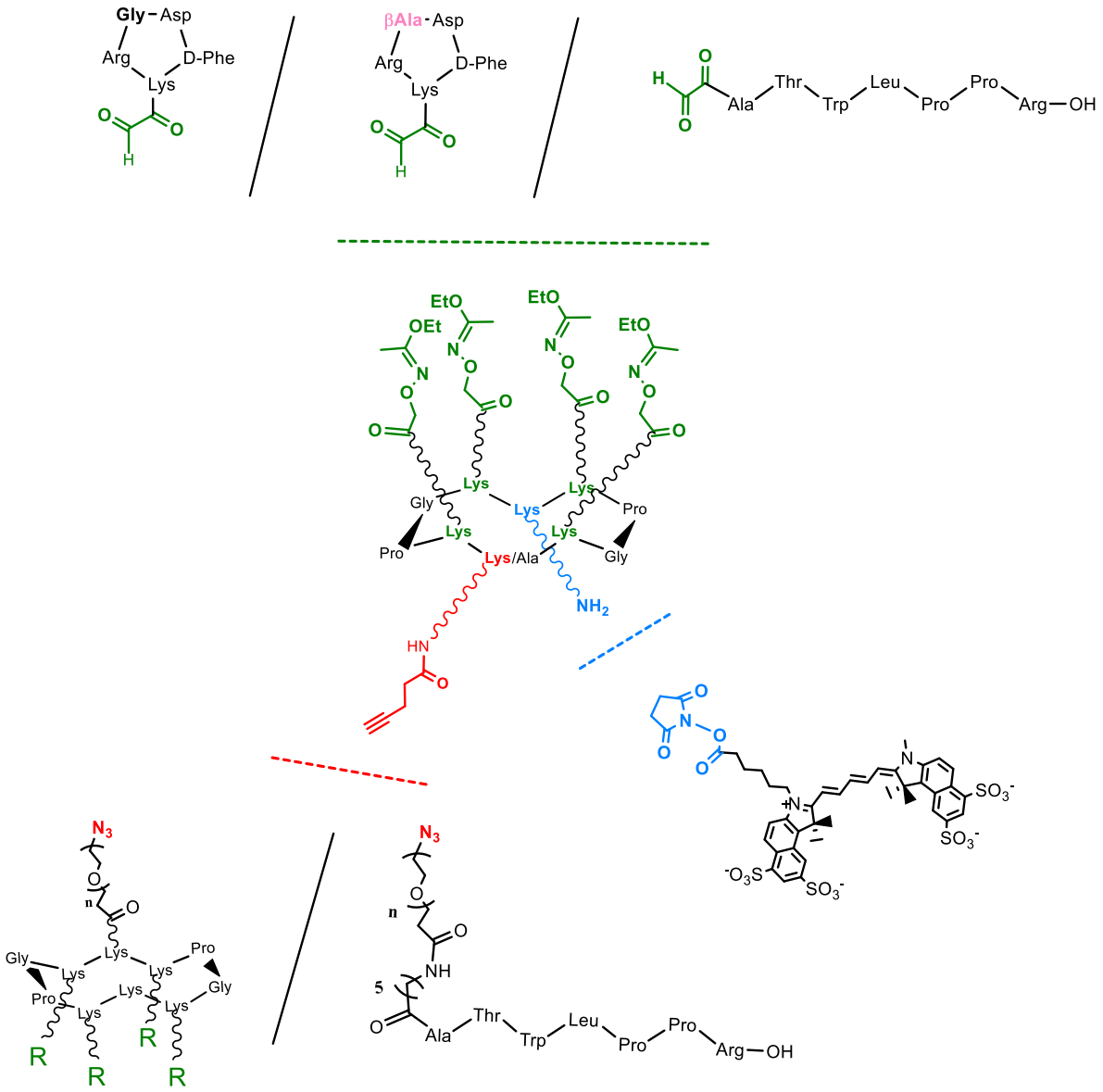


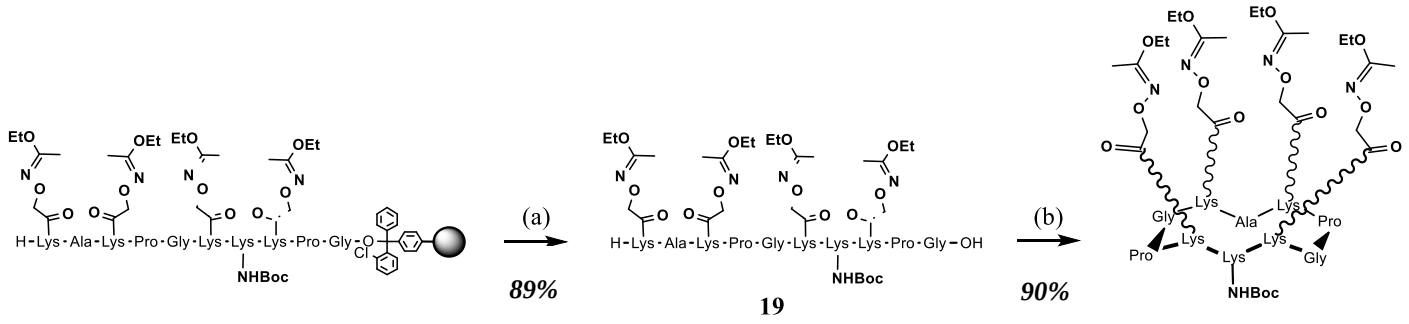
Figure 72 – Exploitation du châssis peptidique pour différentes synthèses du projet.

C. Synthèse des vecteurs peptiques ciblant l'intégrine $\alpha v\beta_3$.

Pour cibler l'intégrine $\alpha v\beta_3$, nous avons décidé de synthétiser des composés présentant quatre ligands RGD de manière multivalente. Nous n'avons pas préparé de composé ne présentant qu'un seul ligand car l'étude comparative des composés tétravalent et monovalent a été décrite précédemment par notre laboratoire.[273] Nous avons tout de même synthétisé un composé contrôle qui présente quatre peptides RβAD. Les synthèses de ces deux composés **1** et **2** sont similaires. Les châssis peptidiques ont été conçus pour présenter quatre fonctions oxyamine et une fonction amine après déprotection. Les ligands RGD et peptides RβAD ont été pourvus d'une fonction aldéhyde masquée pour permettre une ligation oxime, et le fluorophore Cyanine 5.5 a été activé sous forme NHS. Les synthèses sont détaillées ci-dessous.

i. *Synthèse du châssis composé de quatre oxyamines protégées.*

Pour synthétiser le châssis **20**, on réalise l'assemblage du peptide par SPPS, en incorporant l'acide aminé modifié **12** porteur de la fonction oxyamine protégée. En fin de synthèse, on décroche le peptide avec une solution d'acide acétique diluée pour ne pas déprotéger la fonction oxyamine. Le composé linéaire **19** est ensuite engagé dans la réaction de cyclisation en ayant au préalable éliminé tout l'acide acétique résiduel (risque d'acétylation). La cyclisation est effectuée en milieu basique (pH = 9), en présence d'activateur sous des conditions de haute dilution. Le composé cyclique **20** est obtenu avec de bons rendements et une pureté suffisante pour pouvoir l'utiliser dans les étapes suivantes (fig. 73).

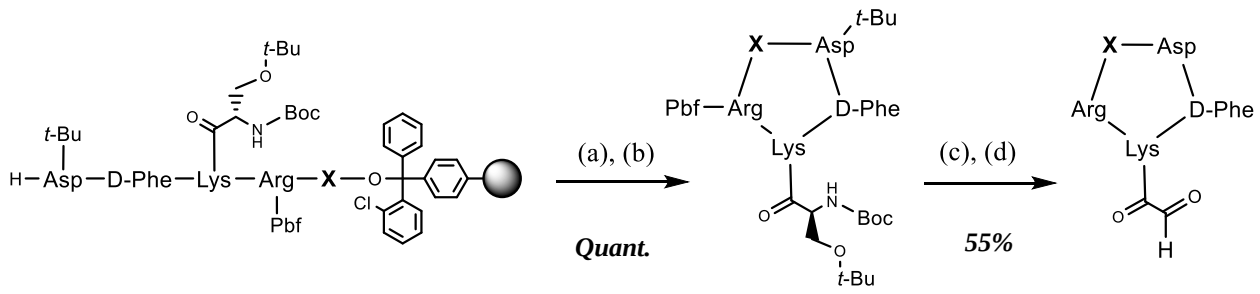


Réactifs : (a) AcOH/TFE/CH_2Cl_2 (2/2/6) ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF

Figure 73 – Schéma de synthèse du châssis peptidique présentant quatre fonctions oxyamine protégées par le groupement 1-éthoxyéthylidène.

ii. Synthèses des ligands c[-RXGfK-] avec une fonction aldéhyde.

Les ligands de ciblage c[-RGDfK-] et c[-RβADfK-] présentant une fonction aldéhyde glyoxylique sont obtenus par SPPS. La synthèse des peptides linéaires est réalisée sur une résine 2-chlorotrityle® en incorporant les acides aminés naturels protégés ainsi que le building block **14** présentant la fonction aldéhyde masquée. Les acides aminés achiraux (Gly et β-Ala) introduits en position *C*-terminale permettent de s'affranchir des risques d'épimérisation lors de l'étape de cyclisation. Après élongation du peptide, ce dernier est libéré de la résine en conditions acides douces compatibles avec les groupements protecteurs (Pbf, *t*-Bu, Boc) puis cyclisé en solution diluée (**23** et **24**). Le peptide est ensuite entièrement déprotégé en milieu acide en présence de piégeurs de carbocations. Enfin, la fonction 1,2-aminoalcool du résidu sérine est oxydée en présence d'un excès de $NaIO_4$ en milieu aqueux (fig.74).



21 : X=Gly
22 : X=βAla

23 : X=Gly
24 : X=βAla

27 : X=Gly
28 : X=βAla

Réactifs : (a) 1% TFA/CH_2Cl_2 ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF ; (c) TFA/H_2O/TIS (95/2.5/2.5) ; (d) $NaIO_4$, H_2O

Figure 74 – Schéma de synthèse de c[RXDfK] fonctionnalisés par un aldéhyde glyoxylique

Les composés **27** et **28** sont obtenus après purification par chromatographie avec des rendements proches de 55% et une excellente pureté. Les produits sont obtenus sous forme hydratée (M = +18) et non hydratée comme le montrent les spectres de masse ci-dessous.

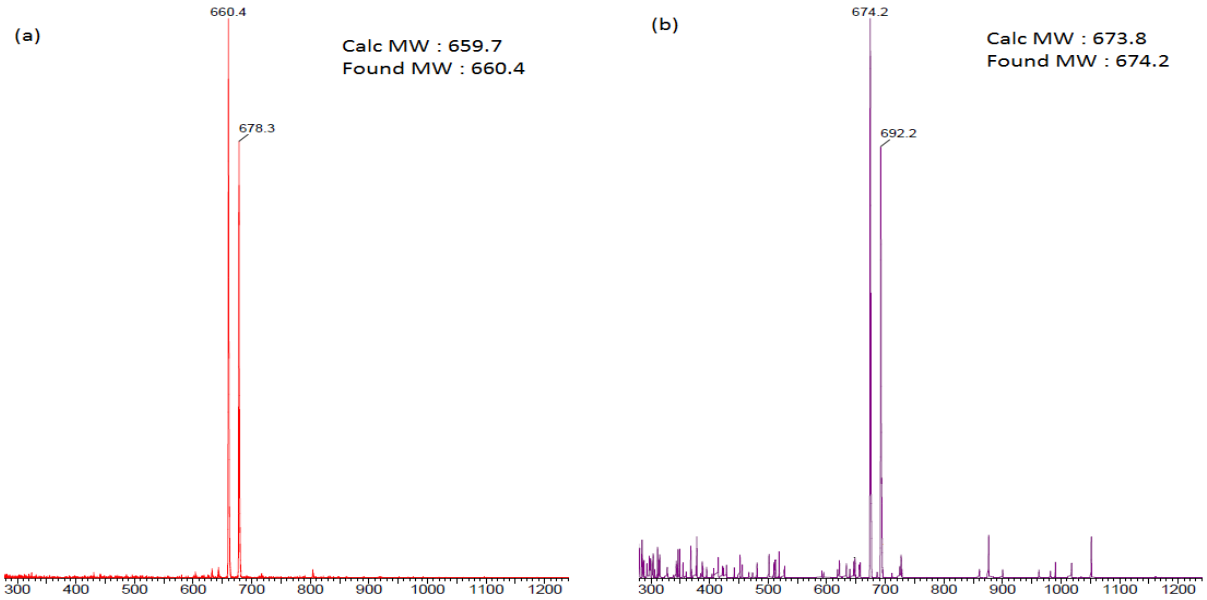
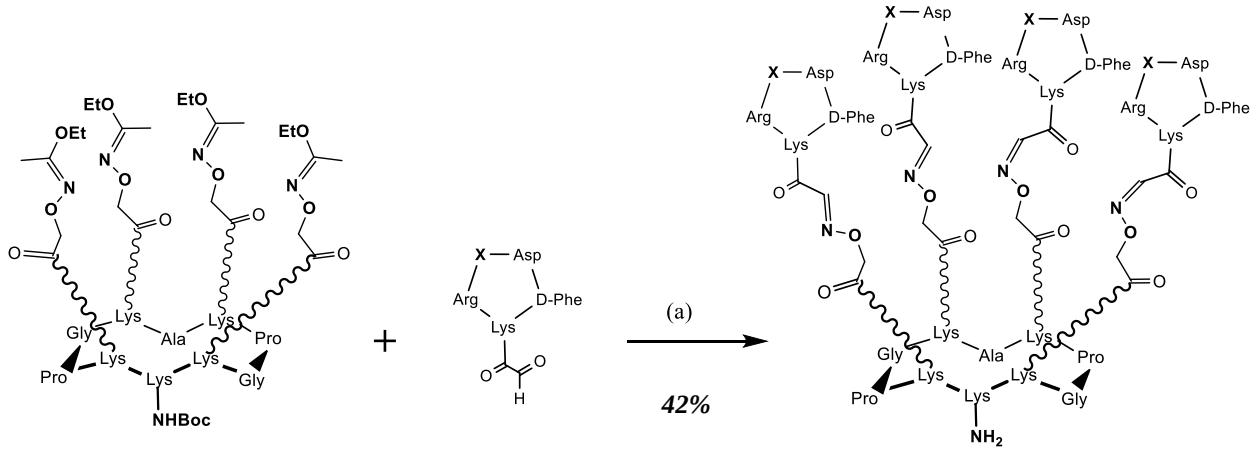


Figure 75 - Spectres ESI des composés (a) **27** *et (b)* **28**

iii. *Synthèse du châssis RAFT(4-c[RXDfK])NH_2 par ligation oxime*

Après avoir synthétisé le châssis **20** composé de quatre oxyamines protégées et les ligands aldéhydiques c[RXDfK] **27** et **28**, il est possible de réaliser la réaction de ligation oxime entre ces partenaires (fig.76). Comme vu précédemment, la déprotection et la réaction des oxyamines peuvent être réalisées en une seule étape pour éviter que ces dernières puissent réagir avec d'autres composés carbonylés présents sous forme de traces dans les solvants.



20

27 : X=Gly
28 : X=βAla

29 : X=Gly
30 : X=βAla

Réactifs : (a) 70% TFA, 30% H_20

Figure 76 – Schéma de l'assemblage de c[RXDfK] sur le châssis **20** *par ligation oxime*

Bien que la ligation oxime s'effectue généralement à pH compris entre 4 et 5, il est possible dans notre cas de la réaliser à pH plus acide dans un milieu concentré en TFA qui permet de déprotéger le groupement Boc de la fonction amine au cours de la même étape. En effet, l'utilisation d'aldéhyde glyoxylique induit la présence d'un carbonyle en α du lien oxime, permettant un effet mésomère stabilisant (fig.77). Le lien éther d'oxime formé reste donc stable malgré la baisse de pH.

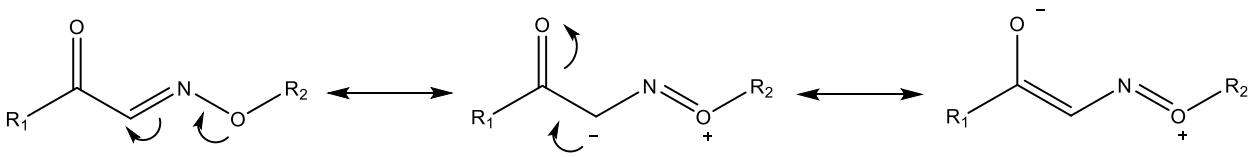


Figure 77 – Formes de résonnance d'un éther d'oxime glyoxylique

Pour réaliser simultanément la ligation oxime et la déprotection du Boc, le châssis **20** et les ligands **27** ou **28** sont mis en réaction dans une solution aqueuse contenant 70% de TFA. Au contraire, pour conserver le groupement Boc il est possible de réaliser la réaction avec seulement 5% de TFA. Les composés aldéhydes sont généralement introduits en excès (1,5 éq. par site oxyamine). L'avancement de la réaction est en partie dicté par l'encombrement stérique des ligands que l'on fixe au châssis. Pour les ligands c[RXDfK], la réaction est terminée après 30 à 60min d'agitation. Les molécules **29** et **30** sont obtenues après purification avec des rendements allant de 45 à 55% avec une très bonne pureté (fig.78)

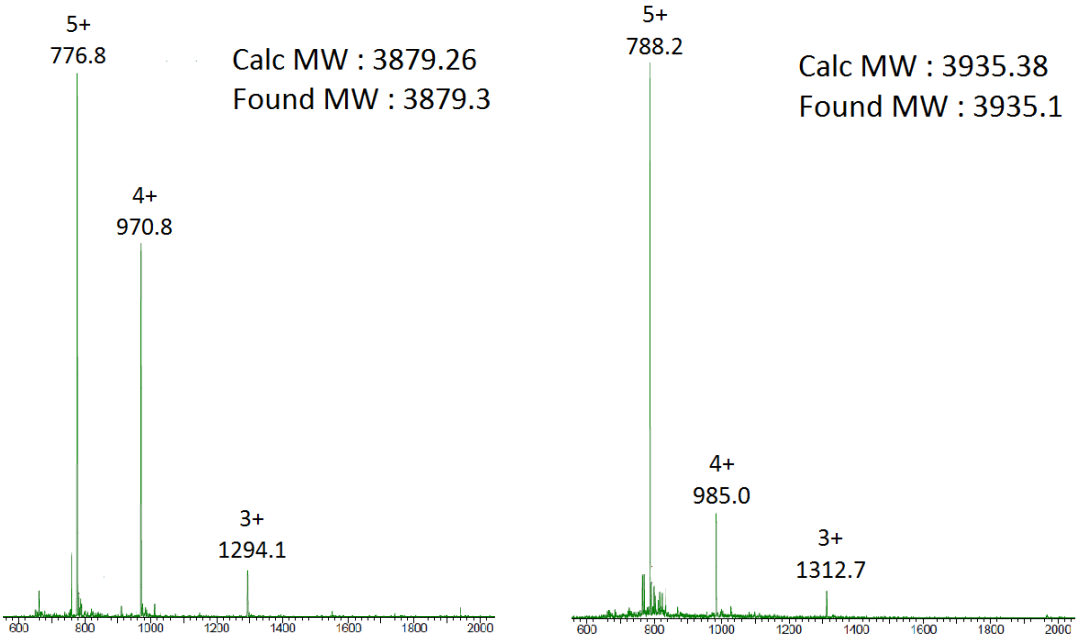


Figure 78 - Chromatogramme et spectre ESI du composé **29** *(gauche) et* **30** *(droite)*

iv. *Synthèse des molécules finales RAFT(4-c[RXDfK])Cy$_{5.5}$*

Une fois les composés RAFT(4-c[RXDfK])NH_2 **29** et **30** en main, la dernière étape consiste à doter ces vecteurs d'un fluorophore Cyanine 5.5. Nous avons décidé d'utiliser un agent de contraste commercial possédant quatre fonctions sulfate pour une meilleure solubilité, et activé sous forme d'ester *N*-hydroxysuccinimique pour pouvoir directement l'engager dans une réaction de couplage peptidique avec une fonction amine.

Ainsi, les composés **29** et **30** sont solubilisés dans une solution de DMF ajustée à pH 9 par ajout de DIPEA (Fig. 79). Deux équivalents (2 éq.) de l'ester activé de la Cyanine 5.5 tétrasulfatée sont nécessaires pour pour obtenir les produits **1** et **2** purs, avec des rendements proches de 90% après purification (Fig. 80 et 81).

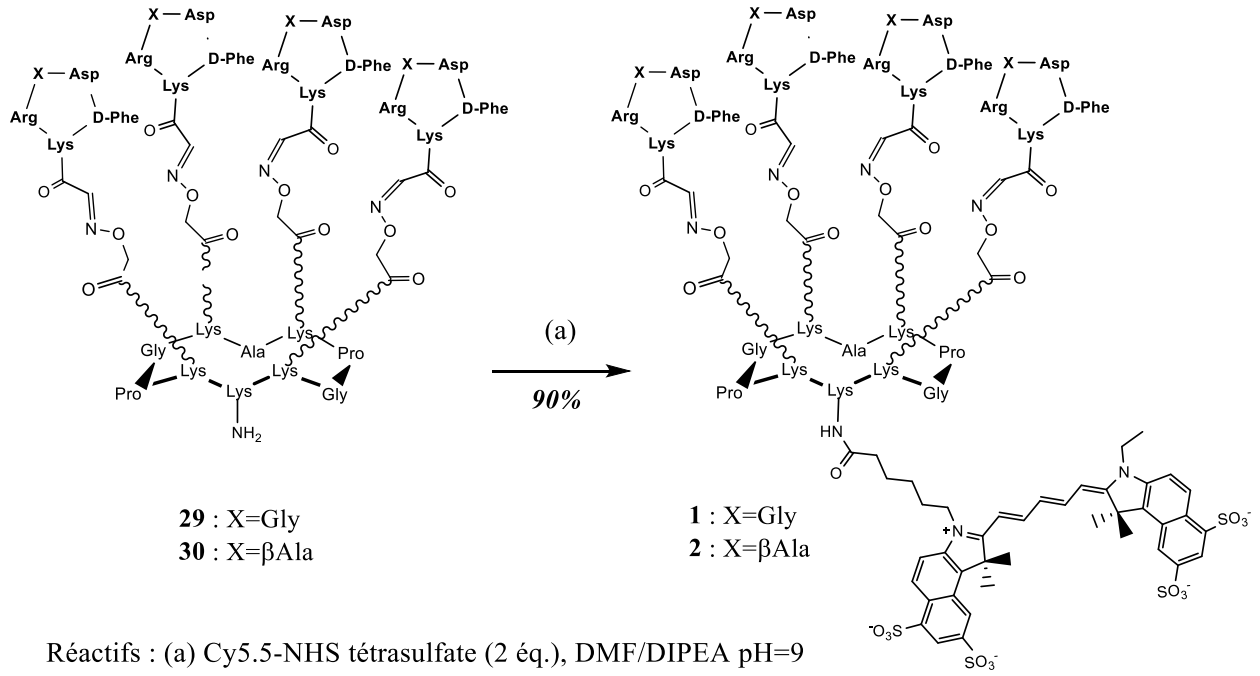


Figure 79 - Schéma de synthèse du RAFT(4-c[RXDfK])Cy5.5

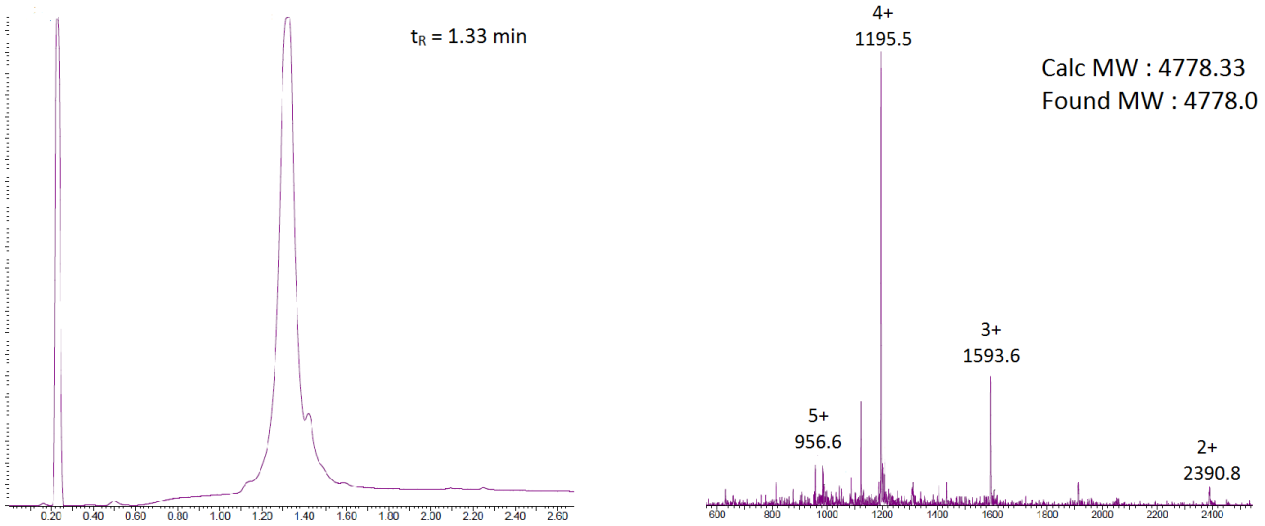


Figure 80 - Chromatogramme et spectre ESI du RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5 **1**

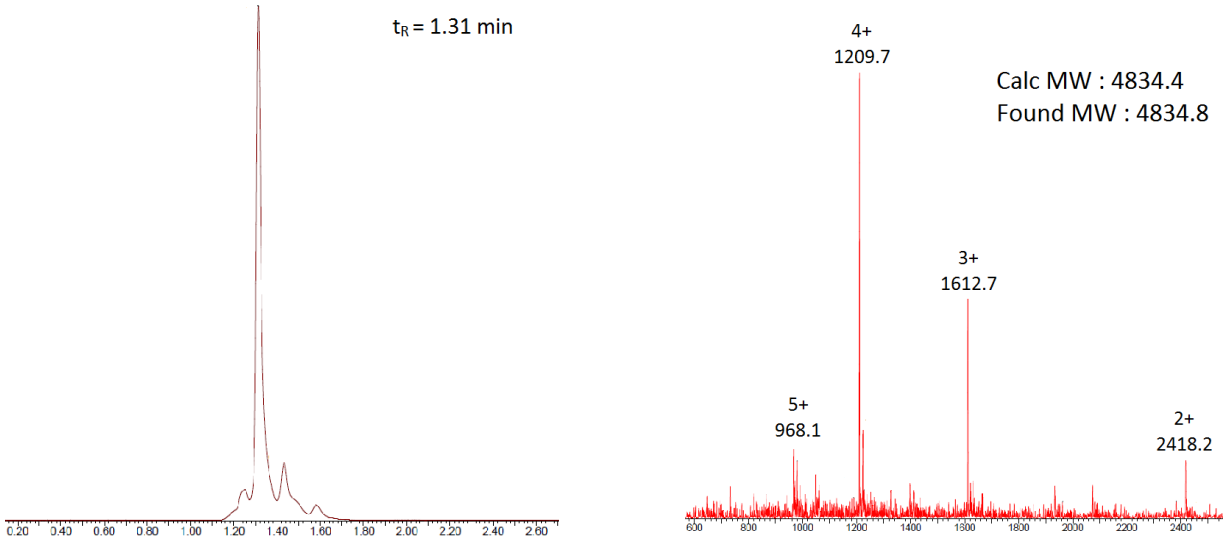


Figure 81 - Chromatogramme et spectre ESI du RAFT(4-c[RβADfK])Cy5.5 **2**

D. Synthèse des vecteurs peptiques ciblant la Neuropiline-1

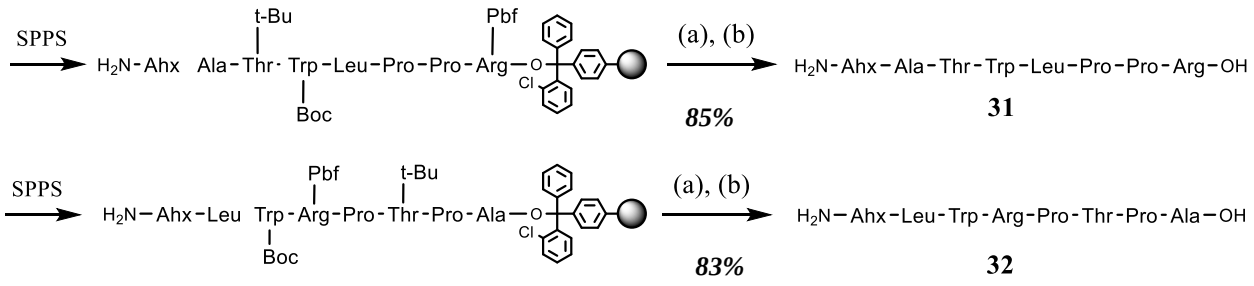
Pour cibler la Neuropiline-1, nous avons décidé d'exploiter le peptide ATWLPPR. Ce dernier n'est pas un ligand agoniste de la Neuropiline-1, mais un inhibiteur de l'interaction entre VEGF-A_{165} et NRP1. Gérard Y. Péret *et coll.* ont néanmoins confirmé que le peptide formait effectivement un complexe avec le récepteur NRP1.[94] Ce dernier peut donc être utilisé en tant que motif de ciblage. De plus, il présente l'avantage d'avoir un peptide contrôle (LWRPTPA) présenté par Péret et son équipe comme n'ayant aucun effet d'inhibition du binding de VEGF-A_{165}. Nous pouvions donc utiliser le même contrôle négatif pour nos tests.

Ces peptides ATWLPPR et LWRPTPA ont été simplement reliés à un fluorophore Cyanine 5-5 *via* un linker acide amino hexanoïque pour former les composés **3** et **4**.

Pour étudier l'influence d'une présentation multivalente du ligand ATWLPPR, nous avons une fois de plus exploité les avantages du châssis cyclodécapeptidique RAFT. Comme pour les composés multivalents ciblant l'intégrine, nous avons opté pour la ligation oxyme en exploitant un châssis avec quatre fonctions oxyamine et en ajoutant une fonction sérine en position *N*-terminale du peptide ATWLPPR, pour obtenir une fonction aldéhyde glyoxylique après oxydation. Les synthèses sont détaillées ci-dessous.

i. *Synthèse des ligands Ahx-ATWLPPR et Ahx-LWRPTPA*

Les ligands Ahx-ATWLPPR et Ahx-LWRPTPA ont été synthétisés par SPPS, sur une résine chlorotrytile® (fig. 82).



Réactifs : (a) 1% TFA/CH_2Cl_2 ; (b) TFA/H_2O/TIS (95/2,5/2,5)

Figure 82 – Schéma de synthèse des composés **31** *et* **32**

Après élongation, les peptides sont libérés de la résine en conditions acides douces (1% TFA) puis déprotégés en présence d'une solution concentrée de TFA. Les peptides **31** et **32** sont obtenus après une purification par chromatographie avec une très bonne pureté (fig. 83).

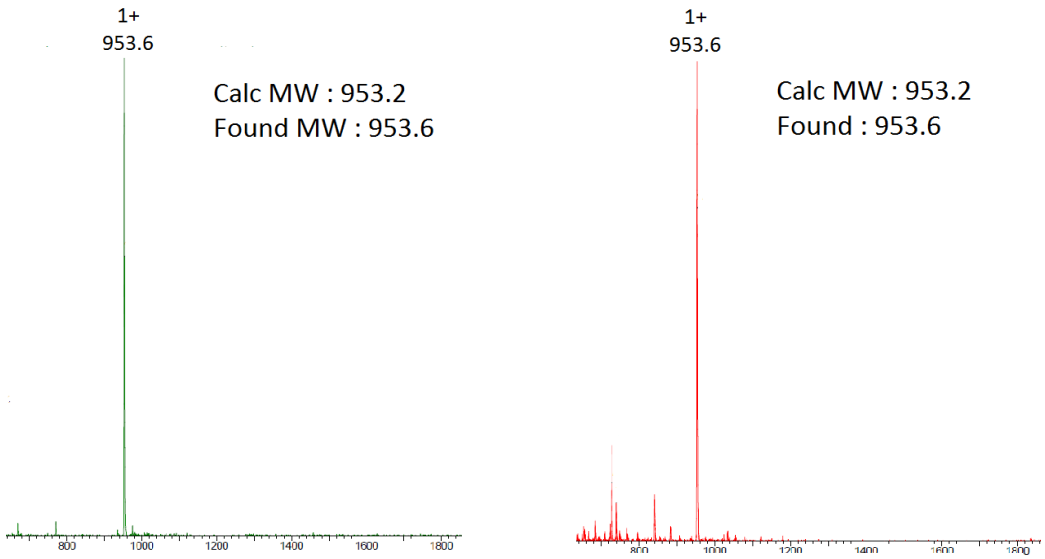
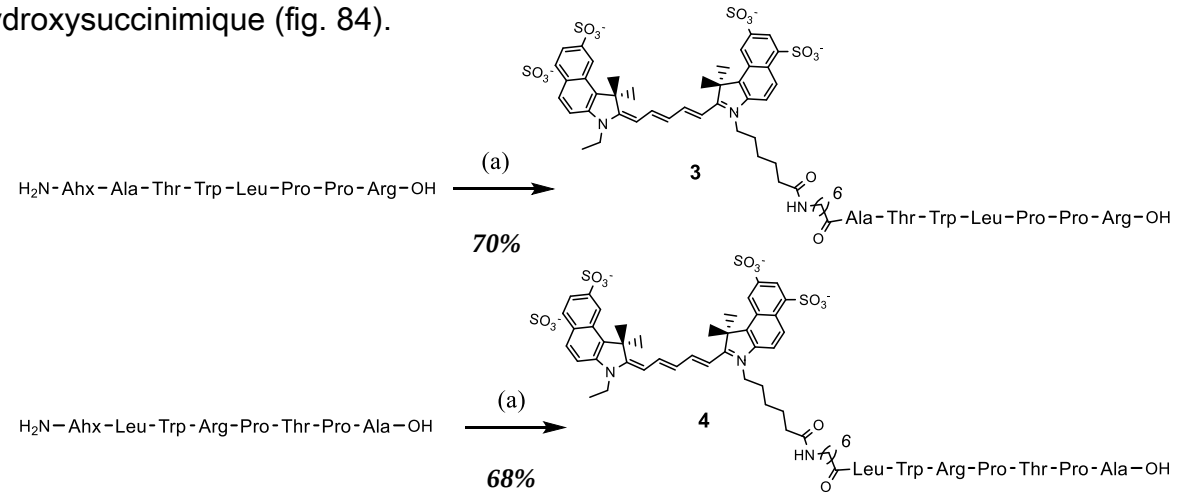


Figure 83 - Spectres ESI des composés **31** *et* **32**

ii. *Ligands Ahx-ATWLPPR et Ahx-LWRPTPA avec une Cy5.5*

Les peptides **31** et **32** décrits précédemment possèdent une fonction amine terminale libre et peuvent donc être engagés dans une réaction de couplage en milieu basique avec la cyanine 5.5 tétrasulfatée activée sous forme d'ester N-hydroxysuccinimique (fig. 84).



Réactifs : (a) (SO^{4-})Cy5.5-NHS, DMF, DIPEA, pH = 9

Figure 84 - Synthèse du ligand fluorescent ATWLPPR **3** *et son contrôle négatif* **4**

Après 1h de réaction, les produits sont purifiés pour obtenir le composé final **3** ciblant la NRP1, ainsi que son contrôle négatif, le composé **4**. Les produits sont obtenus avec des rendements d'environ 75% sur cette étape (fig. 85).

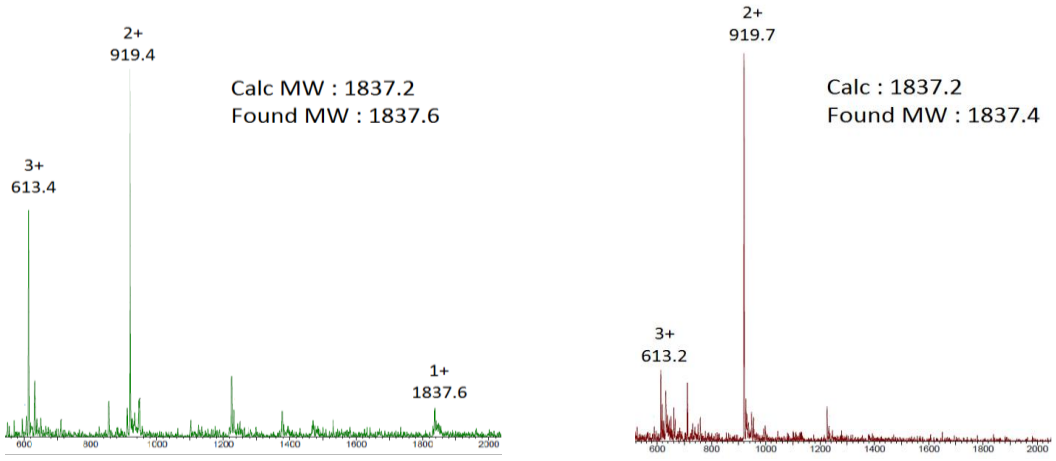
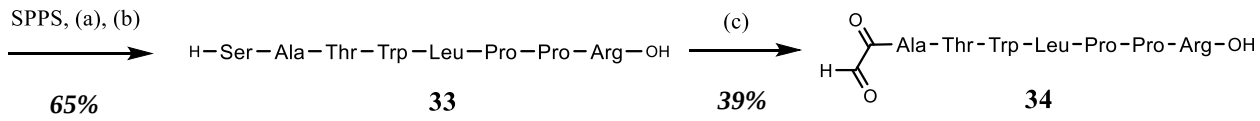


Figure 85 – Spectres ESI de Cy5.5-Ahx-ATWLPPR **3** *et Cy5.5-Ahx-LWRPTPA* **4**

iii. *Synthèse du ligand ATWLPPR présentant une fonction aldéhyde glyoxilique*

Pour fonctionnaliser le châssis moléculaire **20** (fig. 73) avec quatre ligands ATWLPPR, nous avons choisi d'utiliser la ligation oxime. Une sérine a donc été ajoutée en position *N*-terminale de la séquence ATWLPPR, dans l'optique de pouvoir l'oxyder en aldéhyde glyoxylique (fig. 86). Après avoir libéré le peptide de la résine chlorotrytile®, et déprotégé ses chaines latérales (*t-Bu*, *Boc* et *Pbf*) en milieu acide, le composé **33** est isolé par une simple purification CLHP. La fonction sérine terminale a été oxydée en aldéhyde glyoxylique par traitement au périodate pour obtenir le composé **34** qui est obtenu principalement sous forme hydratée (M = +18 g.mol^{-1}) (fig. 87).



Réactifs : (a) 1% TFA/CH_2Cl_2 ; (b) TFA/TIS/H_2O (95/2,5/2,5) (c) $NaIO_4$ (10 éq.), H_2O

Figure 86 – Schéma de synthèse du ligand ATWLPPR avec une fonction aldéhyde **34**

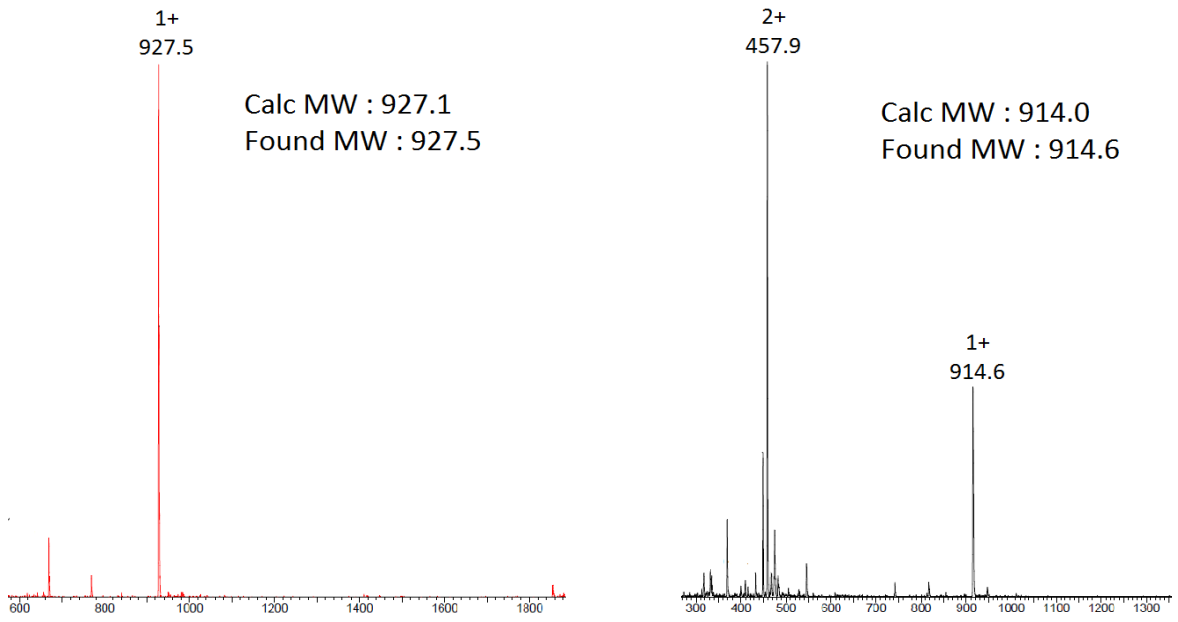
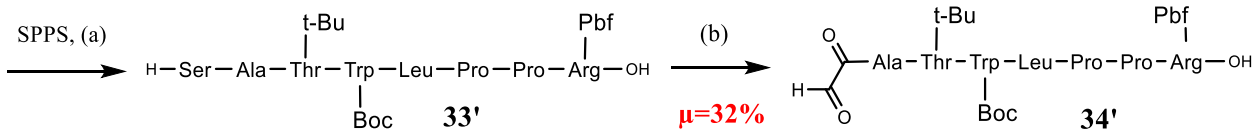


Figure 87 - Spectres ESI des composés **33** *et* **34**

Le rendement de synthèse pour l'étape d'oxydation est assez faible (~30%). Nous avons souvent des rendements très faibles lors de la purification de petits peptides polaires qui ne sont pas retenus sur des colonnes de chromatographie en phase inverse (C18). Nous avons donc envisagé de déprotéger uniquement la sérine tout en gardant les groupes protecteurs sur le peptide ATWLPPR (Fig 88). Dans ce contexte, nous avons utilisé une sérine protégée par un groupe trityle facilement éliminé dans des conditions douces (1% TFA) compatibles avec les autres groupes protecteurs (Pbf, Boc, tBu). Cette stratégie ne donnant pas de meilleurs rendements, nous avons continué nos synthèses à partir du composé **33**.

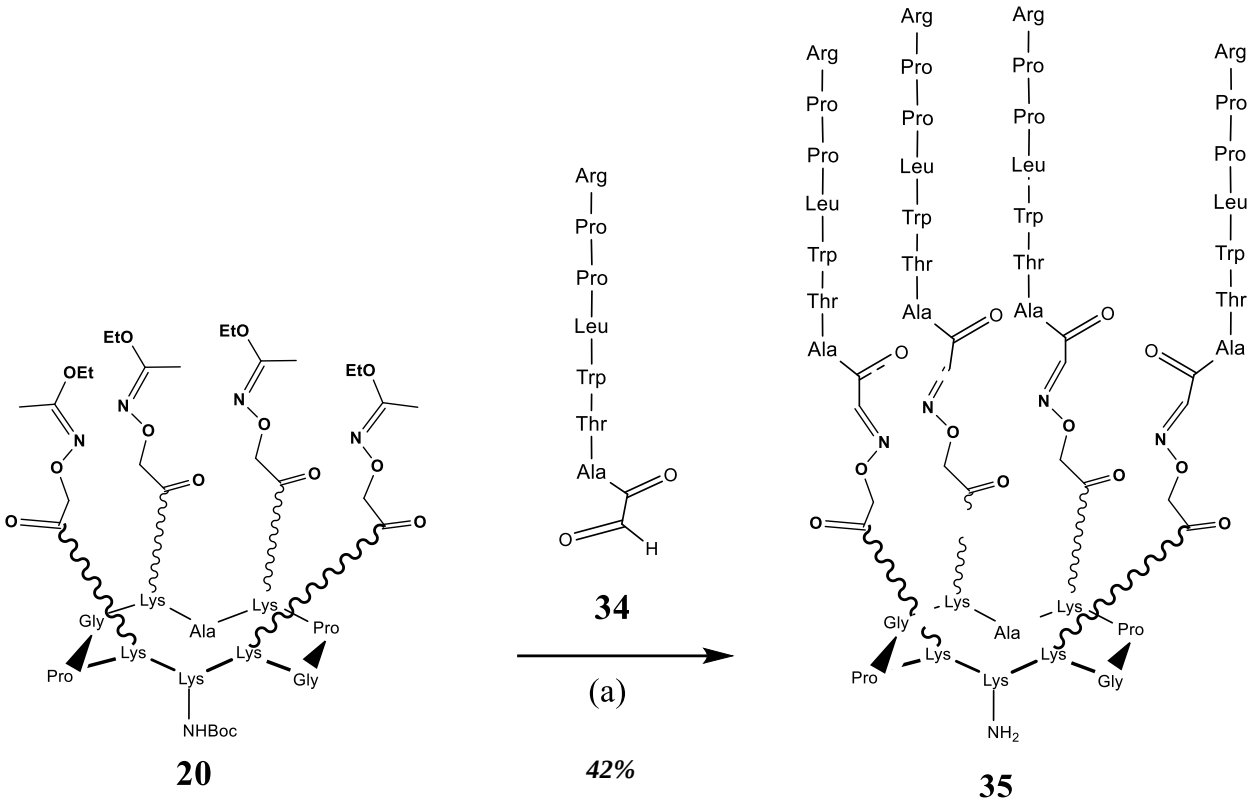


Réactifs : (a) 1% TFA/CH_2Cl_2 ; (b) $NaIO_4$ (10 éq.), H_2O

Figure 88 – Oxydation du peptide SATWLPPR partiellement protégé **33'**

iv. *Synthèse du châssis RAFT(4-ATWLLPR)NH₂ par ligation oxime*

Une fois les composés **20** et **34** en main, nous avons pu réaliser la réaction de ligation oxime. Les deux composés sont mis en présence d'une solution aqueuse contenant du TFA (fig. 89)



Réactifs : (a) 6 éq. CHO-CO-ATWLPPR **34** ; TFA/H_2O (7/3)

Figure 89 – Schéma de synthèse du composé **35** *RAFT(4-ATWLPPR)-NH_2*

Ces conditions de réaction permettent de déprotéger les fonctions oxyamines, de catalyser la ligation oxime, et de déprotéger la fonction amine, tout en garantissant sa protonation et son absence de réaction avec les fonctions aldéhyde. Après 1h de réaction, le produit désiré **35** est purifié par chromatographie CLHP et obtenu pur avec un rendement de 42% (fig. 90)

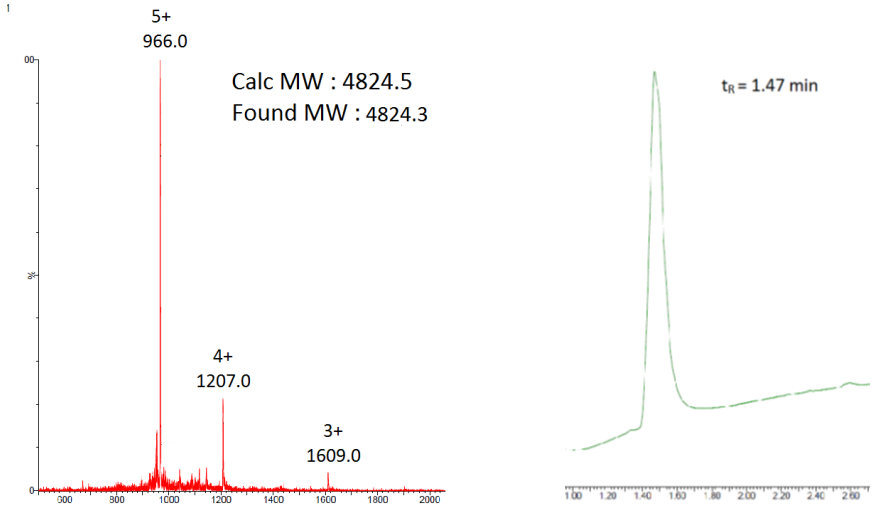
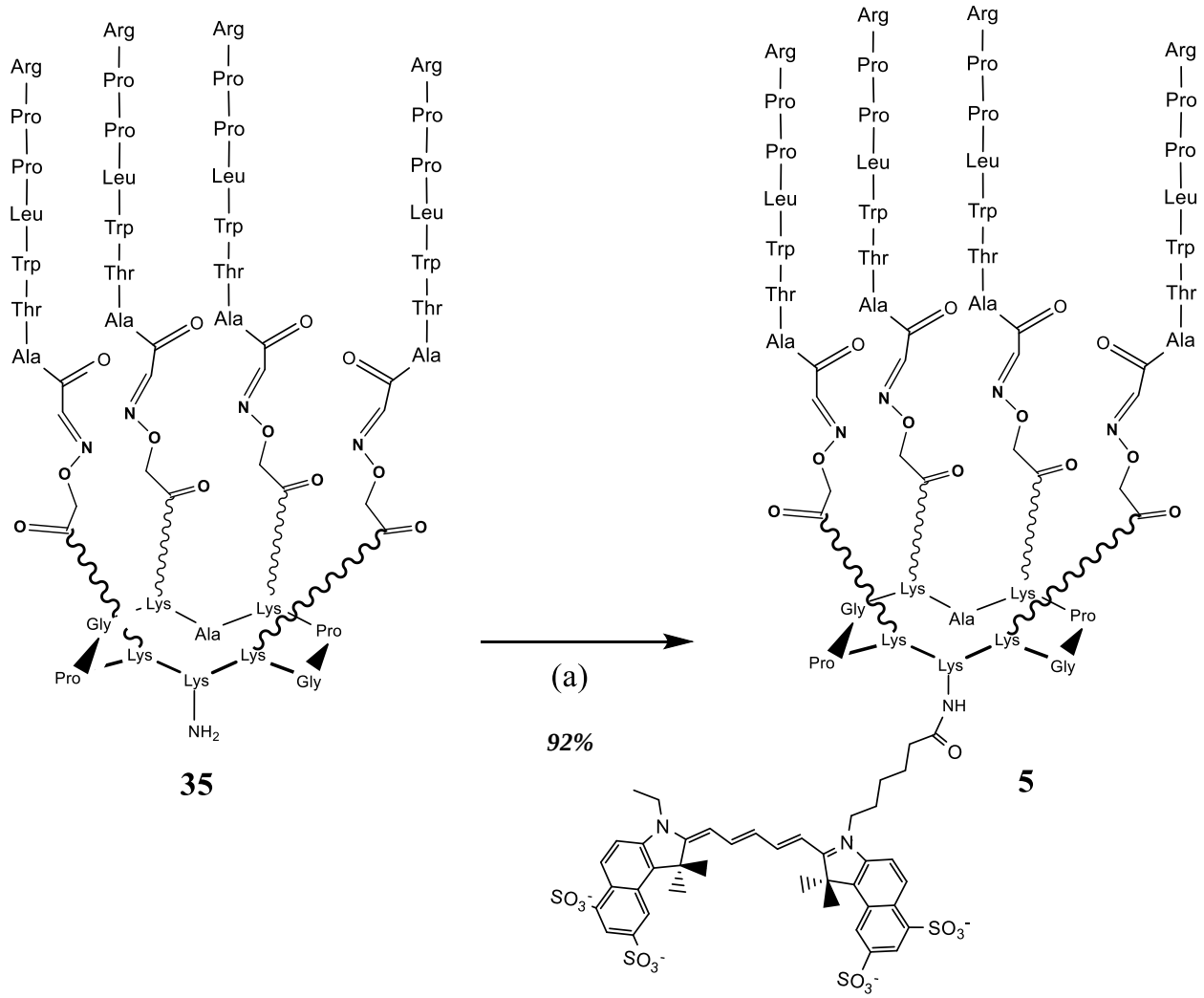


Figure 90 - Spectre ESI et chromatogramme du composé **35**

v. *Synthèse du composé final RAFT(4-ATWLLPR)Cy5.5*

Le composé final **5** a été obtenu par acylation de la fonction amine du composé **35** par l'ester activé du fluorophore Cyanine 5.5 (fig. 91).



Réactifs : (a) Cy5.5-NHS, DIPEA, DMF

Figure 91 – Schéma de synthèse du composé **5** *RAFT(4-ATWLPPR)-Cy5.5*

Après 1h de réaction, le composé a été purifié par chromatographie liquide et a permis d'obtenir le composé final **5** avec un rendement de 40% dû à des lots de fluorophore de mauvaise qualité. La molécule RAFT(4-ATWPPR)Cy5.5 a malgré tout été obtenue avec une pureté très satisfaisante (fig.92) et a pu être utilisée *in vitro* pour étudier l'intérêt de la présentation multivalence de ATWLPPR vis-à-vis de NRP1.

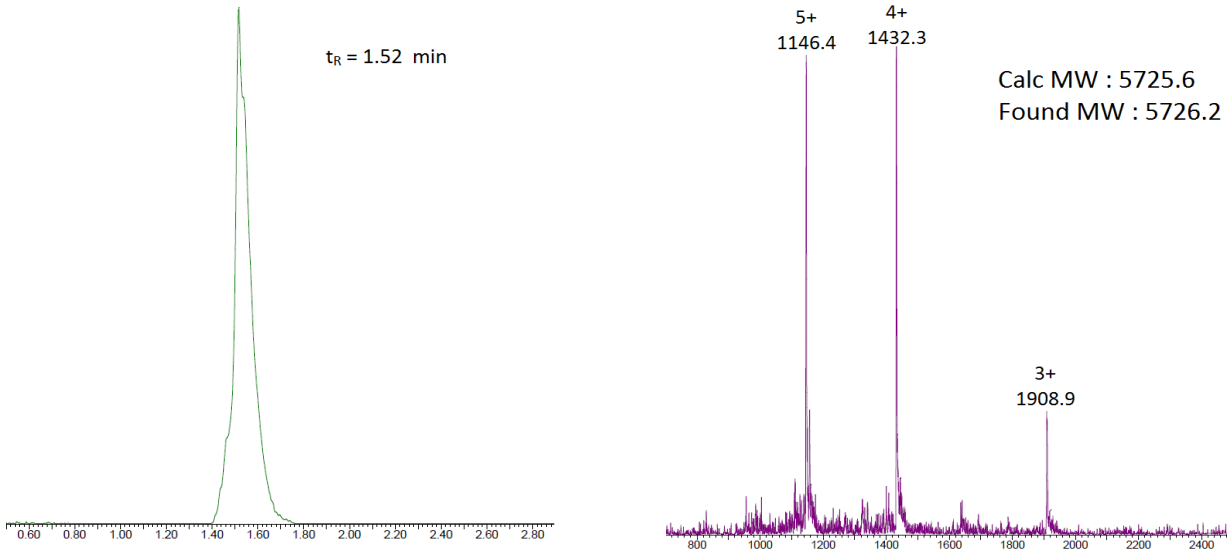


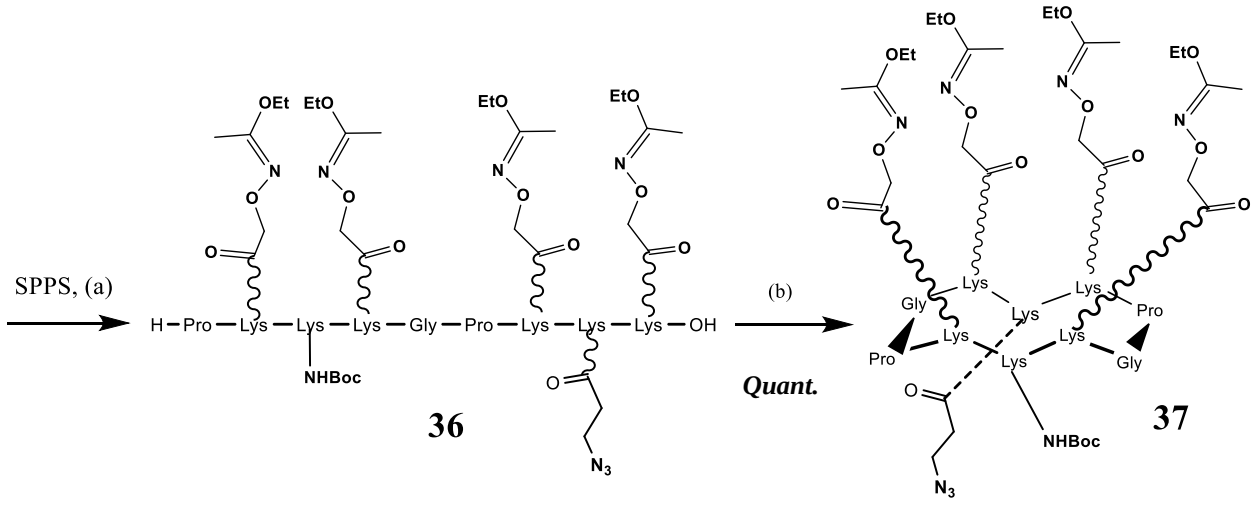
Figure 92 - Chromatogramme et spectre ESI du composé RAFT(4-ATWLPPR)-Cy5.5 **5**

E. Synthèse de composés pour le double ciblage simultané des récepteur Intégrine $\alpha_v\beta_3$ et Neuropiline-1

Pour préparer des composés comportant deux éléments de ciblage, nous avons utilisé un composé présentant 4 ligands RGD et conjugué le ligand ATWLPPR sous une forme monovalente ou tétravalente. Pour greffer les différents ligands, nous avons exploité la ligation CuAAC compatible avec les liens oxime. Pour construire nos composés, les entités RGD et ATWLPPR ont été séparées par des bras espaceurs PEG_{12} ou PEG_{24}, dans le but de déterminer si l'espacement entre les ligands pouvait avoir une influence sur les réponses cellulaires. Les différentes synthèses sont détaillées ci-dessous.

i. *Synthèse d'un châssis RAFT(4-acétimidate)-NHBoc-alcyne*

Pour obtenir un châssis peptidique pouvant accueillir trois éléments différents, il était nécessaire qu'il présente trois modes de ligation possibles. Nous avons donc procédé de manière habituelle, par synthèse supportée sur résine chlorotrytile® en introduisant cette fois deux acides aminés modifiés : la Fmoc-Lys(acétimidate)-OH **12** et la Fmoc-Lys(alcyne)-OH **16** (dont les synthèses sont décrites plus haut). Après élongation, le peptide **36** est libéré de la résine en présence d'acide acétique, puis cyclisé *via* l'agent de couplage PyBOP pour obtenir le composé intermédiaire **37** possédant quatre fonctions oxyamine protégées, une fonction amine protégée et une fonction alcyne (fig. 93)



Réactif : (a) AcOH/TFE/CH_2Cl_2 (2/2/6) ; (b) PyBOP, DIPEA, DMF

Figure 93 – Schéma de synthèse du RAFT(4-acim)-NHBoc-alcyne **37**

La présence des oxyamines empêche toute purification par CLHP qui nécessite une solution contenant 0.1 % de TFA incompatible avec les groupes protecteurs 1-éthoxyéthylidène. Une simple précipitation dans l'éther nous a permis d'isoler le composé avec une pureté satisfaisante pour pouvoir l'engager dans l'étape suivante.

ii. *Synthèse d'un châssis RAFT possédant quatre ligands c[RGDfK], une fonction amine et une fonction alcyne*

Le composé **38** a été obtenu par ligation oxime entre le châssis **37** et le ligand c[RGDfK] **27** comme décrit précédemment. Dans ces conditions, le groupement Boc de l'amine du châssis est déprotégé, et la fonction alcyne est inerte (fig. 94)

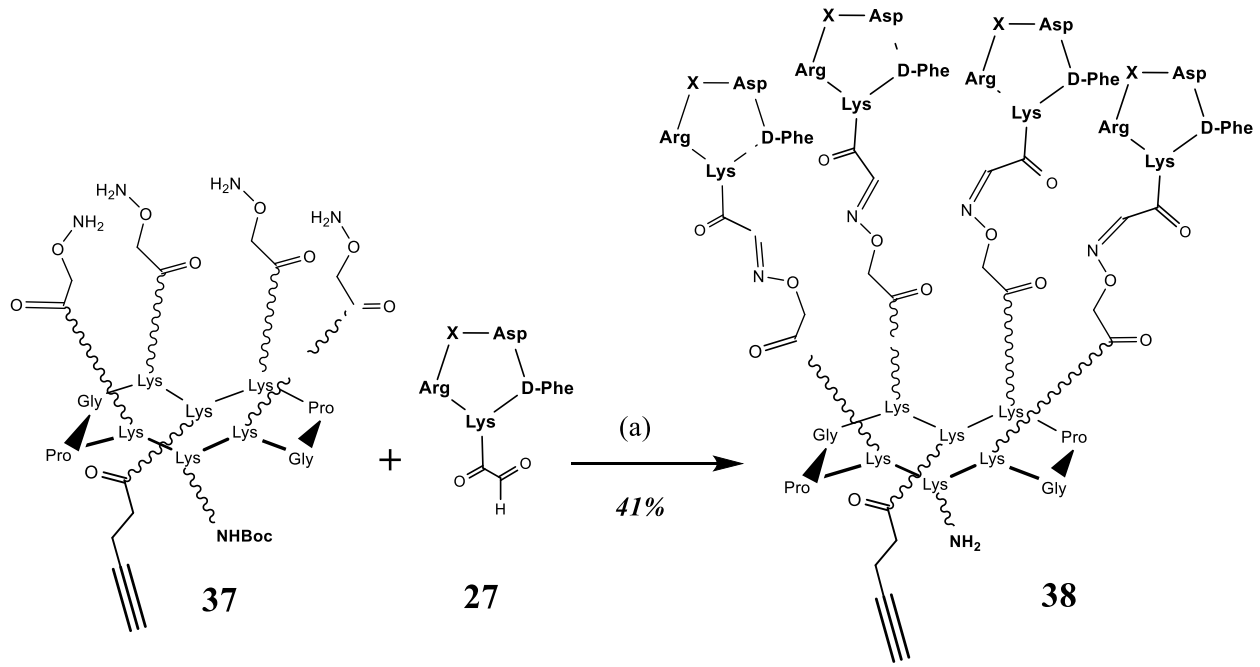


Figure 94 - Schéma de synthèse du RAFT(4RGD)-NHBoc-alcyne **38**

Le composé **38** est obtenu pur après chromatographie CLHP avec un rendement de 32% (fig. 95)

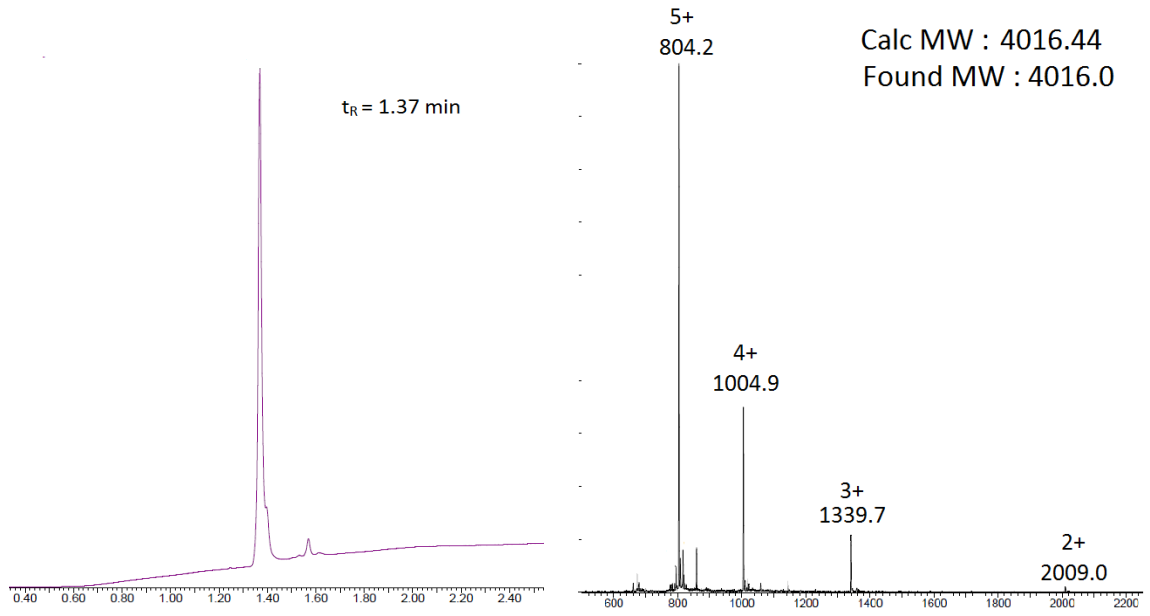
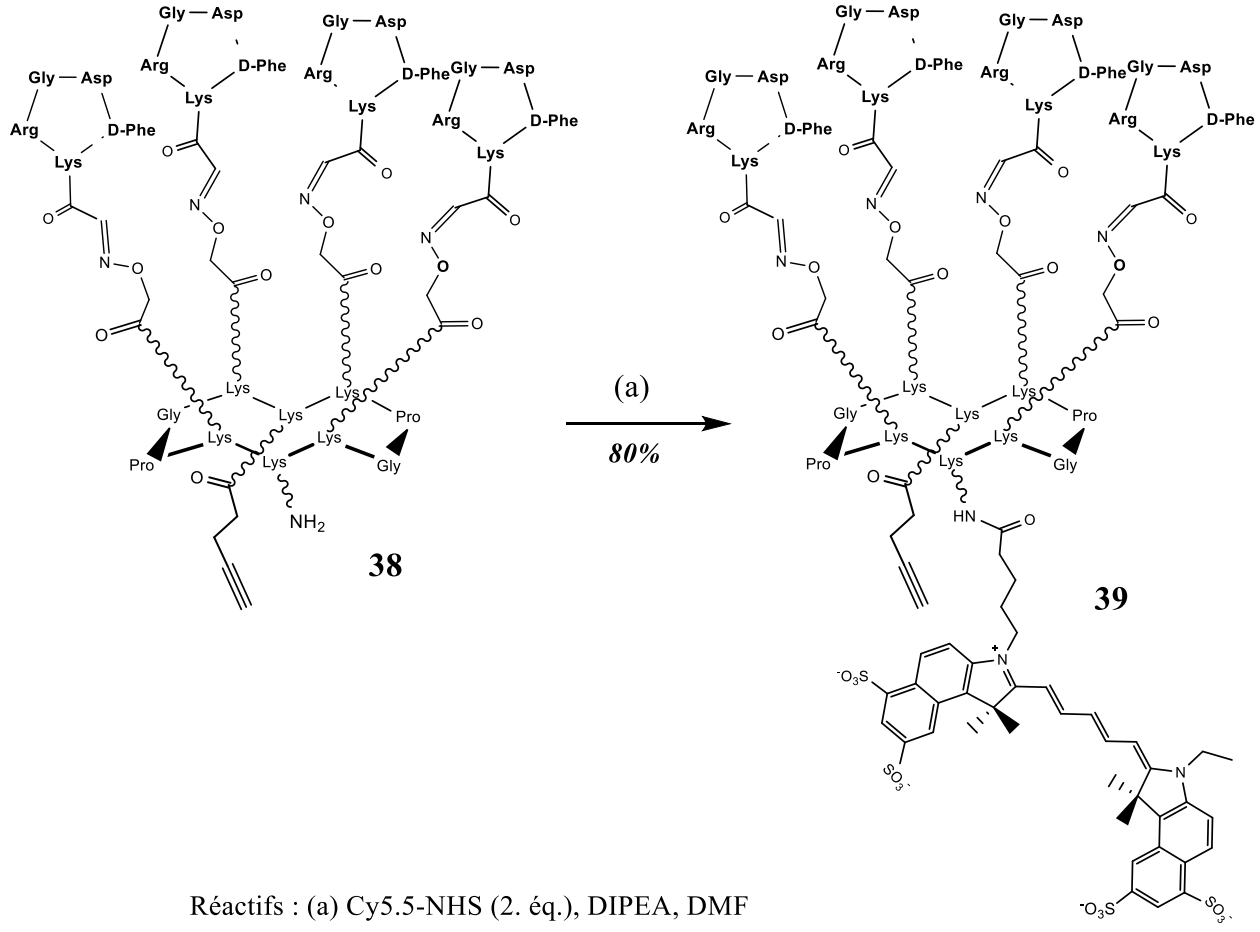


Figure 95 - Chromatogramme et spectre ESI du composé **38**

iii. *Synthèse d'un châssis RAFT possédant quatre ligands c[RGDfK], une fonction alcyne et un fluorophore Cy5.5*

Le composé **38** décrit précédemment a été mis en réaction avec l'ester activé du fluorophore Cy5.5 (fig. 96). Après une heure de réaction, le composé est purifié par chromatographie pour obtenir le composé **39** avec une très bonne pureté et un rendement de 40% (fig. 97).



Réactifs : (a) Cy5.5-NHS (2. éq.), DIPEA, DMF

Figure 96 - Schéma de synthèse du RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5-alcyne **39**

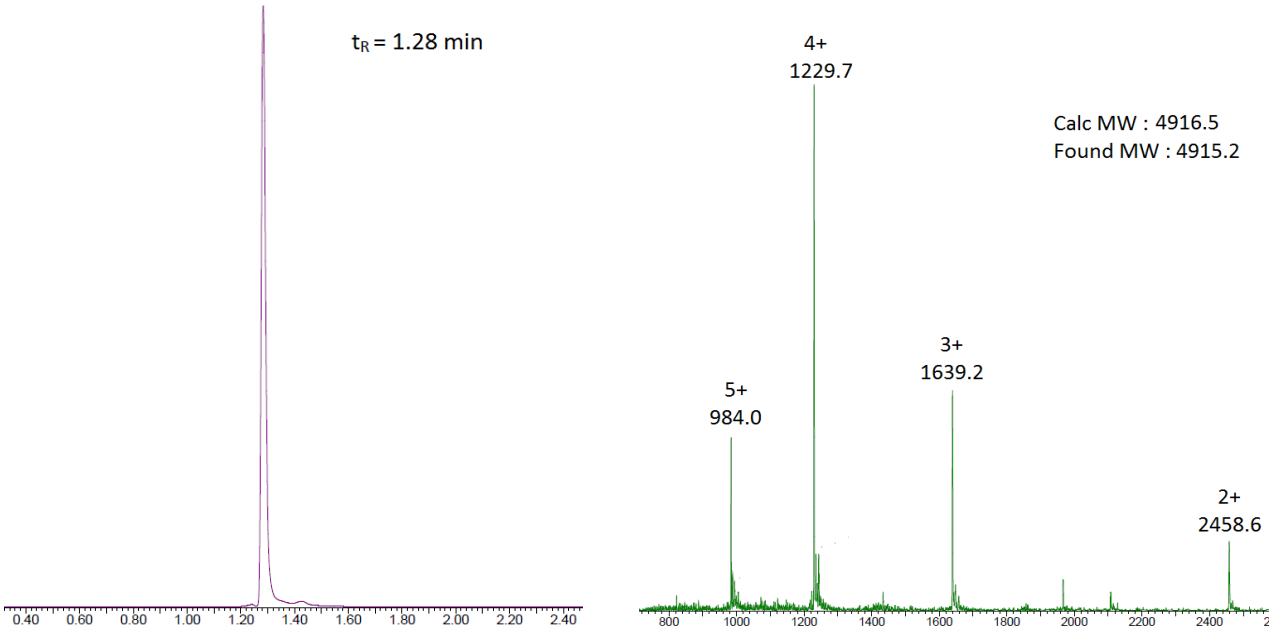


Figure 97 - Chromatogramme et spectre ESI du composé **39**

Ce composé intermédiaire clef est très important puisqu'il est commun pour la synthèse des quatre derniers produits **6**, **7**, **8** et **9.**

iv. *Synthèse du ligand ATWLPPR avec un linker PEGn-N3.*

Pour préparer les composés possédant quatre ligands c[RGDfK] et un ligand ATWLPPR séparés par un linker PEG_{12} ou $PEG_{24,}$ nous avons synthétisé des molécules ATWLPPR présentant un linker PEG_{12} ou PEG_{24} et une fonction azoture.

Dans un premier temps, nous avons tenté d'activer sous la forme d'ester N-hydroxysuccinimique des PEG commerciaux fonctionnalisés par des groupes azoture et un acide carboxylique (N3-$PEG_{12/24}$-OH) (fig. 98. A). Malheureusement, la purification de l'ester activé s'est révélée très compliquée pour deux raisons : la faible absorbance UV du composé (difficile à détecter pendant la purification) et l'hydrolyse du composé sur la colonne de purification en conditions d'élution acides (0,1% TFA).

Au vu de ces résultats, nous avons décidé de réaliser le couplage peptidique entre les PEG et le peptide ATWLPPR au cours de la SPPS lors de la dernière étape de couplage (fig. 98. B). Les composés **40** et **41** sont alors obtenus après décrochage du support solide puis déprotection totale du peptide en condition acide (95% TFA). L'utilisation de la synthèse supportée nous a permis d'éviter plusieurs étapes de lavage et de purification avec un rendement global d'environ 30% après purification (fig. 99).

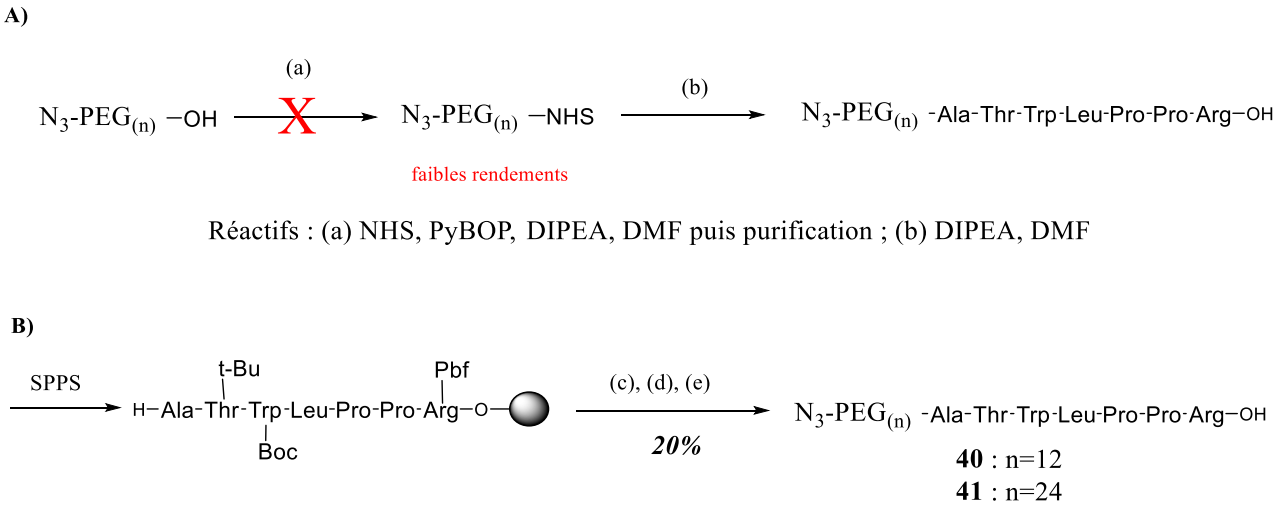


Figure 98 – Schéma de synthèse des ligands N_3-PEGn-ATWLPPR **40** *et* **41**

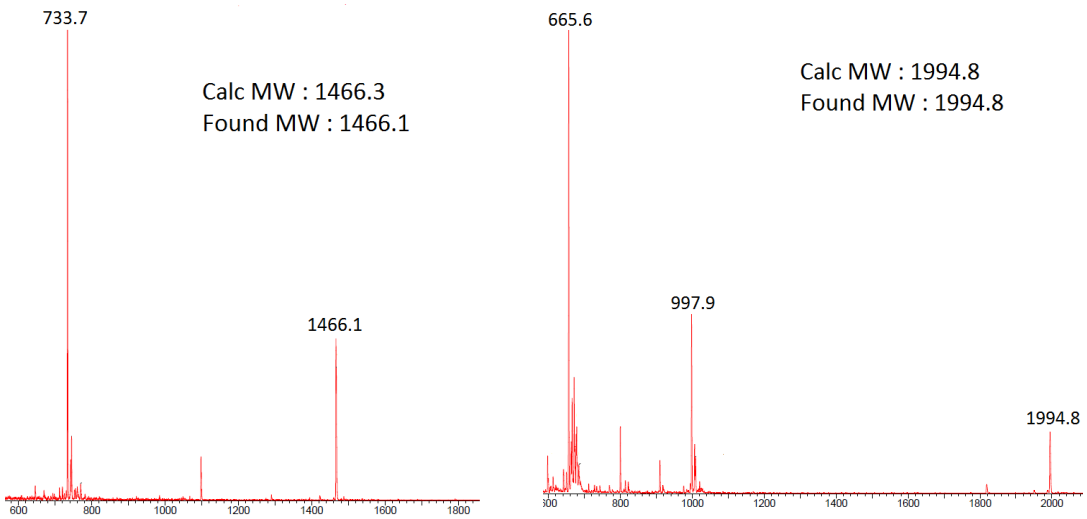
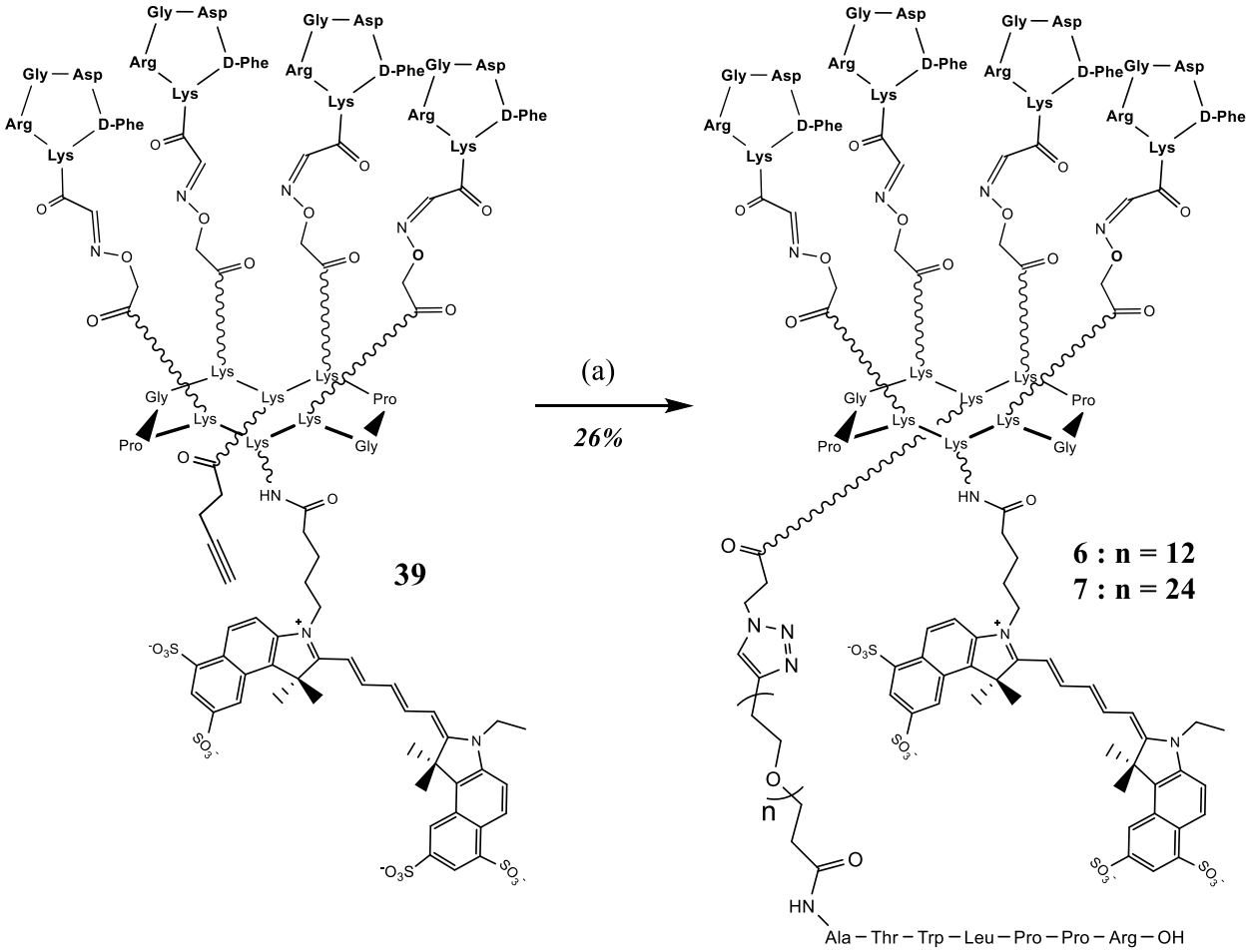


Figure 99 - Spectres ESI des composés **40** *et* **41**

v. *Synthèse des vecteurs RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEGnATWLPPR*

Les macromolécules **6** et **7** présentant deux motifs d'adressage sont obtenus par cycloaddition dipolaire 1,3 entre la fonction alcyne du composé **39** et les fonctions azoture des composés **40** et **41** respectivement (fig. 100). Pour ce faire, les différentes molécules sont mises en présence de cuivre ($CuSO_4$), d'un ligand du cuivre (THPTA) et d'ascorbate de sodium dans une solution tamponnée (pH 7.4) sous Argon. L'ascorbate de sodium permet de réduire le Cu^{II} en Cu^{I} qui est l'espèce active du cycle catalytique, tandis que le THPTA facilite la solubilisation et la stabilité du Cu^{I}.



Réactifs : (a) $CuSO_4$, THPTA, Ascorbate de sodium, N_3-PEG(n)-ATWLPPR (**42** : n=12 ; **43** : n=24)

Figure 100 - Synthèse des RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG(n)ATWLPPR **6** *et* **7**

Après réaction, les milieux réactionnels sont directement engagés en purification par chromatographie HPLC. Cette dernière étape permet d'éliminer le cuivre et les composés **6** et **7** sont obtenus purs avec des rendements respectifs de 30% et 27% (fig.101 et 102). Utiliser une résine Dowex® en amont de la purification permet d'éliminer une grande partie du cuivre.

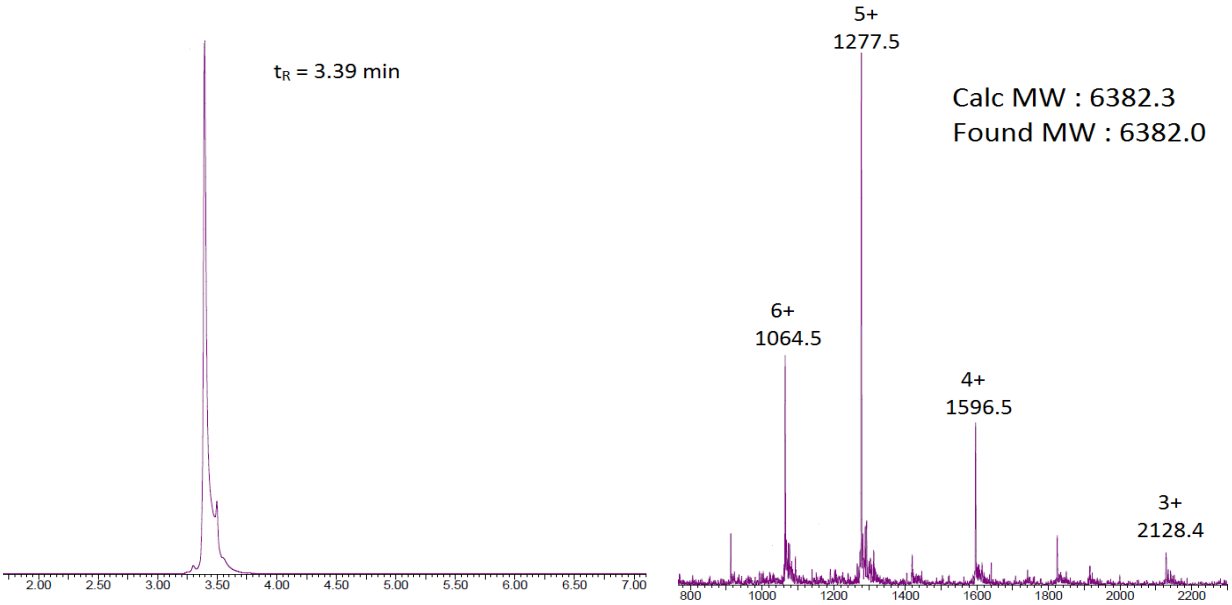


Figure 101 - Chromatogramme et spectre ESI du composé RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG$_{12}$ATW **6**

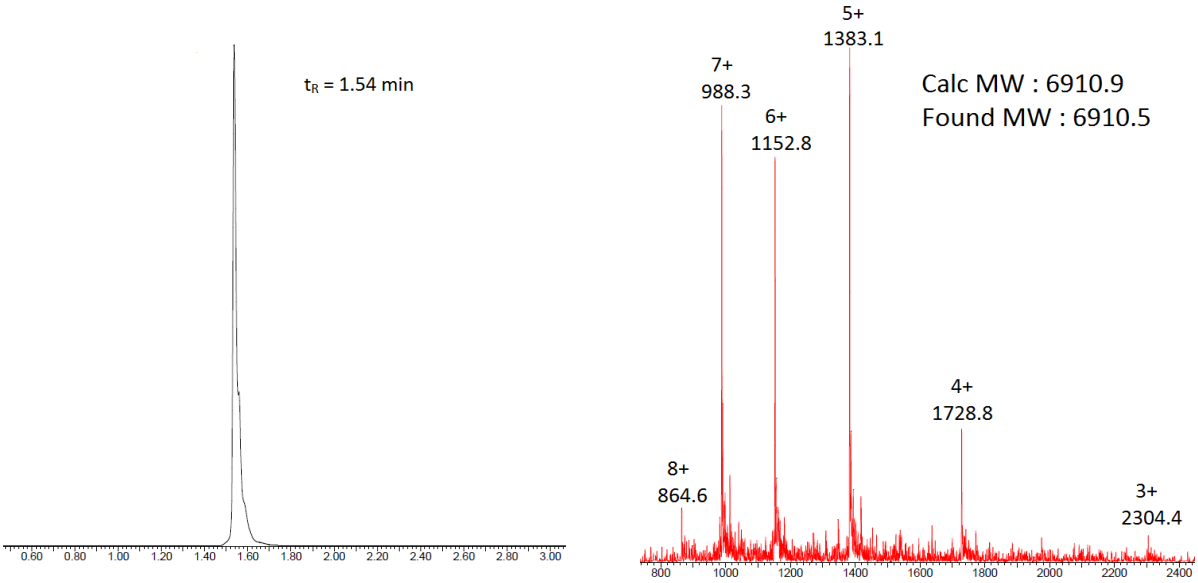


Figure 102 - Chromatogramme et spectre ESI du composé RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG$_{12}$ATW **7**

Il s'est avéré que l'addition d'ascorbate de sodium en plusieurs portions au cours de la réaction a permis d'augmenter son rendement.

Le faible rendement obtenu pour coupler le ligand ATWLPPR par CuAAC est surprenant. En effet la ligation d'un ligand c[RGDfK] présentant une fonction azoture est réalisée en moins de 5 min avec des taux de conversion supérieurs à 99% (fig. 103).

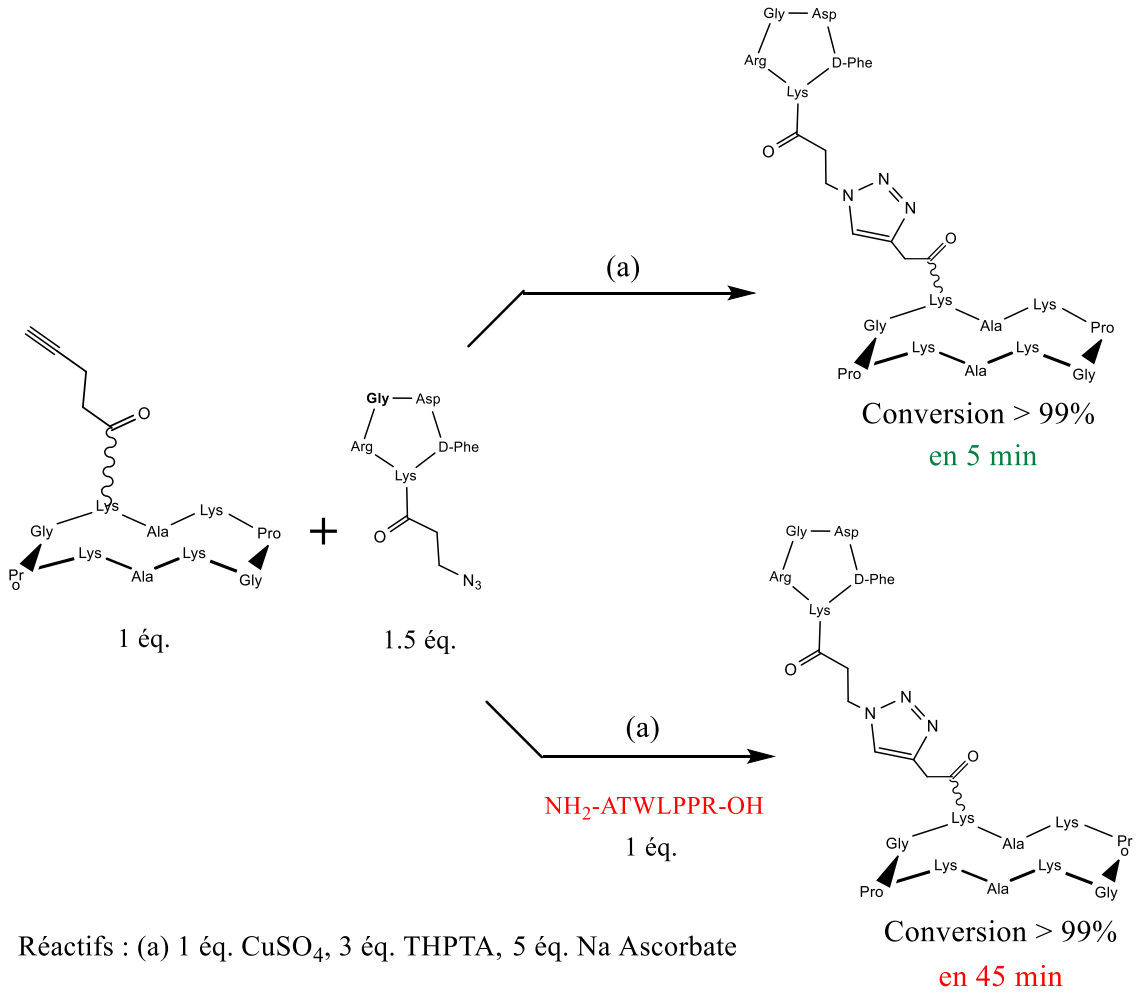
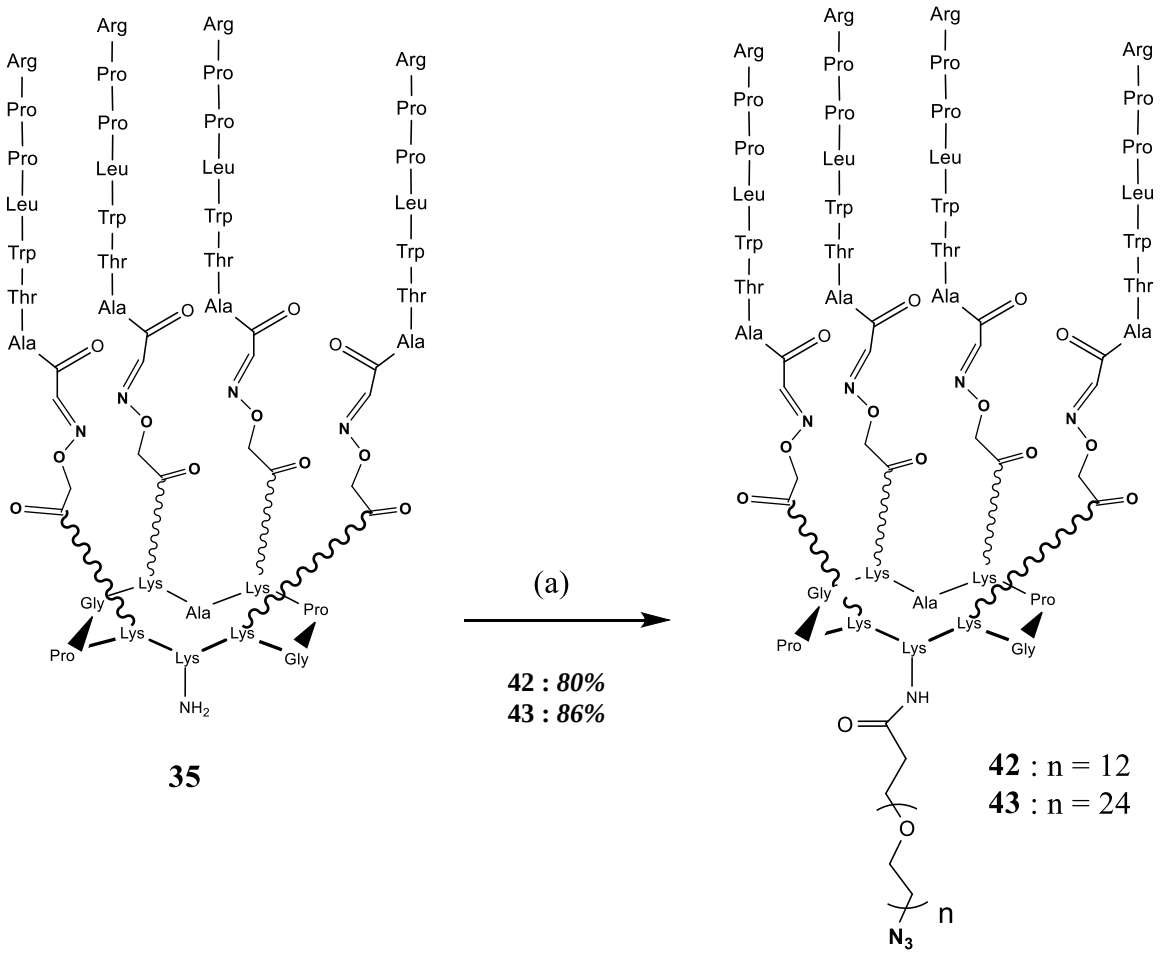


Figure 103 – Schéma de réaction « click » en présence ou absence de peptide NH_2-ATWLPPR-OH

Pour prouver que les mauvais rendements de réaction étaient dus à la séquence peptidique ATWLPPR, nous avons utilisé exactement les mêmes conditions pour coupler le ligand RGD mais en ajoutant 1 éq. de peptide H-ATWLPPR-OH. Ce dernier ne comportait aucune fonction alcyne ou azoture qui auraient pu intervenir dans la réaction de cycloaddition. Pourtant, dans ce contexte, le temps nécessaire pour obtenir une réaction complète entre le c[RGDfK]-N_3 et le RAFT est passé de 5min à 45min. Cette expérience tend à prouver que la séquence ATWLPPR perturbe la réaction CuAAC.
Nous n'avons pas déterminé quelle en était la cause réelle. Il est possible que l'arginine terminale réagisse avec l'ascorbate pour former un adduit « Arginine-déhydroascorbate » comme décrit par Conibear *et Al.*.[274] Néanmoins, aucune masse correspondant à ce type de composé n'a été observée par spectrométrie de masse. De plus, le ligand c[RGDfK]-N_3 possède lui aussi une Arginine et donne pourtant lieu à de très bons rendements de cycloaddition. Il semble donc que le cuivre ne soit pas impliqué dans des réactions parasites d'oxydation du peptide ATWLPPR. Une hypothèse plausible est celle de la complexation du cuivre par ATWLPPR, qui altèrerait sa disponibilité pour la réaction de cycloaddition.

vi. *Synthèse du châssis RAFT(4-ATWLPPR)-PEG(n)N3*

Les macromolécules **8** et **9** sont composées de deux châssis présentant 4 ligands c[RGDfK) et 4 ligands ATWLPPR. Nous avons donc synthétisé dans un premier temps les molécules **42** et **43** qui correspondent au châssis portant 4 ligands ATWLPPR ainsi qu'un bras espaceur N_3-PEG_{12} ou N_3-PEG_{24} (fig. 104).



Réactifs : (a) N_3-PEGn-NHS **40** et **41**, DIPEA, DMF

Figure 104 - Schéma de synthèse des RAFT(4-ATWLPPR)-PEG(n)N_3 **42** et **43**.

Pour ce faire, le composé **35** est acylé par un ester activé N_3-PEG_{12}-NHS ou N_3-PEG_{24}-NHS. Les composés **42** et **43** correspondants sont obtenus purs après purification par HPLC avec des rendements voisins de 90% (fig. 105 et 106).

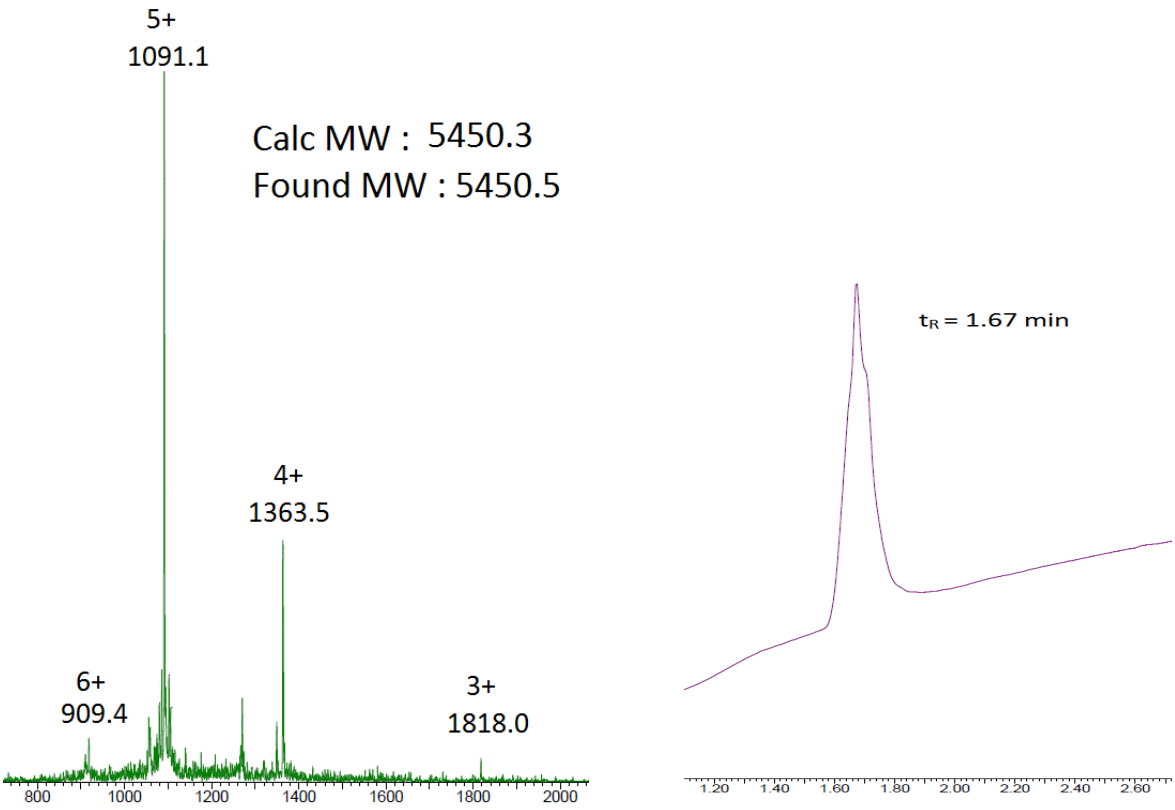


Figure 105 - Spectre ESI et chromatogramme du composé **42**

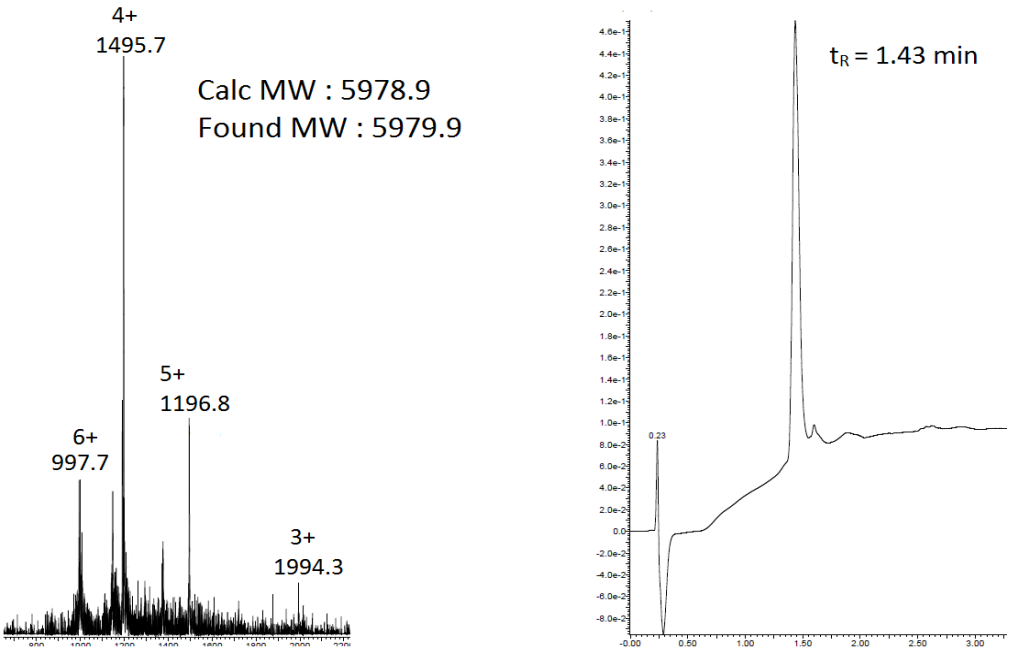
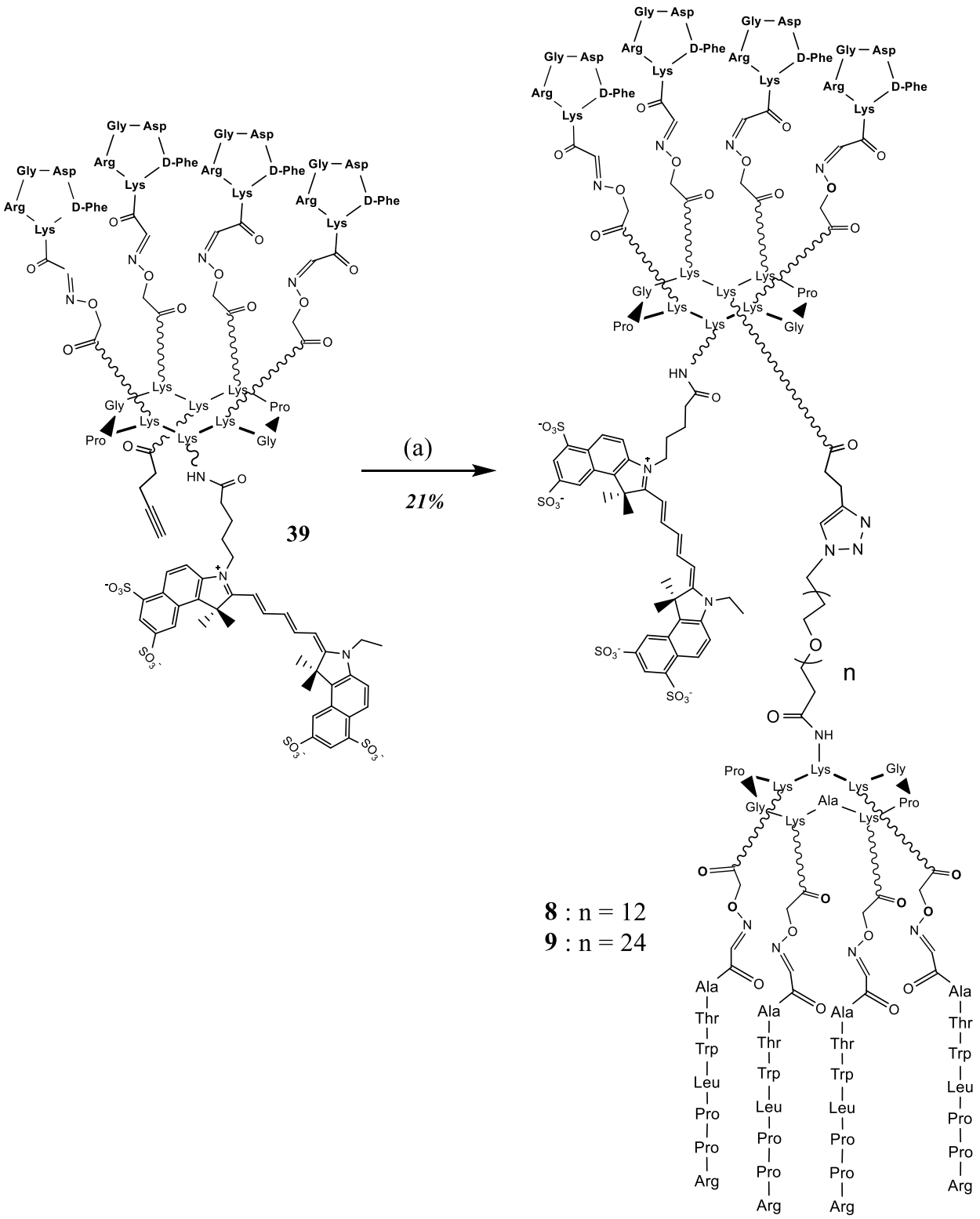


Figure 106 - Spectre ESI et chromatogramme du composé **43**

vii. *Synthèse finale des RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEGn-RAFT(4-ATWLPPR)*

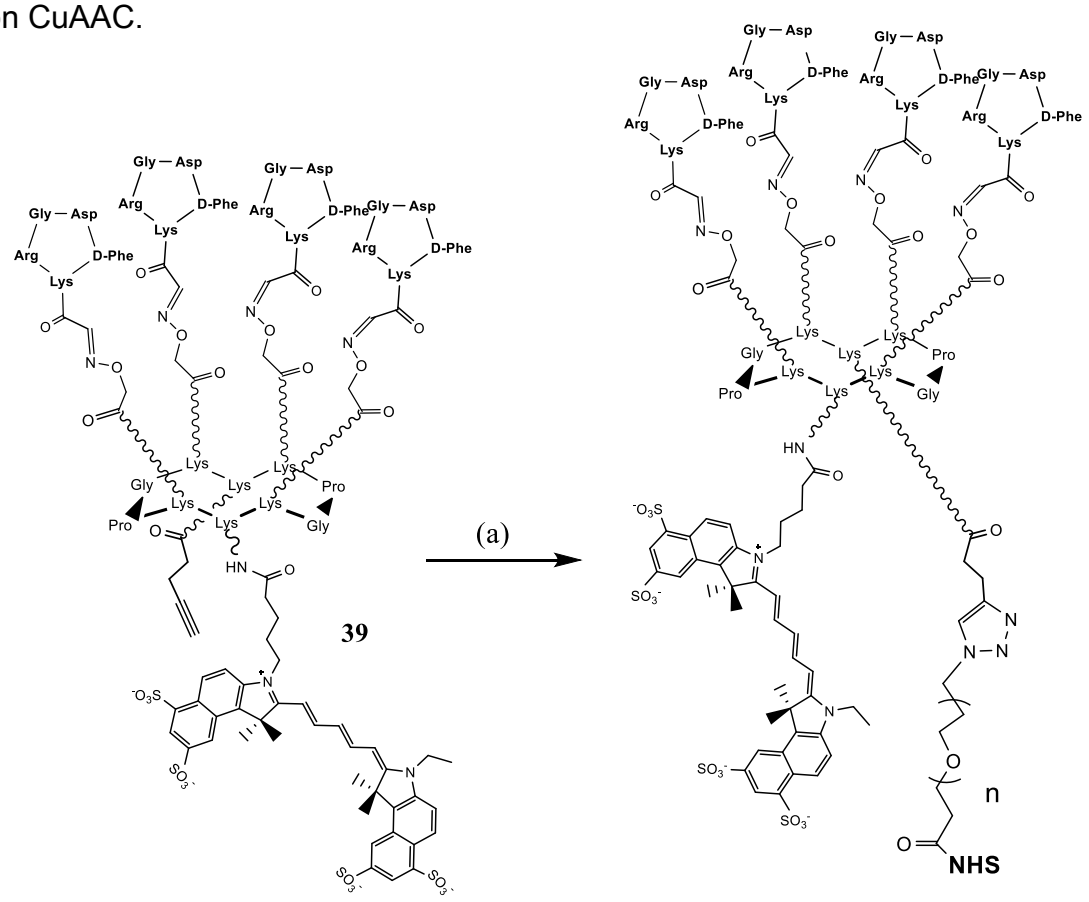
Les molécules **8** et **9** représentent un challenge synthétique. Leur synthèse consiste à réaliser une ligation entre la fonction alcyne du RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-alcyne **39** et la fonction azoture du RAFT(4-ATWLPPR)-PEG_{12}-N_3 **42** ou du RAFT(4-ATWLPPR)-PEG_{24}-N_3 **43** *via* la réaction CuAAC (fig. 107). La synthèse a d'abord été réalisée dans des conditions classiques de cycloaddition de Huisgen (1 éq. $CuSO_4$, 3 éq. THPTA, 5 éq. d'ascorbate de sodium, à 37°C et atmosphère inerte). Malheureusement, même après plusieurs heures de réaction, seuls les produits de départ et un mélange de produits non identifiés ont été observés en analyse de masse, et ce malgré plusieurs tentatives.



Réactifs : (a) Raft(4-ATWLLPR)-PEG(n)N_3, $CuSO_4$, THPTA, Na Ascorbate

Figure 107 - Schéma de synthèse des RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG(n)RAFT(4-ATWLLPR) **8** *et* **9**

Nous avons vu précédemment que la cycloaddition CuAAC pouvait être perturbée par la séquence ATWLPPR. Nous pouvons donc supposer que ces peptides rattachés au châssis pouvaient aussi être un frein à la CuAAC. Aussi, l'encombrement stérique des molécules peut s'avérer néfaste au bon déroulement de la réaction. En effet, la ligation de Huisgen s'est avérée possible en couplant des fragments plus simples. Par exemple, la cycloaddition entre le RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5-alcyne **39** et un linker commercial N_3-PEG_{12}-NHS est très rapide (fig. 108). Ce résultat semble indiquer que l'encombrement stérique du RAFT(4-ATWLPPR) ou la séquence ATWLPPR est défavorable pour la réaction CuAAC.



Réactifs : (a) NHS-PEG(n)N_3, $CuSO_4$, THPTA, Na Ascorbate

Figure 108 - Synthèses des RAFT **8'** *et* **9'** *qui prouvent que le RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-alcyne* **39** *est compatible avec la réaction de cycloaddition*

La cycloaddition entre le RAFT(4-ATWLPPR)-PEG$_{12}$-N$_3$ **42** et le RAFT(4-[RGDfK])-NH$_2$-alcyne **38** qui ne porte pas de fluorophore a aussi été possible (fig. 109). Ce qui incrimine cette fois l'encombrement stérique dû au fluorophore. Ce dernier n'a d'ailleurs pas pu être additionné sur l'amine du composé RAFT(4-c[RGDfK])-NH$_2$-PEG$_{12}$-RAFT(4-ATWLLPR) **8''** obtenu (fig. 109).

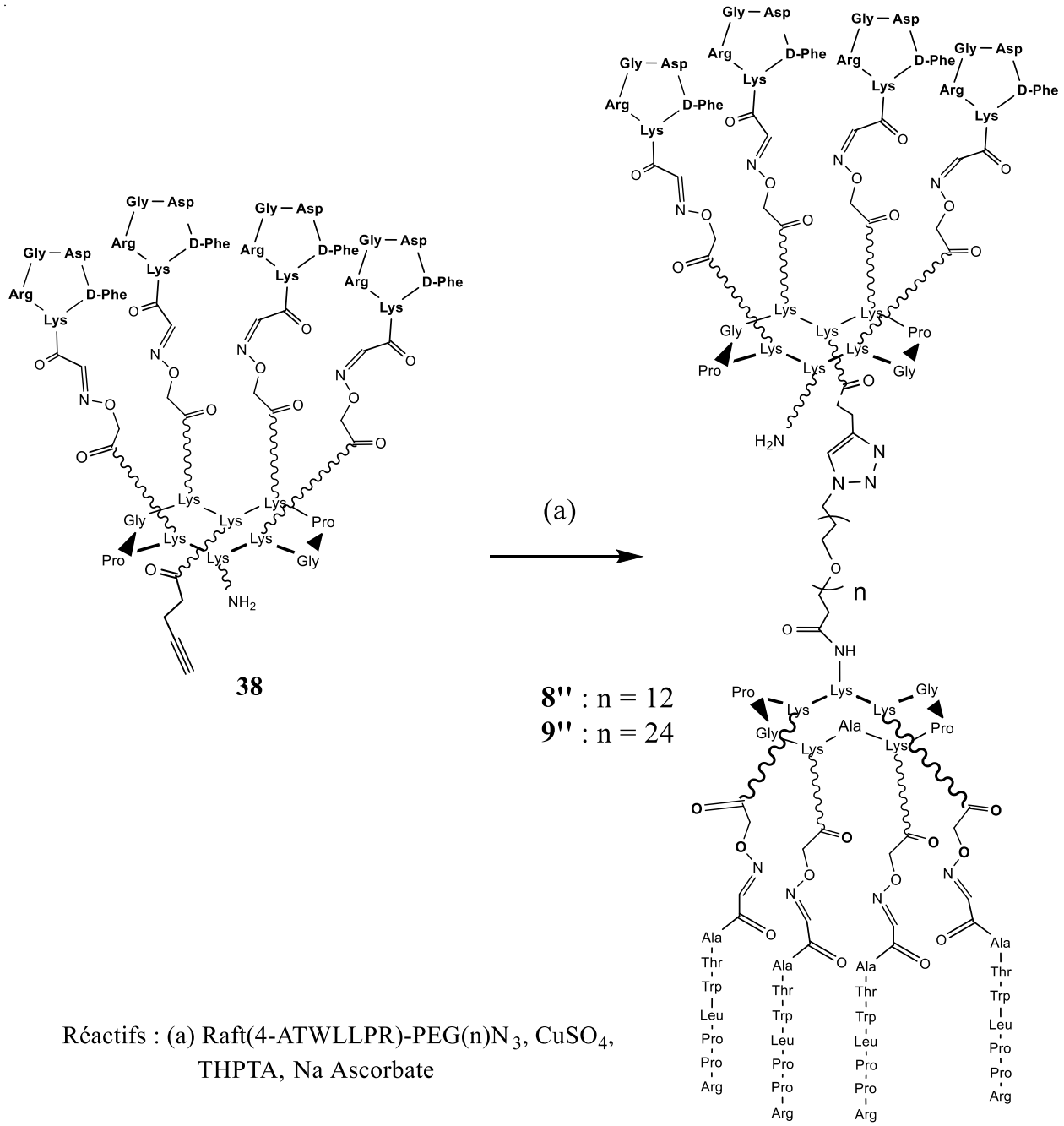


Figure 109 - Synthèses des RAFT **8''** *et* **9''** *qui prouvent que le RAFT(4-ATWLPPR)-PEG(n)N$_3$ peut être impliqué dans une cycloaddition avec le RAFT(4-c[RGDfK])-NH$_2$-alcyne* **38**

Etant donné les difficultés pour obtenir les composés **8** et **9**, et la possibilité d'obtenir malgré tout les composés **8'**, **9'**, **8''** et **9''**, il apparait clairement qu'il y a une gêne stérique entre le fluorophore Cy5.5 porté par le châssis **39** (fig. 115) et les composés portant les ligands ATWLPPR (molécules **42** et **43**) (fig. 113) qui empêche la ligation de ces deux éléments.

Pour contourner ce problème, nous avons décidé de forcer les conditions de réaction. Nous avons notamment observé que la quantité d'ascorbate de sodium ajoutée au départ et en cours de réaction avait un réel effet sur l'avancement de la CuAAC. Le bon déroulement de la synthèse découle d'un bon équilibre entre nombre d'équivalents d'ascorbate de sodium et temps de réaction. Des ajouts successifs d'ascorbate accompagnés d'un suivi très régulier de l'avancement de la réaction entre **39** et **42** nous ont permis d'obtenir le composé **8** avec une pureté très satisfaisante après purification par chromatographie HPLC (fig.110). Le rendement était de 21% sur cette étape.

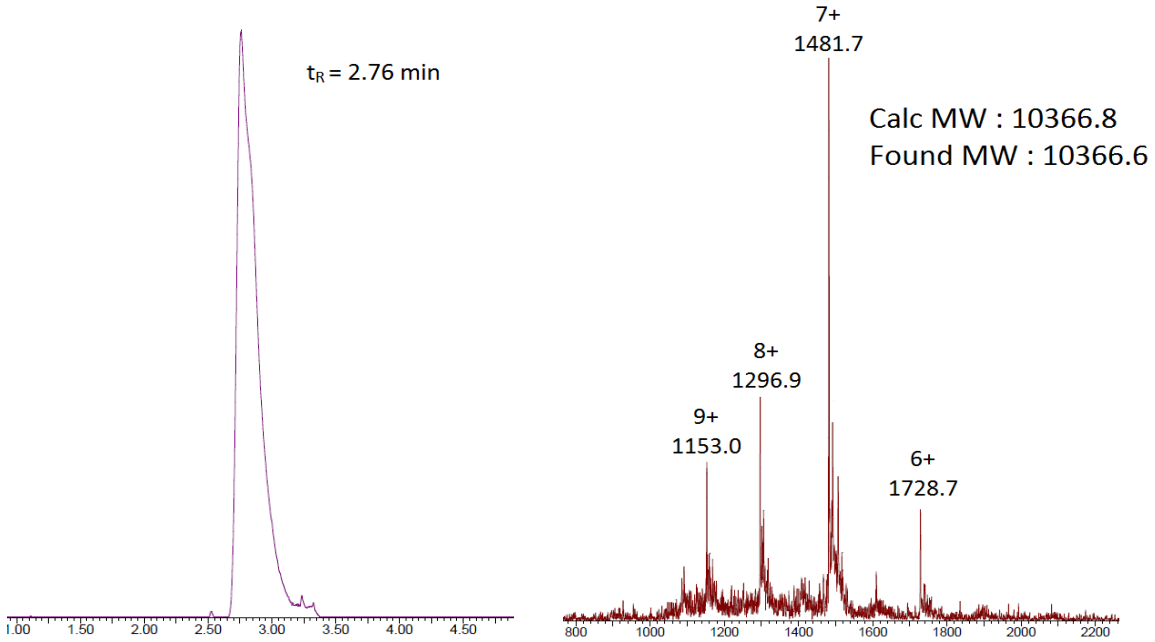


Figure 110 - Chromatogramme et spectre ESI du RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG$_{12}$RAFT(4-ATWLPPR) **8**

En revanche, les premières tentatives de synthèse du composé **9** se sont conclues par des échecs. Face aux difficultés de synthèse et au temps nécessaire pour améliorer les conditions réactionnelles, nous avons décidé de ne pas réaliser de nouveaux essais et de nous concentrer sur les tests biologiques des composés que nous avions déjà en notre possession, à savoir les composés **1** à **8**.

3. TESTS BIOLOGIQUES

A. Tests biologiques *in vitro*

Quatre lignées cellulaires ont été utilisées pour les tests *in vitro*. Elles ont été choisies en fonction de leurs expressions d'intégrine $\alpha v\beta_3$ et de Neuropiline-1. La lignée U87MG exprime les deux récepteurs de façon importante. MDA-MB-235 exprime fortement la NRP1 et exprime peu $\alpha v\beta_3$. H358 exprime NRP1 mais n'exprime pas $\alpha v\beta_3$. La lignée 3T3, elle, serre de lignée contrôle puisqu'elle n'exprime aucun des deux récepteurs (tableau 2)

Lignée	Expression	
	$\alpha v\beta_3$	Nrp-1
U87	++	+
3T3	-	-
MDA-MB-231	+	+++
H358	-	++

Tableau 2 - Taux d'epxression d'intégrine et neuropiline-1 pour différentes lignées cellulaires

i. *Cytométrie de flux*

Dans un premier temps, nous avons voulu étudier l'efficacité de marquage de nos composés fluorescents ciblant un seul récepteur (Intégrine $\alpha v\beta_3$ ou Neuropiline-1) ou les

deux à la fois. Nous avons testé différentes lignées cellulaires exprimant de manière plus ou moins importante un des deux récepteurs, les deux, ou aucun d'entre eux (Tableau 3). Nous avons donc incubé les différentes lignées (U87, 3T3, MDA-B-231, H358) avec chacune des molécules **1** à **8** ou un mélange de **1** et **3** afin de réaliser une analyse par cytométrie en flux. (La comparaison des molécules combinées **6**, **7** et **8** par rapport à la co-injection de **1** et **3** a pour but de distinguer un effet synergique d'un effet simplement additif).

Abréviation	N° molécule	cibles	
		$\alpha v\beta_3$	Nrp-1
R(4RGD)	1	+	-
ATW	3	-	+
R(4ATW)	5	-	+
R(RGD)-12-ATW	6	+	+
R(RGD)-24-ATW	7	+	+
R(RGD)-R(ATW)	8	+	+
R(RGD) + ATW	1 + 3	+	+
R(RAD)	2	-	-
scble	4	-	-

Tableau 3 - Récepteurs ciblés par les molécules (gauche) et expression des récepteurs pour différentes lignées (droite)

La cytométrie en flux est une technique qui permet d'analyser des cellules une par une afin de déterminer leur intensité de fluorescence et leur granulosité. Ainsi, plus il y a de molécules fluorescentes sur ou à l'intérieur des cellules, et plus la fluorescence résultante

de la cellule sera élevée. Cela donne donc une information **qualitative** de l'affinité d'une molécule pour une cellule. Dans notre cas, nous espérons pouvoir relier l'affinité des molécules aux ligands qu'elle possède et à l'expression des récepteurs par les cellules.

Les résultats sont présentés sous forme de graphes, avec le *nombre de cellules* (en Abscisse), possédant un *niveau défini de fluorescence* (en Ordonnée. MFI pour *Mean Fuorescence Intensity*). En amont, la granulométrie permet d'éliminer les évènements détectés qui correspondent à des débris ou des cellules mortes.

a. Présentation des résultats

Les cellules U87MG sont mises en présence des composés **1** à **8** ou **1+3** à une concentration finale en composé de 1µM ou 5µM puis analysées en cytométrie en flux.

Les expériences sont réalisées en triple pour chaque lignée cellulaire. Les conditions expérimentales sont les mêmes pour chaque expérience d'une même lignée cellulaire, ainsi que d'une lignée à une autre. Néanmoins, les contraintes techniques et l'évolution du projet ont fait que certaines molécules n'ont pas été testées à chaque fois.

Dans tous les cas, pour chaque lignée cellulaire, les graphes de fluorescence obtenus pour l'un des triplicatas sont présentés. Les valeurs MFI correspondent à *l'Intensité de fluorescence moyenne*, et Pa-MFI correspond au *pourcentage d'augmentation de fluorescence par rapport à l'auto-fluorescence des cellules contrôles*. Le Pa-MFI est également présenté sous forme de Hit-Map après les graphes (coloration relative des cases d'un tableau en fonction des valeurs qu'elles contiennent).

- **Lignée U87MG**

Témoin U87MG

R(RGD)

R(RAD)

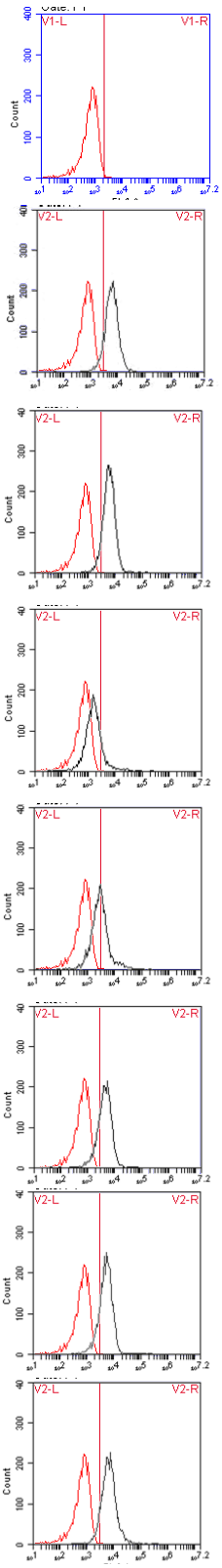
ATW

Scble

PEG24

Raft-Raft

R(RGD) + ATW



	MFI	Ecart Moy.	% erreur	Pa-MFI
Témoin	760	53	6,9	1
R(RGD)	6996	593	8,5	9,2
R(RAD)	5125	1449	28,3	6,7
ATW	2074	222	10,7	2,7
scble	3122	637	20,4	4,1
R(RGD)-24-ATW	4472	224	5	5,9
R(RGD)-R(ATW)	5166	496	9,6	6,8
R(RGD) + ATW	7547	896	11,9	9,9

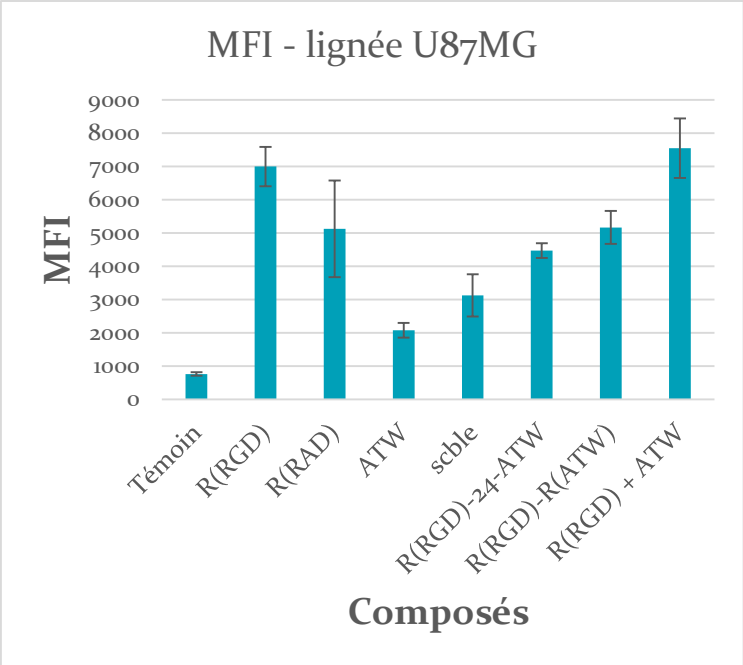
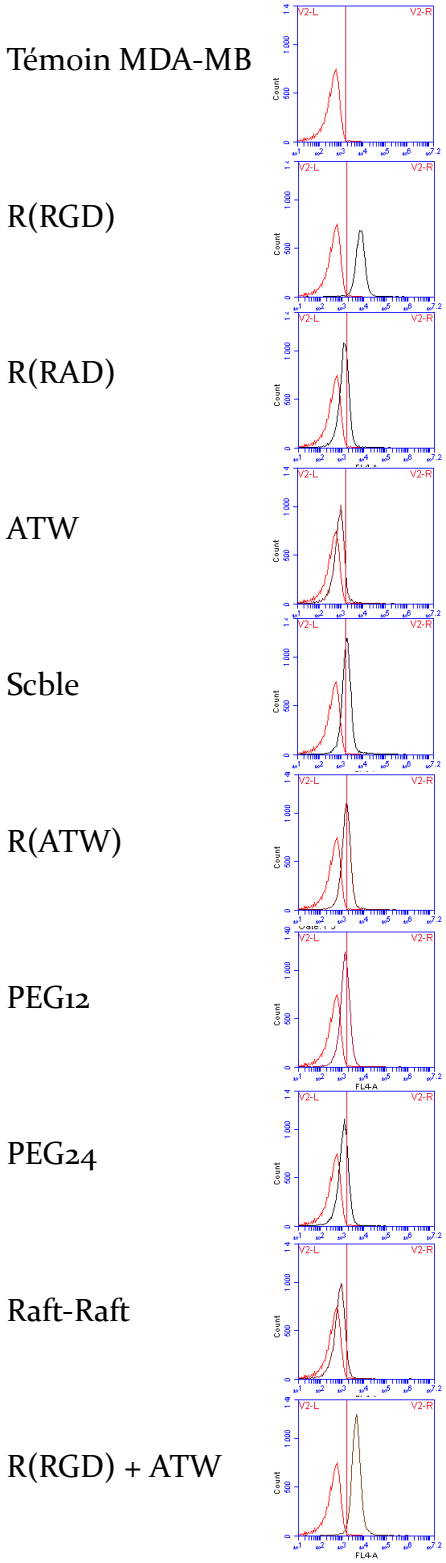


Figure 111 - Résultats de cytométrie de flux pour U87MG

- **Lignée MDA-MB-231**



	MFI	Ecart Moy.	% erreur	Pa-MFI
Témoin	453	46	10,2	1
R(RGD)	3403	356	10,5	7,5
R(RAD)	1323	76	5,8	2,9
ATW	1094	72	6,5	2,4
scble	2473	60	2,4	5,5
R(ATW)	1825	/	/	4
R(RGD)-12-ATW	1562	/	/	3,4
R(RGD)-24-ATW	1221	48	3,9	2,7
R(RGD)-R(ATW)	881	30	3,4	1,9
R(RGD) + ATW	5250	/	/	11,6

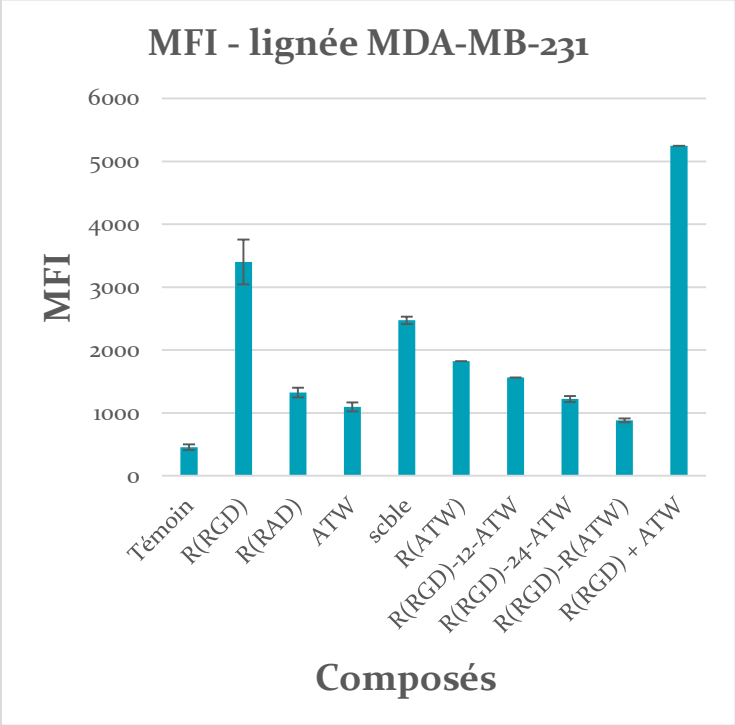
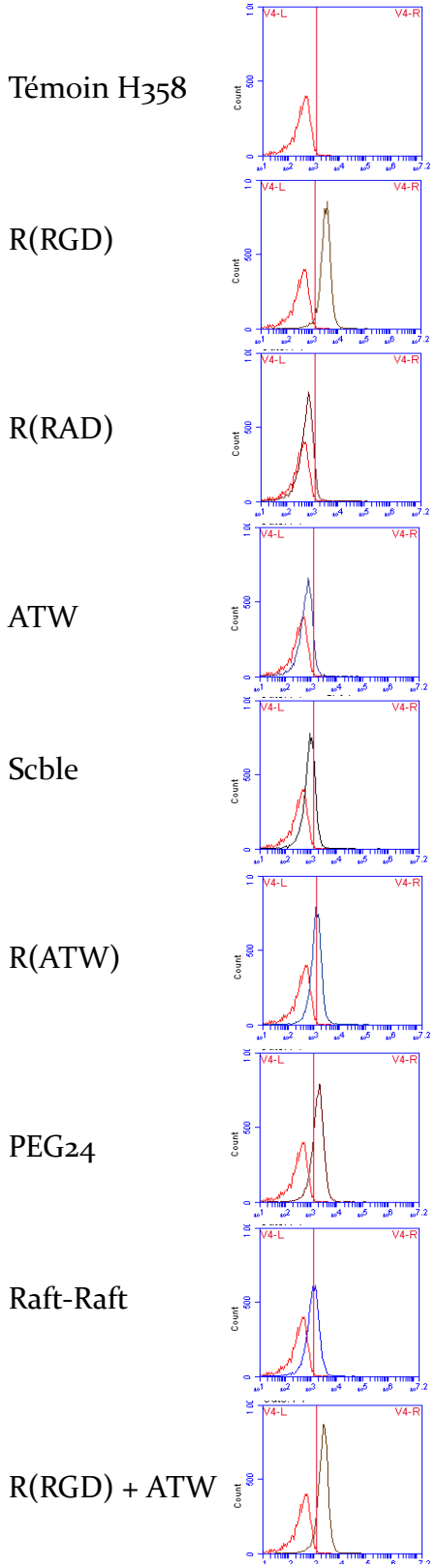


Figure 112 - Résultats de cytométrie de flux pour MDA-MB-231

- **Lignée H358**



	MFI	Ecart	% écart	Pa-MFI
témoin	378	63	16,7	1
R(RGD)	3612	499	13,8	9,55
R(RAD)	983	392	39,8	2,6
ATW	824	127	15,4	2,18
Scble	1720	385	22,4	4,55
R(ATW)	1214	298	24,5	3,21
R(RGD)-24-ATW	1942	68	3,5	5,13
RAFT-RAFT	1315	88	6,7	3,5
R(RGD) + ATW	2558	103	4	6,76

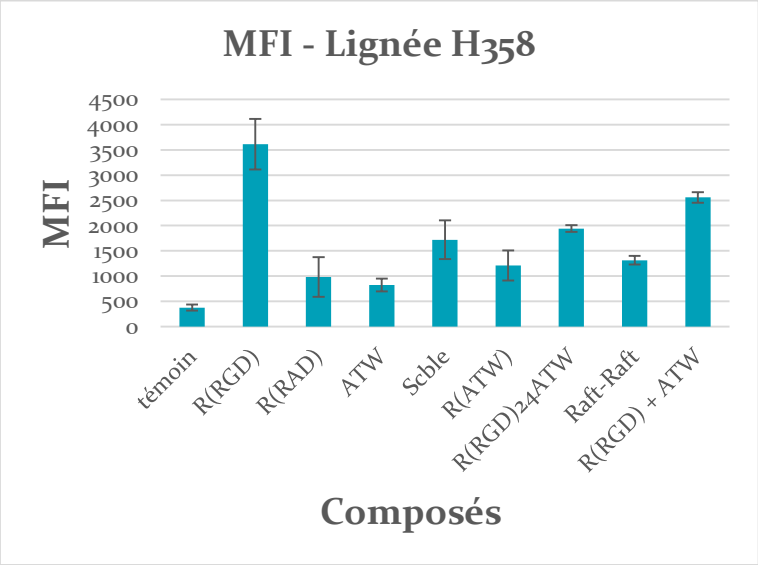


Figure 113 - Résultats de cytométrie de flux pour H358

- **Lignée 3T3**

Témoin 3T3

R(RGD)

R(RAD)

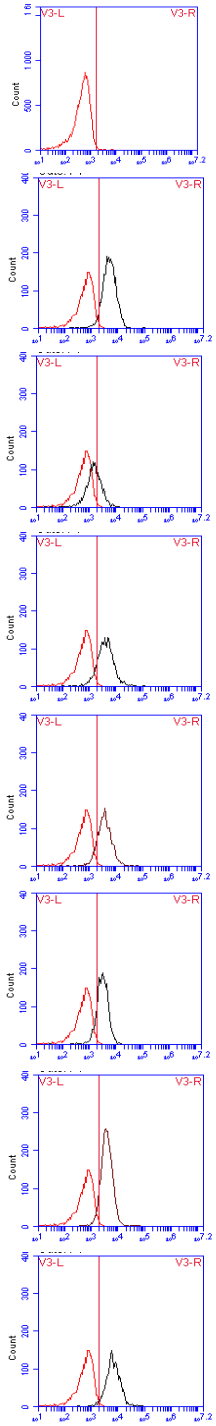
ATW

Scble

PEG24

Raft-Raft

R(RGD) + ATW



	MFI	écart	% écart	Pa-MFI
témoin	564	89	15,8	1
R(RGD)	5816	383	6,6	10,3
R(RAD)	1116	643	9,1	2
ATW	4830	320,4	38,9	8,56
scble	4419	/	/	7,8
R(RGD)-24-ATW	3123	284	27,8	5,53
RAFT-RAFT	3057	1189	57,6	5,42
R(RGD) + ATW	10730	2981	27,8	19

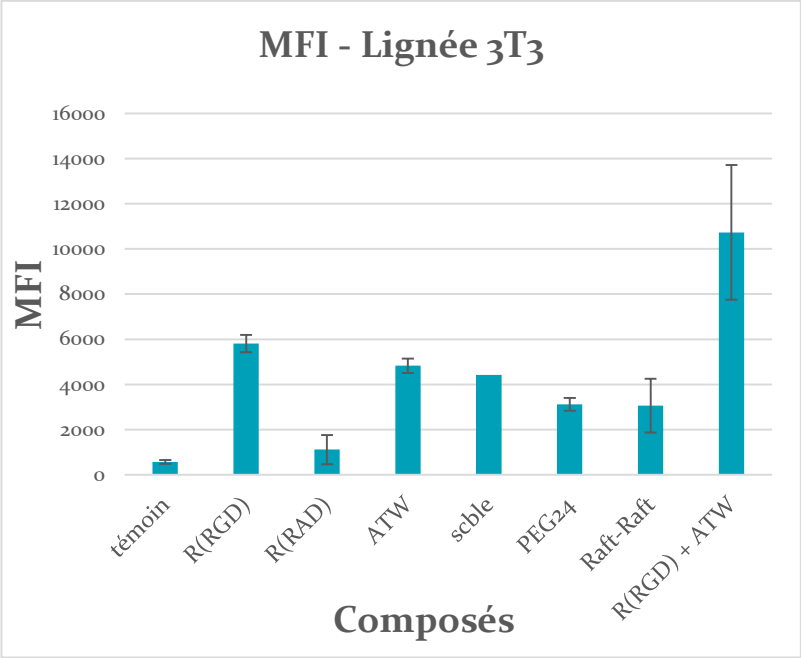


Figure 114 - Résultats de cytométrie de flux pour 3T3

- **Heat Map par lignée cellulaire**

	U87MG	3T3	H358	MDA-MB-231
Témoin	1	1	1	1
R(RGD)	9,2	10,3	9,55	7,5
R(RAD)	6,7	2	2,6	2,9
ATW	2,7	8,56	2,18	2,4
Scble	4,1	7,8	4,55	5,5
R(RGD)-24-ATW	5,9	5,53	5,13	2,7
R(RGD)-R(ATW)	6,8	5,42	3,5	1,9
R(RGD) + ATW	9,9	19	6,76	11,6
R(ATW)			3,21	4

Figure 115 - Heat Map des Pa-MFI. Analyse par lignées cellulaires individuelles

- **Heat Map toutes lignées confondues**

	U87MG	3T3	H358	MDA-MB-231
Témoin	1	1	1	1
R(RGD)	9,2	10,3	9,55	7,5
R(RAD)	6,7	2	2,6	2,9
ATW	2,7	8,56	2,18	2,4
scble	4,1	7,8	4,55	5,5
R(RGD)-24-ATW	5,9	5,53	5,13	2,7
R(RGD)-R(ATW)	6,8	5,42	3,5	1,9
R(RGD) + ATW	9,9		6,76	11,6
R(ATW)			3,21	4

Figure 116 - Heat Map des Pa-MFI. Analyse sur toutes les lignées cellulaires confondues

(la valeur du R(RGD) + ATW a été enlevée pour ne pas « écraser » les autres valeurs)

b. Discussion

Il est possible d'analyser les résultats de cytométrie de manière individuelle pour chaque lignée cellulaire, puis d'avoir un regard plus global. Pour les lignées présentant une grande quantité du récepteur Neuropiline-1 et peu (MDA-MB-231) ou pas (H358) d'intégrine $\alpha v\beta_3$, on devrait obtenir une fluorescence (MFI) importante pour les molécules qui ciblent la Neuropiline-1 et peu importante pour celles ciblant uniquement l'intégrine $\alpha v\beta_3$. En ce qui concerne la lignée U87MG, toutes les molécules ciblant l'un des récepteurs ou les deux devraient entrainer une fluorescence marquée des cellules. On s'attend aussi à observer un effet additif ou synergique pour les molécules ciblant à la fois Neuropiline-1 et Intégrine $\alpha v\beta_3$. On espère voir une différence entre la co-injection R(RGD) + ATW et les molécules de double ciblage, qui témoignerait d'un impact de l'interaction simultanée. Enfin, la lignée 3T3 est une lignée cellulaire contrôle. Comme elle n'exprime aucun des deux récepteurs, on s'attend à observer une fluorescence faible et homogène pour l'ensemble des conditions.

La **lignée U87MG**, exprime à la fois l'Intégrine $\alpha v\beta_3$ et la Neuropiline-1 de façon importante. Nous pouvons voir pour nos expériences (fig. 111) que **1)** les conditions entrainant les plus hautes valeurs de MFI et Pa-MFI sont le R(RGD) et la co-injection R(RGD) + ATW. **2)** La molécule donnant le moins de fluorescence est ATW. **3)** Les composés de double ciblage et les contrôles négatifs R(RAD) et Scramble donnent des valeurs intermédiaires. Il est à noter que le pourcentage d'erreur est assez élevé pour les résultats des deux contrôles négatifs.

Il est étonnant que le contrôle négatif Scramble donne des valeurs plus élevées que ATWLPPR.

La co-injection donne plus de fluorescence que les molécules de double ciblage R(RGD)-24-ATW et R(RGD)-R(ATW). Mais ceci n'est pas étonnant car les ligands sont introduits en même quantité dans chaque condition (1 µM de R(RGD)Cy5.5 + 1µM de Cy5.5-ATW

ou 1µM de R(RGD)Cy5.5-PEG_{24}-ATW), mais dans le cas de la co-injection, chaque ligand porte un fluorophore. Il y a donc deux fois plus de fluorophores introduits.

La fluorescence obtenue pour la co-injection R(RGD) + ATW ($MFI_{R(RGD) + ATW}$ = 7500) est supérieure à celle des ligands seuls ($MFI_{R(RGD)}$ = 7000 et MFI_{ATW} = 2000), mais elle est inférieure à leurs fluorescences cumulées ($MFI_{R(RGD)}$ + MFI_{ATW} = 9000). On peut donc en conclure qu'il y a certainement une compétition de binding entre ces deux ligands, bien qu'ils ne ciblent pas les mêmes récepteurs. Cela prouve aussi l'absence d'un effet coopératif et synergique des ligands ATW et R(RGD) en co-injection.

En ciblant à la fois la Neuropilne-1 et l'intégrine $\alpha v\beta_3$, on s'attendait à obtenir pour les molécules combinées R(RGD)-R(ATW) et R(RGD)-24-ATW des valeurs supérieures à celles obtenues pour R(RGD). Cette augmentation aurait été le reflet d'une action biologique synergique des deux récepteurs, ou d'une meilleure affinité globale des molécules pour la cellule. Malheureusement, nous observons une diminution des valeurs de MFI et Pa-MFI lorsque les molécules combinent les ligands ATW et R(RGD) plutôt qu'avec R(RGD) seul. Elles sont néanmoins supérieures au ligand ATW seul. Il semble donc que l'affinité des molécules combinées soit dictée par l'interaction -RGD- / Intégrine $\alpha v\beta_3$ mais que cette dernière est moins importante que pour R(RGD). Notre hypothèse est que ces molécules combinent une affinité pour la Neuropiline-1 (Ka) et une affinité pour l'Intégrine (Kb). Mais la présence des deux ligands sur une même molécule apporte une certaine rigidité et une gêne stérique au système qui diminuent les affinités intrinsèques des deux ligands pour leurs récepteurs (Ka'<Ka et Kb'<Kb). Ainsi, il en résulte que l'affinité globale des molécules combinées (Ka'+Kb') est finalement plus faible que l'affinité originale du R(RGD) pour l'intégrine $\alpha v\beta_3$ (Ka'+Kb' < Ka).

La **lignée MDA-MB-231** présente peu d'intégrine $\alpha v\beta_3$ et beaucoup de Neuropiline-1. On observe (fig. 112) que **1)** les conditions entrainant le plus de fluorescence sont la co-injection R(RGD) + ATW et le RAFT(4-RGD)Cy5.5. C'était inattendu puisque ce dernier cible uniquement l'intégrine. **2)** Le ligand ATWLPPR qui cible uniquement la Neuropiline-1 est l'un des composés donnant le moins de fluorescence. **3)** Les contrôles RAFT(RAD)

et Scramble sont plus élevés que ATWLPPR. Les résultats obtenus pour cette lignée sont donc contre-intuitifs. On peut imaginer qu'une différence d'affinité en soit l'origine : même si la Neuropiline-1 est exprimée en plus grande quantité que l'intégrine $\alpha v\beta_3$, il se peut que l'interaction Intégrine – RGD soit tellement supérieure à l'interaction ATWLPPR – NRP1 qu'elle contre balance la quantité plus faible d'intégrine.

Mais cette explication ne serait plus valable pour une lignée n'exprimant pas d'intégrine $\alpha v\beta_3$, comme c'est le cas pour la **lignée H358**. Pourtant, les observations (fig. 113) sont sensiblement les mêmes : malgré l'absence d'intégrine, c'est une fois de plus le composé R(RGD) et la co-injection R(RGD) + ATW qui donnent les MFI et les Pa-MFI les plus élevés. Suivent ensuite les molécules de double ciblage (R(RGD)-24-ATW et R(RGD)-R(ATW)) et le Scramble. Le composé ATWLPPR est celui donnant le moins de fluorescence. Les résultats obtenus sont donc totalement inverses à ceux attendus. Cela pourrait témoigner d'une interaction non-spécifique des composés présentant quatre ligands RGD. Aussi, les pourcentages d'erreur observés sur cette lignée sont assez élevés pour certaines conditions (R(RAD), Scramble, R(ATW)). Cela nous pousse à avoir une certaine réserve quant à l'interprétation des résultats.
En observant les résultats des lignées H358 et MDA-MB-231, on note que le RAFT(4ATWLPPR)Cy5.5 donne une plus grande fluorescence que Cy5.5-ATWLPPR. Il pourrait donc s'agir d'un effet positif de la multivalence. Mais l'effet observé est peu marqué. Aussi, compte tenu des résultats contradictoires obtenus pour les autres composés, et du manque d'expériences réalisées avec R(ATW) sur la lignée MDA-MB-231, nous resterons très prudents sur cette hypothèse. Enfin, puisqu'une interaction non-spécifique semble régir l'affinité des composés présentant le motif RGD, il pourrait en être de même pour ceux présentant le motif ATWLPPR. Quatre motifs ATWLPPR au lieu d'un pourraient simplement entrainer plus d'interactions électrostatiques.

La dernière lignée cellulaire présentée est celle des **3T3**. Elle n'exprime ni l'intégrine $\alpha v\beta_3$, ni la Neuropiline-1. Les molécules testées devraient donc générer très peu de

fluorescence, uniquement due à une interaction non spécifique. De ce fait, on attend aussi une réponse globalement homogène pour l'ensemble des composés testés. Mais une fois de plus, les résultats ne sont pas conformes à ceux attendus (fig. 114). Les résultats sont moins disparates que pour les autres lignées mais restent hétérogènes. Surtout, les pourcentages d'erreur obtenus sont très élevés. La faible reproductibilité des résultats empêche de tirer une quelconque conclusion.

Si l'on doit poser un regard global sur les résultats obtenus pour les quatre lignées (Heat Map, fig. 115 et 116), il ressort que dans tous les cas, le composé R(RGD) donne les plus hautes valeurs de MFI et Pa-MFI. Hormis pour la lignée 3T3, le composé ATWLPPR donne les plus faibles valeurs. Les composés de double ciblage et les contrôles négatifs ont des valeurs intermédiaires. Les résultats obtenus sont donc homogènes là où on pensait observer des différences significatives. Les différences d'expression des récepteurs par les cellules n'ont visiblement pas eu d'impact. Seuls les résultats sur 1µM ont été présentés mais les mêmes tendances étaient observées pour des concentrations de 5µM.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats :

Les cellules ont été incubées avec les molécules alors qu'elles étaient en suspension. Les récepteurs Intégrine et NRP1 sont impliqués dans des phénomènes d'adhésion. Incuber des cellules adhérentes plutôt qu'en suspension aurait peut-être donné des résultats plus cohérents. L'utilisation de trypsine dans le protocole entraine peut-être la destruction de certains récepteurs.

Il est possible que les cellules expriment aussi de l'intégrine $\alpha v\beta_5$ reconnue par les motifs –RGD-.

Les fluorophores Cy5.5 possèdent quatre charges négatives. Il est possible qu'elles prennent part à une interaction non spécifique avec la cellule et/ou qu'elles interagissent avec les charges positives des arginines présentes sur chaque molécule, influençant leur arrangement dans l'espace donc la présentation des ligands aux récepteurs.

Enfin, les concentrations utilisées étaient peut-être trop importantes, et les interactions non-spécifiques masqueraient alors les interactions spécifiques.

En résumé, les tests de cytométrie sont peu concluants. Les résultats obtenus avec la lignée U87MG, qui exprime la NRP1 et l'Intégrine $\alpha v\beta_3$, laissent penser que l'affinité des molécules de double ciblage est dictée par l'interaction -RGD- / Intégrine $\alpha v\beta_3$. Néanmoins, cette interaction serait affaiblie par la gêne stérique et la rigidité de ces systèmes bivalents. Aussi, il semblerait que la présentation multivalente du ligand ATWLPPR envers la Neuropiline-1 ait un effet bénéfique bien que mesuré.

Malheureusement, ces hypothèses sont à considérer avec précaution car les résultats obtenus sur les quatre lignées sont globalement contre-intuitifs, avec des pourcentages d'erreur élevés. Il semble que les effets observés soient plutôt issus d'interactions non spécifiques. Les conditions expérimentales ou la structure du fluorophore sont mises en causes.

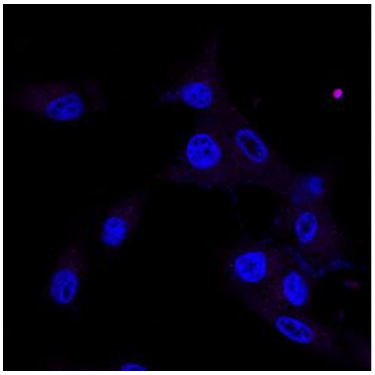
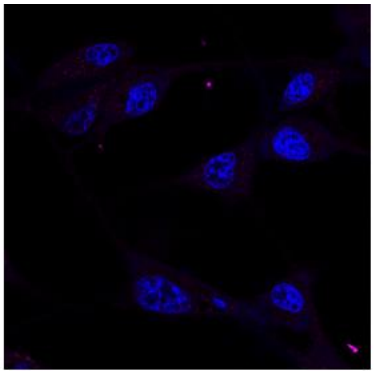
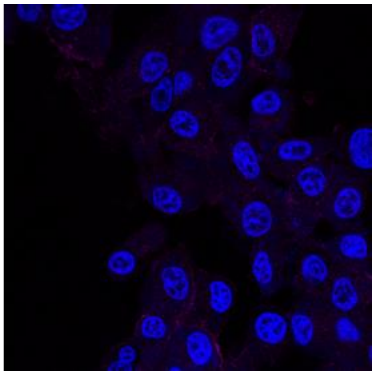
ii. *Microscopie Confocale : Etude du marquage de fluorescence*

La microscopie confocale permet de visualiser les cellules et la fluorescence émise par les molécules à la périphérie ou à l'intérieur des cellules. Cette technique renseigne donc sur l'efficacité de marquage des cellules par les molécules fluorescentes et sur la localisation des composés fluorescents. Nous avons réalisé des expériences de microscopie confocale sur la lignée cellulaire U87MG. Nous avons choisi cette lignée puisqu'elle exprime les deux récepteurs Intégrine $\alpha v\beta_3$ et Neuropiline-1. Les différentes molécules fluorescentes synthétisées au cours de ce projet ont été testées.

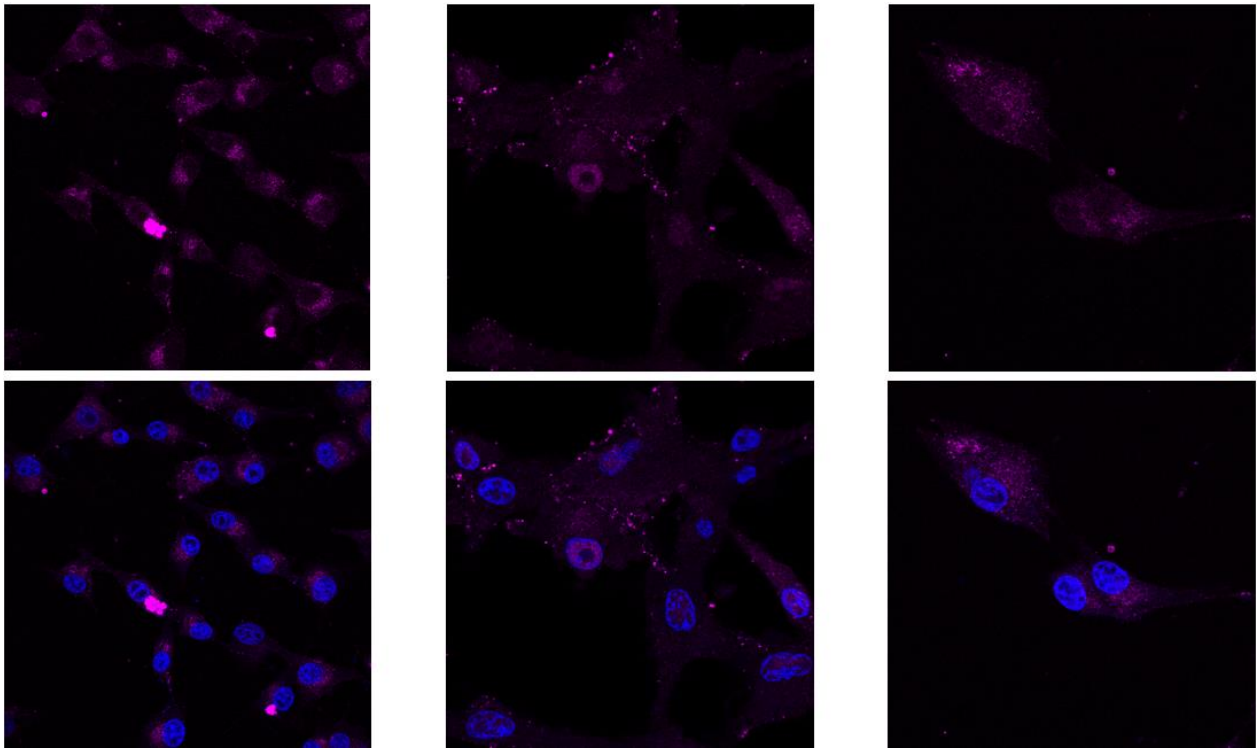
a. Résultats de Microscopie confocale

Les cellules sont incubées avec 2,5µM de molécules fluorescentes puis imagées au Dynascope. Les noyaux apparaissent en bleu et la fluorescence en magenta. Trois clichés sont présentés pour chaque condition, pour prouver que les observations faites ne sont pas des cas isolés.

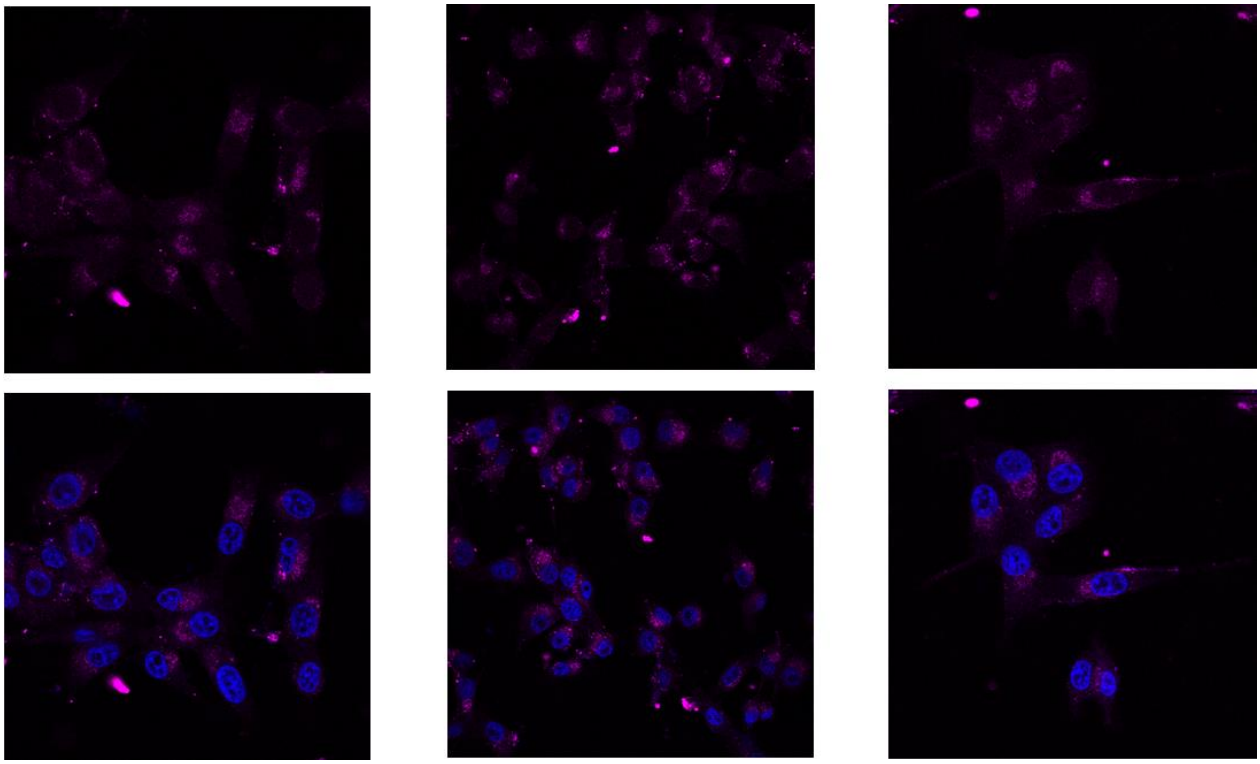
- U87MG (témoin)

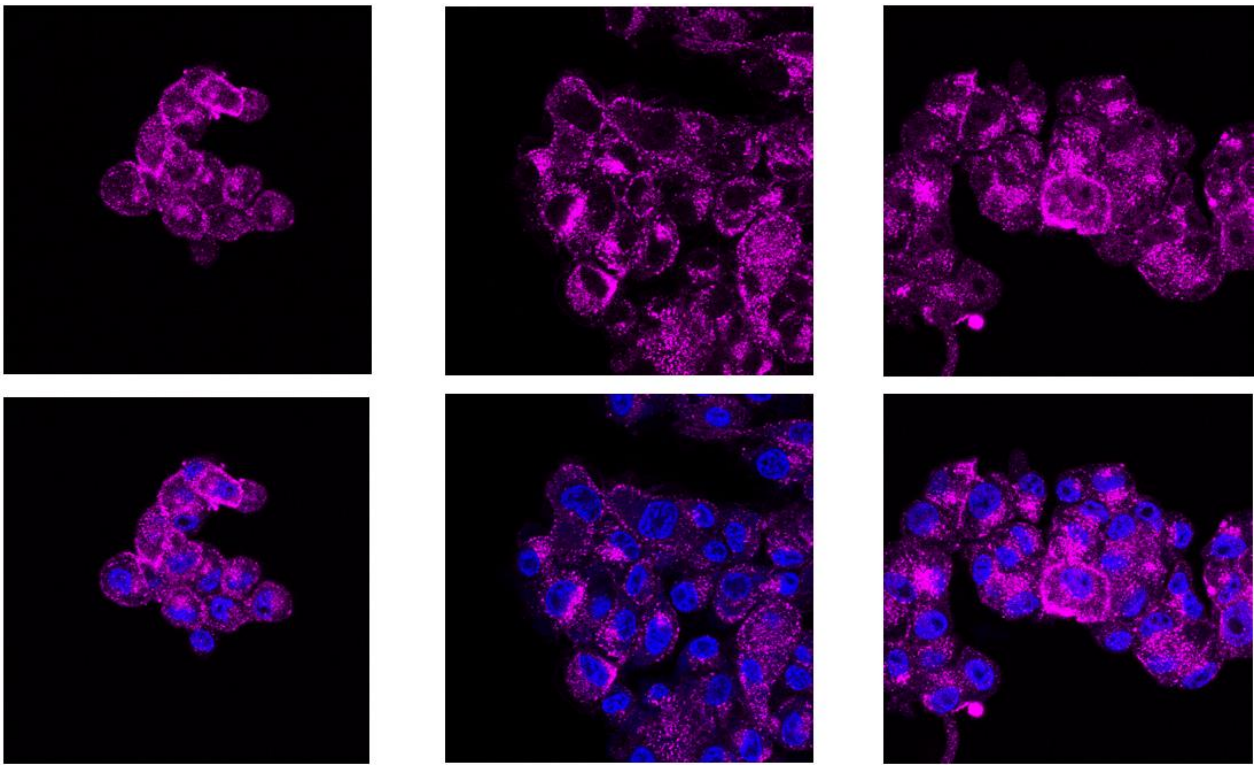
- U87MG + ATWLLPR



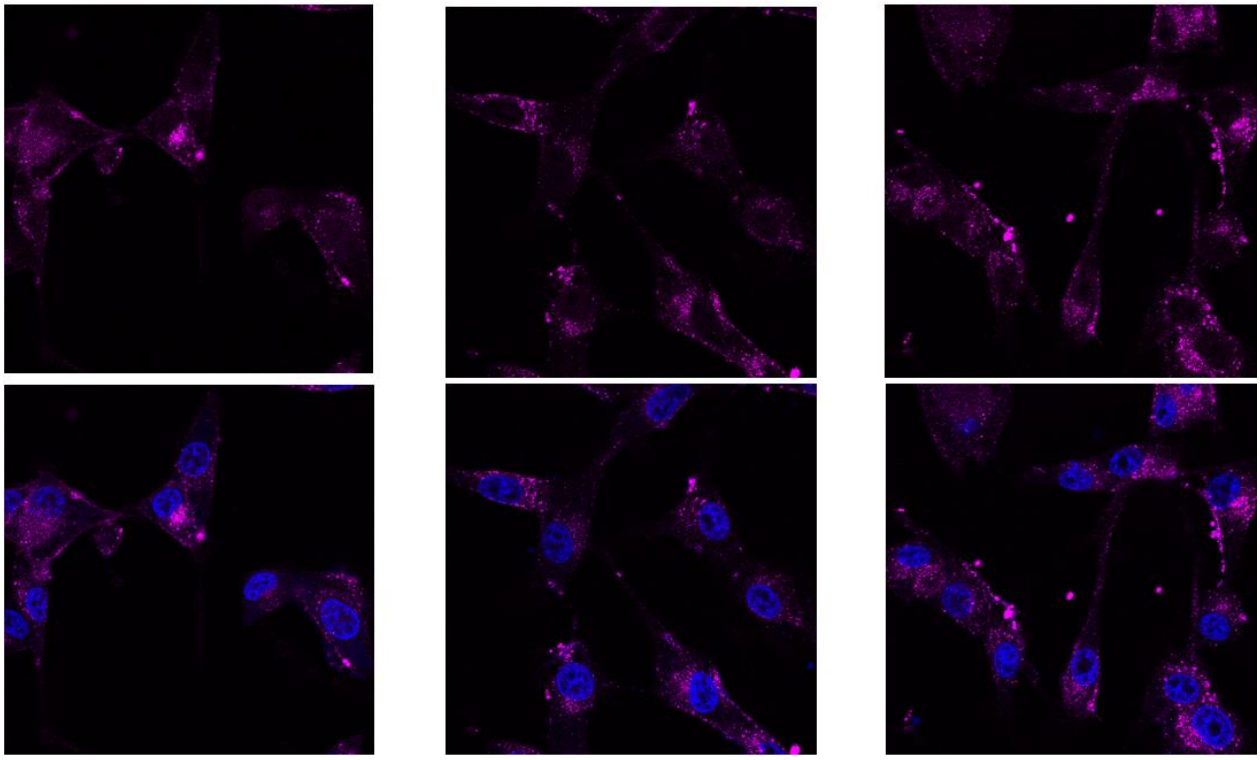
- U87MG + scramble



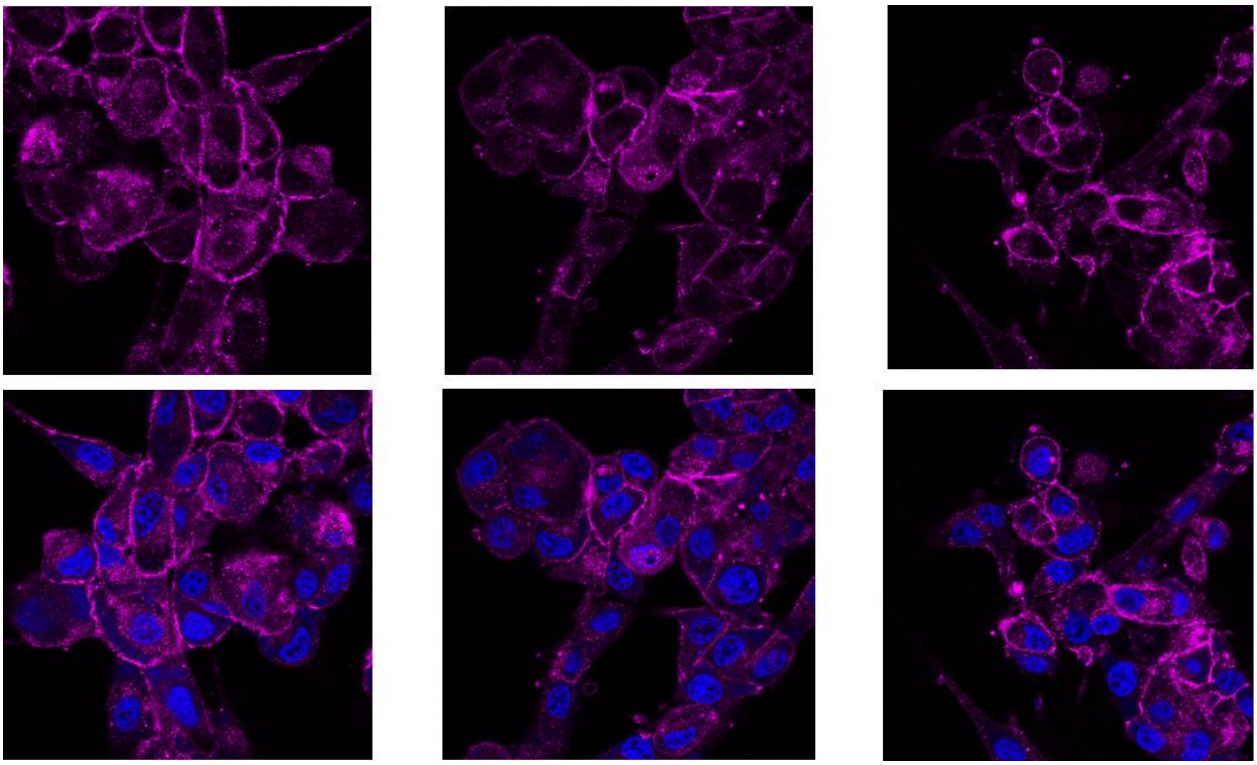
- RAFT(RGD)Cy5.5



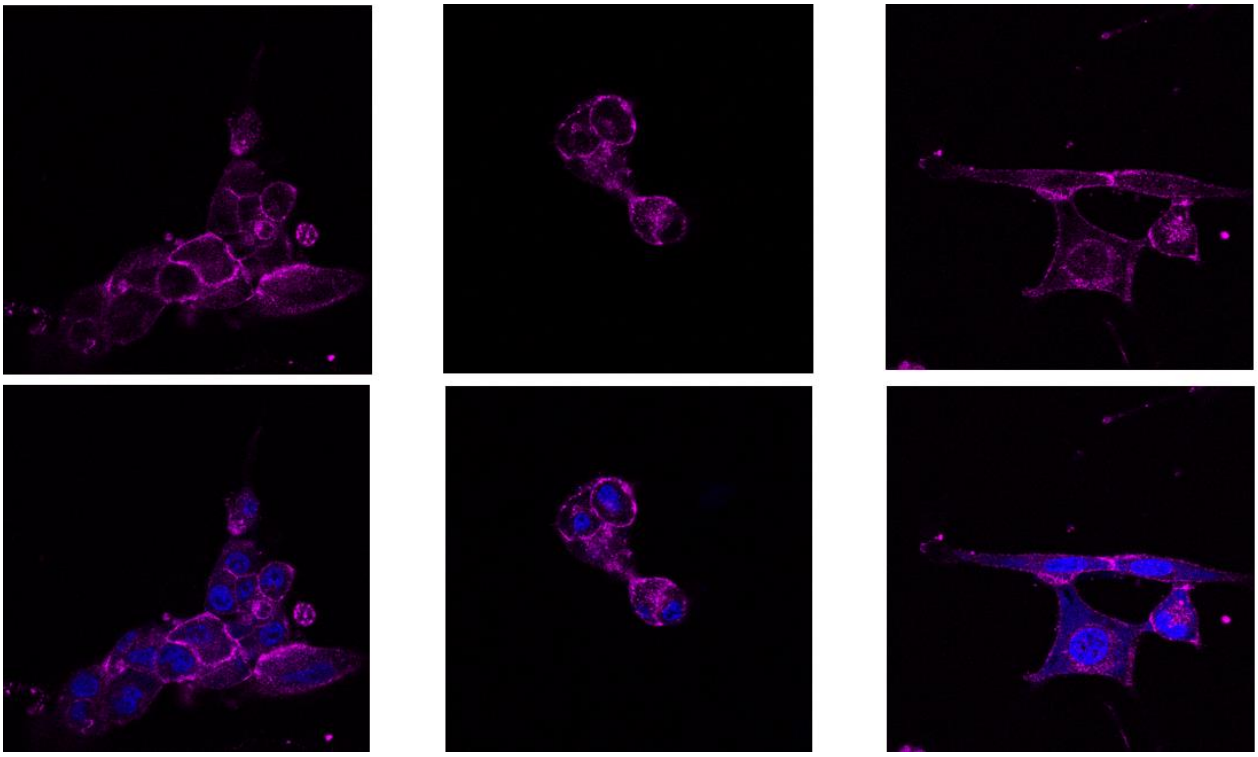
- RAFT(RAD)Cy5.5



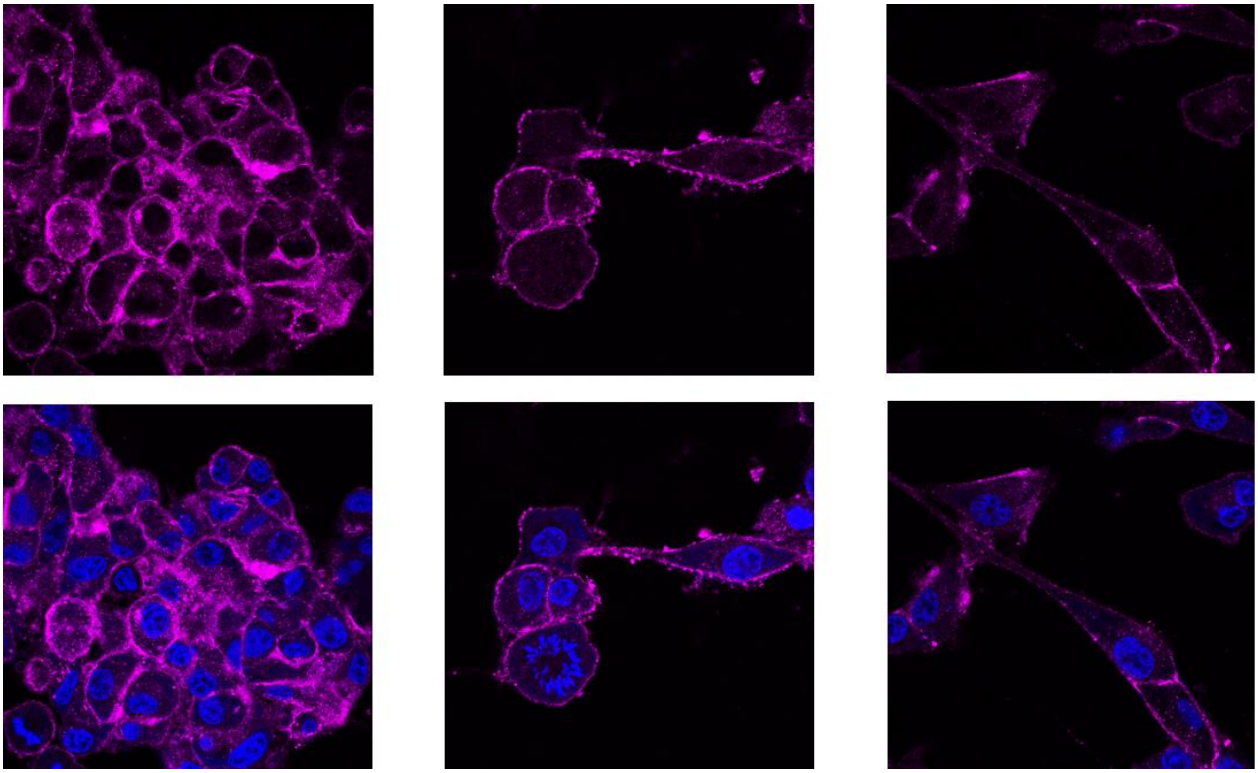
- RAFT(RGD)Cy5.5-PEG$_{12}$-ATWLPPR



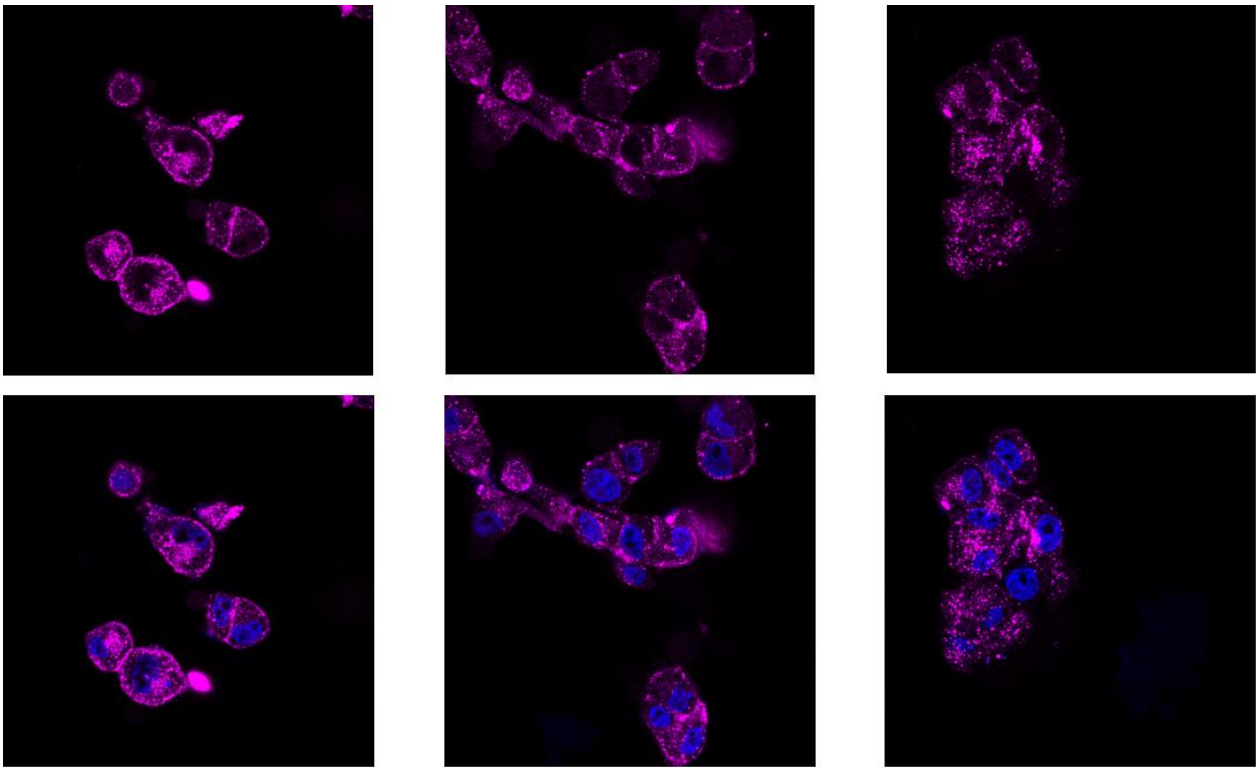
- RAFT(RGD)Cy5.5-PEG$_{24}$-ATWLPPR



- RAFT(RGD)-RAFT(ATW)



- Co-injection RAFT(RGD) + ATW



b. Discussion.

Sur les clichés de microscopie confocale, les noyaux des cellules apparaissent en bleu. La fluorescence émise par la Cyanine 5.5 des molécules se traduit par la couleur magenta. Un cliché de chaque condition expérimentale est présent dans la figure ci-dessous, pour faciliter les comparaisons.

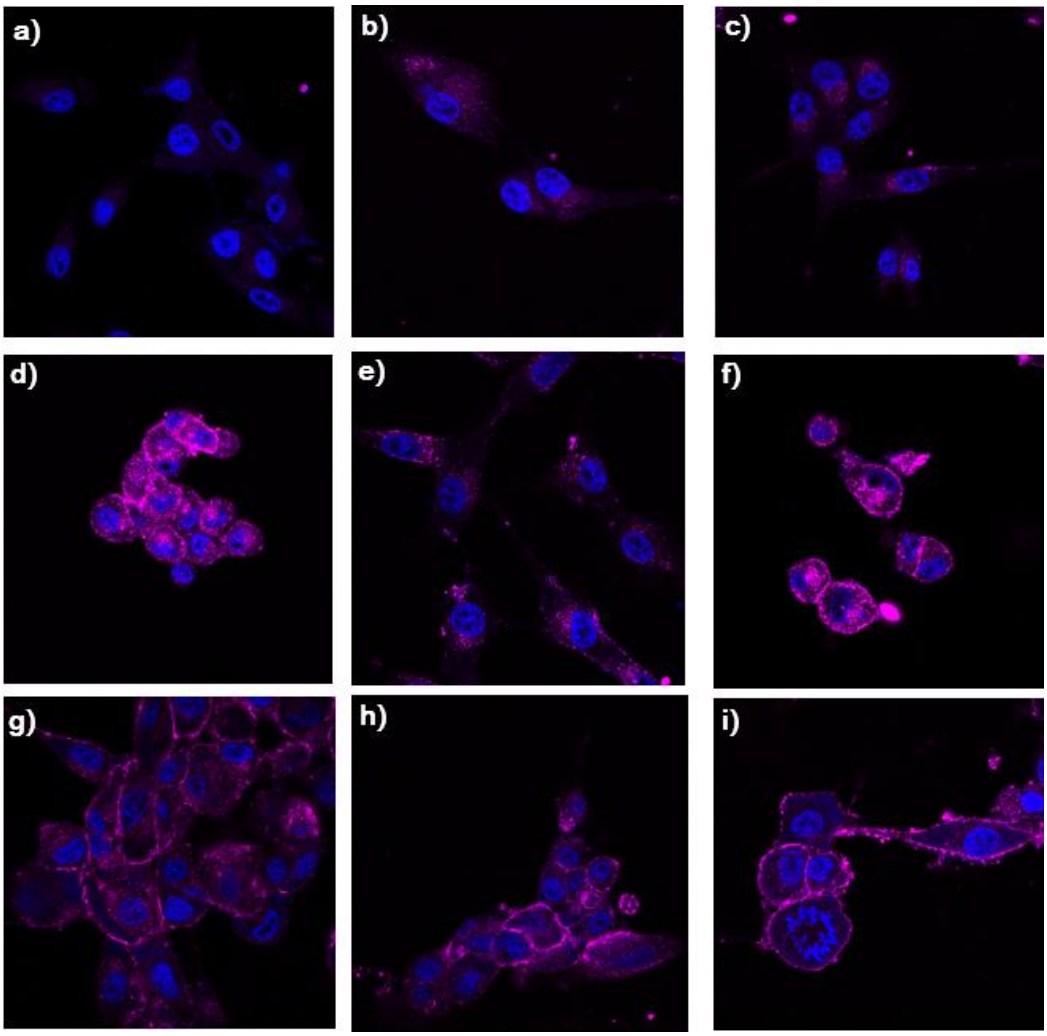


Figure 117 - Images prises au microscope confocale de cellules U87MG incubées avec a) aucun composé, b) Cy5.5-ATW, c) Cy5.5-scble, d) R(RGD)Cy5.5, e) R(RAD)Cy5.5, f) R(RGD)Cy5.5 + Cy5.5-ATW, g) R(RGD)Cy5.5-PEG$_{12}$-ATW, h) R(RGD)-Cy5.5-PEG$_{24}$-ATW, i) R(RGD)Cy5.5-PEG$_{12}$-R(ATW)

Les cellules **U87MG seules** (Fig. 17. a) n'émettent aucune fluorescence, on ne distingue que le noyau. En revanche, dans tous les autres cas on distingue de la fluorescence. Cette fluorescence est assez faible dans le cas de Cy5.5-ATW (Fig. 117. b) et Cy5.5-scramble (Fig. 117. c). Elle semble localisée dans la cellule, et proche du noyau. Il pourrait s'agir d'une concentration au sein du réticulum endoplasmique. Aucune différence notoire de fluorescence n'est observée entre le ligand Cy5.5-ATW et son contrôle négatif Cy5.5-scramble. La fluorescence observée pourrait donc être issue d'une interaction non spécifique.

Le **R(RGD)Cy5.5** induit une importante fluorescence de la cellule (Fig. 117. d). Le marquage est très prononcé au niveau des membranes cellulaires ainsi que dans le cytoplasme des cellules. L'intensité de marquage soutient l'hypothèse d'une interaction spécifique de la molécule avec les Intégrines $\alpha v\beta_3$ de la cellule. L'internalisation du composé suite à cette interaction Intégrine / -RGD- expliquerait la présence de marquage fluorescent dans le cytoplasme. L'internalisation d'un châssis présentant quatre ligands -RGD- médiée par des clusters d'intégrine a déjà été démontrée par notre laboratoire.[275,276]

Le composé **R(RAD)Cy5.5** (Fig. 117. e) donne également de la fluorescence. Mais cette dernière est beaucoup moins importante que pour R(RGD)Cy5.5. Aussi, les membranes sont moins marquées. Il semblerait donc que le R(RAD)Cy5.5 soit un bon contrôle négatif, et que la fluorescence observée soit due à une interaction non spécifique entre la cellule et la molécule. La présence de charges positives sur les arginines des motifs –RAD- pourrait en être l'origine.

La **co-injection** des composés R(RGD)Cy5.5 et Cy5.5-ATW (Fig. 117 f) donne elle aussi un haut taux de fluorescence. On retrouve les même caractéristiques que pour R(RGD)Cy5.5. Il apparait donc que les deux composés agissent de manière additive, sans synergie particulière.

Les composés **R(RGD)Cy5-5-PEG$_n$-ATW** (Fig. 117 g. et h.) induisent un marquage fluorescent très intéressant. En effet, il est moins prononcé que R(RGD)Cy5.5 mais reste important. Surtout, sa localisation est particulière. Comparativement au R(RGD)Cy5.5, la fluorescence des R(RGD)Cy5.5-PEGn-ATW est moins présente dans le cytoplasme, mais est particulièrement concentrée au niveau des membranes cellulaires. Cette différence pourrait s'expliquer par une internalisation moins importante dans le cas des composés de double ciblage. En effet, cela induirait que 1) les molécules restent localisées au niveau de la membrane, 2) l'accès au cytoplasme serait restreint donc son marquage fluorescent serait diminué, 3) la fluorescence globale serait plus faible puisque les récepteurs occupés par les molécules ne sont pas recyclés par endocytose et sont donc moins disponibles pour interagir avec de nouvelles de molécules. Les trois points précédents sont en effet observés. Comme la fluorescence observée est tout de même importante, cela confirme qu'il y a une bonne affinité d'interaction, malgré une internalisation possiblement ralentie. La faible fluorescence cytoplasmique observée est assez similaire de celle observée pour le R(RAD)Cy5.5, elle pourrait donc être issue du même type d'interaction non spécifique. Il est possible aussi que l'internalisation soit ralentie mais pas totalement bloquée.

Le composé **R(RGD)Cy5.5-PEG$_{12}$-R(ATW)** (Fig. 117 i) a un comportement très similaire aux composés R(RGD)Cy5-5-PEG$_n$-ATW. La fluorescence est assez importante, avec un marquage important des membranes cellulaires, et un faible marquage cytoplasmique. **Il semble donc que la même hypothèse puisse être émise pour tous les composés de double ciblage, à savoir un marquage spécifique mais une faible internalisation, au profit d'une accumulation membranaire.**

Il est intéressant de noter également que la co-injection de R(RGD) et ATW ne donne absolument pas le même type de marquage que les molécules de double ciblage. **Il apparait clairement qu'un ciblage simultané des récepteurs Intégrine $\alpha v\beta_3$ et Neuropiline-1 au sein d'un espace restreint, induit par le châssis qui porte les deux ligands, provoque**

une interaction et des processus biologiques spécifiques. Ces effets sont différents d'un double ciblage par des ligands individuels.

Pour expliquer la différence de comportement des molécules de double ciblage R(RGD)Cy5-5-PEG$_n$-ATW et R(RGD)-R(ATW) vis-à-vis de R(RGD) et de la co-injection, on peut avancer l'hypothèse que les molécules de double ciblage interagissent à la fois avec l'intégrine $\alpha v\beta_3$ et avec la Neuropiline-1. **Le complexe Intégrine-Molécule-NRP1 formé, semblable à une agrafe, resterait ancré dans la membrane**, **bloquant ainsi son internalisation**. La proximité des deux récepteurs induite par le complexe pourrait provoquer une contrainte mécanique et/ou induire un cross-talk entre les protéines de signalisation des récepteurs. Les contraintes physiques du système ou une cascade de signalisation induite pourraient alors bloquer l'internalisation. D'autres processus que le blocage de l'internalisation pouraient être mis en jeu. C'est pourquoi il était intéressant d'étudier en Western Blot les cascades de signalisation provoquées par ces composés.

Après l'étude du marquage fluorescent de cellules U87MG par nos composés, plusieurs hypothèses se dégagent :

ATWLPPR et son scramble ne semblent pas avoir d'interaction spécifique
Le ciblage des U87MG par un motif –RGD- tétravalent est très efficace et induit une internalisation.
Le ciblage simultané de l'intégrine $\alpha v\beta_3$ et de NRP1 par des ligands co-injectés ne semble pas donner lieu à une action synergique
Les molécules de double ciblage présentant des ligands –RGD- et ATWLPPR permettent un ciblage spécifique de la cellule et s'accumulent dans la membrane. Il est possible qu'un complexe ligand/récepteurs se forme et bloque l'internalisation.
La présentation simultanée des ligands –RGD- et ATWLPPR par une même molécule plutôt qu'une co-injection a un réel impact sur la cellule.

iii. *Western Blot : Etude des voies de signalisation*

Afin d'étudier l'impact biologique de nos composés sur les cellules U87MG, nous avons analysé l'expression de la protéine NRP1 ainsi que celle de la protéine AKT sous ses formes totale et phosphorylée. AKT est une protéine notamment impliquée dans les voies de signalisation de l'Intégrine $\alpha v\beta_3$ et de VEGFR-2, ainsi que dans leur cross-talk. Une modification de l'expression d'AKT ou pAKT indique donc une probable interaction entre nos molécules et les récepteurs ciblés. La phosphorylation de la protéine AKT promeut la survie de la cellule en partie en bloquant la protéine Caspase 3 qui induit l'apoptose.

a. Résultats

Des cellules adhérentes U87MG sont incubées avec les composés à tester, à une concentration finale de 1µM. Puis l'influence des molécules sur les niveaux de NRP1, AKT et pAKT est étudiée en Western Blot (fig. 118). Plus les bandes sont intenses, plus la protéine est présente. Les deux dernières bandes du Western Blot correspondent à la tubuline, protéine constitutivement exprimée et dont le niveau constant. Elle sert à contrôler l'homogénéité des dépôts de protéines.

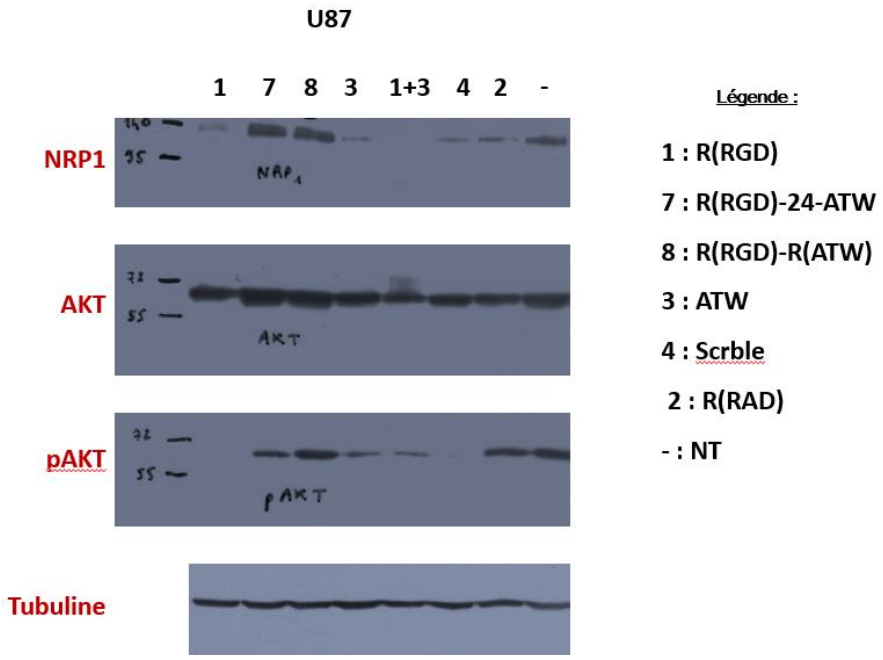


Figure 118 - Analyse Western Blot sur la lignée U87MG incubée 30min à 37°C avec 1µM de composés

Une analyse de l'intensité des bandes a été réalisée grâce au logiciel Image J®. Les intensités lues pour chaque bande ont été normalisées par rapport à la tubuline (données non présentées), puis traduites en pourcentages par rapport à l'intensité des cellules U87MG non traitées (tableau 4).

	R(RGD)	R(RGD)-PEG24-ATW	RAFT-RAFT	ATWLPPR	R(RGD) + ATWLPPR	R(RAD)	scble	U87
NRP1	12	102	130	11	-	12	25	***100***
AKT	55	86	99	79	50	57	74	***100***
pAKT	-	36	74	14	15	1	61	***100***

Tableau 4 – Intensités normalisées des bandes de Western Blot, exprimées en pourcentage, avec la bande U87MG comme intensité de référence.

Le *Tableau 5* renseigne le rapport d'intensité de pAKT vis-à-vis d'AKT. La comparaison des rapports obtenus pour chaque condition permet de savoir si c'est la phosphorylation et/ou le niveau de la protéine totale qui varie. Dans le *Tableau 6*, ces mêmes rapports pAKT/AKT sont présentés, mais en pourcentages relatifs à ceux des cellules U87MG non traitées.

	RAFT(RGD)	R(RGD)-PEG24-ATW	RAFT-RAFT	ATWLPPR	R(RGD) + ATW	R(RAD)	scble	U87
pAKT/AKT	0%	30%	52%	13%	21%	1%	57%	69%

Tableau 5 – Rapports des intensités des bandes pAKT et AKT, exprimés en pourcentages

	RAFT(RGD)	R(RGD)-PEG24-ATW	RAFT-RAFT	ATWLPPR	R(RGD) + ATW	R(RAD)	scble	U87
pAKT/AKT ref=U87	0%	43%	74%	18%	30%	1%	82%	***100%***

Tableau 6 - Rapports des intensités des bandes pAKT et AKT, exprimés en pourcentages relatifs, avec pour référence le rapport obtenu pour U87MG

b. *Analyse des résultats et discussion*

L'étude en Western Blot (fig.118) prouve que les composés que nous avons synthétisés ont un impact différent sur la cellule selon qu'ils présentent les motifs de ciblage –RGD-, ou ATWLPPR, les deux à la fois, ou les deux séparément.

- **Impact sur l'expression de NRP1**

En prenant pour référence le signal obtenu pour les cellules U87MG non traitées (à droite), on constate que la quantité de Neuropiline-1 détectée décroit pour tous les composés, excepté pour **7** et **8** qui sont les composés de double ciblage (fig.118).

Les composés **1** et **3** qui ciblent respectivement l'Intégrine et la Neuropiline-1 ont un effet comparable, puisqu'ils réduisent le taux d'expression de Neuropiline-1 de 90% (Tableau 4). Leur action simultanée par co-administration semble additive puisqu'on obtient une disparition totale de NRP1. Néanmoins, l'effet observé pour les molécules **1** et **3** est sensiblement le même que celui obtenu avec leurs contrôles négatifs **2** et **4**.

A l'inverse des autres composés, les vecteurs 7 et 8 ne réduisent pas le taux de Neuropiline-1 détecté mais l'augmentent. On obtient une augmentation de 2 et 30% respectivement par rapport à la référence U87 (tableau 4). A ce stade, on peut en conclure que 1) une fois de plus, les molécules de double ciblage ont un effet spécifique, 2) la présentation simultanée des motifs –RGD- et –ATW- par une même molécule envers des cellules U87MG semble augmenter l'expression de Neuropiline-1 ou freiner son recyclage/sa dégradation.

Il est plus probable qu'il s'agisse d'une disparition moins importante du récepteur. Dans ce cas, la production de NRP1 par la cellule resterait constante, mais la diminution de sa dégradation ferait pencher la balance en faveur d'une quantité globale détectée plus

élevée. Cette hypothèse va dans le même sens que celle proposée après les études de microscopie : Si les composés de double ciblage forment effectivement un complexe avec l'Intégrine $\alpha v\beta_3$ et NRP1, cela pourrait ralentir son recyclage par internalisation.

A notre connaissance, une telle observation n'a jamais été publiée. Elle confirme 1) l'intérêt d'étudier le double ciblage de l'Intégrine et la NRP1 par un même vecteur ; 2) mais aussi qu'une proximité des deux récepteurs est possible, 3) que la signalisation et/ou les contraintes mécaniques induites par le complexe formé induit des phénomènes biologiques spécifiques.

Il reste à confirmer l'hypothèse de la formation d'un complexe. C'est dans cette optique que nous avons réalisé des tests ELISA sur cellules (voir plus bas). Des tests de compétition entre les molécules de double ciblage et les ligands individuels seraient aussi intéressants. Il reste également à déterminer l'impact sur les cascades de signalisation, notamment AKT et pAKT.

- **Impact sur l'expression d'AKT et pAKT**

L'analyse en Western Blot (Fig. 118 et Tableau 5) nous apprend que le taux d'AKT détecté est diminué de 45% lorsque les cellules U87MG sont incubées avec le RAFT(RGD)Cy5.5. Elles le sont dans une moindre mesure (21%) en présence de Cy5.5-ATWLPPR. L'incubation avec les deux molécules séparées induit une diminution de 50%. Ces composés entrainent donc une dégradation de la protéine AKT. Néanmoins, comme pour NRP1, les résultats obtenus avec les contrôles négatifs RAFT(RAD)Cy5.5 et Cy5.5-scramble sont proches de ceux des composés supposés actifs. Il semblerait donc que cet effet ne soit pas spécifique.

Une fois de plus, une tendance différente se dégage pour les composés de double ciblage. Le taux d'AKT ne varie pas dans le cas de RAFT(RGD)Cy5.5-PEG12RAFT(ATW)

et diminue de seulement 14% en présence de RAFT(RGD)Cy5.5-PEG_{24}ATWLPPR (Tableau 4).

Le signal pAKT diminue dans toutes les conditions, mais cette diminution est moins importante pour les molécules doubles que pour les autres, à l'exception du Scramble (Fig.119 et Tableau 4).

Les cellules utilisées lors de l'expérience ont été privées de sérum pendant plusieurs heures auparavant (starvation) afin de ramener les taux d'expression et de phosphorylation des protéines à un niveau basal. La présence d'AKT phosphorylée est généralement associée à la survie cellulaire. Comme nos composés induisent une diminution d'AKT et pAKT, on pourrait en conclure que tous nos composés ont une tendance à diminuer la survie de ces cellules tumorales. Mais cela devra être approfondi.

Les rapports pAKT/AKT présentés dans le Tableau 5 montrent que la phosphorylation est diminuée quelle que soit la molécule. Mais le Scramble et les molécules de double ciblage gardent des valeurs assez élevées, qui représentent respectivement 82%, 74% et 43% de l'activité de phosphorylation des cellules non traitées (Tableau 6).

Les **molécules à double ciblage maintiennent un haut taux global d'AKT phosphorylé**, tandis que toutes les autres réduisent l'expression d'AKT et son taux de phosphorylation (à l'exception du scramble). L'incubation des cellules U87MG avec les molécules doubles pourrait donc induire la formation d'un complexe de récepteurs qui séquestre AKT sous sa forme phosphorylée en particulier, ce qui ralentirait sa dégradation.

Cet effet semble être accentué pour le R(RGD)-R(ATW) par rapport au R(RGD)-PEG_{24}ATW. Il est donc possible que la présentation multivalente du ligand ATWLPPR ait une influence.

Il serait intéressant d'effectuer d'avantages d'études, notamment sur les autres protéines des voies de signalisation de l'Intégrine et de la Neuropiline-1. Par exemple, les

travaux de thèse de Tao Jia (Jia. T*., Definition of bifunctional theranostic molecules for cancer treatment*, Th : bio. : Grenoble : 2016) ont montré que des nanoparticules présentant des ligands –RGD- et ATWLPPR pouvaient induire la phosphorylation d'AKT mais aussi de GSK3β et eNOS. Les signalisations de ERK1/2 et Src, impliquées dans la prolifération, la survie et l'angiogenèse, sont d'autres exemples de protéines qu'il serait intéressant d'étudier dans ce contexte.

L'étude biochimique de l'influence de nos composés sur les cellules U87MG semble confirmer l'hypothèse d'un complexe formé entre les composés de double ciblage et les récepteurs Neuropiline-1 et Intégrine $\alpha v\beta_3$. Elle est renforcée par deux observations :

La quantité de Neuropiline-1 détectée est maintenue voire augmentée en présence des composés de double ciblage. Cet effet pourrait découler d'un blocage de l'internalisation induit par l'ancrage du complexe dans la membrane cellulaire.

Les molécules combinées maintiennent un taux de protéines AKT et pAKT plus élevé que les ligands séparés. Cet effet pourrait être la conséquence d'une séquestration d'AKT dans un complexe sub-membranaire.

iv. *In cell ELISA test.*

Plusieurs faisceaux d'indices, issus de la microscopie confocale et des Western Blot semblent indiquer la formation d'un complexe entre les composés de double ciblage R(RGD)-PEG_{24}ATW ou R(RGD)-R(ATW) et les deux récepteurs ciblés que sont l'Intégrine $\alpha v\beta_3$ et la Neuropiline-1.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons voulu déterminer à l'aide d'une technique différente du Western Blot, la quantité de récepteurs Neuropiline-1 membranaires exprimés par les cellules U87MG après 30min d'incubation avec nos composés. Nous avons utilisé le kit « In cell ELISA test » (ThermoFisher®).

Le principe de ce test est de déposer des cellules dans les puits d'une plaque 96 puits et de les traiter avec différents composés. L'avantage des plaques est de pouvoir tester beaucoup de conditions en même temps. La combinaison d'un anticorps I^{aire} anti-NRP1 et d'un anticorps II^{aire} fonctionnalisé par la HRP (Horse Raddish Peroxydase) permet de déterminer, en analysant la fluorescence émise, les quantités relatives de Neuropiline-1 exprimées. L'analyse de fluorescence des cellules **non traitées par l'anticorps I** permet de déterminer l'absorbance **non spécifique** due à l'anticorps II^{aire}, tandis qu'un Janus test permet de quantifier le nombre de cellules par puits donc de normaliser les absorbances détectées (fig. 119).

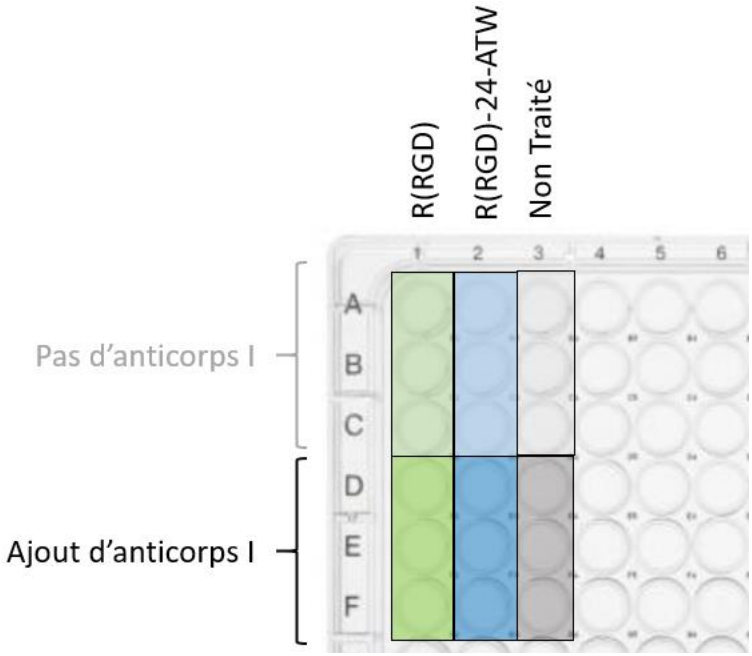


Figure 119 - Schéma de l'expérience "in cell ELISA test". Répartition des conditions d'expérience. L'anticorps I^{aire} n'est pas utilisé pour chaque condition. L'anticorps II^{aire} est utilisé pour chaque condition.

a. Résultats

Les cellules sont incubées avec le composé RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5 (1µM), ou RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5-PEG$_{24}$ATWLPPR (1µM), ou uniquement du PBS. La valeur d'absorbance obtenue suite aux incubations avec les anticorps I^{aire} puis II^{aire} est proportionnelle à la quantité de NRP1 présente sur les membranes cellulaires (fig. 120).

Les fluorescences de l'anticorps secondaire lues à 450nm (Tableau 7) et celles du Janus test lues à 615nm (Tableau 8) sont présentées ci-dessous. Une valeur (en rouge) relevée durant le Janus test semble être une erreur expérimentale.

	DMEM		
	RAFT	PEG24	NT
SANS ANTICORPS	*0,113*	*0,119*	*0,110*
	0,099	*0,122*	*0,110*
	0,092	*0,106*	*0,094*
AVEC ANTICORPS	***0,265***	***0,396***	***0,349***
	0,300	***0,329***	***0,294***
	0,271	***0,319***	***0,316***

Tableau 7 -Absorbances lues à 450nm pour la détection de Neuropiline-1

	DMEM		
	RAFT	PEG24	NT
SANS ANTICORPS	*0,063*	*0,065*	*0,073*
	0,065	*0,069*	*0,07*
	0,088	*0,083*	*0,065*
AVEC ANTICORPS	***0,069***	***0,063***	***0,065***
	0,07	***0,13***	***0,073***
	0,068	***0,069***	***0,069***

Tableau 8 - Absorbances lues à 615nm, pour évaluer le nombre de cellules par puits

Les valeurs d'absorption obtenues à 450nm sont divisées par celles obtenues à 615nm (normalisation). Puis, les valeurs d'absorbance obtenues ***sans*** *anticorps I*, qui correspondent donc à une fluorescence non spécifique, sont soustraites aux valeurs obtenues ***avec*** *anticorps I*. Les résultats obtenus sur les triplicatas sont moyennés et présentés dans le tableau 9.

	DMEM		
	RAFT	PEG24	NT
Absorbance normalisée spécifique	*2,58*	*3,83*	*3,15*
Ratio des absorbances (ref = NT)	**82%**	**122%**	**100%**

*Tableau 9 - Valeurs d'absorption **normalisées** et **spécifiques** du récepteurs NRP1 pour des cellules U87MG après différents traitements*

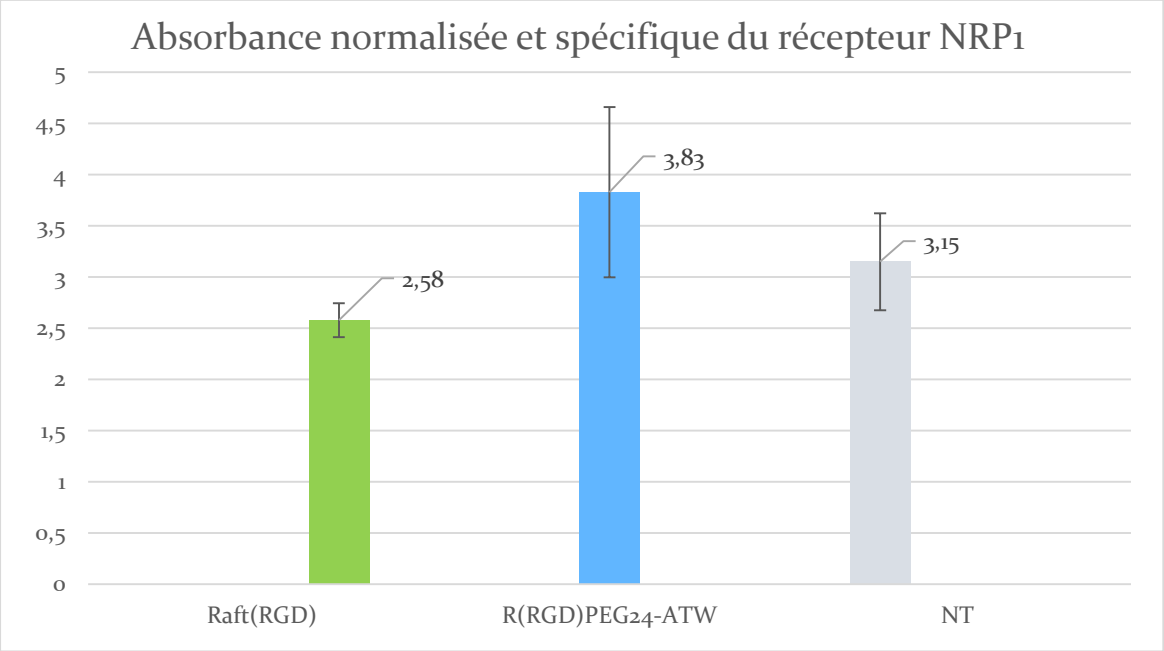


Figure 120 - Valeurs d'absorbances normalisées et spécifiques de l'expression du récepteur NRP1 par les cellules U87MG après traitement.

b. *Analyse des résultats et discussion*

Les expériences de microscopie confocale et de Western Blot nous ont permis d'émettre l'hypothèse qu'un complexe Intégrine / Molécule double ciblage / NRP1 pouvait se former au niveau des membranes cellulaires. Mais en Western Blot, les récepteurs NRP1 détectés sont les récepteurs à la fois membranaires et intracellulaires. **Avec l'expérience « In Cell Elisa Test », nous détectons uniquement les récepteurs membranaires** puisque les cellules n'ont pas été perméabilisées.

Il s'avère que l'absorbance détectée est plus élevée pour une incubation avec le composé de double ciblage R(RGD)Cy5.5-PEG$_{24}$ATWLPPR (fig. 120). L'absorbance obtenue avec les cellules non traitées est intermédiaire et celle obtenue avec R(RGD)Cy5.5 est la plus faible. La présence du composé de double ciblage augmente donc la quantité de récepteurs NRP1 membranaires détectée. Cette augmentation est de 22% par rapport aux cellules non traitées (Tableau 9). En revanche, l'incubation avec le R(RGD)Cy5.5 provoque une diminution de 18% de l'absorbance détectée.
La quantité plus importante de récepteurs Neuropiline-1 détectés au niveau de la membrane cellulaire est compatible avec l'hypothèse de la formation d'un complexe entre les molécules de double ciblage RGD/ATW et les récepteurs Intégrine $\alpha v\beta_3$ et Neuropiline-1. Il serait néanmoins intéressant de répéter cette expérience en testant d'avantage de composés, et en utilisant des temps d'incubation plus ou moins longs (étude cinétique), pour voir notamment si le recyclage des récepteurs NRP1 est ralenti en présence de molécules de double ciblage par rapport au ligand ATWLPPR seul par exemple.

La quantité de Neuropiline-1 détectée à la surface des cellules U87MG est plus importante après une incubation avec le R(RGD)Cy5.5-PEG$_{24}$ATWLPPR qu'avec R(RGD)Cy5.5 ou l'absence de traitement. Cette observation est compatible avec l'hypothèse d'un complexe ancré dans la membrane.

V. *Conclusion des tests in vitro*

Les vecteurs synthétisés pour le projet de double ciblage des récepteurs Intégrine $\alpha v\beta_3$ et Neuropiline-1 ont été testés *in vitro* sur des cellules U87MG car elles expriment les deux récepteurs. Des expériences de cytométrie, microsocpie, Western Blot et test ELISA sur cellule ont été réalisés.

Les tests de cytométrie ont donné des résultats incohérents et une reproductibilité contestable. En effet, les différentes expériences révèlent que le vecteur RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5, dont les ligands c-[RGDfK] sont spécifiques de l'intégrine $\alpha v\beta_3$, est le composé ayant le plus d'affinité pour les cellules, quelle que soit la lignée cellulaire. Pourtant, certaines de ces cellules expriment peu ou pas l'intégrine $\alpha v\beta_3$. Il apparait donc qu'un effet non spécifique soit dominant. Ces résultats contradictoires pourraient être dus à un protocole mal adapté (cellule en suspension au lieu d'être adhérentes, concentrations utilisées trop élevées).

Les autres tests *in vitro* se sont montrés concluants et tendent vers une conclusion commune. En microscopie, on observe que le vecteur RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5 marque les cellules U87MG de façon plus importante que tout autre composé. La fluorescence est détectée au niveau dans la membrane et dans le cytoplasme. Les vecteurs qui présentent à la fois des ligands c-[RGDfK] et ATWLPPR donnent une fluorescence importante, mais très majoritairement concentrée au niveau de la membrane cellulaire. Nous expliquons cette accumulation préférentielle par la formation d'un complexe Intégrine $\alpha v\beta_3$ / vecteur / Neuropiline-1 qui resterait ancré dans la membrane cellulaire. Des tests de compétition avec des ligands de l'Intégrine $\alpha v\beta_3$ et/ou de la Neuropiline-1 pourraient déterminer si oui ou non il est question d'un engagement conjoint des deux récepteurs dans une interaction avec le composé.

Les analyses de Western Blot et de test ELISA sur cellules confirment respectivement une accumulation globale et une accumulation membranaire du récepteur Neuropiline-1

lorsque les cellules U87MG sont incubées avec le composé RAFT(4-RGD)Cy5.5-PEG_{24}ATWLPPR.

Il se pourrait que ce complexe séquestre AKT et prolonge la phosphorylation d'AKT qui est favorable à la survie de la cellule. Néanmoins, cette phosphorylation est moins importante que pour les cellules non traitées. Enfin, la co-injection des ligands individuels c[RGDfK] et ATWLPPR n'engendre pas du tout les mêmes effets, que ce soit en termes d'intensité et de localisation de marquage des cellules, ou en termes de signalisation.

Ces résultats semblent donc indiquer que la présentation simultanée des ligands ATWLPPR et c[RGDfK] par un même vecteur présente un réel intérêt. La perspective de former un complexe entre la molécule et les deux récepteurs visés prouve d'une part qu'une telle proximité des récepteurs est possible, ce qui renforce encore un peu plus la théorie d'un cross-talk possible entre l'intégrine $\alpha v\beta_3$ et la Neuropiline-1. D'autre part, la complexation et l'immobilisation des vecteurs doublement ciblés au niveau de membranes cellulaires exprimant à la fois l'intégrine $\alpha v\beta_3$ et la Neuropiline-1 nous laisse espérer que cet effet sera toujours valable *in vivo* et que nos molécules seront favorablement accumulées au niveau de la périphérie tumorale, à la frontière entre la tumeur et son environnement sain (cellules endothéliales, matrice extracellulaire), où ces deux récepteurs sont souvent surexprimés.

B. Tests biologiques *in vivo* et *ex vivo*

i. *Imagerie optique in vivo*

Après avoir étudié l'activité biologique *in vitro* de nos composés, nous avons voulu tester leur efficacité en tant que marqueurs fluorescents pour l'imagerie optique de tumeurs. Pour cela, nous avons généré des tumeurs orthotopiques de glioblastome (U87MG) en sous cutané chez des souris nude. Nous avons injecté nos composés et avons réalisé des clichés d'imagerie optique à différents temps après injection.

Des cellules U87MG sont cultivées avant d'être injectées en sous cutané chez des souris nude. Après trois semaines, les souris ont développé des tumeurs orthotopiques sous-cutanées de glioblastome.
Des injections par voie codale de 10nmol de composé dans 200µl de sérum physiologique (50µM) sont réalisées. Les souris ont été divisées en cinq groupes (tableau 10). Chaque groupe s'est vu injecter un composé différent (composé **1**, **2**, **3**, **4** ou **7**). Les images sont prises à t=1h et t=3h, t=5h, et t=24h après injection.

Composé Injecté	R(RGD) **1**	R(RGD)-24-ATW **7**	R(RAD) **2**	Cy5.5-scble **4**	Cy5.5-ATW **3**
Souris N°	S1 à S6	S7 à S12	S13 à S15	S16 à S18	S19 à S20
N° du Groupe	I	II	III	IV	V

Tableau 10 - Numérotation des souris en fonction des conditions expérimentales

Les souris S1 à S3 et S7 à S9 ont été sacrifiées 5h après injection tandis que les autres ont été sacrifiées à 24h post-injection. Le plan d'expérience est schématisé ci-dessous (fig.121). Après sacrifice, la fluorescence des organes est analysée. Des coupes histologiques des tumeurs ont ensuite été réalisées et analysées en microscopie et microscopie confocale de fluorescence.

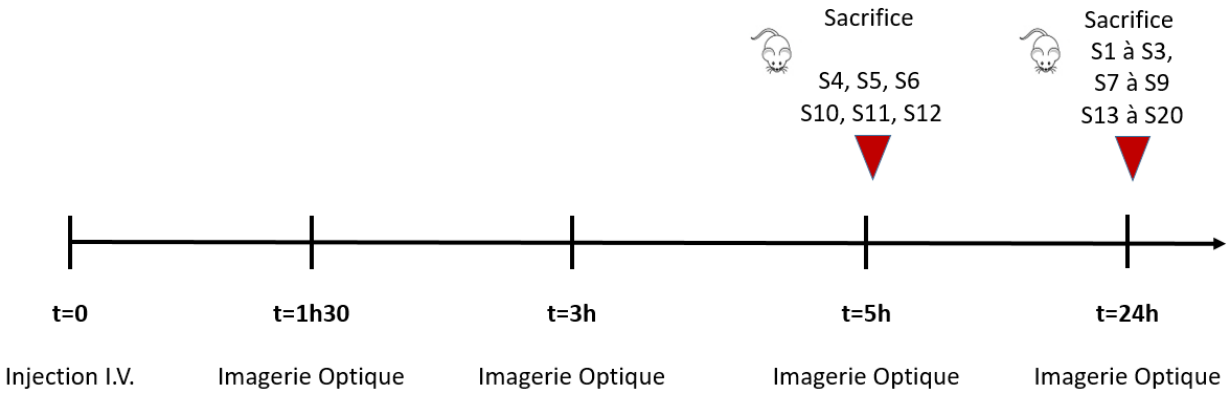


Figure 121 - Plan d'expérience in vivo

a. Résultats.

Les images d'une souris pour chaque groupe, obtenues à t=1h30, 5h et 24h post-injection sont présentées dans cette partie.

t=1h30

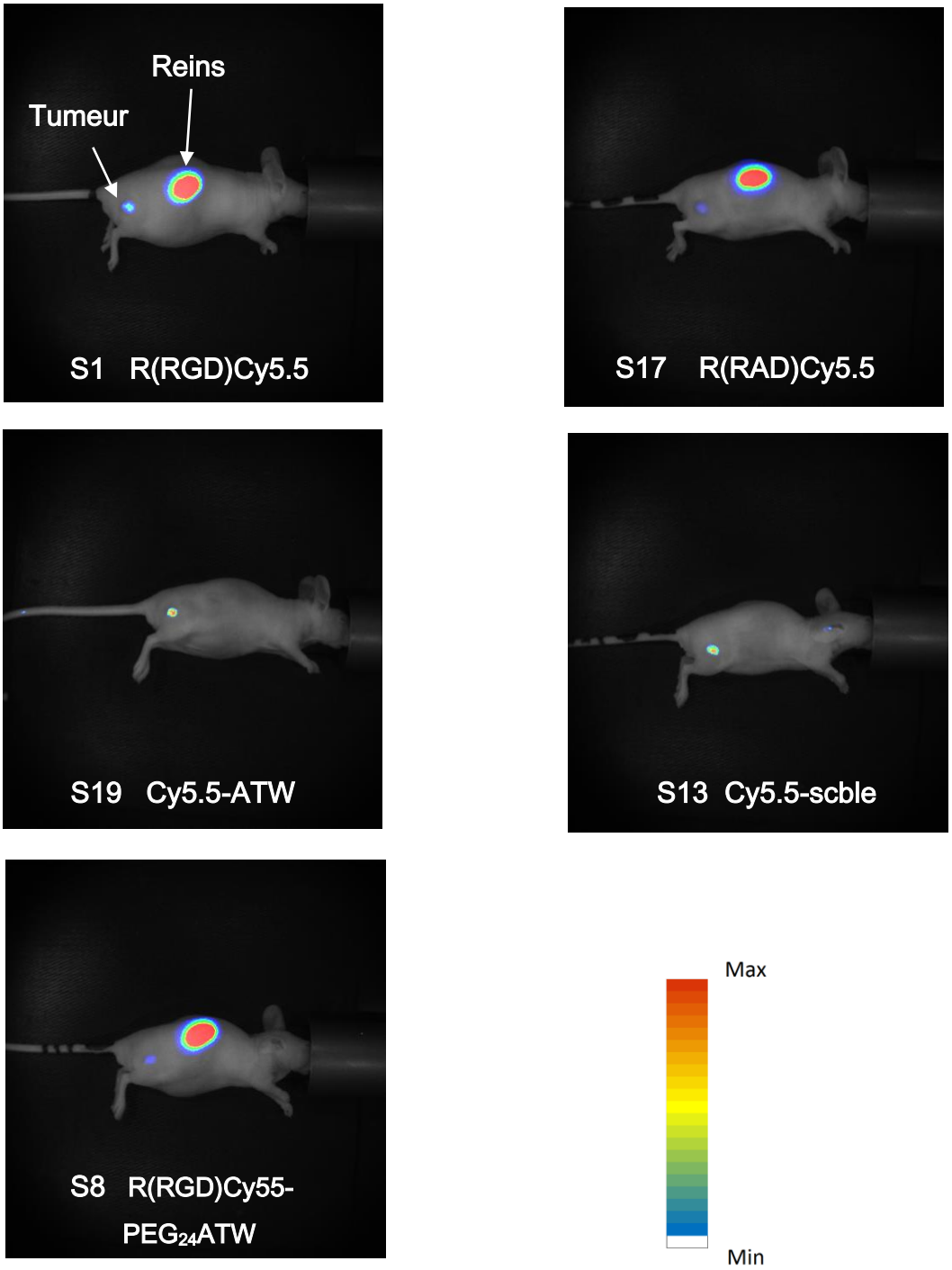


Figure 122 - Emissions de Fluorescence relevées avec l'Hamamatsu 1h30 après injection

t=5h

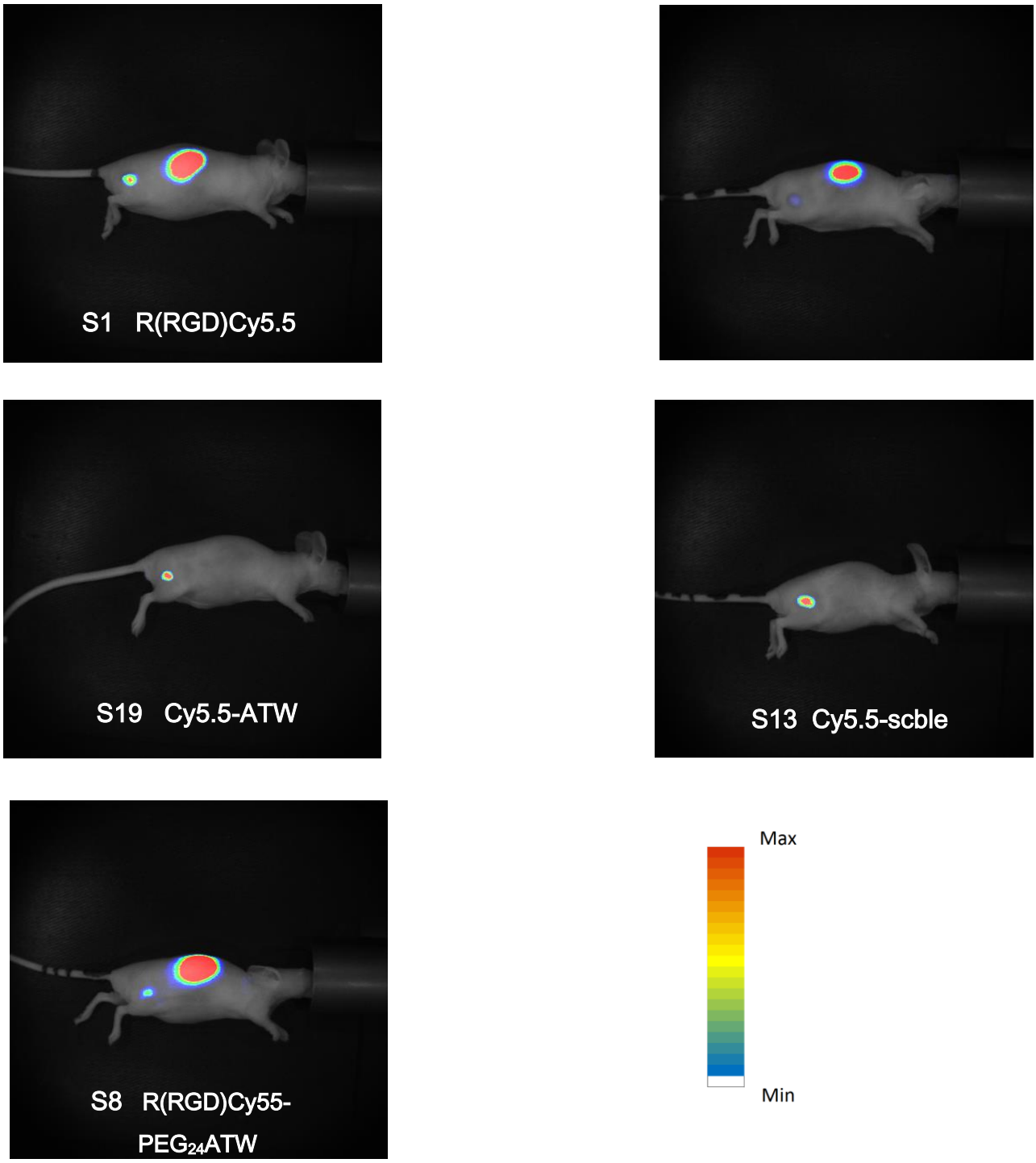


Figure 123 - Emissions de Fluorescence relevées avec l'Hamamatsu 5h après injection

t=24h

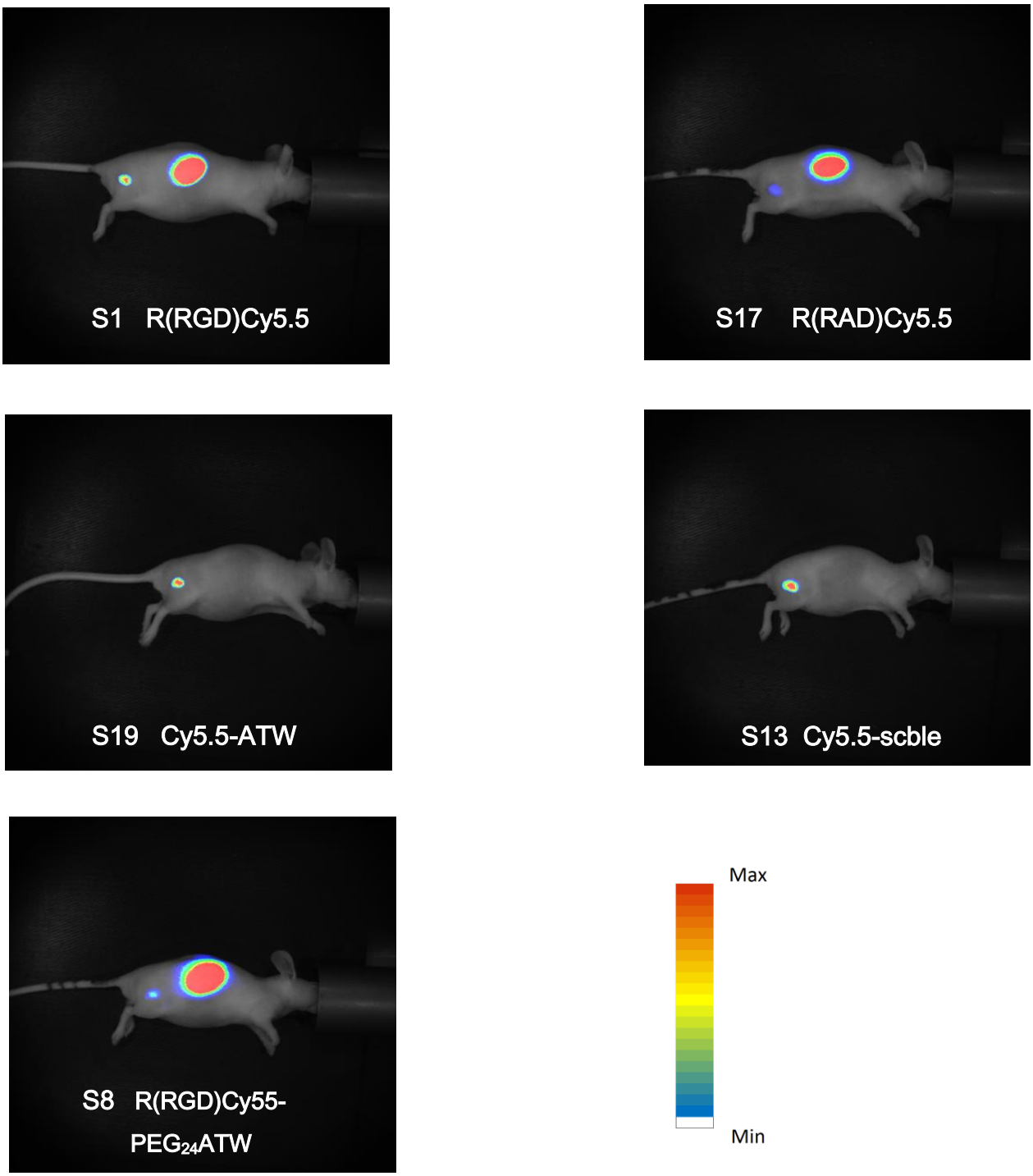


Figure 124 - Emissions de Fluorescence relevées avec l'Hamamatsu 24h après injection

Les graphes suivants (fig. 125 à 129) représentent sous forme d'histogrammes les fluorescences mesurées au niveau de la tumeur et de la peau (échelle de gauche) à différents temps après injection. Le ratio entre ces deux valeurs est reporté sous forme de points (courbe rouge, échelle droite). La Fig . 130 regroupe l'ensemble des données.

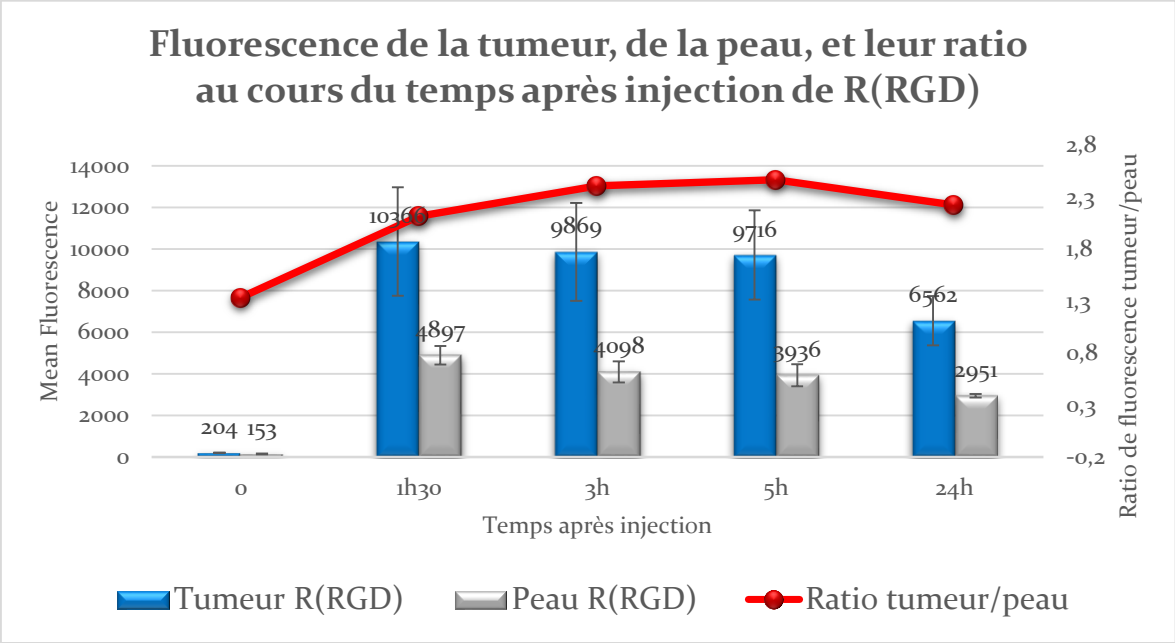


Figure 125 - Suivi de fluorescence et ratio tumeur/peau pour RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5

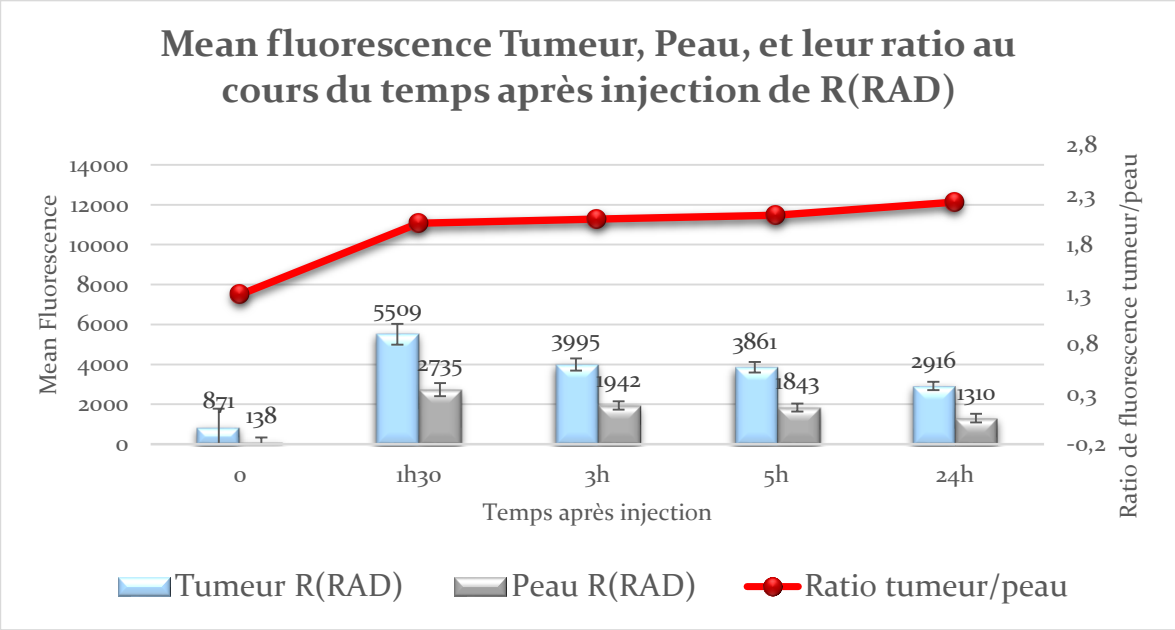


Figure 126 - Suivi de fluorescence pour RAFT(4-c[RADfK])Cy5.5

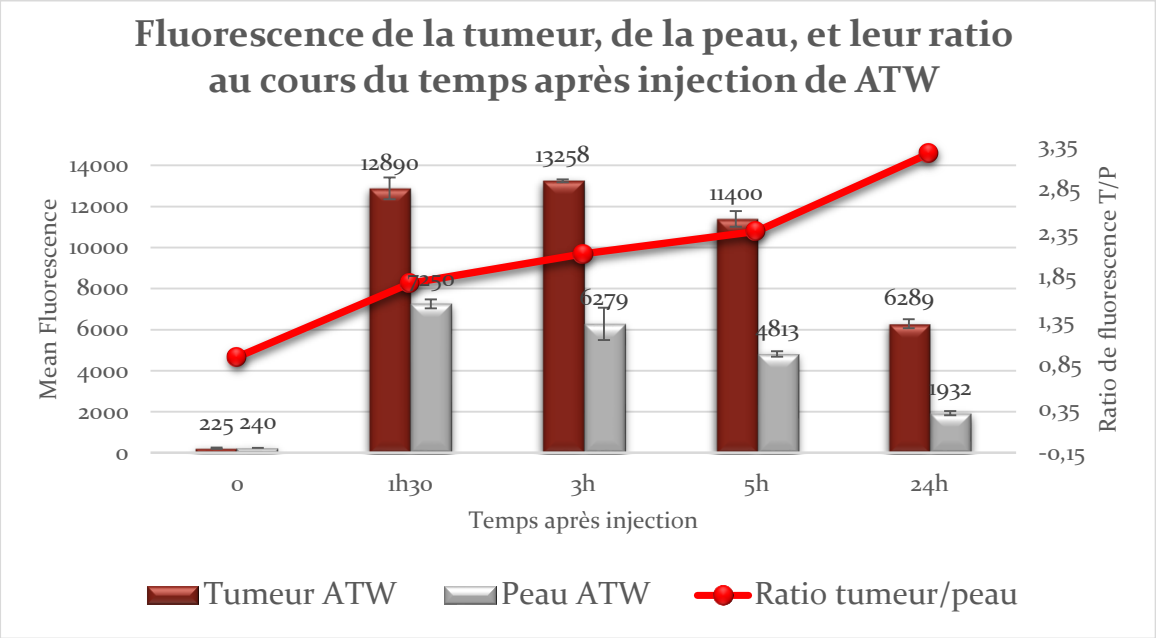


Figure 127 - Suivi de fluorescence pour Cy5.5-Ahx-ATWLPPR

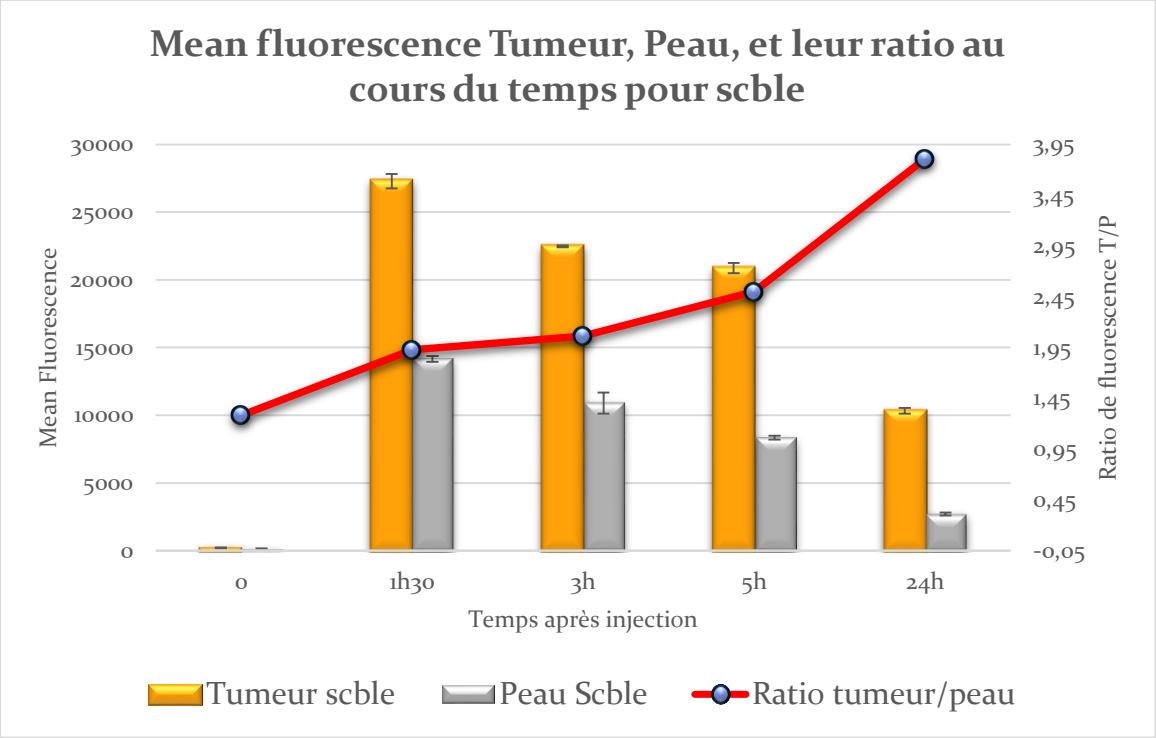


Figure 128 - Suivi de fluorescence pour Cy5.5-Ahx-scramble

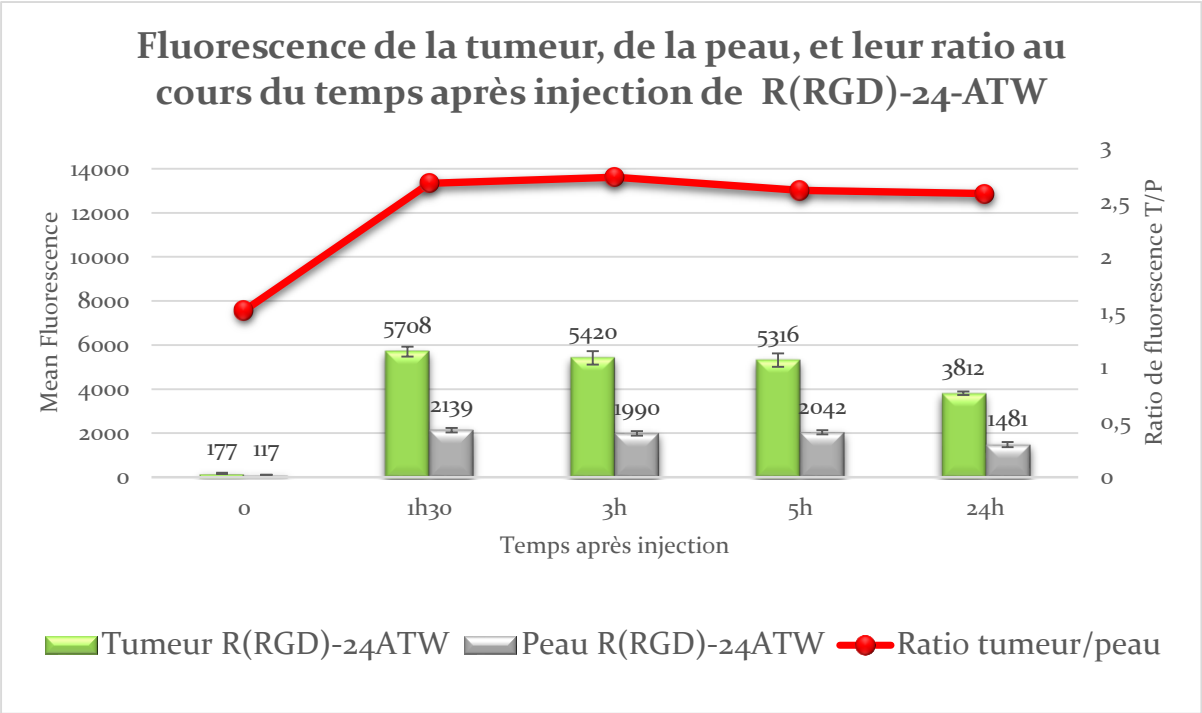


Figure 129 – Suivi de fluorescence pour R(RGD)-Cy5.5-PEG$_{24}$ATWLPPR

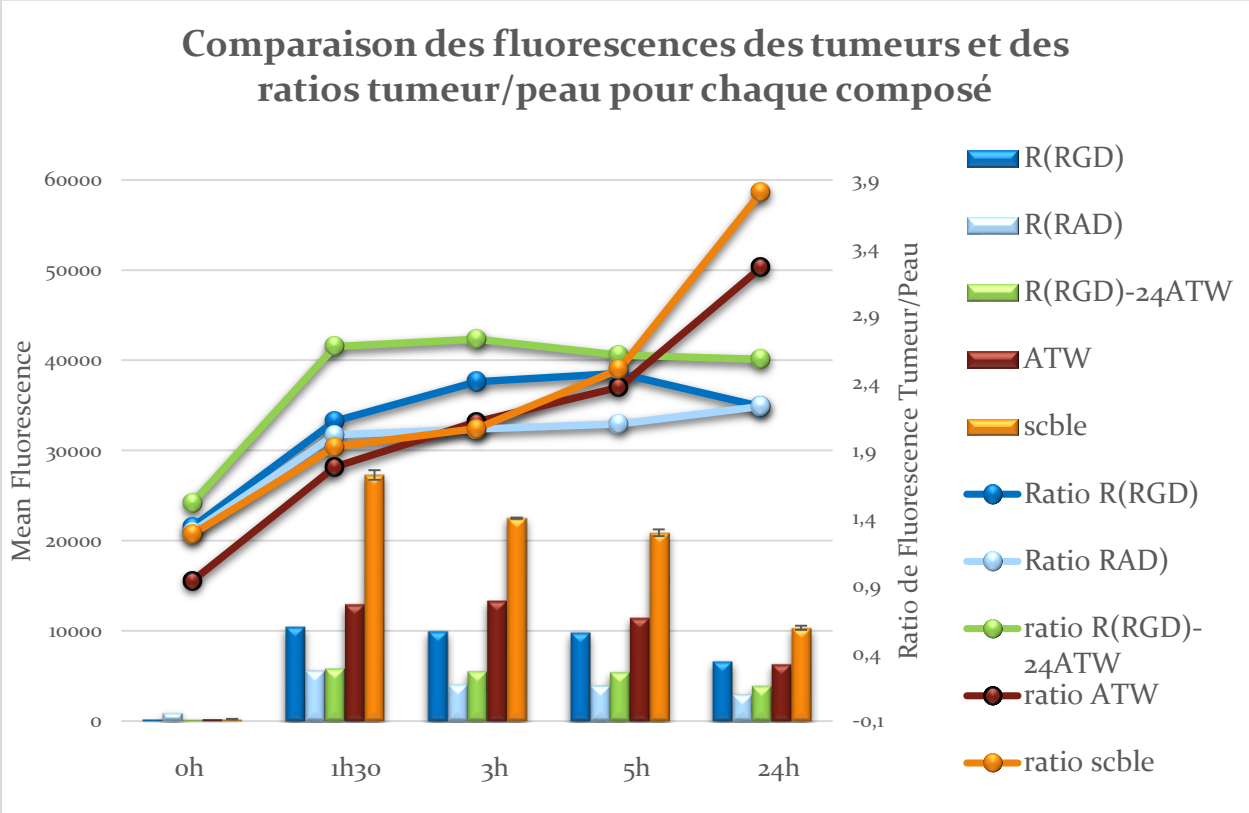


Figure 130 - Comparaison des fluorescences des tumeurs et des ratios tumeur/peau pour tous les composés testés in vivo, à différents temps après injection

b. Analyse des résultats et discussions

- **Analyse qualitative des clichés d'imagerie optique**

Sur les clichés de souris obtenus par imagerie optique (fig. 122 à 124) on observe de façon qualitative que pour tous les composés les fluorescences sont plus intenses à t=5h ou t=24h plutôt qu'à t=1h30. Le composé R(RGD) permet d'obtenir une très bonne fluorescence de la tumeur. **Le composé de double ciblage R(RGD)-24-ATW permet lui aussi de distinguer clairement la tumeur, ce qui est un résultat positif pour notre projet**. Néanmoins, le composé contrôle R(RAD) donne lui aussi une fluorescence notable de la tumeur, qui indique **donc une part de ciblage non sélectif pour les trois composés cités**. Ce dernier est certainement dû aux nombreuses charges des molécules.

De plus, les clichés permettent également de voir qu'une très grande fluorescence est émise au niveau des reins pour ces composés, alors que ce n'est pas le cas pour les souris ayant reçu le ATW ou son Scramble. Et cette observation est valable pour l'ensemble des souris des groupes I, II et III. **Il apparait donc que le châssis peptidique entraîne une rétention rénale**. Cette caractéristique avait déjà été observée par notre équipe, mais dans une moindre mesure.[206] La lignée utilisée pour la xénogreffe était différente et surtout, la Cyanine utilisée ne comportait pas 4 fonctions sulfate. Il se pourrait donc que les quatre charges négatives supplémentaires accentuent la rétention rénale. Il est aussi possible que la dose injectée (10nmol) soit élevée au point de saturer les récepteurs Intégrine $\alpha v\beta_3$ et de générer une plus grande quantité de molécules circulantes qui sont éliminées par voie rénale et s'accumulent donc dans les reins. Une expérience avec différents dosages administrés pourrait répondre à cette hypothèse.

De manière surprenante, **les meilleurs résultats en termes de spécificité et de contraste sont obtenus avec ATW et le Scramble**. En effet, pour les souris S13 et S19, la fluorescence est localisée uniquement au niveau de la tumeur, et de façon très intense. Cela dénote une accumulation accrue des composés au niveau la tumeur. Néanmoins,

cette accumulation semble non spécifique. Du moins, elle n'est vraisemblablement pas spécifique du récepteur Neuropiline-1 puisque le contrôle négatif Scramble possède la même précision de ciblage que ATW, et donne même des fluorescences plus élevées, alors que ce composé n'est pas censé interagir avec Neuropiline-1. Certes il se pourrait que la conjugaison du fluorophore Cy5.5 possédant quatre charges négatives induise un repliement des molécules Cy5.5-AHx-ATWLPPR et Cy5.5-AHx-LWRPTPA (Scramble). Ce repliement pourrait diminuer l'affinité du ligand ATWLPPR pour NRP1 et/ou augmenter celle du Scramble pour NRP1 (notamment en exposant le motif arginine qui est primordial pour l'interaction avec le récepteur). Des études de modélisation pourraient apporter une réponse. Mais les résultats obtenus en Western Blot (Fig. 118) suggèrent que le composé Cy5.5-Ahx-ATWLPPR et son Scramble n'ont pas les mêmes effets biologiques (voire pAKT). Ils semblent confirmer que le Scramble n'interagit pas avec NRP1, et ce malgré de possibles changements de conformation.

Ainsi, les explications possibles pour justifier une telle spécificité pour la tumeur est soit que les composés Cy5.5-ATW et Cy5.5-scramble interagissent avec un récepteur tumoral non identifié, soit que **le ciblage obtenu est passif, non spécifique**, ce qui est plus vraisemblable. Le bon équilibre entre poids moléculaire, charges positives (notamment l'arginine) et charges négatives (les fonctions sulfates), ainsi qu'une bonne balance hydrophilicité/lipophilicité permettrait d'assurer une très bonne biodistribution aux composés, qui sont alors accumulés de façon passive dans la tumeur dont les besoins nutritifs sont plus importants que ceux des tissus sains. Pour confirmer ces hypothèses, il serait utile d'effectuer un Ala scan sur ces deux composés, de même que réduire leur taille ou les allonger et étudier leur effet *in vivo*. Enfin, il est possible que les composés soient rapidement dégradés et qu'un fragment majoritairement composé du motif Cy5.5 tétrasulfaté engendre les résultats observés. Nous avons récolté et analysé les urines en UHPLC pour vérifier cette possibilité mais sans succès. Aucun composé spécifique n'a pu être identifié. Néanmoins, la fluorescence induite par le fluorophore Cy5.5 tétrasulfaté pour des xénogreffes de sarcome de Kaposi a déjà été étudiée auparavant, et le marquage tumoral obtenu était faible.[245]

- **Analyse quantitative des clichés d'imagerie optique**

Les observations qualitatives faites à partir des clichés d'imagerie optique peuvent être confirmées de façon quantitative en analysant les valeurs de fluorescence par informatique. Les fluorescences détectées au niveau de la tumeur et sur la peau des souris ont été analysées pour chaque souris, puis les valeurs moyennes obtenues pour chaque groupe ont été présentées sur des graphes individuels (Fig 125 à 129). Les ratios de fluorescence tumeur/peau sont également indiqués.

Pour l'ensemble des composés, on remarque que la fluorescence émise au niveau du site tumoral est plus importante dans les premières heures. Mais c'est aussi le cas de la peau. Au fur et à mesure du temps écoulé après injection, les composés fluorescents sont éliminés par l'organisme des souris et les niveaux de fluorescence diminuent. Les composés sont plus retenus par la tumeur que par la peau, ce qui engendre une **augmentation du ratio de fluorescence tumeur/peau** au cours du temps, et ce pour chaque groupe de souris. Ainsi, la fenêtre d'utilisation optimale du R(RGD) est aux alentours de 5h (fig. 125), celle du R(RGD)-PEG_{24}ATW est aux alentours de 3h (fig. 129), tandis que celle des composés ATW et Scramble est obtenue à t=24h après injection (fig. 127 et 128). Au vue de leurs courbes, il semblerait que ce ratio puisse encore augmenter au cours du temps.

La réunion des données de fluorescence et de ratio sur un même graphique (Fig. 130) permet de distinguer clairement que les fluorescences relevées au niveau des tumeurs sont bien plus élevées pour les molécules ATWLPPR et Scble. La fluorescence du composé R(RGD) est malgré tout très élevée elle aussi. On peut voir que celle du R(RGD)-PEG_{24}ATW est moins élevée, bien qu'elle conserve un niveau très satisfaisant. En revanche, elle est peu supérieure à celle du R(RAD), qui donne une fluorescence importante malgré que son accumulation soit non spécifique. Du point de vue du ratio tumeur/peau, le composé de double ciblage R(RGD)-PEG_{24}ATW est intéressant puisqu'il

est supérieur au R(RGD) dès les premières heures (r= 2,67 et 2,12 respectivement), et qu'il semble se maintenir à 24h quand celui du R(RGD) décroit.

Il s'avère qu'obtenir une fluorescence importante est nécessaire. Mais combiné à une fluorescence satisfaisante, le contraste est encore plus important puisque c'est lui qui permettra au chirurgien de distinguer clairement les parties à retirer ou non. **De ce point de vue, le composé de double ciblage R(RGD)-PEG$_{24}$ATW est satisfaisant, avec un ratio allant jusqu'à 2,72 ± 0,14.** Ce ratio étant plus élevé que celui du R(RGD), on peut espérer que cela témoigne d'une plus grande spécificité du composé de double ciblage pour la tumeur, et que cette spécificité serait conférée par le ligand ATWLPPR qu'il présente en plus des ligands RGD.

Il est difficile de comparer les intensités de fluorescence avec la littérature à cause des différences dans les doses administrées et les appareillages utilisés. En revanche, il est possible de comparer les ratios de fluorescence. Et les ratios obtenus pour l'ensemble de nos composés, compris entre 2 et 3 pour les composés avec châssis moléculaire et allant jusqu'à 3,8 pour les autres, sont conformes à ceux trouvés dans la littérature (fig. 130). En effet, les meilleurs ratios que nous avons pu trouver sont, à notre connaissance, d'une valeur proche de 3. Ils sont obtenus en imagerie optique, pour des xénogreffes de glioblastome (cellules U87MG), à l'aide de composés comportant des motifs –RGD- et un fluorophore de la famille des Cyanine[242,244,277] Les mêmes ordres de grandeurs sont obtenus pour des sarcome de Kaposi.[278]

ii. *Analyses ex vivo après sacrifice des souris*

Après avoir réalisé les études d'imagerie optique pendant 24h, les souris sont sacrifiées puis disséquées. Les organes sont analysés selon le même procédé que pour l'imagerie *in vivo*. Des coupes histologiques des tumeurs sont ensuite réalisées et analysées.

a. Résultats

Les ratios de fluorescence Tumeur/Peau et Tumeur/Muscle sont importants pour évaluer le contraste procuré par les molécules dans les tumeurs. Le diagramme suivant (fig. 131) est obtenu à partir des fluorescences mesurées pour les organes *ex vivo* après que les souris aient été sacrifiées (fig. 132).

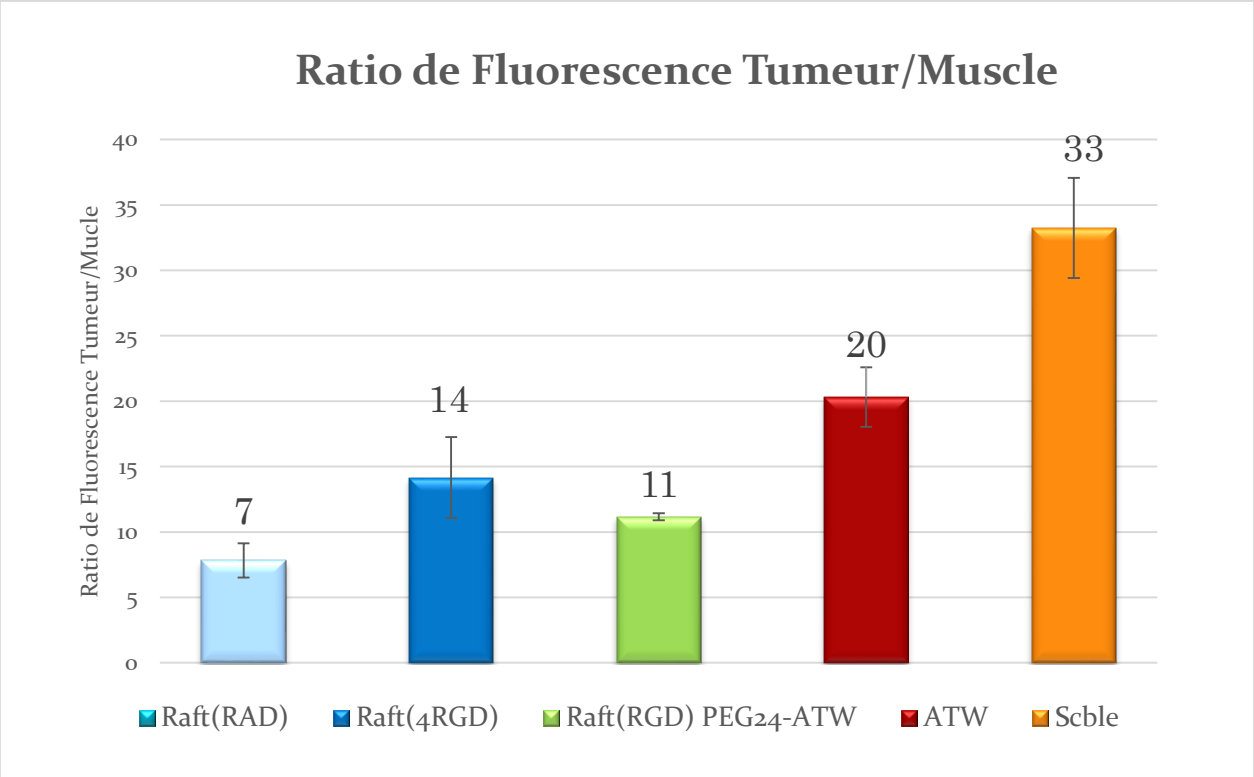


Figure 131 - Ratios moyens des fluorescences mesurées pour la tumeur et le muscle pour chaque groupe de souris, en fonction du composé injecté

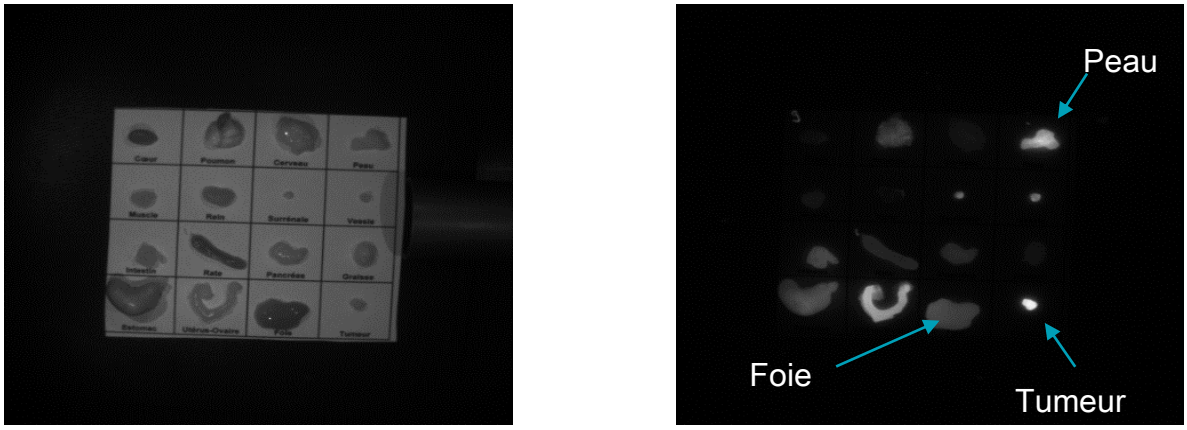


Figure 132 - Exemple d'analyse par imagerie optique de la fluorescence des organes pour la souris S9

Lors des mesures de fluorescence des organes, nous avons parfois dû enlever le rein, qui saturait le signal. Les intensités de fluorescence des organes en fonction des composés injectés sont réunies dans le graphe suivant. Il permet de vérifier que l'accumulation des composés est spécifique à la tumeur et atteint peu les autres organes hormis les reins (fig. 133).

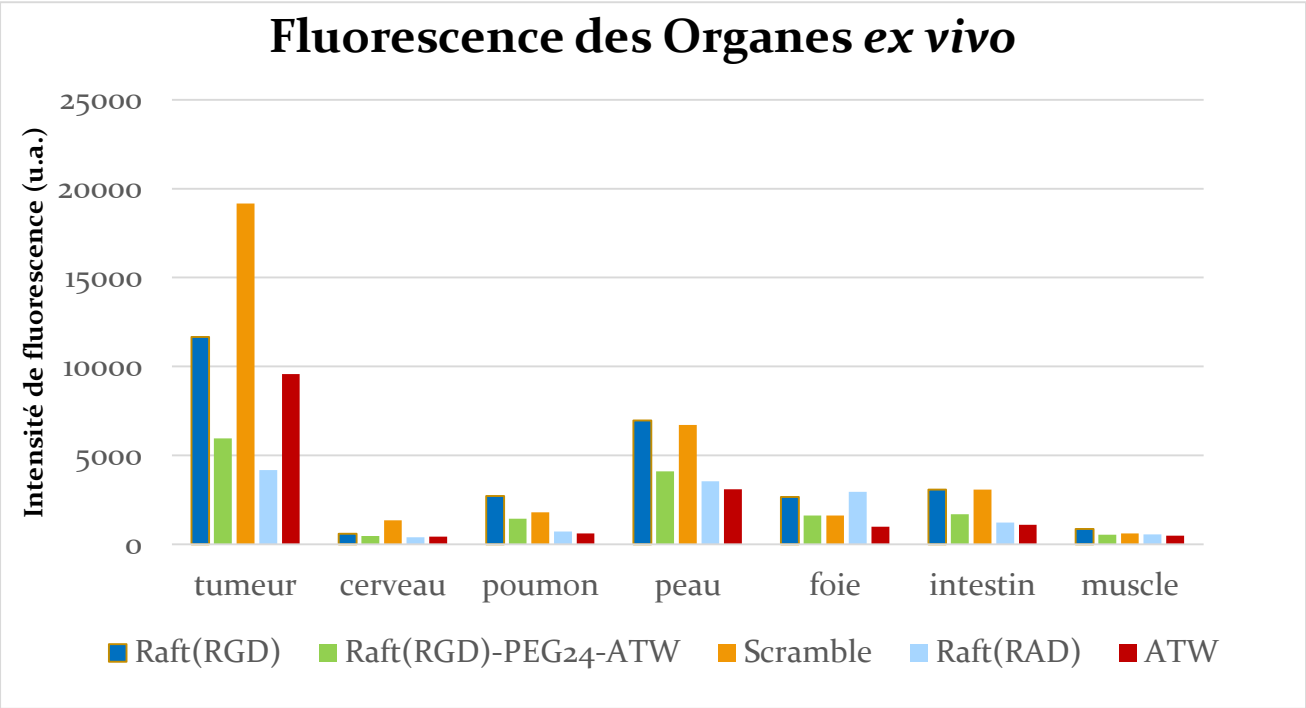


Figure 133 - Fluorescence des organes ex vivo mesurées en imagerie optique (Hamamastu)

Après avoir analysé la fluorescence des organes, les tumeurs sont conditionnées dans l'OCT (une matrice qui permet de congeler les tissus tout en conservant leur intégrité) puis congelées. Ces tumeurs sont ensuite sectionnées en coupes fines de 7µM. Les coupes ont été réalisées sur les bords et au centre des tumeurs. Les coupes histologiques sont traitées avec de l'hématoxiline et de l'éosine dans un cas, pour une observation au microscope (fig. 134). Dans l'autre cas, elles sont traitées avec du DAPI (détection des noyaux) et sont analysées en microscopie confocale pour étudier la répartition de la fluorescence (fig. 135 à 139).

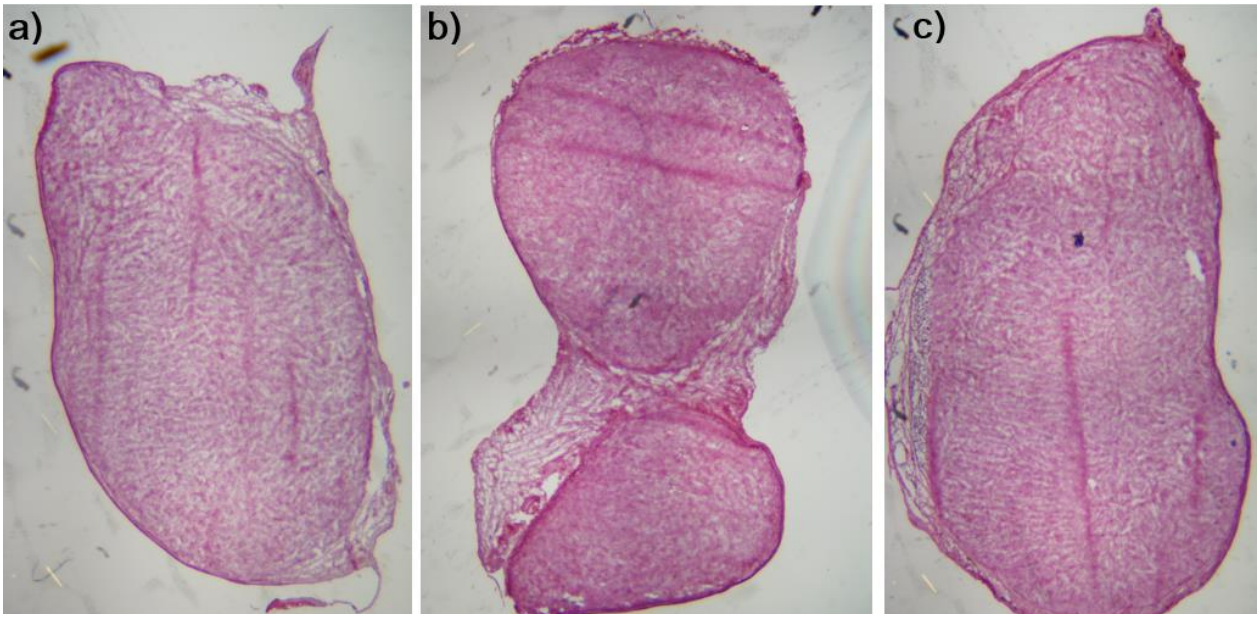


Figure 134 – Observation au microscope de coupes histologiques de tumeurs après traitement par a) RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5, b) RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG$_{24}$ATWLPPR, c) Cy5.5-Scramble

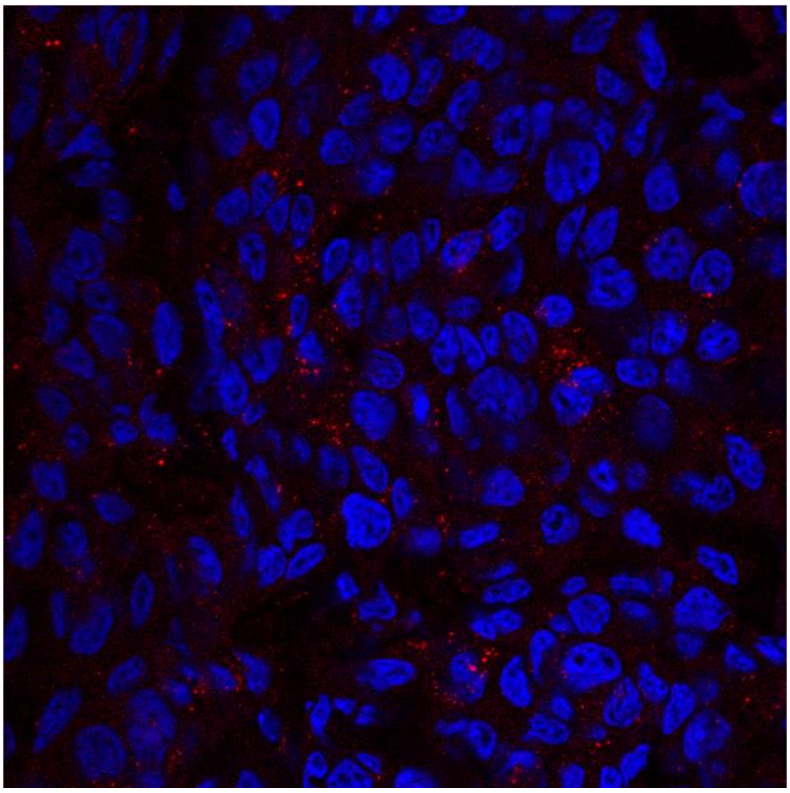


Figure 135 - Analyse de fluorescence d'une coupe de tumeur traitée par Cy5.5-Ahx-ATWLPPR

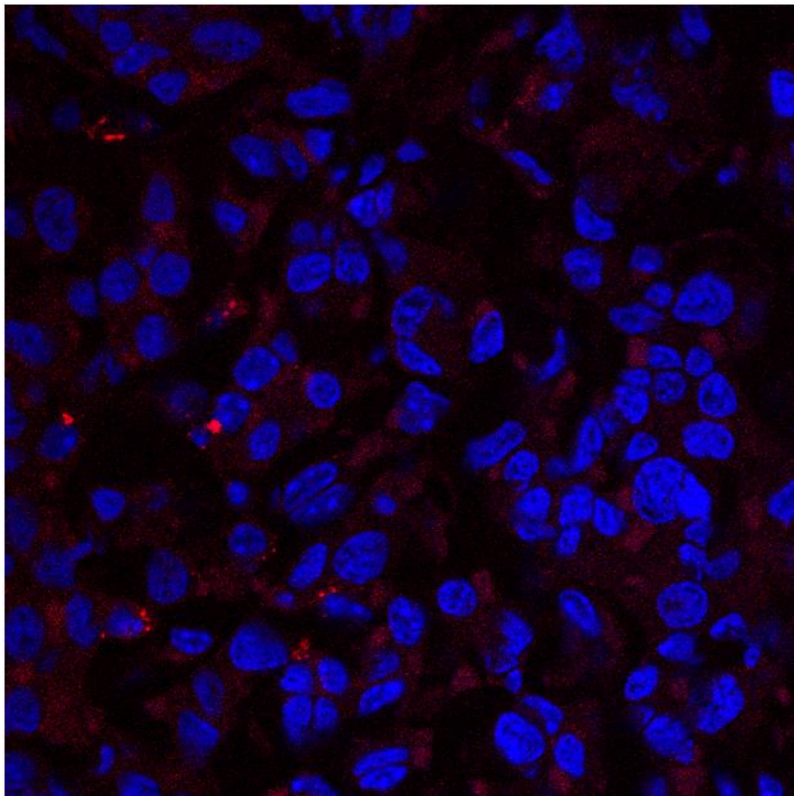


Figure 136 - Analyse de fluorescence d'une coupe de tumeur traitée par Cy5.5-Ahx-scramble

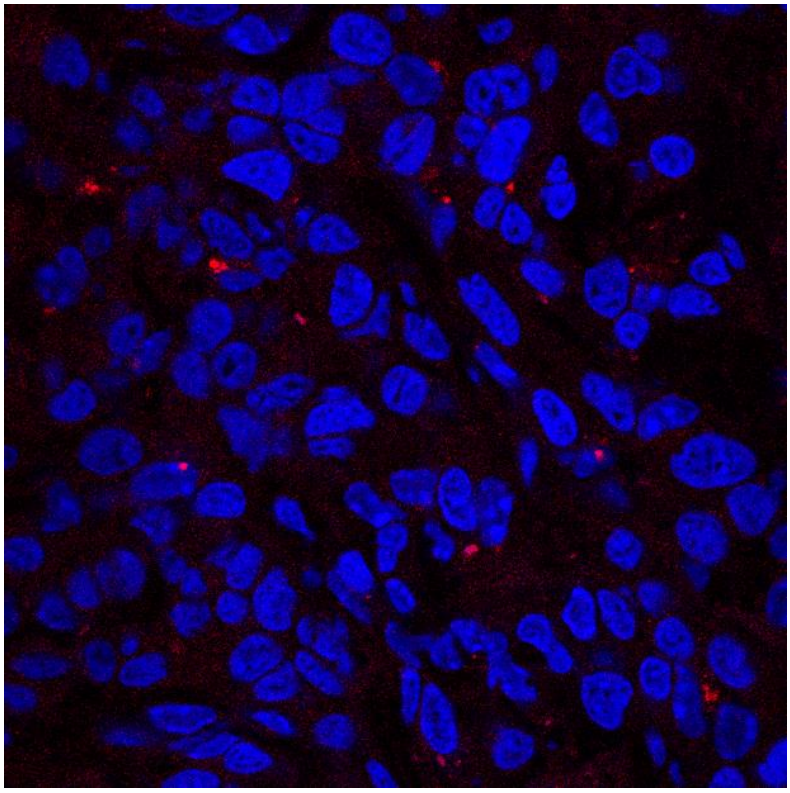


Figure 137 - Analyse de fluorescence d'une coupe de tumeur traitée par RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5

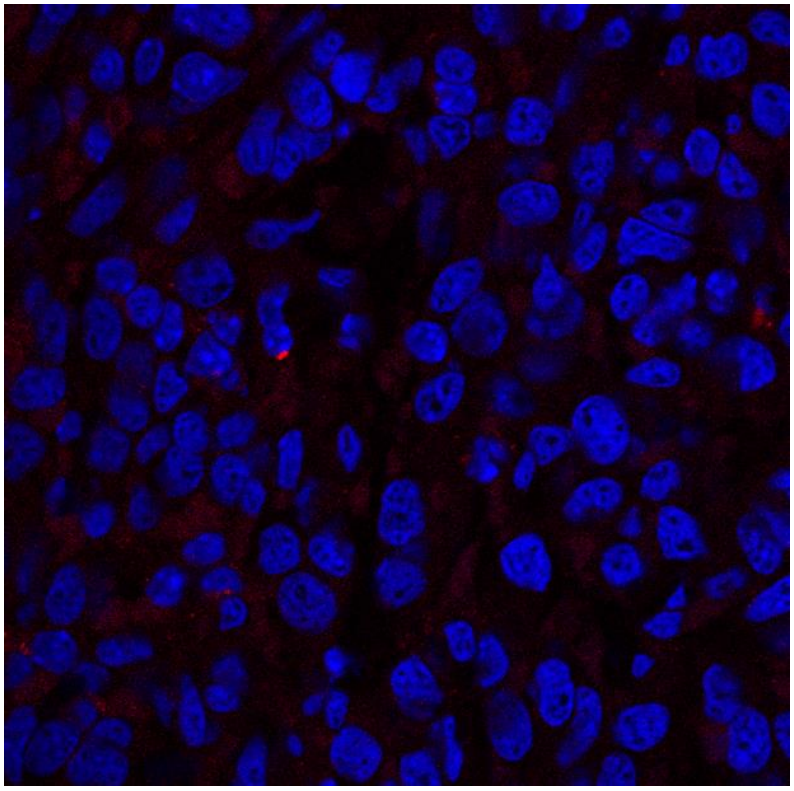


Figure 138 - Analyse de fluorescence d'une coupe de tumeur traitée par RAFT(4-c[RβADfK])Cy5.5

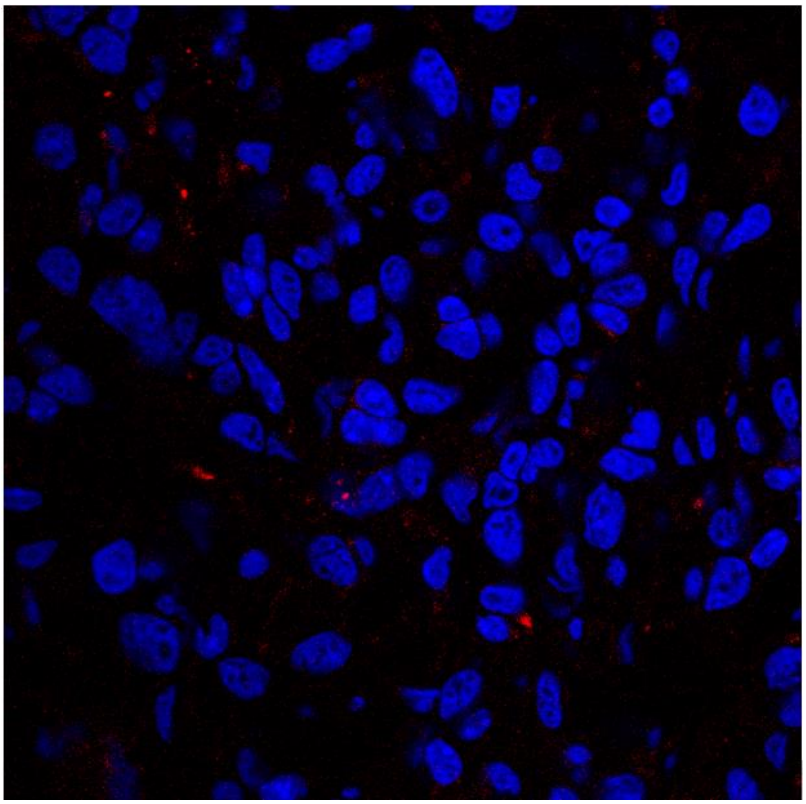


Figure 139 - Analyse de fluorescence d'une coupe de tumeur traitée par RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG$_{24}$ATWLPPR

Nous n'avons pas détecté de différences spécifiques entre les coupes réalisées en périphérie de tumeur ou en son centre. Aussi, les fluorescences observées pour différentes coupes d'une même tumeur ne sont pas toujours homogènes. L'hétérogénéité des tumeurs en est certainement la cause. Les coupes présentées ci-dessus sont représentatives des observations faites d'une manière générale pour chaque condition. Elles ont été réalisées vers le milieu de la tumeur.

b. *Analyse des résultats et discussion*

- Analyses *ex vivo*

Les analyses *ex vivo* des niveaux de fluorescence des organes après dissection (fig. 133) nous montrent **qu'à part les reins (non montrés), les organes accumulent les composés testés en faible quantité**, quels qu'ils soient. Il est confirmé que c'est la tumeur qui accumule le plus de composés, et que les vecteurs donnant le plus de fluorescence sont le ligand ATW et le Scramble, tandis que le R(RGD) est le châssis moléculaire le plus efficace.

Le ratio de fluorescence Tumeur/Muscle mesuré à partir des organes *ex vivo* est très élevé pour tous les composés. Il est étonnement important pour le scramble ($R_{T/M}$=33), et **le composé de double ciblage donne un ratio intéressant de 11 environ**. Comme évoqué précédemment, le ratio Tumeur/Muscle est très important pour distinguer la tumeur lors d'une exérèse chirurgicale.

- Coupes histologiques

Les différentes analyses des expériences *in vivo* ont révélé que parmi les vecteurs comportant un châssis moléculaire, le R(RGD) donne les meilleures fluorescences, mais le R(RGD)-PEG_{24}ATW donne les meilleurs ratios Tumeur/Peau. Pour voir si cette dernière caractéristique serait due à une meilleure spécificité, nous avons réalisé et analysé des coupes histologiques. Dans la lignée des tests *in vitro*, nous pouvions espérer que les composés de double ciblage se fixent de manière plus spécifique que les mono ciblés et s'accumulent ainsi au niveau de la périphérie tumorale.

Malheureusement, les coupes histologiques ne révèlent pas de différences entre les divers composés injectés, et **les analyses de fluorescence ne montrent pas de façon évidente que le R(RGD)-PEG_{24}ATW s'accumule de façon préférentielle au niveau des bordures tumorales**.

iii. *Conclusion des tests in vivo et ex vivo*

En conclusion, nous retiendrons que le composé de double ciblage R(RGD)-PEG_{24}ATW permet un marquage fluorescent efficace de la tumeur de glioblastome humain en sous-cutané chez la souris. Il induit une fluorescence moins importante que le composé R(RGD) et un ratio Tumeur/Muscle moins élevé, mais le ratio Tumeur/Peau obtenu est meilleur.

Les coupes histologiques révèlent que le composé de double ciblage ne s'accumule pas particulièrement au niveau de la périphérie tumorale, contrairement à ce qui était attendu suite aux tests *in vitro*.

Les analyses de fluorescence *ex vivo* révèlent que les composés sont retenus essentiellement au niveau de la tumeur, du rein (pour les vecteurs composés d'un châssis moléculaire) et de la peau.

Enfin, les tests *in vivo* ont démontré que les composés Cy5.5-Ahx-ATWLPPR et Cy5.5-Ahx-Scramble permettaient une détection très efficace de la tumeur en induisant une très forte fluorescence et des forts contrastes Tumeur/Peau et Tumeur/Muscle. Ce ciblage spécifique semble être la conséquence d'une accumulation passive et d'une forte infiltration au sein de la tumeur. Un Ala scan pourrait apporter des éléments de réponse pour expliquer l'efficacité de ces deux composés.

C. Conclusion des tests biologiques

Les tests biologiques ont confirmé l'intérêt d'étudier des systèmes vecteurs comportant à la fois des ligands c[RGDfK] et des ligands ATWLPPR pour cibler simultanément l'Intégrine $\alpha v\beta_3$ et la NRP1. En effet, les analyses de microscopie confocale, de test Elisa sur cellule et de Western Blot révèlent que de tels vecteurs fonctionnalisés par la Cyanine5.5 tétra-sulfatée s'accumulent au niveau de la membrane de cellules U87MG qui expriment les deux récepteurs en question. Il semble qu'un complexe tripartite se forme entre la molécule et les deux récepteurs. Cet effet n'est pas observé avec une co-administration des deux ligands individuels. La fluorescence obtenue *in vitro* est très faible pour le composé **3** (*Cy5.5-Ahx-ATWLPPR*) ciblant NRP1, elle est élevée pour les composés de double ciblage **6**, **7**, **8** (*RAFT(4-c[RGDfK]-Cy5.5-PEG$_{12}$ATW, RAFT(4-c[RGDfK]-Cy5.5-PEG$_{24}$ATW et RAFT(4-c[RGDfK]-Cy5.5-PEG$_{12}$RAFT(4-ATW)*) et très élevée pour le composé **1** (*RAFT(4-c[RGDfK]Cy5.5*) ciblant uniquement l'Intégrine $\alpha v\beta_3$.

Les résultats obtenus *in vivo* sont très différents. Parmi les vecteurs comportant un châssis moléculaire, le composé **1** induit la plus grande fluorescence (MF_{3h} = 9869 u.a.), devant le composé de double ciblage **7** (MF_{3h} = 5420 u.a.). En revanche, le ratio Tumeur/Peau est plus élevé pour le composé **7** (Rmax = 2,72 contre Rmax = 2,47). Cette spécificité n'est pas due à une accumulation spécifique du composé **7** au niveau de la périphérie tumorale, comme l'ont montré les coupes histologiques.

De façon surprenante compte-tenu des résultats *in vitro*, les composés **3** et **4** (ligand fluorescent ATWLPPR et son scramble) induisent un marquage très sélectif et très important des tumeurs. Le ratio Tumeur/Peau du scramble atteint une valeur Rmax de 3,8 à 24h et semble pouvoir augmenter dans le temps.

En résumé, les vecteurs de double ciblage ont révélé des effets spécifiques intéressants *in vitro* et une activité très satisfaisante *in vivo* pour la détection de tumeurs par imagerie optique. Mais le marquage n'est pas spécifique de la périphérie tumorale comme nous

l’attendions. Nous avons néanmoins découvert des composés potentiellement très intéressants pour une application en imagerie.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES DU PROJET DE DOUBLE CIBLAGE

En nous basant sur des travaux antérieurs, nous avons synthétisé des composés ciblant les récepteurs Intégrine $\alpha v\beta_3$ et Neuropiline-1 simultanément. Les vecteurs peptidiques mis au point permettent de combiner deux types de ligands peptidiques présentés de façon multivalente ainsi qu'un fluorophore au sein d'une seule et même molécule. Ce défi chimique a été réalisé grâce à l'utilisation d'un châssis peptidique constitué d'acides aminés modifiés qui permettent la fonctionnalisation du châssis par diverses réactions de ligations chimiques orthogonales.

Divers molécules ciblant soit l'intégrine (**1**), soit la Neuropiline-1 (**3**), soit les deux (**6**, **7**, **8**) ainsi que des composés contrôles (**2** et **4**) ont été préparés avec succès mais non sans difficulté. Avec du recul, il s'avère qu'une ligation click ne nécessitant pas de Cuivre I comme catalyseur aurait certainement facilité les synthèses des composés de double ciblage qui ont nécessité l'utilisation de la cycloaddition de Huisgen.

Les composés obtenus ont été testés *in vitro* et *in vivo,* majoritairement sur la lignée cellulaire U87MG qui exprime les récepteurs Intégrine $\alpha v\beta_3$ et Neuropiline-1. Les tests *in vitro* valident le concept de vecteurs permettant un ciblage simultané des deux récepteurs puisqu'une accumulation spécifique au sein de la membrane est obtenue avec ces derniers alors qu'elle n'est observée avec aucun autre composé, y compris la co-injection des ligands individuels. Il est probable qu'un complexe se forme entre les composés de double ciblage et les deux récepteurs visés. Il est fort probable qu'il y ait un cross-talk entre l'Intégrine $\alpha v\beta_3$ et Neuropiline-1. Cela ouvre donc de nouvelles perspectives d'approche et de conception de vecteurs pour le ciblage des tumeurs. Plus de tests biologiques doivent être réalisés pour étudier les cascades de signalisation engendrées, et si un effet thérapeutique peut être induit.

Les tests *in vivo* réalisés montrent que le composé de double ciblage **8** est un vecteur efficace pour l'imagerie optique *in vivo* sur souris. Il permet de détecter la tumeur de façon très claire. Sa fluorescence est forte, bien qu'inférieure à celle obtenue pour le composé **1** ciblant uniquement l'intégrine $\alpha v\beta_3$. En revanche, le ratio Tumeur/Peau obtenu est supérieur au composé **1**, et comparable aux meilleurs ratios rapportés dans la littérature.

L'analyse des coupes histologiques révèle que l'accumulation membranaire observée *in vitro* ne s'est pas traduite en ciblage spécifique de la périphérie tumorale *in vivo*. En revanche, compte tenu des observations faites en Western Blot, il est possible que des effets biologiques spécifiques aux composés de double ciblage soient observés *in vivo*. Des études supplémentaires sont nécessaires pour étudier une éventuelle activité antitumorale de ces derniers qui, combinée à leur efficacité en imagerie optique, pourrait en faire de bons outils théranostiques.

Enfin, les composés **3** et **4** (ATWLPPR fluorescent et son scramble) ont une spécificité et une efficacité de ciblage *in vivo* surprenantes, qu'il convient d'étudier plus en détail.

Partie II :

Application du scaffold(4-c[RGDfK]) pour des projets de diagnostic et thérapie du cancer

Nous avons développé dans le chapitre précédent l'utilisation d'un châssis peptidique qui possède l'avantage de pouvoir être fonctionnalisé par de multiples ligands et effecteurs *via* des réactions chimiosélectives orthogonales. Nos résultats ainsi que ceux obtenus précédemment au sein du laboratoire ont prouvé que dans de nombreux cas, le châssis RAFT(4-c[RGDfK]) était un vecteur très efficace pour transporter des cargos de manière spécifique jusqu'à une tumeur.[131,279] La sélectivité du vecteur est due au ciblage des récepteurs Intégrine $\alpha v\beta_3$ surexprimés dans une majorité de cancers.[280] En plus d'augmenter sensiblement l'affinité du vecteur pour l'intégrine $\alpha v\beta_3$, la présentation multivalente des ligands c[RGDfK] permet d'induire son internalisation.[273,276] Ainsi, le vecteur RAFT(4-c[RGDfK]) est un outil très performant pour la vectorisation d'agents diagnostiques et/ou thérapeutiques car il combine une synthèse optimisée, une structure chimique facilement adaptable, une forte sélectivité tumorale ainsi que la capacité à faire pénétrer des composés actifs dans les cellules.

A ce jour, ce vecteur est exploité au travers de nombreuses collaborations dans l'objectif de véhiculer des composés thérapeutiques ou diagnostiques. Ainsi, le RAFT(4-c[RGDfK]) a été combiné à un peptide pro-apoptotique, un photosensibilisateur, un agent cytotoxique ou encore du DOTA pour complexer des métaux. Les châssis peptidiques ont aussi été utilisés dans des approches supramoléculaires en les greffant sur des polymères pour une utilisation en imagerie, et sur des nanoparticules de silice pour étudier la capacité de ciblage d'un tel objet.

Les différents projets, dont les états d'avancement divergent, sont déclinés dans ce chapitre. Nous évoquerons d'abord les applications en thérapie, puis celle en diagnostique.

1. EXPLOITATION DU VECTEUR RAFT(4-C[RGDFK]) POUR DES APPLICATIONS THERAPEUTIQUES ANTICANCEREUSES.

A. Projet RAFT(4-c[RGDfK])porocombo : vectorisation d'un agent proapoptotique

i. *Objectif du projet*

L'objectif du projet est de véhiculer un peptide proapoptotique à l'aide du vecteur RAFT(4-c[RGDfK]). Le peptide en question est dérivé de la protéine Bax, protéine façonnée par l'évolution et qui est responsable de la formation de pores au sein des mitochondries. Ces derniers provoquent la libération du cytochrome c, une protéine qui joue un rôle décisif dans l'initiation du mécanisme d'apoptose. Le transport d'un tel peptide au sein de cellules tumorales pourrait donc provoquer leur mort par apoptose.

Le premier défi du projet a été d'identifier la plus petite séquence d'acides aminés responsable de l'activité de la protéine. Un premier peptide ($_{106}$NWGRVVALFYFASKLVLKALSTKVPELIR$_{134}$), appelé Bax [106-134], avait déjà été publié.[281] L'équipe d'A. Aouacheria a évalué des peptides tronqués aux extrémités C et N-terminales et réduits de 11 acides aminés par rapport au peptide Bax [106-134]. Le peptide Bax [109-127] s'est révélé le plus intéressant des peptides testés, plus efficace même que le peptide original. C'est donc lui qui a été choisi pour la suite.

Le second volet du projet concernait la production à grande échelle du peptide Bax [109-127], qui plus est en série D. En effet, un peptide en série D est beaucoup moins sujet aux dégradations enzymatiques. L'équipe de G. Subra (Montpellier) a préparé les peptides de série D. La longueur du peptide et sa forme hélicoïdale induisent une faible solubilité.

L'introduction d'un depsipeptide en exploitant la Serine118 a permis d'augmenter favorablement la solubilité. Décrite simultanément par Mutter[282] et Kiso,[283] cette méthode consiste à déplacer la liaison peptidique de l'azote α de la sérine, vers son hydroxyle. On obtient donc un lien ester plutôt qu'un lien amide, et la fonction amine libre obtenue est à même d'être protonée en milieu acide, augmentant ainsi la solubilité du peptide. Un retour à pH neutre ou basique entraine un transfert d'acyle O->N qui redonne le squelette peptidique naturel. Dans notre cas, le retour en condition neutre se fait après greffage au vecteur RAFT(4-c[RGDfK]), dont la solubilité intrinsèque permet une solubilité satisfaisante du composé final (fig. 140).

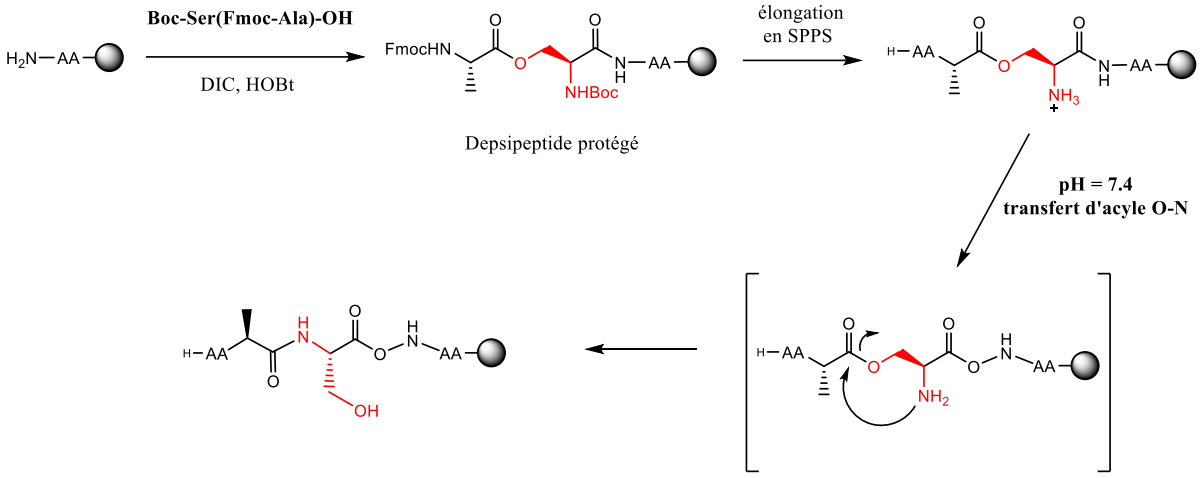


Figure 140 - Synthèse et mécanisme du transfert d'acyle d'un depsipeptide

Le greffage entre le RAFT(4-c[RGDfK]) et le peptide Bax [109-127] se fait *via* un pont disulfure. En effet, ce dernier peut être coupé dans les conditions réductrices rencontrées au sein de la cellule. Il permet la libération du composé actif après internalisation du composé par endocytose. Pour ce faire, le peptide Bax [109-127] a été prolongé par un bras espaceur constitué de la séquence NH_2-Cys-Gly-Gly-OH. Le composé obtenu, baptisé « Poro2 », est greffé au châssis RAFT(4-c[RGDfK]) présentant une fonction cystéine activée.

Nous sommes intervenus dans la synthèse du châssis peptidique et la réaction de ligation entre le châssis et le peptide Poro2. Ces dernières sont détaillées dans le chapitre suivant.

Les composés obtenus ont ensuite été testés *in vitro* et *in vivo* pour leur activité apoptotique, et la réponse immunitaire déclenchée a été étudiée. Cette partie a été réalisée par l'équipe de J-L. Coll et C. Aspord respectivement. Les résultats seront brièvement exposés par la suite. Ces travaux ont été soumis à publication récemment.

ii. *Synthèses*

Les châssis peptidiques RAFT(4-c[R**X**DfK])-Cys(NPyS)NH_2 **48** et **49** sont synthétisés selon une approche convergente en préparant différents cyclopeptides assemblés par liens oxime (fig. 141). Comme nous l'avons décrit précédemment, cela demande l'incorporation d'acides aminés portant des fonctions chimiosélectives telle que la molécule **12**.

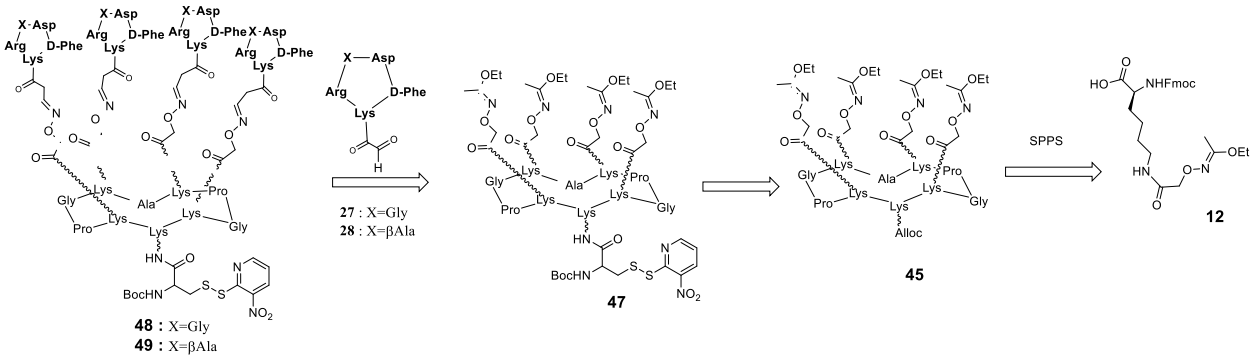
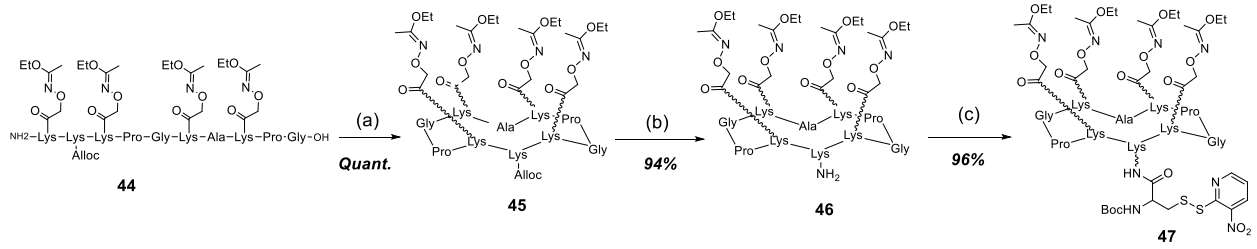


*Figure 141 - Schéma de rétrosynthèse des RAFT(4-c[R**X**DfK])-Cys(NPyS)NH_2*

Pour accéder au produit final, l'utilisation d'un groupe N-Pys permet de former régiosélectivement le pont disulfure désiré reliant le peptide Poro2 au vecteur peptidique. Cette réaction est détaillée ci-dessous.

a. Synthèse du châssis RAFT(4-acim)-Cys(NPyS) 51

L'acide aminé modifié **12** est introduit en SPPS sur une résine 2-Chlorotrityle® avec des acides aminés naturels protégés, dont la Fmoc-Lys(Alloc)-OH. Après assemblage, le peptide linéaire est décroché en condition acide très douce (Acide acétique/trifluoroéthanol) pour obtenir le peptide **44**. Ce dernier est cyclisé en condition diluée en présence de PyBOP et DIPEA pour obtenir **45**, dont la fonction Alloc est déprotégée sous Argon en présence d'un excès de phénylsilane (50 equiv.) et d'une quantité catalytique de $Pd(PPh_3)_4$ (0.2 équiv.) pour obtenir le châssis **46**. La fonction amine libre du composé **46** est ensuite acylée par le composé BocNH-Cys(NPyS)-OH en solution. Le groupe N-Pys n'étant pas stable dans les conditions de SPPS en stratégie Fmoc, celui-ci est introduit en fin de synthèse. Le composé **47** correspondant est obtenu sous forme de poudre avec d'excellents rendements.



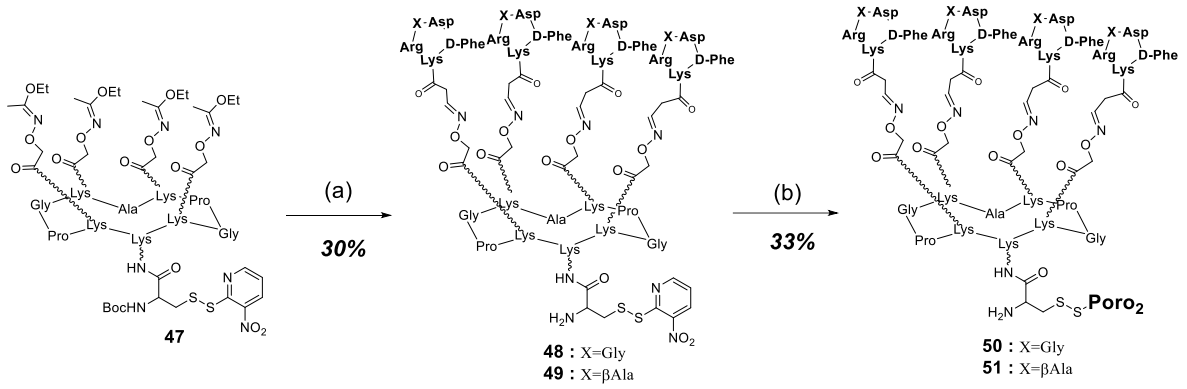
Réactifs : (a) PyBOP, DIPEA, DMF ; (b) Phénylsilane, $Pd(PPh_3)_4$, CH_2Cl_2/DMF anhydres, sous Argon ; (c) BocNH-Cys(NPyS)-OH, PyBOP, DMF, DIPEA

Figure 142 - Synthèse du RAFT(4-acim)-Cys(NPyS) **47**

b. Synthèse des composés finaux RAFT(4-c[RXDfK])Poro2

Une fois le châssis **47** en main, nous réalisons la ligation oxime avec les composés CHO-c[RXDfK] **27** ou **28** en milieu aqueux acide pour obtenir les produits **48** et **49** purs après purification par chromatographie (Fig. 143). La dernière étape consiste à faire réagir les châssis **48** et **49** avec le peptide Poro2 dans un milieu tamponné (acétate de sodium,

pH=4.8) sous atmosphère d'Argon. La réaction de ligation a lieu en milieu acide et sous Argon pour éviter la formation spontanée de composés homo-disulfures. La réaction est rapide (< 5min) et est arrêtée par acidification du milieu réactionnel et purification. Les composés finaux RAFT(4-c[RGDfK])Poro2 **50** et RAFT(4-c[RβADfK])Poro2 **51** purs sont obtenus avec des rendements moyens compris entre 30% et 50%.



Réactifs : (a) CHO-c[R**X**DfK] **27** ou **28**, TFA/H_2O (7/3) ; (b) **Poro2** (Cys-Gly-Gly-Bax[109-127]), CH_3CN/tampon acétate (pH = 5.4) (2/1)

Figure 143 – Schéma de synthèse des composés finaux RAFT(4-c[RGDfK])Poro2 **50** *et son contrôle négatif RAFT(4-c[RβADfK])Poro2* **51**

iii. *Activité in vitro et in vivo du RAFT(4-c[RGDfK])Poro2*

Divers tests biologiques ont été réalisés *in vitro* et *in vivo* pour évaluer l'activité du RAFT(4-c[RGDfK])Poro2 en termes de toxicité, d'induction d'apoptose et de réponse immunogénique déclenchée. Seuls certains résultats *in vitro* et *in vivo* seront présentés ici.

a. Tests in vitro

Deux types de tests *in vitro* ont été effectués. Le premier concernait l'étude de la toxicité du RAFT(4-c[RGDfK])Poro2 sur les lignées cellulaires de mélanome Me275 et Colo829. Les résultats (non présentés) montrent que 24h après incubation avec 10µM de composé, la viabilité cellulaire mesurée au MTT est de 40% seulement, révélant la toxicité du composé.

Le second test réalisé concerne l'impact sur l'apoptose cellulaire. Il a été étudié sur les lignées de mélanome Me275, Colo875 et A375 en mesurant le taux d'activation de la Caspase 3 (fig.144). Les résultats montrent clairement une induction d'apoptose pour chaque lignée cellulaire. Cet effet n'est pas observé avec le composé contrôle RAFT(Rβ ADfK])Poro2. Cela permet d'affirmer que la toxicité observée précédemment est associée à une induction d'apoptose suite à l'activation de la caspase-3 par le composé RAFT(4-c[RGDfK])Poro2.

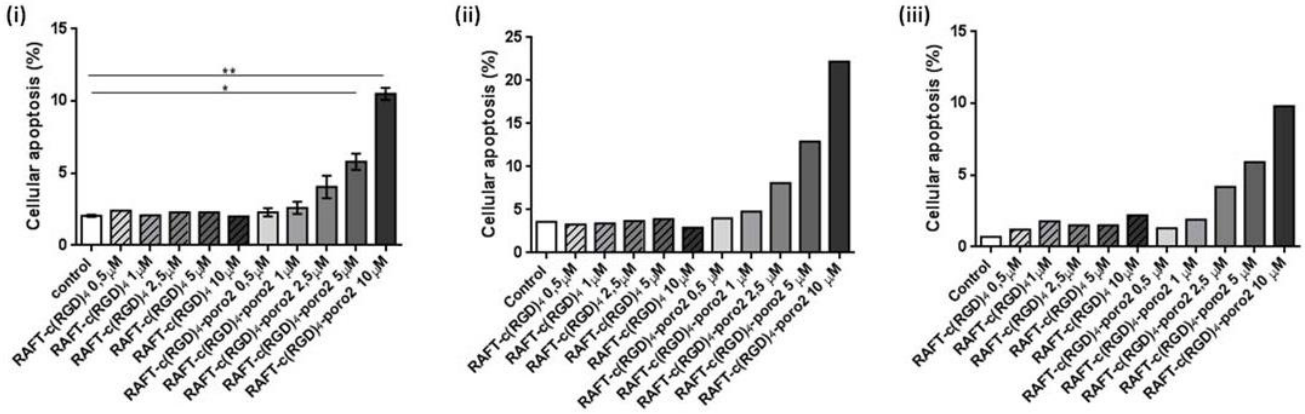


Figure 144 – Evaluation de l'impact du RAFT(4-c[RGDfK])Poro2 sur l'apoptose cellulaire par mesure de l'activation de Caspase 3, sur les lignées de mélanome Me275 (i), Colo875 (ii) et A375 (iii).

b. Tests in vivo

L'objectif des tests *in vivo* était à la fois d'étudier l'activité anti-tumorale du RAFT(4-c[RGDfK])Poro2 sur des xénogreffes de mélanome humain, mais aussi la réponse immunitaire que pouvait provoquer le traitement (mais nous ne parlerons pas ici des résultats obtenus concernant l'immunologie). Pour ce faire, des souris NOD-SCID IL2RγC-/- ont reçu une injection de cellules de mélanome Me275 en sous-cutané. Six jours après implantation, les souris ont été traitées par des injections journalières de 200 µL de solutions contenant 0.132 µmol de différents composés (le RAFT(4-c[RGDfK])poro2, le RAFT(4-c[RβADfK])poro2, le peptide poro2 seul, le RAFT(4-c[RGDfK])NH_2 ou du sérum physiologique), et ce pendant six jours (de J7 à J13). Le volume des tumeurs est relevé tous les jours pour suivre leur évolution. Les données récoltées et réunies dans le graphe ci-dessous (fig.145) montrent que le traitement des souris par le composé RAFT(4-[RGDfK])poro2 induit un arrêt de la croissance tumorale qui n'est pas observé pour les autres composés.

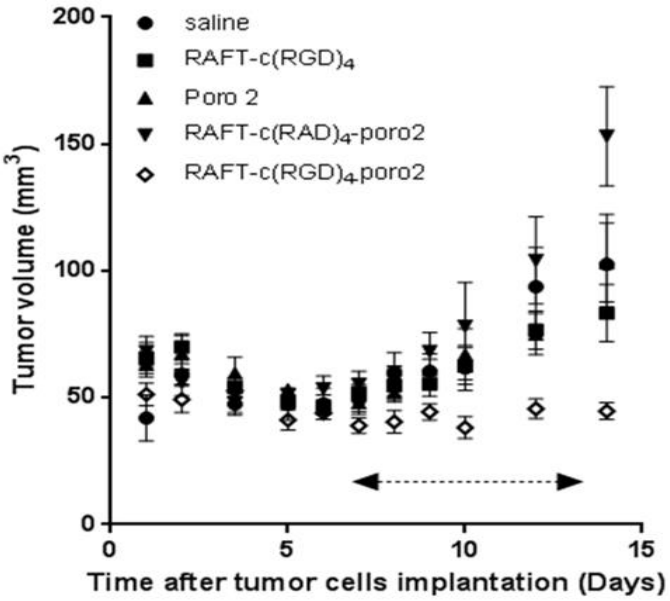


Figure 145 - Mesure quotidienne du volume des tumeurs après implantation des cellules tumorales. Les composés sont injectés entre les jours 7 et 13 (double flèche)

Les analyses d'immuno-histologie réalisées sur plusieurs tumeurs ont démontré que le ralentissement de la croissance tumorale était dû à une réduction de la prolifération cellulaire, comme le montre l'immuno-marquage de Ki67, qui est un marqueur de prolifération (fig. 146). Cet effet est associé à une augmentation mesurable mais non statistiquement significative de l'apoptose et de l'activation de la caspase 3. Aucun de ces effets n'a été détecté avec les autres composés.

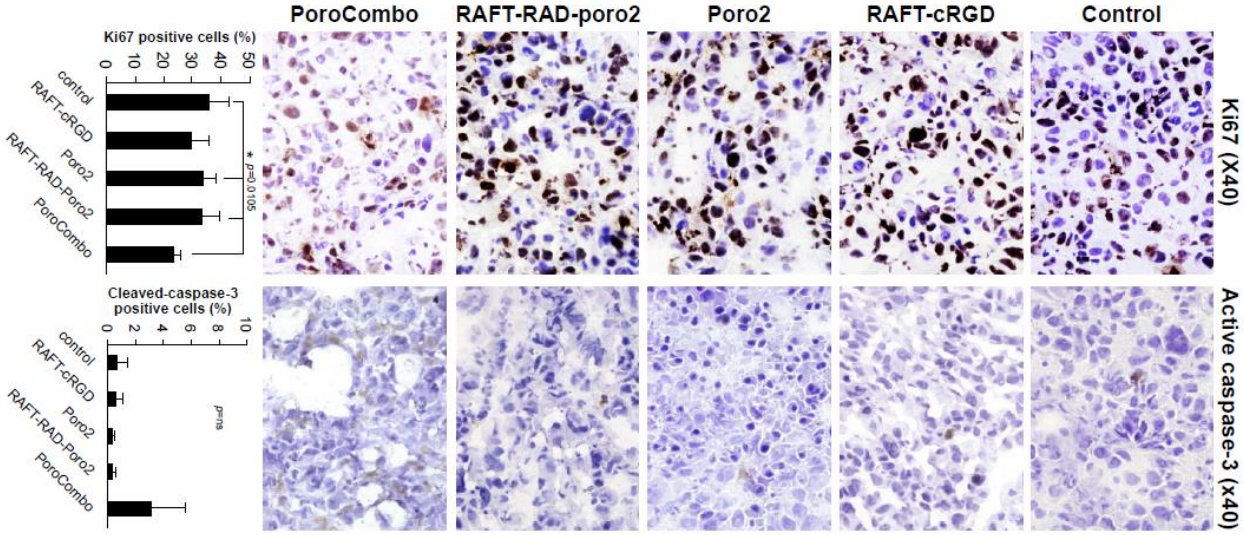


Figure 146 – Immuno-marquage de Ki67 (marqueur de prolifération) et de la caspase-3 activée (marqueur d'apoptose). « PoroCombo » = RAFT(4-c[RGDfK]poro2

iv. *Conclusion*

En résumé, nous avons conçu une macromolécule polyfonctionnelle constituée d'un châssis peptidique doté d'éléments de ciblage et d'un peptide pro-apoptotique bio-inspiré. Le peptide pro-apoptotique est lié au châssis par un lien disulfure. Il a été synthétisé en série D et comporte un depsipeptide pour améliorer sa stabilité et sa solubilité.

Le vecteur utilisé a permis de véhiculer le cargo de manière très spécifique au niveau tumoral. La libération du composé par coupure enzymatique du pont disulfure lui a permis

d'effectuer son activité pro-apoptotique, qui s'est traduite par un arrêt de la croissance tumorale.

Le composé que nous avons mis au point présente une activité anti-tumorale intéressante qu'il convient d'améliorer.

B. Projet RAFT(4-c[RGDfK])-DHP : Vectorisation d'un photosensibilisateur pour la photothérapie

i. *Objectifs du projet*

L'équipe de G. Royal au Département de Chimie Moléculaire de Grenoble a développé un couple de photochromes très intéressant.[284] Les deux molécules en question font partie de la famille des diarylethenes. Elles sont contraintes et isomères l'une de l'autre : le dimethyldihydropyrene (**DHP**) est un cycle fermé tandis que l'autre isomère, le cyclophanediene (**CPD**), est une forme ouverte du cycle (fig.147). L'avantage de ce système est qu'il est possible de passer de la forme ouverte à la forme fermée (DHP → CPD) par irradiation en lumière visible (> 630nm), et que la réaction est totalement réversible (CPD → DHP) sous irradiation UV ou de façon thermique. Ce couple de photochromes possède deux autres caractéristiques qui le rendent vraiment unique et intéressant. En effet, la forme ouverte CPD peut stocker de l'oxygène lorsque l'irradiation est effectuée en condition aérobie. Il se forme un dérivé endoperoxyde de façon quantitative (CPD → CPD-O_2). Cette réaction est réversible thermiquement et le dérivé endoperoxyde libère l'oxygène qu'il stockait sous forme d'oxygène singulet, qui est une espèce toxique pour les cellules (CPD-O_2 → CPD).

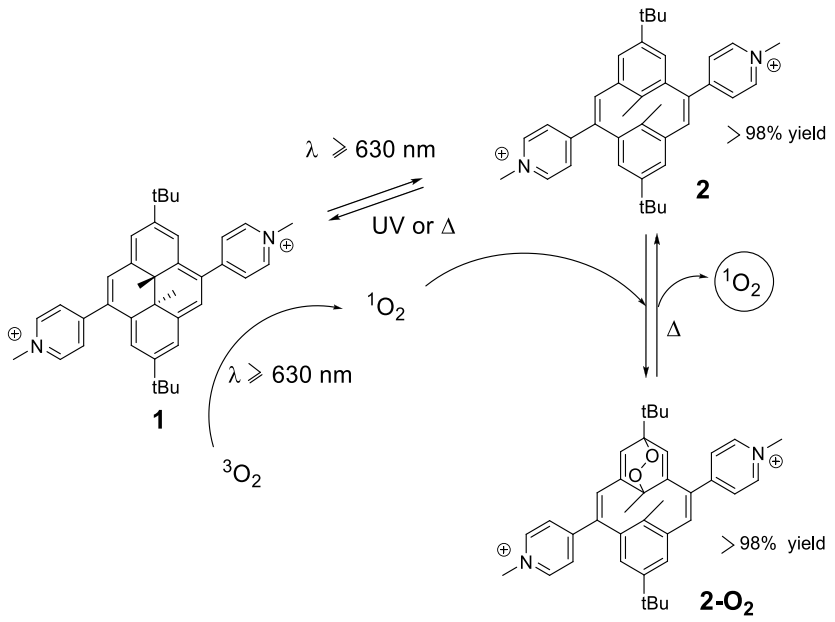


Figure 147 - Extrait de publication montrant le processus de conversion de la DHP (**1**) *en CPD* (**2**) *et CPD-O_2* (**2-O_2**).

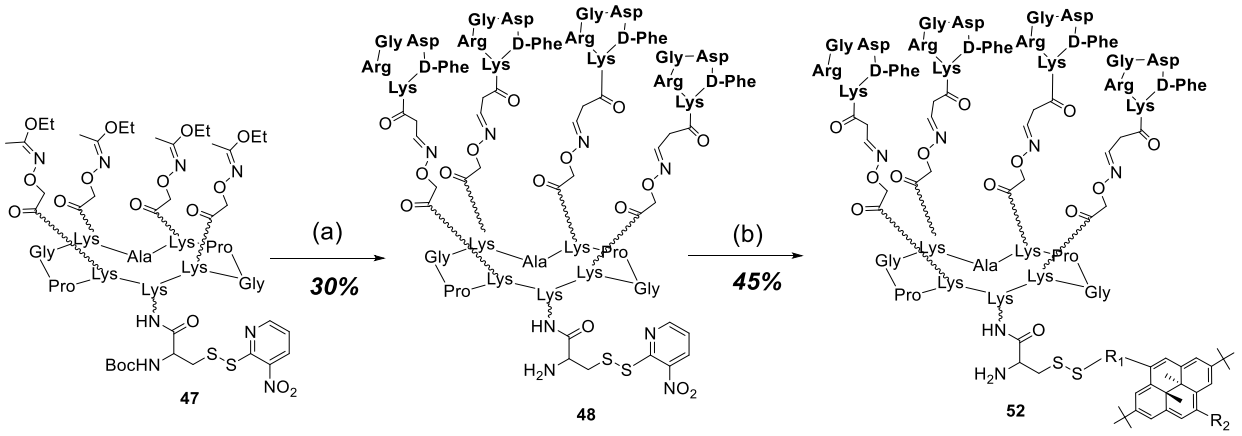
G. Royal et son équipe ont montré que l'excitation de DHP par la lumière proche infra-rouge (630nm) mène soit à son ouverture sous forme CPD, soit à un transfert d'excitation vers l'oxygène triplet environnant qui devient oxygène singulet.[284] L'espèce CPD formée peut ensuite stocker l'oxygène singulet créé pour donner la molécule CPD-O_2. Sous effet de la chaleur, le CPD-O_2 libère l'oxygène, toujours sous forme singulet, et reforme le DHP. L'ouverture du DHP et la captation d'oxygène sont des réactions très rapides. Et, contrairement à d'autres composés générateurs d'oxygène singulet, il est possible dans ce cas de réaliser des cycles de stockage/relargage d'oxygène sans dégrader la molécule.

Le composé DHP s'avère donc très prometteur pour une utilisation en photothérapie ciblée. Combiné au vecteur RAFT(4-c[RGDfK]) il pourrait atteindre les tumeurs, pénétrer les cellules tumorales et voir son activité toxique être sélectivement déclenchée par irradiation lumineuse. La combinaison d'un vecteur ciblé et d'un stimulus extérieur réduisent d'autant plus les effets secondaires éventuels d'un tel traitement. De plus,

comme le retour thermique de la forme CPD-O_2 vers les formes CPD et DHP est effectif à 35°C, il est envisageable de réaliser des cycles de captation/relargage d'oxygène singulet au sein même de l'organisme, pour bénéficier de l'effet thérapeutique de manière répétée. Cette particularité confère au composé un potentiel réellement intéressant vis-à-vis d'autres photosensibilisateurs « classiques ».

Compte tenu de tous ces avantages, nous avons décidé de greffer ce photosensibilisateur à nos vecteurs peptidiques pour ses propriétés de guidage tumoral et d'internalisation. Véhiculer le DHP au sein de la cellule tumorale doit permettre d'augmenter sa toxicité. Dans ce contexte, nous avons aussi décidé d'utiliser un pont disulfure qui libèrera le DHP du châssis après endocytose.

Les composés que nous avons mis au point font l'objet d'un dépôt de brevet. Nous ne pouvons donc pas détailler la formule exacte des molécules. Mais un lien disulfure a été choisi pour relier le dérivé de DHP au châssis RAFT. Nous avons effectué une réaction de ligation entre un dérivé thiolé du DHP et le RAFT(4-c[R**G**DfK])-Cys(NPyS)NH_2 **48** dont nous avons déjà décrit la synthèse (fig. 148). La réaction se fait dans un milieu tamponné (pH 4.8) sous argon et à l'abri de la lumière. Le composé **52** est obtenu pur après purification par CLHP.



Réactifs : (a) CHO-c[R**X**DfK] **27** ou **28**, TFA/H_2O (7/3) ; (b) **DHP-SH**, CH_3CN/tampon acétate (pH = 5.4) (2/1), argon, obscurité

Figure 148 – Schéma de synthèse du RAFT(4-c[RGDfK])-SS-DHP

L'amine libre sur le composé **52** peut être exploitée pour ajouter un fluorophore, mais la forme DHP émet elle-même une fluorescence. La disparition de cette dernière sous irradiation témoigne de l'ouverture du DHP. Sur ce principe, nous avons étudié l'ouverture de cycle *in vitro* des composés DHP, RAFT(4-c[RGDfK])-SS-DHP et RAFT(4-c[RβADfK])-SS-DHP ainsi que leur toxicité en faisant varier les paramètres d'irradiation/obscurité et la présence/absence d'oxygène. Ces tests ont été réalisés en collaboration avec V. Josserand (OPTIMAL, Grenoble). Une partie des résultats est présentée ci-dessous.

ii. *Tests biologiques*

La forme fermée DHP émet une fluorescence contrairement aux formes ouvertes CPD et CPD-O_2. Le suivi de cette fluorescence renseigne donc sur la disparition et la reformation du DHP. Le graphe présenté ci-dessous (fig.149) confirme l'ouverture du DHP sous excitation à 680nm (diminution de fluorescence). Au repos et sous effet thermique, les formes CPD-O_2 et CPD subissent la réaction inverse et reforment DHP, d'où le retour de fluorescence.

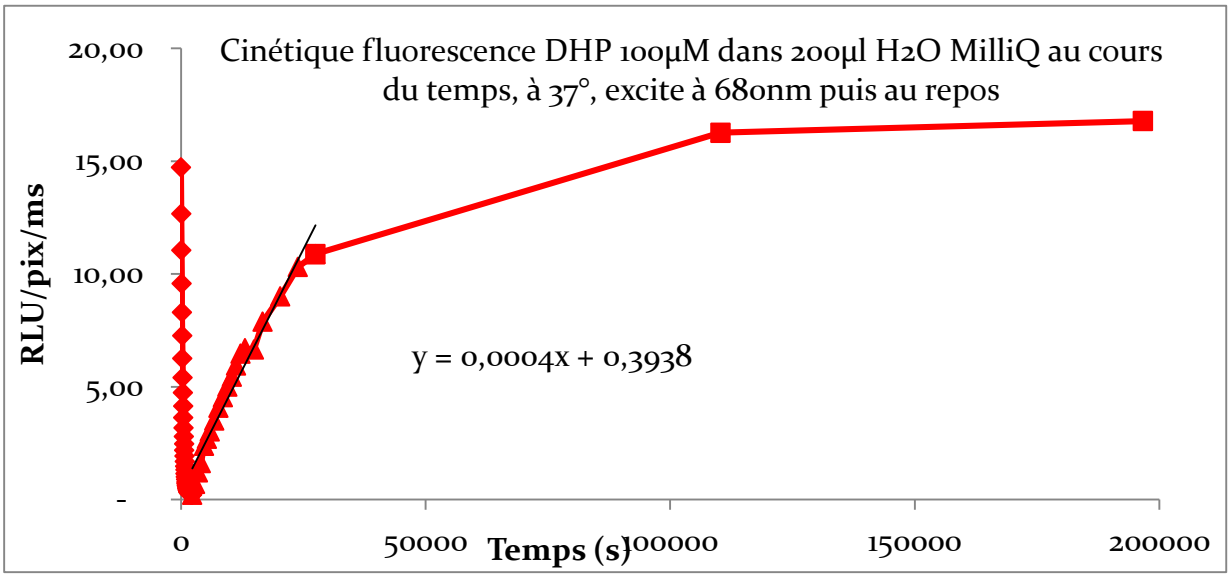


Figure 149 - Graphe présentant la cinétique de fluorescence de la DHP au cours du temps sous excitation à 680nm puis au repos

Pour évaluer le potentiel du conjugué **56**, nous avons évalué la toxicité du RAFT(4-c[RGDfK])-SS-DHP sur des cellules surexprimant l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. Celle-ci se révèle être très largement supérieure à celle du DHP seul (fig. 150 et 151). Des tests MTT révèlent une viabilité cellulaire de 60% lorsque des cellules IGROV1 (cellules de carcinome d'ovaire humain) sont incubées avec 100µM de DHP alors que seulement 20% de viabilité sont obtenus avec 50µM de composé RAFT(4-c[RGDfK])-SS-DHP. Ce dernier semble actif dès 5µM et s'avère plus toxique que la référence staurosporine à 200µM (fig. 150)

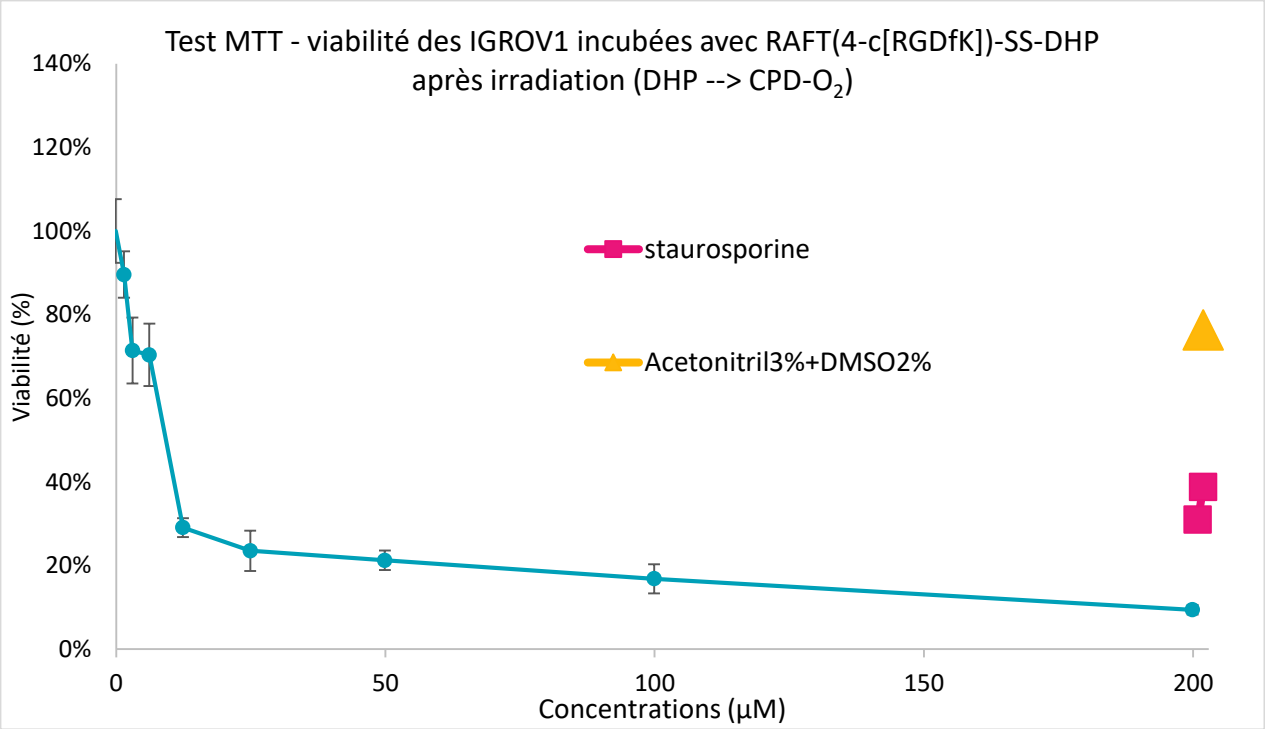


Figure 150 - Test de toxicité au MTT : % de viabilité des cellules IGROV1 après incubation avec différentes concentrations de RAFT(4-c[RGDfK])-SS-DHP

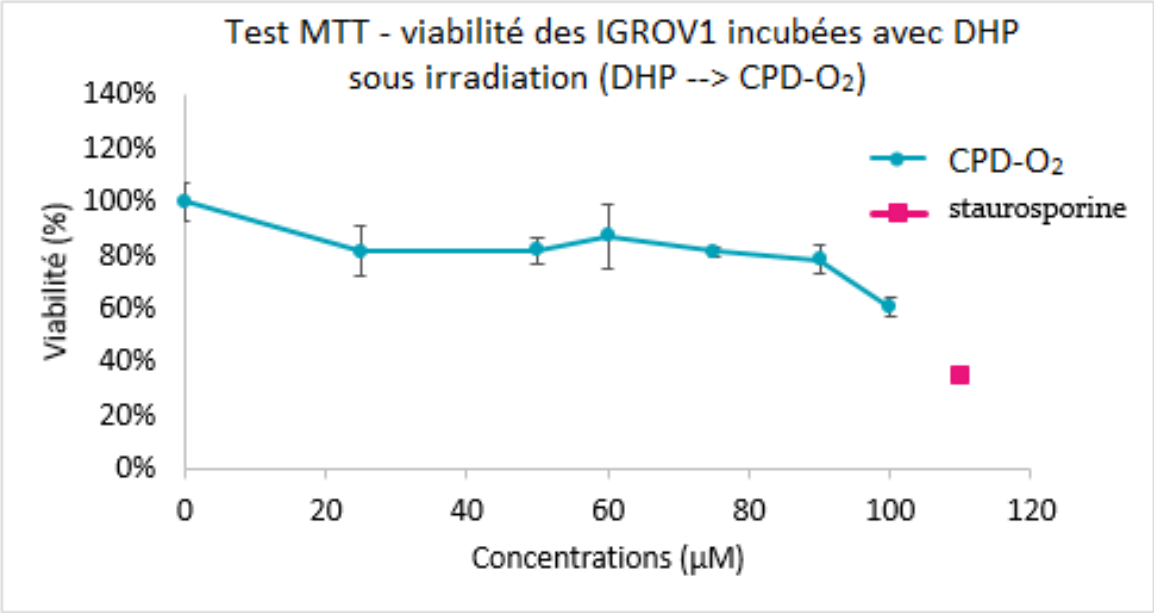


Figure 151 - Test de toxicité au MTT : % de viabilité des cellules IGROV1 après incubation avec différentes concentrations de RAFT(4-c[RGDfK])-SS-DHP

La forte augmentation de toxicité observée pourrait s'expliquer en grande partie par l'entrée du DHP dans la cellule, permise par le RAFT(4-c[RGDfK]). En utilisant les propriétés de fluorescence de la DHP, des tests de cytométrie de flux confirment clairement que la présence du RAFT induit une forte augmentation de la quantité de DHP au niveau cellulaire (fig. 152).

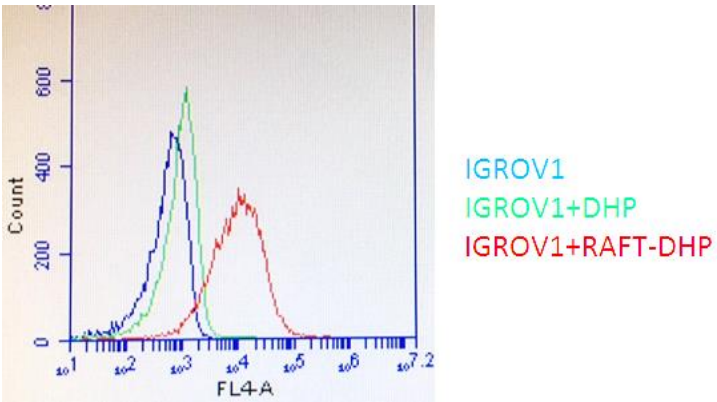


Figure 152 - Figure 14 - Cytométrie en flux. IGROV1 seules (bleu) ou incubées avec DHP ou RAFT-DHP.

L'interaction et certainement l'internalisation du DHP par les cellules IGROV1 sont donc largement augmentés lorsqu'il est relié au châssis RAFT(4-c[RGDfK]). Il est possible que l'oxygène singulet généré par le DHP atteigne plus facilement ses cibles biologiques, typiquement le noyau cellulaire, lorsqu'il a été internalisé par la cellule.

Il est aussi envisageable que cette augmentation de toxicité soit liée à l'activation de la cellule suite à l'interaction des RAFT(4-c[RGDfK]) avec les intégrines qui mettraient les cellules dans un état plus sensible au DHP.

iii. *Conclusion*

En conclusion, les propriétés intéressantes du photosensibilisateur DHP, combinées à la capacité de ciblage et d'internalisation du vecteur RAFT(4-c[RGDfK]) forment une molécule dont la haute toxicité peut être générée par un stimuli externe non invasif. Les résultats obtenus sont préliminaires et d'autres études *in vitro* et *in vivo* sont en cours. Mais au vu des premiers résultats encourageants, la molécule présente un potentiel très intéressant pour une application en photothérapie ciblée.

C. Projet RAFT(4-c[RGDfK])-cryptophycine

Ce projet a été initié récemment. Les premières synthèses ont été réalisées mais les produits finaux sont encore en cours de synthèse. Des tests biologiques *in vitro* voire *in vivo* seront réalisés suivant l'avancement du projet.

i. *Objectif du projet*

Les cryptophycines sont des depsipeptides cycliques hautement cytotoxiques. Leur toxicité est issue de leur activité antimitotique. En particulier, la cryptophycine-1 et son analogue synthétique cryptophycin-52 sont très efficaces y compris contre des lignées cellulaires multi-résistantes.[285] Le composé cryptophycin-52 a été le premier candidat testé en clinique mais les études se sont arrêtées en phase II, à cause d'un manque d'efficacité *in vivo* et une haute neurotoxicité. Il serait donc intéressant de véhiculer ces composés toxiques jusqu'à la tumeur pour augmenter le potentiel anti-tumoral et diminuer les effets secondaires.

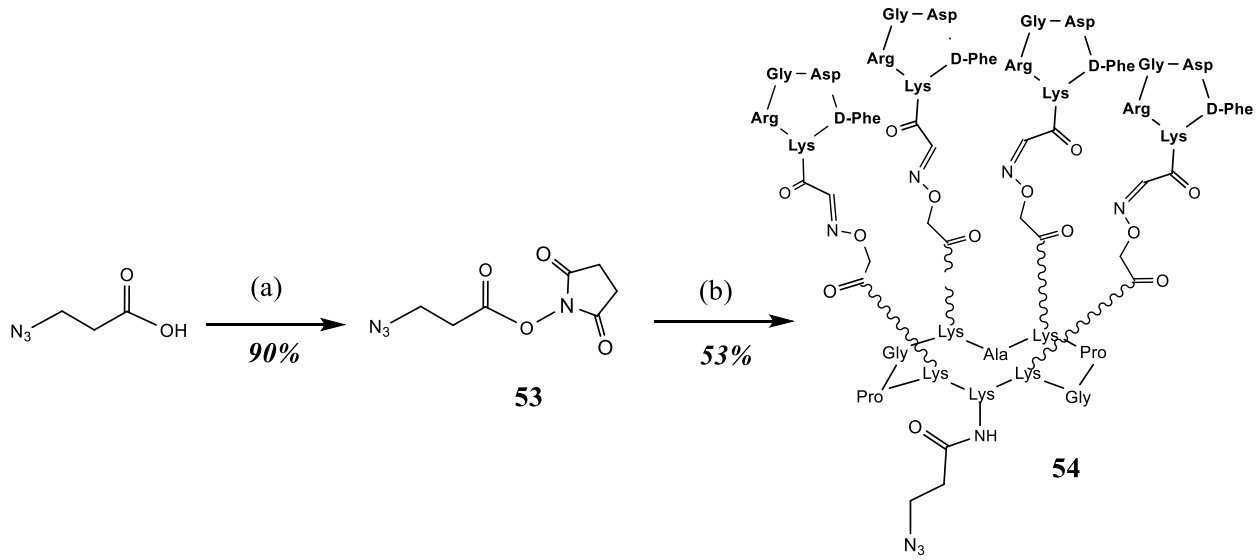
C'est dans cette optique que l'équipe de N. Sewald, qui jouit d'une grande expérience dans la synthèse totale de la cryptophycine et de ses analogues, a développé des molécules composées de la cryptophycine-52, d'une fluorescéine et d'un ligand –RGD- pour exploiter la surexpression d'intégrine $\alpha v\beta_3$ par de nombreuses tumeurs.[286] Ils ont ainsi pu démontrer l'internalisation du composé et sa localisation au sein des lysosomes. L'intérêt de ces résultats, l'expertise de l'équipe de N. Sewald concernant la cryptophycine, et le potentiel que représente cet agent cytotoxique, conjugués aux grandes capacités de ciblage et d'internalisation du châssis peptidique RAFT ont conduit nos deux équipes à collaborer dans l'objectif de mettre au point des composés RAFT(4-c[RGDfK])-**linker**-cryptophycine.

Différents linkers labiles entre le vecteur et le cargo seront testés, comme par exemple la séquence ValCitPAB, coupée enzymatiquement par la cathepsin B au sein des lysosomes.[287]

La ligation entre le châssis peptidique et le composé linker-cryptophycine sera réalisée par réaction de cycloaddition de Huisgen entre la fonction azoture du premier partenaire et l'alcyne terminale du second.

ii. *Synthèses*

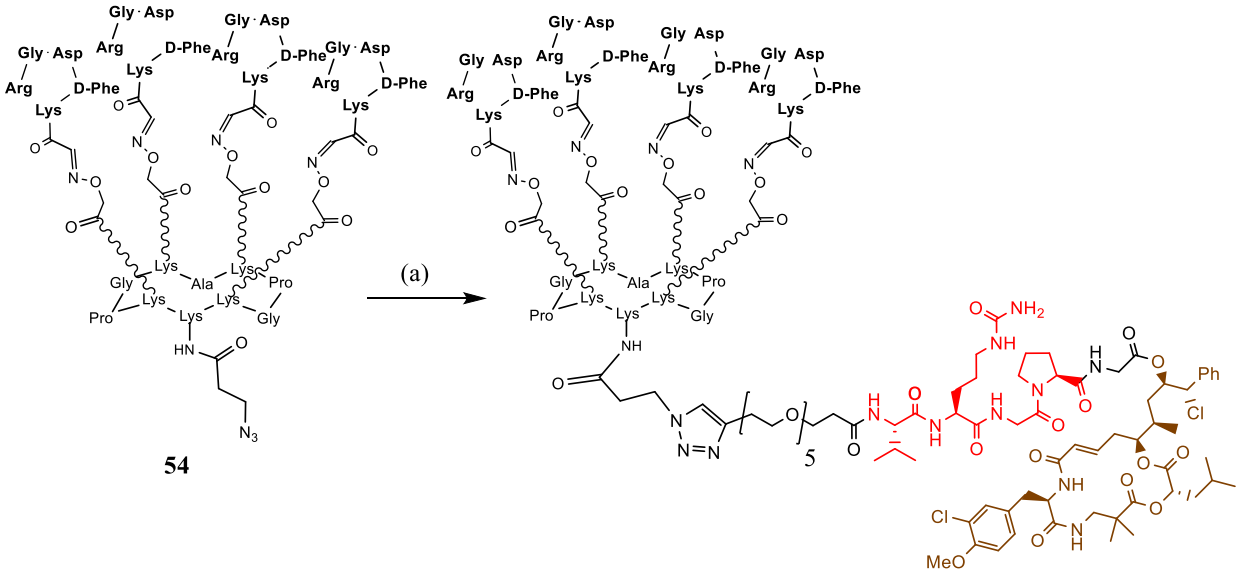
L'intermédiaire RAFT(4-c[RGDfK])N_3 **54** qui sera couplé avec le dérivé de cryptophycine est obtenu par réaction entre le RAFT(4-c[RGDfK])NH_2 **29**, dont nous avons déjà décrit la synthèse, et l'ester activé **53**. Ce dernier est obtenu par activation de l'acide azido acétique sous forme d'ester *N*-hydroxysuccinimique (Fig. 153).



Réactifs : (a) NHS, DCC, AcOEt/Dioxane ; (b) RAFT(4-c[RGDfK])NH_2 **29**, PyBOP, DIPEA

Figure 153 – Schéma de synthèse du RAFT(4-c[RGDfK])N_3

L'étape de couplage entre **54** et les différents analogues de cryptophycine est réalisée *via* cycloaddition de Huisgen (fig. 154). Un exemple est donné ci-dessous, avec un lien cleavable ValCitGlyPro. Les tests biologiques seront réalisés par l'équipe de N. Sewald.



Réactifs : (a) alcyne-PEG-ValCytGlyPro-Cry55Gly, CuSO4, THPTA, ascorbate de sodium, DMF/PBS (pH = 7,4)

Figure 154 – Schéma de synthèse d'un RAFT(4-c[RGDfK])-ValCitPAB-cryptophycine

2. EXPLOITATION DU VECTEUR RAFT(4-C[RGDFK]) POUR DES APPLICATIONS DIAGNOSTIQUES EN CANCEROLOGIE.

A. Synthèse et fonctionnalisation contrôlées de SiNP-RAFT(RGD) fluorescentes

i. *Principe du projet*

Le châssis peptidique RAFT permet la présentation multivalente de ligands dans une conformation relativement contrainte, pour une taille finale de molécule d'environ 5nm. Notre équipe a déjà montré que la présentation de quatre ligands c[RGDfK], séparés du châssis par une chaine lysine, induisait une très forte affinité pour l'intégrine $\alpha v\beta_3$.[275,288] Les nanoparticules sont des objets plus imposants, généralement compris entre 50 et 200nm et qui permettent de présenter une quantité bien plus élevée de ligands. Mais le contrôle spatiale de ces derniers est plus compliqué.

L'objectif de ce projet en collaboration avec l'équipe de G. Subra est de combiner la haute capacité de fonctionnalisation d'une nanoparticule à la bonne répartition spatiale des ligands de ciblage. En greffant les RAFT(4-c[RGDfK]) sur des nanoparticules, on obtient un objet supramoléculaire avec de nombreux sites où les ligands sont contraints dans une conformation idéale pour interagir avec l'intégrine $\alpha v\beta_3$.

Ces objets moléculaires pourraient permettre de transporter une grande quantité d'agents effecteurs de manière ciblée vers les tumeurs. Mais dans un premier temps, nous voulons étudier l'activité biologique induite par des nanoparticules fluorescentes décorées de composés RAFT(4-c[RGDfK]).

Subra *et al.* ont développé une méthode de synthèse et de fonctionnalisation de nanoparticules de silice très efficace. Les nanoparticules sont préparées en utilisant la condensation de tétraéthylorthosilicates (TEOS). Ils ont pu incorporer des dérivés triéthoxysilylés de fluorescéine au sein même de la particule pour la rendre fluorescente, en les ajoutant pendant la synthèse (fig. 155).[143] Il est possible de décorer la nanoparticule après son obtention avec des ligands triéthoxysilylés qui viendront se fixer par hydrolyse et condensation des organosylanes, sans besoin d'utiliser de réaction de ligation ni de groupes protecteurs. Enfin, la quantité de ligands fixés sur la particule peut être contrôlée par analyse RMN du ^{19}F en incluant au préalable des atomes de fluor sur les ligands (méthode ERETIC, « Electronic REference To acces In vivo Concentrations »).

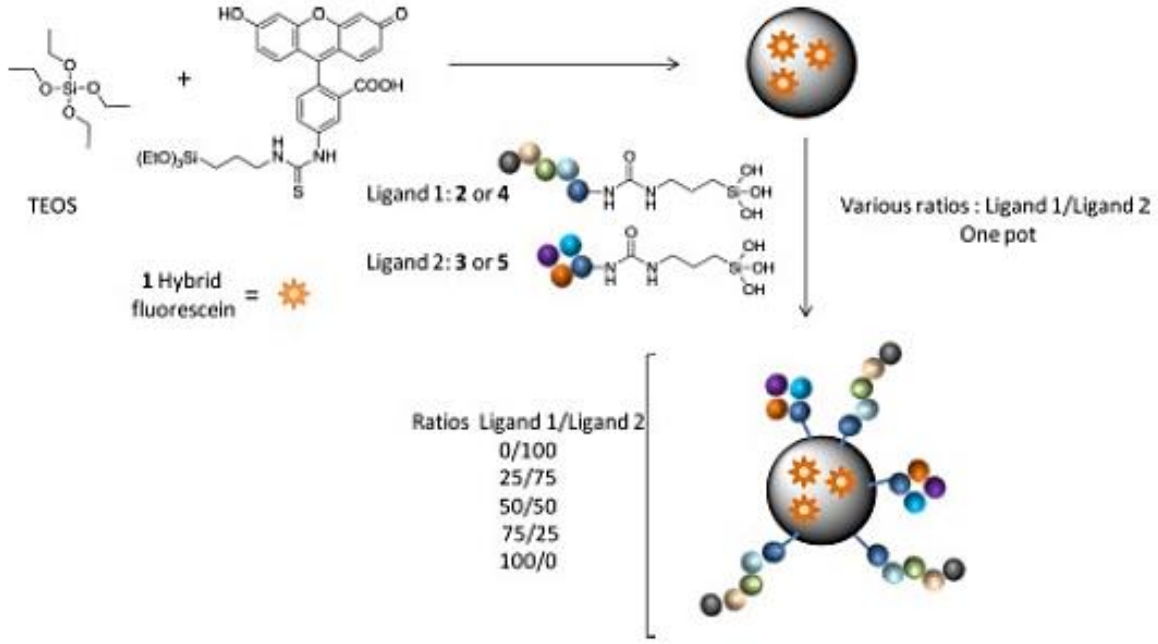


Figure 155 - Extrait de publication schématisant la synthèse de nanoparticules de silice fluorescentes puis leur fonctionnalisation par ligands organosylilés[143]

Ce projet consiste d'abord en la synthèse de RAFT(4-c[RGD])-$C^{19}F_3$-NH_2 (Fig. 156). La fonction amine libre du RAFT(4-c[RGD])-CF_3-NH_2 permet de le fonctionnaliser par un

groupement triéthoxysylane pour ensuite greffer le RAFT(4-c[RGDfK])-$C^{19}F_3$-Si(OEt)$_3$ sur la nanoparticule. Les atomes de fluor, introduits *via* un acide aminé modifié lors de la synthèse SPPS du châssis, permettra de quantifier le taux fonctionnalisation des nanoparticules avant de tester leur activité biologique.

Des tests d'adhésion cellulaire seront réalisés par cytométrie de flux, avant d'effectuer des études de biochimie et éventuellement des études *in vivo*.

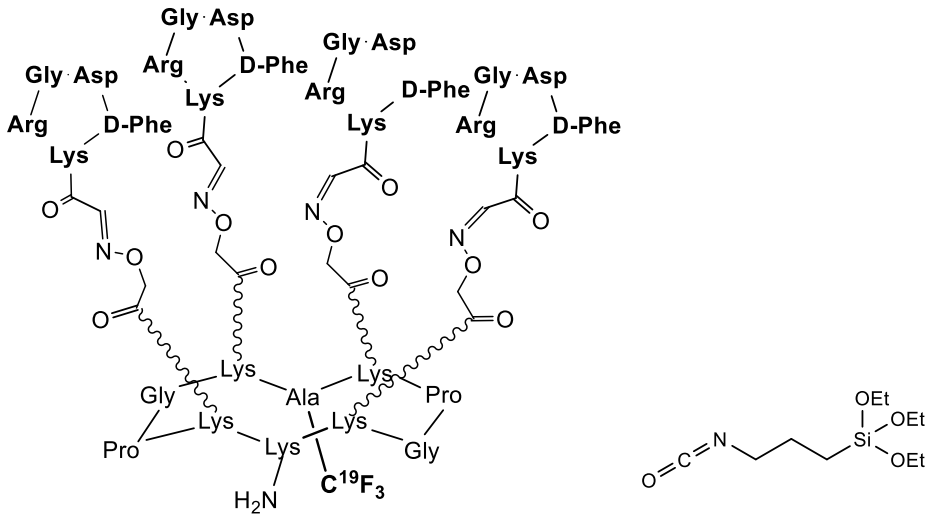
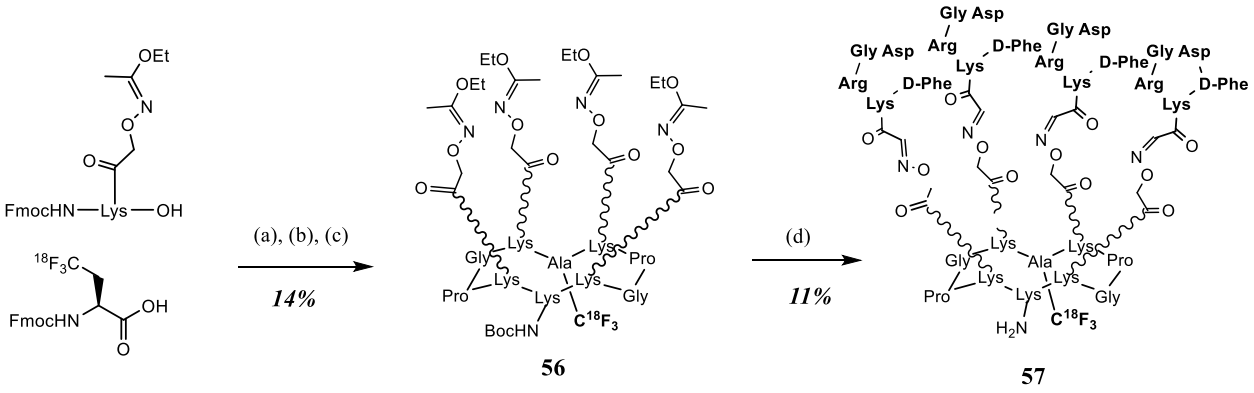


Figure 156 – RAFT(4-c[RGDfK])-$C^{19}F_3$-NH_2 et dérivé triéthoxysilane

ii. *Synthèses*

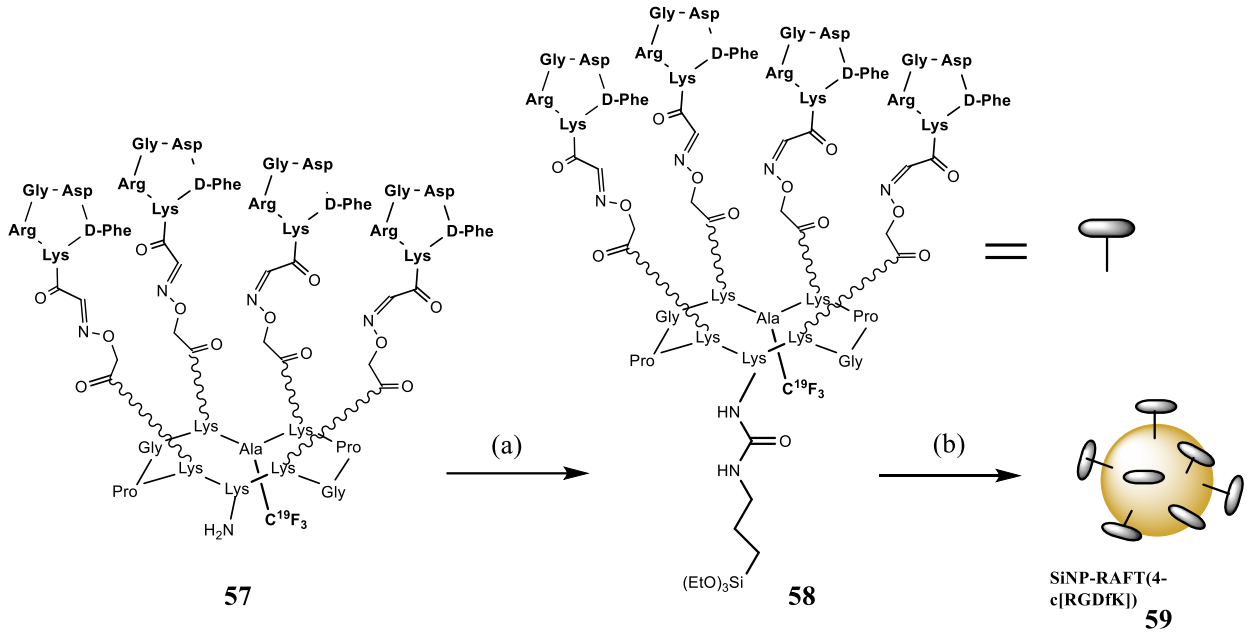
La synthèse du châssis RAFT(4-c[RGDfK])-$C^{19}F_3$-NH_2 est réalisée selon les mêmes procédures que celles décrites précédemment pour les autres types de RAFT(4-c[RGDfK]). Les ligands c[RGDfK] sont greffés sur le châssis par ligation oxime. La différence réside dans l'incorporation du groupement $C^{19}F_3$, qui se fait en utilisant l'acide aminé Fmoc-Ala($C^{19}F_3$)-OH lors de la SPPS (fig. 157).



Reactif : (a) SPPS ; (b) TFA/CH_2Cl_2 ; (c) PyBOP, DMF, DIPEA ; (d) CHO-c[RGDfK], TFA/H_2O (7/3)

Figure 157 - Schéma de synthèse du RAFT(4-c[RGDfK])-C^{18}F$_3$-NH2

Le greffage du RAFT(4-c[RGDfK])-C^{19}F$_3$-NH$_2$ sur les nanoparticules de silice a été réalisé en deux étapes. Il a d'abord été mis en présence de 3-isocyanatopropyltriethoxysilane afin de le doter de la fonction triethoxysilane (**58**). Elle permet ensuite de le greffer sur la nanoparticule par condensation des organosilanes (**59**) (fig. 158).



Réactifs : (a) 3-isocyanatopropyltriethoxysilane, (b) SiNPs

Figure 158 – Schéma de synthèse des SiNP-RAFT(4-c[RGDfK])CF$_3$

A l'heure actuelle, les tests biologiques sont en cours au sein l'équipe de J.L. Coll.

3. CONCLUSION DE LA PARTIE II

Le châssis peptidique RAFT est un outil très intéressant, notamment lorsqu'il est fonctionnalisé avec des ligands –RGD- qui permettent de cibler les tumeurs surexprimant l'intégrine $\alpha v\beta_3$. Nous avons montré que ce vecteur était très polyvalent et pouvait être combiné à différents effecteurs comme un peptide pro-apoptotique, la cryptophycine hautement toxique, le photosensibilisateur DHP ou être greffé sur des nanoparticules de silice. Ce vecteur a aussi été utilisé pour préparer des polymères fluorescents (collaboration A Favier, thèse de Damien Duret, « Développement de sondes polymères fluorescentes à propriétés de ciblage améliorées pour des applications en imagerie cellulaire et en oncologie », Lyon). Enfin, une collaboration est en cours avec l'équipe de C. Ghezzi qui utilise des RAFT(4-c[RGDfK])-DOTA pour complexer du Gallium 68 pour réaliser des tests cliniques de phase I en tomographie par émission de positrons (PET scan)..

Le châssis RAFT(4-c[RGDfK]) est donc un vecteur très intéressant pour de multiples applications à l'interface chimie/biologie. La possibilité de le fonctionnaliser régiosélectivement par une multitude d'éléments *via* des réactions de ligation orthogonales lui confère une polyvalence intéressante pour de nombreuses autres applications.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette thèse était de mettre au point des vecteurs peptidiques à visée diagnostique et/ou thérapeutique. Notre laboratoire possède un historique important dans le domaine de la vectorisation, grâce à l'utilisation de châssis cyclopeptidiques qui permettent de combiner de nombreux ligands et effecteurs sur une même molécule. Ce châssis, baptisé RAFT (Regioselectively Adressable Functionnalised Template), peut être fonctionnalisé de façon chimiosélective par des éléments de ciblage et des effecteurs. Sa fonctionnalisation par quatre ligands c[-RGDfK-], lui confère une puissante affinité pour les intégrines $\alpha v\beta_3$ (4 nM), qui sont des récepteurs fortement exprimés par les tumeurs et les cellules endothéliales qui les entourent, alors que les cellules saines les expriment peu. La présentation multivalente des ligands c[-RGDfK-] induit également une internalisation du vecteur, qui permet donc aux cargos qu'il véhicule de pénétrer dans la cellule. Toutes ces caractéristiques font du châssis RAFT fonctionnalisé par quatre ligands c[-RGDfK-] (abrégé en RAFT(4-c[RGDfK])) un vecteur très intéressant pour la vectorisation d'agents diagnostiques et thérapeutiques dans le domaine de la cancérologie. Il a d'ailleurs été utilisé pour vectoriser un fluorophore ou des agents de contraste pour l'IRM.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont majoritairement porté sur l'exploitation de ce vecteur. Ils se sont organisés autour de deux axes :

Le premier axe a consisté à exploiter la structure habituelle du vecteur RAFT(4-c[RGDfK]), en le dotant d'effecteurs inédits. Ainsi, à travers de multiples collaborations, nous avons couplé le châssis RAFT(4-c[RGDfK]) à un peptide pro-apoptotique (BAX), un photosensibilisateur (DHP), une toxine très puissante (cryptophycine) ou encore un complexe de Gallium 68 pour une application en PET-scan.

La vectorisation du peptide pro-apoptotique [BAX] s'est traduite par un effet toxique ainsi qu'un effet angiostatique très clair *in vitro* et *in vivo* sur la lignée cellulaire Me275

(mélanome). Ces résultats, bien que perfectibles, sont intéressants dans l'optique d'un traitement anticancéreux.

Le projet de vectorisation du photosensibilisateur DHP s'avère lui aussi très prometteur. En effet, le DHP est un composé qui, sous irradiation lumineuse, capte de l'oxygène, puis est capable de le libérer sous forme d'oxygène singulet toxique pour la cellule. Ce composé possède une activité biologique contrastée à cause d'une mauvaise biodistribution. Le fait de le lier au châssis RAFT(4-c[RGDfK]) a permis d'améliorer significativement son internalisation au sein de cellules tumorales *in vitro*. Cela s'est également traduit par une cytotoxicité fortement accrue (IC_{50} de viabilité cellulaire passé de >100µM à 8µM). Ces résultats préliminaires sont très encourageants et laissent présager un fort potentiel pour une application en photothérapie. Des tests *in vivo* vont être réalisés prochainement.

Les projets de vectorisation de la cryptophycine et de Gallium-68 sont à des stades préliminaires. Mais la très forte toxicité de la cryptophycine rend très intéressante l'étude de sa vectorisation. Et l'étude de la vectorisation de Gallium-68 étant une phase clinique I, elle revêtit une importance toute particulière pour déterminer si les promesses du châssis RAFT(4-c[RGDfK]) pourront ou non se traduire par un apport réel et concret en cancérologie.

Ce même châssis a aussi été greffé sur des nanoparticules de silice fluorescentes et des polymères fluorescents, cette fois dans une approche plus fondamentale. Nous voulons déterminer si la présentation de très nombreux ligands c[RGDfK] envers les intégrines $\alpha v\beta_3$ serait plus efficace si ces ligands étaient contraints dans une géométrie optimale à leur interaction plutôt que disposés aléatoirement sur les structures supramoléculaires. Les projets sont en cours, mais nous pouvons d'ores et déjà confirmer que la synthèse de tels objets s'est avérée possible.

Le deuxième axe de recherche était le projet principal de ma thèse. Il consistait aussi à utiliser le châssis RAFT(4-c[RGDfK]) pour cibler les intégrines $\alpha v\beta_3$, mais en le

combinant à un second motif de ciblage pour améliorer sa spécificité et son affinité. En ciblant simultanément les récepteurs intégrine $\alpha v\beta_3$ et Neuropiline-1, qui sont tous deux surexprimés dans le processus d'angiogenèse tumorale, l'objectif était d'obtenir un ciblage précis de la périphérie tumorale. De tels vecteurs, fonctionnalisés par un agent de contraste pour l'imagerie optique seraient utiles pour une application d'aide à la chirurgie. Pour ce faire, nous avons synthétisé différents vecteurs de mono et de double ciblage, présentant des motifs de ciblage c[RGDfK] (pour $\alpha v\beta_3$), des motifs ATWLPPR (pour cibler la Neuropiline-1), ou les deux à la fois. Les synthèses ont été réalisées par synthèse peptidique et par réactions de ligations orthogonales. Nous avons également étudié l'impact d'une présentation multivalente de ces ligands et l'impact de la taille des linkers reliant les ligands des molécules de double ciblage.

Les tests *in vitro* révèlent que le ciblage simultané de NRP1 et de $\alpha v\beta_3$ induit une signalisation et un phénotype uniques sur des cellules U87MG (glioblastomes). En effet, la présentation simultanée des ligands par le vecteur provoque sa complexation avec les deux récepteurs. Le complexe tri-partite formé reste ancré dans la membrane (comme le montrent les analyses de microscopie confocale) et cela bloque son internalisation (d'après les études de Western Blot et de tests ELISA). Ce complexe semble aussi séquestrer Akt comme le montrent les études de Western Blot. Ces effets ne sont pas observés lorsque les ligands sont utilisés en co-administration. Nos résultats prouvent donc que la combinaison des deux ligands sur un même composé plutôt qu'en co-administration a un réel impact sur la cellule. Sur un aspect biologique, ils confirment aussi les premières évidences d'un cross-talk entre l'intégrine $\alpha v\beta_3$ et la Neuropiline-1, ainsi que leur proximité spatiale.

Nous avons réalisé des tests *in vivo* d'imagerie optique avec nos vecteurs fluorescents. Les effets spécifiques observés *in vitro* ne se sont pas traduits par un ciblage spécifique de la périphérie tumorale *in vivo.* Mais le taux de fluorescence obtenu avec les composés de double ciblage sont très intéressants et permettent une détection évidente de la tumeur. Le ratio de fluorescence tumeur/peau s'est révélé plus important pour le composé

de double ciblage RAFT(4-c{RGDfK])Cy5.5-PEG$_{24}$ATWLPPR que pour le châssis RAFT(4-c{RGDfK])Cy5.5. Cela pourrait témoigner d'une spécificité accrue grâce au double ciblage.

De manière inattendue, le composé ciblant la Neuropiline-1 ainsi que son scramble ont permis de très bon résultats d'imagerie optique et de très bons ratios de fluorescence. Mais l'accumulation sélective au niveau tumoral n'est visiblement pas spécifique d'un récepteur en particulier.

En termes de perspectives, nous pouvons espérer que les projets exploitant le RAFT(4-c[RGDfK]) pour la vectorisation de différents effecteurs confirment l'intérêt de ce vecteur, y compris en phase clinique.

En ce qui concerne le projet de double ciblage, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur les effets du double ciblage sur les cascades de signalisation de l'intégrine $\alpha v\beta_3$ et de NRP1. Des études de compétitions pourraient confirmer la formation d'un complexe $\alpha v\beta_3$ / vecteur / NRP1. Puisqu'un tel complexe semble se former et séquestrer les récepteurs au niveau de la membrane, il serait intéressant d'étudier les possibles effets anti-angiogéniques et toxiques de ces composés. Les résultats surprenants obtenus avec le ligand fluorescent ATWLPPR et son scramble méritent d'être étudiés plus en profondeur pour déterminer l'origine d'un marquage tumoral aussi efficace. Un Ala screen peut être envisagé. Enfin, nous avons apporté la preuve qu'un ciblage simultané de plusieurs récepteurs par une même molécule pouvait avoir des effets intéressants et uniques. Cela ouvre donc un nouveau champ de possibilités pour la conception de vecteurs pour des applications diagnostiques et thérapeutiques puisque de nombreuses combinaisons de ligands peuvent être envisagées.

PARTIE EXPERIMENTALE

i. *Matériel et réactifs de synthèse*

All Fmoc amino acid derivatives and resins were purchased from Advanced ChemTech Europe Brussels, Belgium), Bachem Biochimie SARL (Voisins-Les-Bretonneux, France) and France Biochem S.A. (Meudon, France). PyBOP was purchased from France Biochem.

PEG were purchased from Iris Biotech GMBH (Marktredwitz, Deutschland), tetrasulfate-Cyanine 5.5 was obtained from Interchim (Montluçon, France), and other reagents were obtained from either Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) or Acros (Noisy-Le-Grand, France).

RP-HPLC analyses were performed on Waters equipment consisting of a Waters 600 controller, a Waters 2487 Dual Absorbance Detector and a Waters In-Line Degasser. The analytical column used was a Nucleosil 120 Å 3µm C18 particles, 125×4 mm operated at 1 mL/min with linear gradient programs in 20 min run time (routine program: 5% to 100 % B in 20 min).

UV monitoring was performed most of the time at 214 nm and 250 nm. Solvent A consisted of H_2O containing 0.1% TFA and solvent B consisted of CH_3CN containing 9.9% H_2O and 0.1% TFA. Water was of Milli-Q quality. CH_3CN and TFA were of HPLC use quality.

RP-UHPLC analyses were performed on Waters equipment consisting of a Waters Acquity H-Class Bio UPLC combined to a Waters SQ Detector 2 mass spectrometer. The analytical column used was a ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm operated at 0.6 mL/min with linear gradient programs in 2.20 min run time (routine program: 5% to 100 % B in 2.20min).

UV monitoring was performed at 214 nm or 678 nm. Solvent A consisted of H_2O containing 0.1% formic acid (FA) and solvent B consisted of CH_3CN containing 0.1% FA.

Water was of Milli-Q quality. CH_3CN and FA were LC-MS grade.

RP-HPLC purifications were either performed on Gilson GX-281 (high quantities, hundreds of mg, starting material) or GX-271 equipment (low quantities, few mg, molecular assemblies).

For GX-281, the preparative column, Macherey-Nagel 100 Å 7 µm C18 particles, 250 ×21 mm was operated at 20.84 mL/min. For GX-271, the preparative column, Macherey-Nagel 100 Å 7µm C18 particles, 250×10 mm was operated at 4.65 mL/min. For very polar and complex compounds, a C5 column was used to improve the resolution: Discovery BIO 300 Å 10µm C5 particles, D.250 × 10 mm. Linear gradient programs in 20 min run time were used and solvents A and B were the same as the ones used in RP-HPLC analysis.

Electron spray ionization (ESI-MS) mass spectra were obtained on an Esquire 3000 (Bruker).

The multiply charged data produced by the mass spectrometer on the m/z scale were converted to the molecular weight.

NMR spectra were recorded on BRUKER Avance 400 spectrometers. Chemical shifts are expressed in ppm and calculated taking the solvent peak as an internal reference.

ii. *Méthodes générales de synthèse*

a. General Procedure for Solid-Phase Peptide Synthesis

Assembly of all protected peptides was carried out using the Fmoc/t-Bu strategy manually in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass frit or automatically on a peptide synthesizer using 2-chlorotritylchloride®. Coupling reactions were performed manually by using 2 eq. of N-Fmoc-protected amino acid (relative to the resin loading) activated in situ with 2 eq. of PyBOP and 3-5 eq. of diisopropylethylamine (DIPEA) in DMF (10 mL/g resin) for 30 min. The coupling efficiency in manual synthesis was assessed by TNBS tests. N-Fmoc protecting groups were removed by treatment with a piperidine/DMF solution (1:4) for 10 min (10 mL/g resin). The process was repeated three times and the deprotection was verified by reading the absorbance of the piperidine washings at 299 nm. The linear peptides were then released from the resin by treatments with a solution of trifluoroacetic acid/dichloromethane (1:99, 10 mL/mg resin, 2x30 min). After evaporation, diethyl ether was added to precipitate peptides.
Then they were triturated and washed three times with diethyl ether to obtain crude materials.

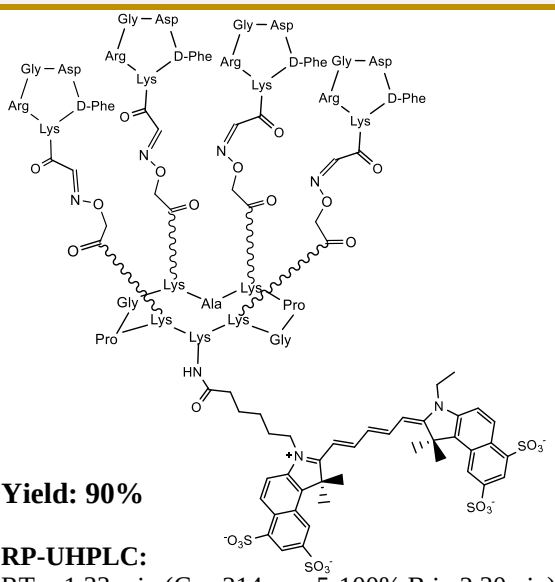
b. General Procedure for Cyclization Reactions

All linear peptides were dissolved in DMF (0.5 mM) and the pH values were adjusted to 8-9 by addition of DIPEA. PyBOP (1.3 eq.) was added and the solution stirred at room temperature for 1 h. Solvent was removed under reduced pressure and the residue dissolved in a minimum of dichloromethane. Diethyl ether was added to precipitate peptides. They were then triturated and washed three times with diethyl ether to obtain crude materials.

iii. *Protocoles de synthèse*

RAFT(4-c[-RGDfK-])-Cy5.5	1

The scaffold **29** (2 mg, 515 nmol) and 2 equiv. of Cy5.5-NHS (1.05 mg, 1.03 µmol) were dissolved in 1 mL of DMF/DIPEA solution (pH=9). The mixture was stirred for 2h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **1** as a blue powder after lyophilisation (2.21 mg, 464 nmol).



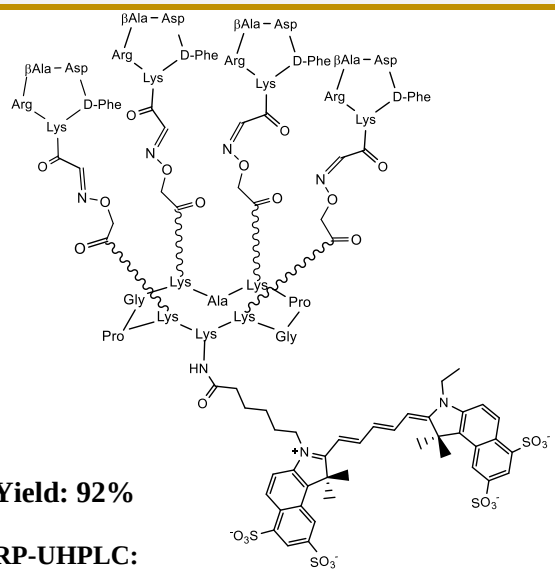
Yield: 90%

RP-UHPLC:
RT = 1.33 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.30min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{212}H_{297}N_{57}O_{63}S_4$
Calcd MW = 4778.3 g.mol^{-1}
Found MW = 4778.0 g.mol^{-1}

RAFT(4-c[-RβADfK-])-Cy5.5	2

The scaffold **30** (4 mg, 1 µmol) and 2 equiv. of Cy5.5-NHS (2.03 mg, 2 µmol) were dissolved in 2 mL of DMF/DIPEA solution (pH=9). The mixture was stirred for 2h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **2** as a blue powder after lyophilisation (4.45 mg, 920 nmol).



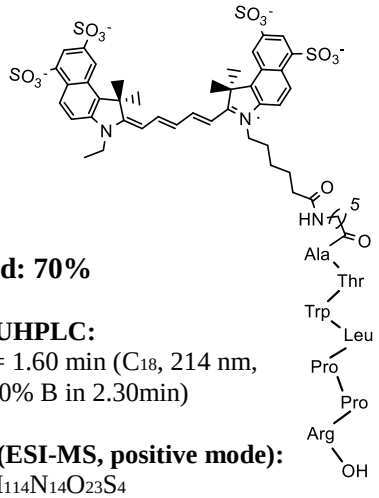
Yield: 92%

RP-UHPLC:
RT = 1.31 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.30min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{216}H_{303}N_{57}O_{63}S_4$
Calcd MW = 4834.4 g.mol^{-1}
Found MW = 4834.8 g.mol^{-1}

Cy5.5-Ahx-A-T-W-L-P-P-R-OH — 3

To a stirred mixture of peptide **31** (1.32 mg, 1.38 µmol) in DMF and DIPEA (pH = 9) was added 2 eq. of tetrasulfo-Cy5.5-mono-NHS-ester (2.8 mg, 2.76 µmol). The dark blue solution was stirred 1h at room temperature. After solvents evaporation under reduced pressure, the crude was purified by RP-HPLC, affording the product **3** as a dark blue powder after lyophilisation (1.78 mg, 966 nmol).



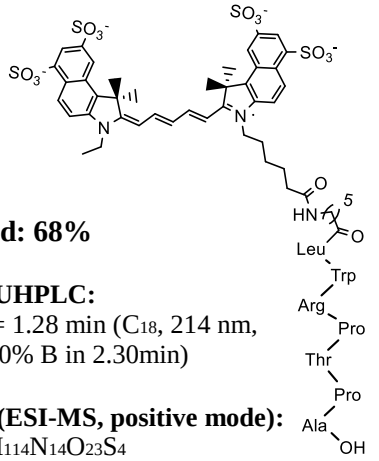
Yield: 70%

RP-UHPLC:
RT = 1.60 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.30min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{86}H_{114}N_{14}O_{23}S_4$
Calcd MW = 1837.2 g.mol^{-1}
Found MW = 1837.6 g.mol^{-1}

Cy5.5-Ahx-L-W-R-P-T-P-A-OH — 4

To a stirred mixture of peptide **32** (1 mg, 1.05 µmol) in DMF and DIPEA (pH = 9) was added 2 eq. of tetrasulfo-Cy5.5-mono-NHS-ester (2.1 mg, 2.1 µmol). The dark blue solution was stirred 1h at room temperature. After solvents evaporation under reduced pressure, the crude was purified by RP-HPLC, affording the product **4** as a dark blue powder after lyophilisation (1.31 mg, 714 nmol).



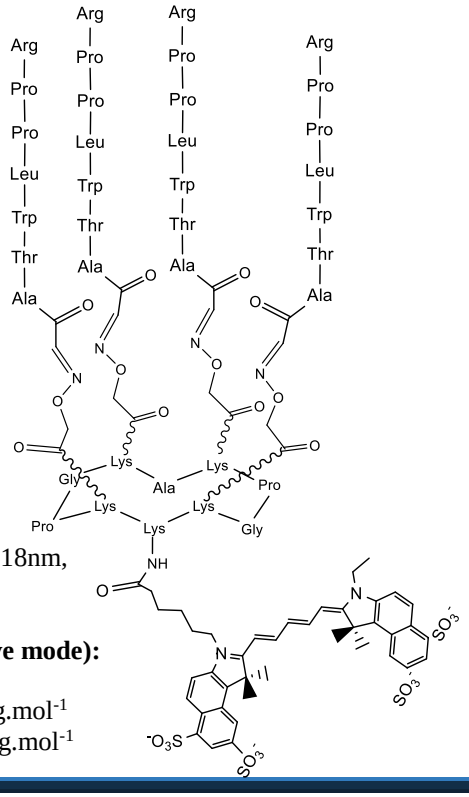
Yield: 68%

RP-UHPLC:
RT = 1.28 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.30min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{86}H_{114}N_{14}O_{23}S_4$
Calcd MW = 1837.2 g.mol^{-1}
Found MW = 1837.6 g.mol^{-1}

RAFT(4-ATWLPPR)-Cy5.5 — 5

To a stirred solution of scaffold **35** (950 µg, 197 nmol) in 70 µL DMF was added 1.9 eq. of commercial tetrasulfo-Cy5.5-mono-NHS-ester (390 µg, 380 nmol). The pH was adjusted to 9 with DIPEA (3µL) and the mixture was stirred 1h at room temperature. The conjugate **5** was obtained as a blue dark powder after purification by RP-HPLC and lyophilisation (1.04 mg, 182 nmol).



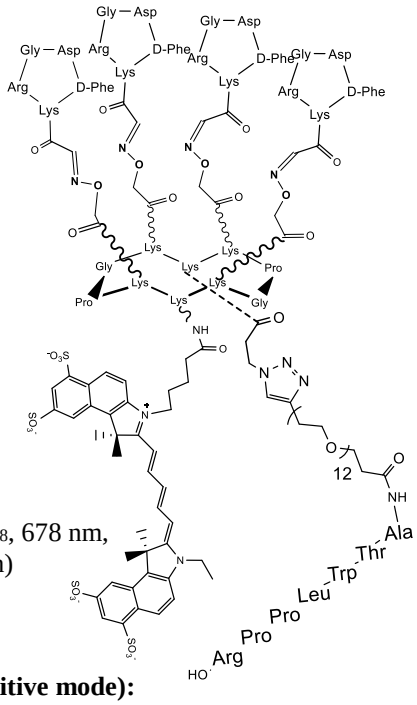
Yield: 92%

RP-UHPLC:
RT = 1.52 min (C_{18}, 618nm, 5-60% B in 5.0 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{263}H_{376}N_{65}O_{72}S_4$
Calcd MW = 5725.6 g.mol^{-1}
Found MW = 5726.2 g.mol^{-1}

RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG$_{12}$ATWLPPR — 6

To a stirred solution of scaffold **39** (1.5 mg, 306 nmol) in 100 µL DMF/PBS (pH = 7.4, 1 mM) (5/5) was added a solution of **40** (1.2 eq., 540 µg, 367 nmol) in 50 µL DMF. The solution is degased under argon. A solution of $CuSO_4$ (38 µg, 153 nmol, 0.5 eq.) and THPTA (330 µg, 765 nmol, 2.5 eq) in 25 µL of PBS (7.4, 1 mM) was added to the previous one. The resulting blue solution is degased under argon. To this blue stirred solution, was added a solution of ascorbate (135 µg, 765 nmol, 2.5 eq.) in 25 µL PBS (7.4, 1 mM) previously degased under argon. The uncoloured resulting solution is stirred 4h at 40°C. Another portion of sodium ascorbate (90 µg, 1.7 eq.) in PBS was added and the resulting mixture was stirred for 16h at 50°C. The compound **6** was obtained pure as a blue powder after RP-HPLC purification and lyophilisation (500 µg, 78nmol)



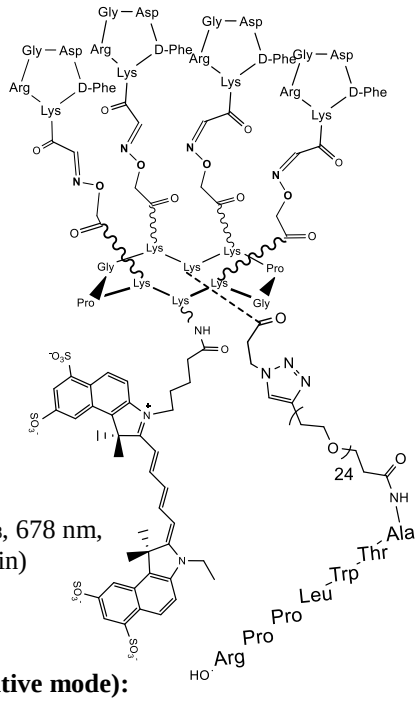
Yield: 26%

RP-UHPLC:
RT = 3.39 min (C_{18}, 678 nm, 5-60% B in 5.0min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{287}H_{420}N_{72}O_{86}S_4$
Calcd MW = 6382.3 g.mol^{-1}
Found MW = 6382.0 g.mol^{-1}

RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG$_{24}$ATWLPPR	7

To a stirred solution of scaffold **39** (1.2 mg, 245 nmol) and **41** (1.2 eq., 640 µg, 318 nmol) in 200 µL DMF/PBS (pH = 7.4, 1 mM) (5/5) was added a solution of $CuSO_4$ (66 µg, 265 nmol, 1 eq.) and THPTA (345 µg, 795 nmol, 3 eq) in 30 µL of PBS (7.4, 1 mM). All solutions were degased under argon. To this blue stirred solution, was added a solution of ascorbate (233 µg, 1.325 µmol, 5 eq.) in 30 µL PBS (7.4, 1 mM). Both solutions were degased under argon. The uncolored resulting solution is stirred 4h at 40°C. The compound **6** was obtained pure as a blue powder after RP-HPLC purification and lyophilisation (420 µg, 61 nmol)



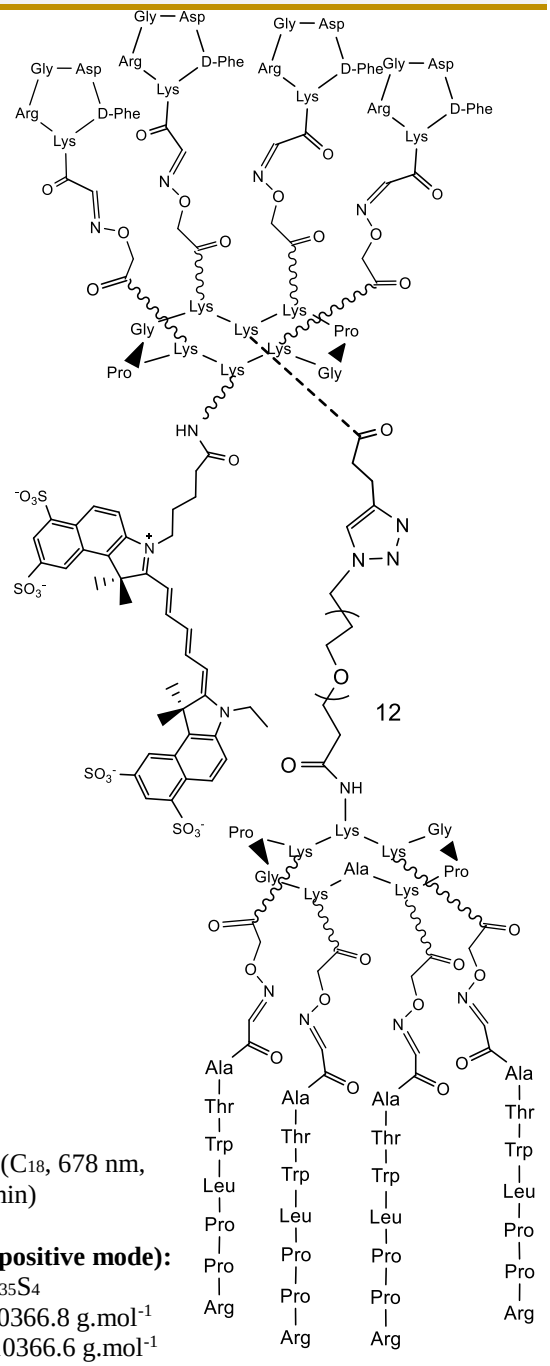
Yield: 25%

RP-UHPLC:
RT = 1.54 min (C_{18}, 678 nm, 5-100% B in 2.3 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{311}H_{468}N_{72}O_{38}S_4$
Calcd MW = 6910.9 g.mol^{-1}
Found MW = 6910.5 g.mol^{-1}

RAFT(4-ATWLPPR)-PEG$_{24}$N$_3$	**8**

To a stirred solution of scaffold **39** (812 µg, 165 nmol, 0.9 eq.) and **42** (1 mg, 183 nmol, 1.0 eq.) in 60 µL of DMF/PBS (pH = 7.4, 1 mM) (5/5) was added a solution of $CuSO_4$ (23 µg, 92 nmol, 0.5 eq.) and THPTA (200 µg, 458 nmol, 2.5 eq.) in 20µL of PBS (7.4, 1 mM). All solutions were degased under argon. To this blue stirred solution, was added a solution of ascorbate (322 µg, 1.83 µmol, 10 eq.) in 40 µL DMF/PBS (7.4, 1 mM) (5/5). Both solutions were degased under argon. The uncolored resulting solution is stirred 4h at 50°C. The compound **8** was obtained pure as a blue powder after RP-HPLC purification and lyophilisation (352 µg, 34 nmol)



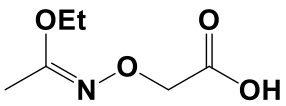
Yield : 21%

RP-UHPLC:
RT = 2.76 min (C_{18}, 678 nm, 5-60% B in 5 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{470}H_{691}N_{124}O_{135}S_4$
Calcd MW = 10366.8 g.mol^{-1}
Found MW = 10366.6 g.mol^{-1}

2-(1-Ethoxyethylideneaminooxy)acetic Acid — 10

To a stirred solution of iodoacetic acid (9.00 g, 48.4 mmol) in water (19 mL) at 0°C was added aqueous NaOH (3.0 mL, 40% w/w). The resulting solution was allowed to heat to room temperature, whereafter ethyl N-hydroxyacetimidate (6.0 g, 58.3 mmol) was added followed by aqueous NaOH (4.5 mL, 40% w/w) and water (19 mL) (pH of solution >12). After 4.5 h of stirring at 80°C and cooling to room temperature, H_2O (70 mL) was added and the aqueous mixture was washed with CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). The water phase was cooled down to 0°C and was brought to pH 2-3 with a 1 M hydrochloride solution. The acidified water phase was then extracted with AcOEt (4 x 50 mL) (NB: After each extraction the pH was adjusted to 2-3 with a 1 M hydrochloride solution, at 0°C), and the combined organic phases from this last extraction were washed with brine (50 mL), dried over $MgSO_4$, and concentrated under vacuum, providing compound **10** as a yellow oil (6.37 g, 39 mmol).



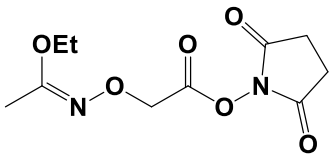
Yield : 78 %

MS (ESI-MS, negative mode):
$C_6H_{11}NO_4$
Calcd MW = 161.2 g.mol^{-1}
Found MW = 161.0 g.mol^{-1}

NMR 1H (300 MHz, CDCl3) :
δ 4.48 (2H, s), 4.00 (2H, q, J = 7.2 Hz), 2.01 (3H, s), 1.27 (3H, t, J = 7.2 Hz)

N-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-Ethoxyethylideneaminooxy)acetate — 11

To a stirred solution of compound **10** (6.37 g, 39.5 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (5.46 g, 47.4 mmol) in ethyl acetate/ dioxane (120 mL, 1:1) at 0°C was added DCC (8.15 g, 39.5 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature overnight. The formed DCU was filtered off and the filtrate was concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (200 mL), and the solution was washed with 5% aqueous $NaHCO_3$ (2x75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic solution was dried over Na_2SO_4 and evaporated under vacuum to yield **11** as a yellow solid (8.66 g, 33.5 mmol) which was used without further purification.



Yield : 85 %

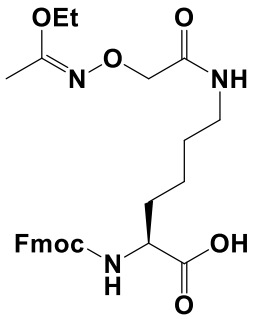
MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{10}H_{14}N_3O_7$
Calcd MW = 258,1 g.mol^{-1}
Found MW = 258.3 g.mol^{-1}

NMR 1H (300 MHz, CDCl3):
δ 4.78 (2H, s), 4.01 (2H, q, J = 7.2 Hz), 2.84 (4H, s), 1.98 (3H, s), 1.28 (3H, t, J = 7.2 Hz)

Fmoc-Lys[*N*-EEI-Aoa]-OH

12

To a stirred mixture of Fmoc-lysine (4.35 g, 16.9 mmol) and DIPEA (3 mL, pH=9) in DMF (100 mL) at room temperature was added dropwise over 20min a solution of the above-prepared NHS-ester **11** (4.35 g, 16.9 mmol) in DMF (40 mL). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. After addition of Ethyl acetate (100 mL), the organic phase was washed with a 10 % citric acid aqueous solution (3 x 30mL). The organic phase was then washed with brine (100 mL), dried over $MgSO_4$, and evaporated under reduced pressure to yield the compound **12** as a light yellow powder (8.07 g, 15.8mmol), which was used without further purification.



Yield : 93 %

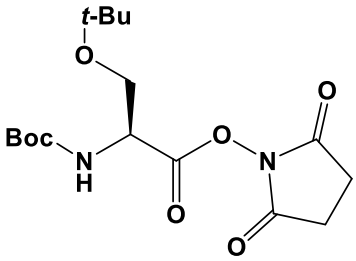
MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{27}H_{33}N_3O_7$
Calcd MW = 511.2 g.mol^{-1}
Found MW = 511.3 g.mol^{-1}

NMR $_1$H (300 MHz, $CDCl_3$):
δ 7.75 (2H, d, J = 7.4 Hz), 7.60 (2H, d, J = 7.4 Hz), 7.38 (2H, t, J = 7.4 Hz), 7.29 (2H, t, J = 7.4 Hz), 6.50 (1H, t, J = 5.6 Hz), 5.70 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.38- 4.36 (5H, m), 4.20 (1H, t, J = 6.9 Hz), 3.96 (2H, q, J = 7.1 Hz), 3.34 (2H, m), 1.96 (3H, s), 1.81 (2H, m), 1.58 (2H, m), 1.45 (2H, m), 1.24 (3H, t, J = 7.1 Hz)

Boc-Ser(*tBu*)-NHS

13

To a stirred solution of Boc-Ser(tBu)-OH (5 g, 19.1 mmol) and N-hydroxysuccinimide (1.8 g, 16 mmol) in AcOEt/dioxan (1:1, 160 mL) cooled in an ice bath was added DCC (4.23 g, 20.5 mmol). After 12 h stirring at room temperature, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite and washed with AcOEt and the collected filtrate was concentrated under vacuum. The obtained oily residue was taken into 150 mL ethyl acetate and washed with 5 % aqueous $NaHCO_3$ (2 x 70 mL), water (2 x 70 mL) and brine (2 x 70 mL). The organic fraction was then dried over $MgSO_4$. Boc-Ser(tBu)-NHS **13** was obtained as a white powder after evaporation of the solvent (6.7 g, 18.7 mmol).



Yield: 98 %

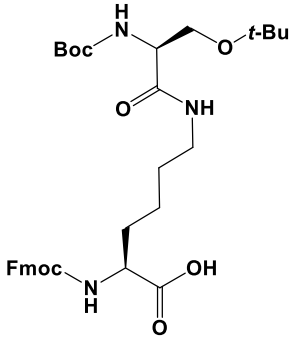
RP-HPLC: RT = 9,8 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{16}H_{26}N_2O_7$
Calcd MW = 358.2 g.mol^{-1}
Found MW = 358.3 g.mol^{-1}

$_1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$):
δ 5.41 (1H, d, J = 9.0 Hz), 4.78 (1H, d, J = 9.0 Hz), 3.92 (1H,m), 3.66 (1H, m), 2.82 (4H, s), 1.46 (9H, s), 1.20 (9H, s)

Fmoc-Lys[Boc-Ser(*t*Bu)]-OH — 14

The above Boc-Ser(tBu)-NHS **13** (6.7 g, 18.7 mmol) in CH_2Cl_2 (75 mL) was added dropwise over 30 min to a stirred suspension of Fmoc-lysine chloride salt (7.65 g, 18.9 mmol) and DIPEA (14mL, pH=9) in CH_2Cl_2 (130 mL). After 5 h of reaction, the solvent was evaporated under vacuum and the remaining residue was dissolved in AcOEt (400 ml), followed by washing with a 10 % citric acid aqueous solution (70 ml), water (2 x 100 ml), and finally brine (100 mL). The organic fraction was dried over Na_2SO_4 and evaporation under vacuum followed by lyophilisation gave **14** as a white solid (11.71 g, 19.2 mmol).



Yield: 94 %

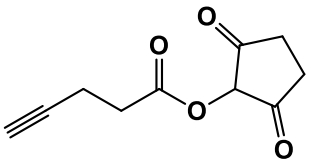
RP-HPLC: RT = 11.7 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{33}H_{45}N_3O_8$
Calcd MW = 611.3 g.mol^{-1}
Found MW = 611.2 g.mol^{-1}

$_1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$):
δ 7.68 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.55 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.33-7.18 (4H, m), 6.84 (1H, broad s), 6.25 (1H, broad d), 5.62 (1H, broad s), 4.34-4.06 (5H, m), 3.63 (1H, m), 3.36 (1H, m), 3.20-3.05 (2H, m), 1.84 (1H, m), 1.65 (1H, m), 1.47-1.32 (14H, m),1.09 (9H, s)

4-Pentynoic acid succinimidyl ester — 15

To a stirred solution of pent-4-ynoic acid (1 g, 10.2 mmol) and *N*hydroxysuccinimide (1.18 g, 10.2 mmol) in ethyl acetate/dioxane (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (2.10 g, 10.2 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5h. The formed DCU was filtered through Celite and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (300 mL), and the solution was washed with 5% aqueous $NaHCO_3$ (2x 75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated. Recrystallization from CH_2Cl_2 / ether afforded **15** as white solid which was used without further purification (1.95 g, 10 mmol).



Yield: 98%

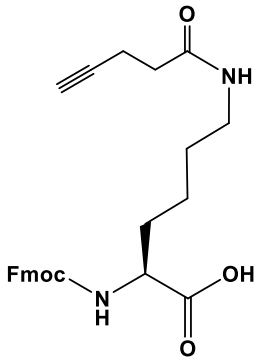
$_1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$):
δ 2.03 (1H, t, J = 2.4 Hz), 2.60 (2H, td, J = 2.4, 7.0 Hz), 2.83 (4H, s), 2.87 (2H, t, J = 7.0 Hz)

$_{13}$C NMR (68 MHz, $CDCl_3$):
δ 14.1, 25.6, 30.3, 69.6, 80.3, 167.1, 169.0.

$_{13}$C NMR (68 MHz, $CDCl_3$):
δ 14.1, 25.6, 30.3, 69.6, 80.3, 167.1, 169.0.

4-Pentynoic acid succinimidyl ester — 16

To a stirred mixture of Fmoc-lysine (3.68 g, 10 mmol) and DIPEA (1.9 mL, 11 mmol) in DMF (50 mL) at room temperature was added dropwise over 10 min a solution of **15** (1.95 g, 10 mmol) in DMF (20 mL). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of DIPEA. After 2 h of reaction, the reaction mixture was concentrated under vacuum providing an oily residue. After addition of ethyl acetate (50 mL), the organic phase was washed with a concentrated citric acid solution (2 x 25 mL), water (25 mL), and brine (25 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated. Precipitation from CH_2Cl_2 / ether afforded the building block **16** as a white solid which was used without further purification (4 g, 9 mmol).



Yield: 90%

RP-HPLC: RT = 9.8 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

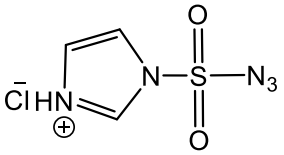
MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{26}H_{28}N_2O_5$
Calcd MW = 448.5 g.mol^{-1}
Found MW = 449.1 g.mol^{-1}

$_1$H NMR (300 MHz, $CDCl_3$):
δ 7.75 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.60 (2H, d, *J* =7.4 Hz), 7.38 (2H, t, *J* =7.4 Hz), 7.29 (2H, t, *J* =7.4 Hz), 6.0 (1H, t, *J* =5.6 Hz), 5.70 (1H, d, *J* =7.8 Hz), 4.38-4.36 (3H, m), 4.12 (1H, t, *J* =6.9 Hz), 3.19 (2H, m), 2.42 (2H, t, J = 7.0 Hz), 2.30 (2H, dt, J = 2.3, 7.0 Hz), 1.92 (1H, t, J = 2.4 Hz), 1.96 (3H, s), 1.81 (2H, m), 1.58 (2H, m), 1.45 (2H, m), 1.24 (3H, t, *J* =7.1 Hz)

$_{13}$C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz):
δ 173.9, 170.0, 156.1, 143.8, 143.7, 140.6, 127.6, 127.0, 125.2, 120.0, 83.7, 71.2, 65.6, 53.7, 46.6, 38.2, 34.2, 30.4, 28.6, 23.0, 14.2

Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride — 17

Sulfuryl chloride (16.1 mL, 200 mol) was added drop-wise to an ice cooled suspension of NaN_3 (13.0g, 200 mmol) in MeCN (200 mL) and the mixture stirred overnight at room temperature. Imidazole (25.9 g, 380 mmol) was added portion-wise to the ice-cooled mixture and the resulting slurry stirred for 3h. at room temperature. The mixture was diluted with EtOAc (400 mL), washed with H_2O (2 × 400 mL) then saturated aqueous $NaHCO_3$ (2 × 400 mL), dried over $MgSO_4$ and filtered. A solution of HCl in EtOH [obtained by the drop-wise addition of AcCl (21.3 mL, 300 mmol) to ice-cooled dry ethanol (75 mL)] was added drop-wise to the filtrate with stirring, the mixture chilled in an ice-bath, filtered and the filter cake washed with EtOAc (3 × 100 mL) to give **17** as colorless needles (26.4 g,0.125 mmol).



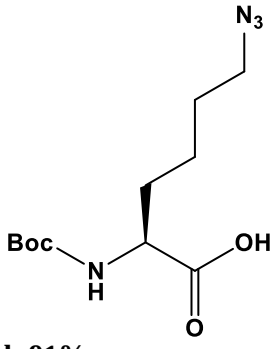
Yield: 63%

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_3H_4ClN_5O_2S$
Calcd MW = 173.1 g.mol^{-1}
Found MW = 173.0 g.mol^{-1}

NMR $_1$H (400 MHz, D_2O):
9.53 (1 H, dd, J = 1.3, 1.6 Hz) δ, 8.09 (1 H, dd, J = 1.6, 2.2 Hz), 7.68 (1H, dd, , J = 1.3, 2.2 Hz)

Fmoc-azidonorleucine — 18

To a stirred mixture of Fmoc-lysine (3.68 g, 10 mmol) and $CuSO_4$ (0.025g, 0.16 mmol) in MeOH/Water (8:2, 80 mL) at room temperature was added $NaHCO_3$ (3 g, 35 mmol) followed by imidazole-1-sulfonyl azide **18** (2.5 g, 12 mmol). The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by further additions of $NaHCO_3$. The reaction mixture was stirred overnight and the pH was acidified at 2 using HCl 3M. The mixture was extracted with ethyl acetate (4 x 75 mL), then the combined organic phase was washed with brine (50ml), dried over anhydrous Mg_2SO_4, filtered and concentrated in order to obtain the building block **17** as a yellowish oil which was used without further purification (3.58 g, 9.1 mmol).



Yield: 91%

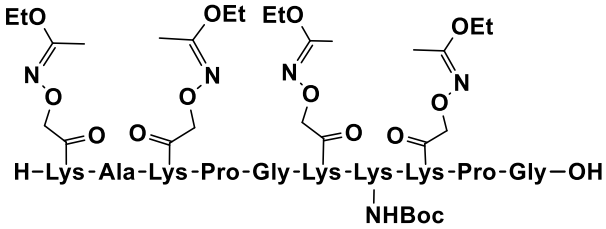
RP-HPLC:
RT = 10.2 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 15 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{26}H_{28}N_2O_5$
Calcd MW = 394.44 g.mol^{-1}
Found MW = 394.2 g.mol^{-1}

$_1$H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.75 (2H, d, *J* = 7.4 Hz), 7.60 (2H, d, *J* =7.4 Hz), 7.38 (2H, t, *J* =7.4 Hz), 7.29 (2H, t, *J* =7.4 Hz), 5.3 (1H, d), 4.2 (2H, d), 4.12 (1H, t, *J* =6.9 Hz), 3.8 (1H, m), 3.2 2H, t), 1.9-1.1 (6H,m)

Linear RAFT 4(Acetimidate)-NHBoc — 19

The linear decapeptide **19** was assembled on 2-chlorotritylchloride® resin (1 g, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **12**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.68 mmol/g. The peptide was released from the resin using cleavage solution of TFE/AcOH/CH_2Cl_2 (2:1:7). Linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (1.04 g, 605 µmol).



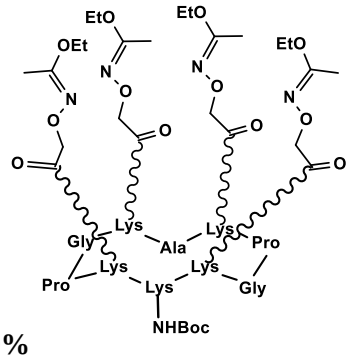
Yield: 89%

RP-HPLC:
RT = 1.69 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{76}H_{131}N_{19}O_{25}$
Calcd MW = 1711.0 g.mol^{-1}
Found MW = 1711.2 g.mol^{-1}

Linear RAFT 4(Acetimidate)-NHBoc — 20

The cyclization reaction was carried out as described in general procedure using the crude linear peptide **19** (1.04 g, 605 µmol).
Solubilisation in a small amount of CH_2Cl_2 and dropwise addition in Et_2O afforded precipitation of cyclic peptide **20** as a white solid powder (922 mg, 544 µmol). This crude material was used without further purification.



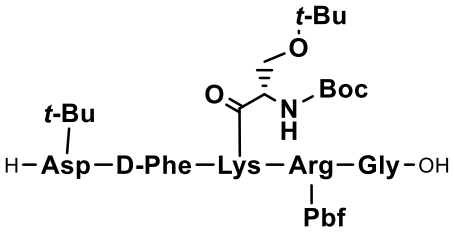
Yield: 90%

RP-HPLC:
RT = 2.09 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{76}H_{129}N_{19}O_{24}$
Calcd MW = 1693.0 g.mol^{-1}
Found MW = 1693.1 g.mol^{-1}

H-D(*t*Bu)-f-K(BocS(*t*Bu))-R(Pbf)-G-OH — 21

The linear peptide **20** was assembled on 2-chlorotritylchloride® resin (1.5 g, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **14**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a resin loading of 0.53 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/CH_2Cl_2 (1/99) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (900 mg, 765 µmol).



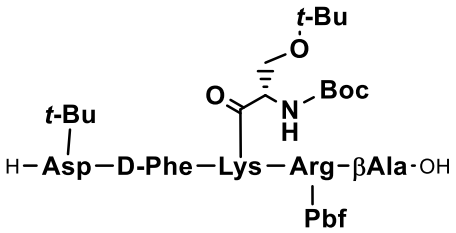
Yield: 96 %

RP-UHPLC:
RT = 1.92 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{26}H_{28}N_2O_5$
Calcd MW = 1173.5 g.mol^{-1}
Found MW = 1173.5 g.mol^{-1}

H-D(*t*Bu)-f-K(BocS(*t*Bu))-R(Pbf)-βA-OH — 22

The linear peptide **21** was assembled on 2-chlorotritylchloride® resin (2.75 g, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **14**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-βAla-OH) was performed following the standard procedure yielding a resin loading of 0.475 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/CH_2Cl_2 (1/99) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a white solid powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (1.54 g, 1.3 mmol).



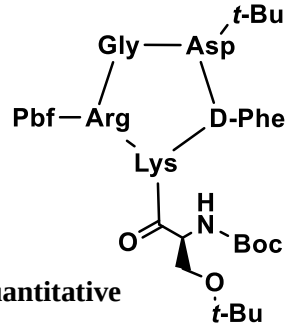
Yield: 86 %

RP-UHPLC:
RT = 1.92 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{57}H_{90}N_{10}O_{15}S$
Calcd MW = 1187.5 g.mol^{-1}
Found MW = 1187.1 g.mol^{-1}

c[-R(Pbf)-G-D(*t*Bu)-f-K(Boc-Ser(*t*Bu))-] — 23

The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **21** (900 mg, 765 µmol). Precipitation from Et_2O afforded the cyclic peptide **23** as a white powder (880 mg, 761 µmol). This crude material was used without further purification.



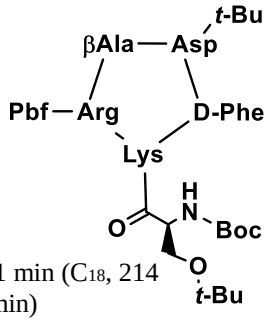
Yield: Quantitative

RP-UHPLC:
RT = 2.38 min (C18, 214 nm, 5100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{56}H_{87}N_{10}O_{14}S$
Calcd MW = 1156.4 g.mol^{-1}
Found MW = 1156.2 g.mol^{-1}

c[-R(Pbf)-βA-D(*t*Bu)-f-K(Boc-Ser(*t*Bu))-] — 24

The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **22** (1.54 g, 1.3 mmol). Precipitation from Et_2O afforded the cyclic peptide **24** as a white powder (1.49 g, 1.28 mmol). This crude material was used without further purification.



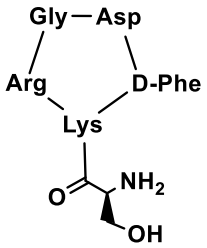
Yield: Quantitative

RP-UHPLC: RT = 2.41 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{57}H_{88}N_{10}O_{14}S$
Calcd MW = 1169.5 g.mol^{-1}
Found MW = 1169.2 g.mol^{-1}

c[-R-G-D-f-K(NH_2-Ser(OH))-] — 25

The cyclopeptide **23** (880 mg, 761 µmol) was dissolved in 50 mL of TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitation from Et_2O afforded peptide **25** as a white solid powder (525 mg, 760 µmol). This crude material was used without further purification.



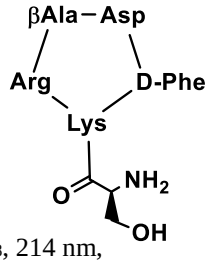
Yield: Quantitative

RP-UHPLC: RT = 0.93 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{30}H_{46}N_{10}O_9$
Calcd MW = 690.8 g.mol^{-1}
Found MW = 690.5 g.mol^{-1}

c[-R-βA-D-f-K(NH_2-Ser(OH))-] — 26

The cyclopeptide **22** (1.49 g, 1.28 mmol) was dissolved in 50 mL of TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) solution. The reaction mixture was stirred for 2h at room temperature. The product was concentrated under reduced pressure and precipitation from Et_2O afforded peptide **26** as a white solid powder (881 mg, 1.25 mmol). This crude material was used without further purification.



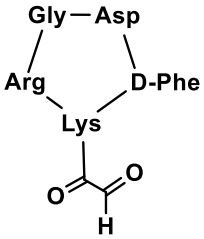
Yield: Quantitative

RP-UHPLC: RT = 0.96 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{30}H_{46}N_{10}O_9$
Calcd MW = 704.8 g.mol^{-1}
Found MW = 705.0 g.mol^{-1}

c[-R-G-D-f-K(COCHO)-] 27

Peptide **25** (880 mg, 761 µmol) and 10 eq. $NaIO_4$ (1.63 g, 7.6 mmol) were stirred in 25 mL of water. The mixture was stirred at room temperature for 45 min and the product was directly purified by RP-HPLC affording aldehyde containing pentacyclopeptide **27** as a white powder after lyophilisation (276 mg, 418 µmol).



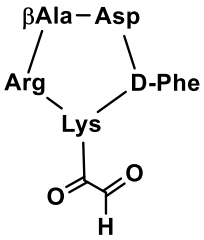
Yield: 55%

RP-UHPLC:
RT = 0.85 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{29}H_{41}N_9O_9$
Calcd MW = 659.7 g.mol^{-1}
Found MW = 660.4 g.mol^{-1}

c[-R-βA-D-f-K(COCHO)-] 28

Peptide **26** (460 mg, 652 µmol) and 10 eq. $NaIO_4$ (1.4 g, 6.52 mmol) were stirred in 25 mL of water. The mixture was stirred at room temperature for 45 min and the product was directly purified by RP-HPLC affording aldehyde containing pentacyclopeptide **28** as a white powder after lyophilisation (195 mg, 289 µmol).



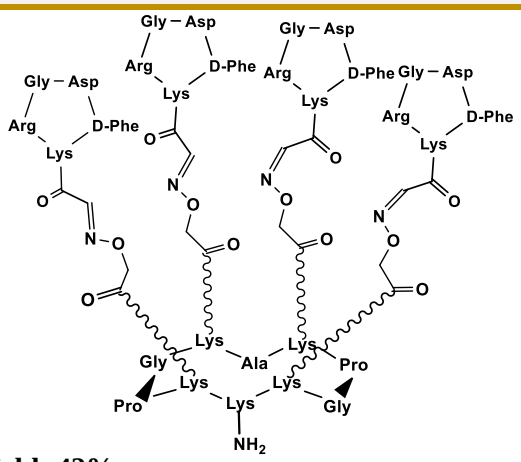
Yield: 44%

RP-UHPLC:
RT = 0.93 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{30}H_{43}N_9O_9$
Calcd MW = 673.8 g.mol^{-1}
Found MW = 674.2 g.mol^{-1}

RAFT(4-c[-RGDfK-])-NH_2 — 29

The scaffold **20** (10 mg, 6.0 µmol) and 6 equiv. of c[-RGDfK(COCHO)-] **27** (23.5 mg, 36 µmol) were dissolved in 1 mL of TFA/H_2O (7/3) solution. The mixture was stirred for 2h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **29** as a white powder (9.78 mg, 2.52 µmol).



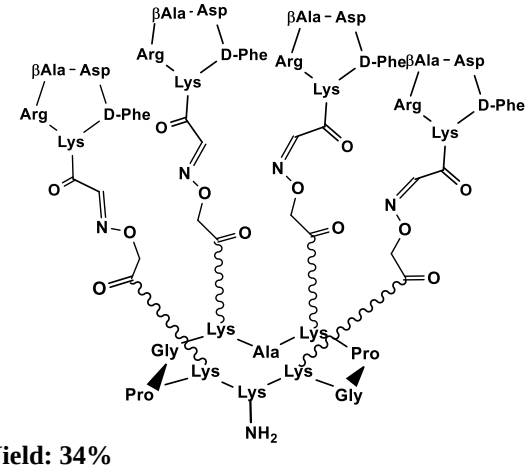
Yield: 42%

RP-UHPLC:
RT = 1.17 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{171}H_{253}N_{55}O_{50}$
Calcd MW = 3879.3 g.mol^{-1}
Found MW = 3878.6g.mol^{-1}

RAFT(4-c[-RβADfK-])-NH_2 — 30

The scaffold **20** (10 mg, 6.0 µmol) and 6 equiv. of c[-RGDfK(COCHO)-] **28** (23.5 mg, 36 µmol) were dissolved in 1 mL of TFA/H_2O (7/3) solution. The mixture was stirred for 2h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **29** as a white powder (8 mg, 2.52 µmol).



Yield: 34%

RP-UHPLC:
RT = 1.06 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{175}H_{261}N_{55}O_{50}$
Calcd MW = 3935.4 g.mol^{-1}
Found MW = 3935.1 g.mol^{-1}

H-Ahx-ATWLPPR-OH	31
Linear peptide **31** was assembled on 2-chlorotritylchloride® resin (2 g, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and automatised synthesis. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) was performed manually following the standard procedure yielding a resin loading of 0.37 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/CH_2Cl_2 (99/1) cleavage solution and stirred 4h in a TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) deprotection solution. The linear peptide was obtained after RP-HPLC and lyophilisation (600 mg, 630 µmol).	H_2N·Ahx·Ala·Thr Trp·Leu·Pro·Pro Arg-OH **Yield: 85%** **RP-UHPLC:** RT = 0.88 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min) **MS (ESI-MS, positive mode):** $C_{46}H_{72}N_{12}O_{10}$ Calcd MW = 953.2 g.mol^{-1} Found MW = 953.6 g.mol^{-1}

H-Ahx-LWRPTPA-OH	32
Linear peptide **32** was assembled on 2-chlorotritylchloride® resin (2 g, loading of 0.7 mmol/g) using the general procedure and automatised synthesis. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Ala-OH) was performed manually following the standard procedure yielding a resin loading of 0.42 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/CH_2Cl_2 (99/1) cleavage solution and stirred 4h in a TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) deprotection solution. The linear peptide was obtained after RP-HPLC and lyophilisation (665 mg, 698 µmol).	H_2N–Ahx·Leu·Trp Arg·Pro·Thr·Pro Ala–OH **Yield: 83%** **RP-UHPLC:** RT = 1.05 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min) **MS (ESI-MS, positive mode):** $C_{46}H_{72}N_{12}O_{10}$ Calcd MW = 953.2 g.mol^{-1} Found MW = 953.6 g.mol^{-1}

H-SATWLPPR-OH — 33

Linear peptide **33** was assembled on 2-chlorotritylchloride® resin (3 g, loading of 0.54 mmol/g) using the general procedure and automatised synthesis. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) was performed manually following the standard procedure yielding a resin loading of 0.35 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFA/CH_2Cl_2 (99/1) cleavage solution and stirred 4h in a TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) deprotection solution. The linear peptide was obtained after RP-HPLC and lyophilisation (633 mg, 683 µmol).

Yield: 65%

RP-UHPLC:
RT = 0.97 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{43}H_{66}N_{12}O_{11}$
Calcd MW = 927.1 g.mol^{-1}
Found MW = 927.5 g.mol^{-1}

CHO-ATWLPPR-OH — 34

To a stirred solution of linear peptide **33** (25 mg, 27 µmol) in water (1 mL) was added 3 eq. of $NaIO_4$ in one portion (17 mg, 81 µmol). The mixture is stirred 20min at room temperature and directly purified on RP-HPLC. The aldehyde-containing linear peptide **34** is obtained as a pure white powder after lyophilisation (9.6 mg, 10.5 µmol).

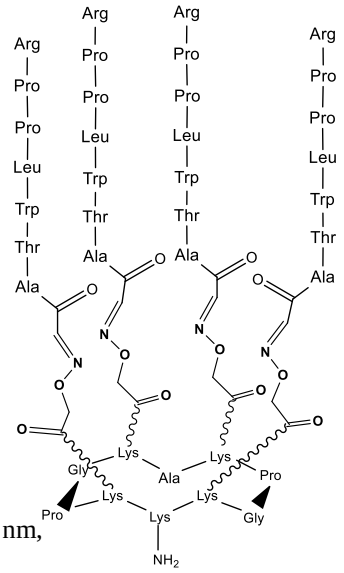
Yield: 39%

RP-HPLC:
RT = 1.16 min (C_{18}, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{42}H_{63}N_{11}O_{12}$
Calcd MW = 914.0 g.mol^{-1}
Found MW = 914.6 g.mol^{-1}

RAFT(4-ATWLPPR)-NH_2 — 35

To a stirred solution of cyclodecapeptide **20** (2.5 mg, 1.57 µmol) in TFA/H_2O (7/3) solution (160µL) was added 5.6 eq of aldehyde-containing peptide **34** (7.8 mg, 8.75 µmol). The mixture is stirred 1h30 at room temperature. The desired cyclodecapeptide **35** is obtained as a white powder after RP-HPLC purification and lyophilisation (3.2 mg, 665 nmol).



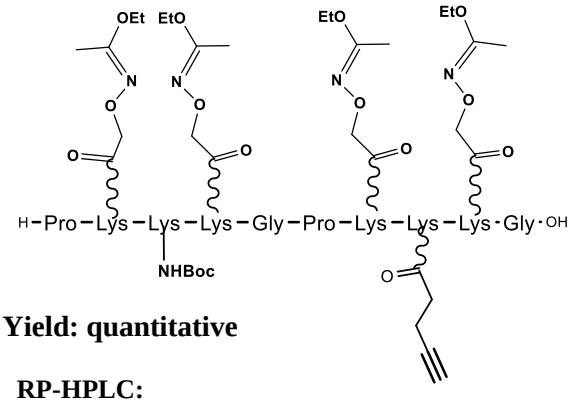
Yield: 42%

RP-HPLC:
RT = 1.47 min (C_{18}, 214 nm, 5-60% B in 5.0 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{223}H_{333}N_{63}O_{58}$
Calcd MW = 4824.5 g.mol^{-1}
Found MW = 4824.3g.mol^{-1}

Linear RAFT(4-acétimidate)-NHBoc-NHalcyne — 36

Linear decapeptide **36** was assembled on 2-chlorotritylchloride® resin (500 mg, loading of 0.54 mmol/g) using the general procedure and modified amino acid **12** and **16**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.6 mmol/g. The peptide was released from the resin using a TFE/AcOH/CH_2Cl_2 (2/1/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (554 mg, 0.3 mmol).



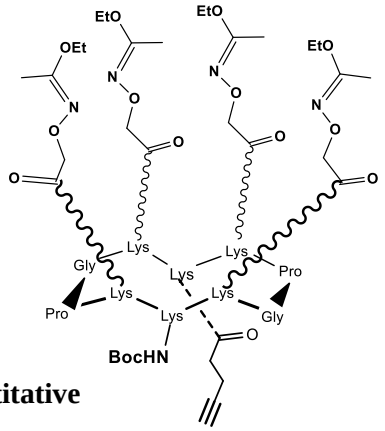
Yield: quantitative

RP-HPLC:
RT = 15.6 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{84}H_{142}N_{20}O_{26}$
Calcd MW = 1848.2 g.mol^{-1}
Found MW = 1848.1 g.mol^{-1}

Linear RAFT(4-acétimidate)-NHBoc-NHalcyne — 37

The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using crude linear peptide **61** (554 mg, 0.3 mmol). Precipitation from Et_2O afforded cyclic peptide **62** as a light brown powder (550 mg, 0.3 µmol). This crude material was used without further purification.



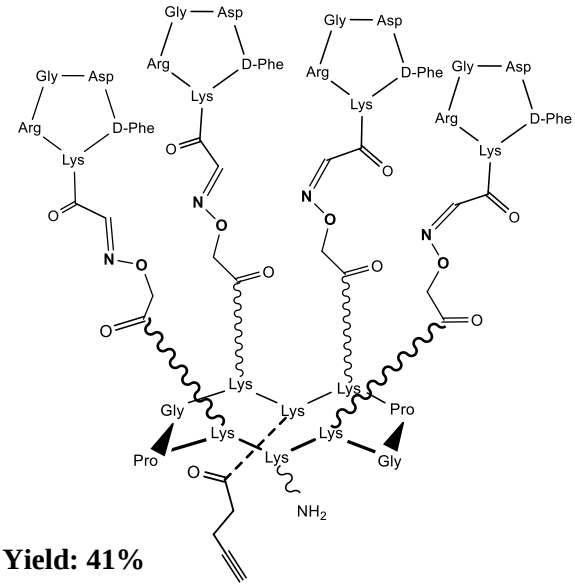
Yield: quantitative

RP-HPLC:
RT = 16.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{84}H_{140}N_{20}O_{25}$
Calcd MW = 1830.2 g.mol^{-1}
Found MW = 1830.1 g.mol^{-1}

Linear RAFT(4-acétimidate)-NH_2-NHalcyne — 38

Scaffold **37** (20 mg, 11 µmol) and 6 equiv of c[-RGDfK(COCHO)-] **27** (44 mg, 66 µmol) were dissolved in 1.2 mL of a TFA/H_2O (7/3) solution. The mixture was stirred for 30min and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **38** as a white powder (18 mg, 4.48 µmol).



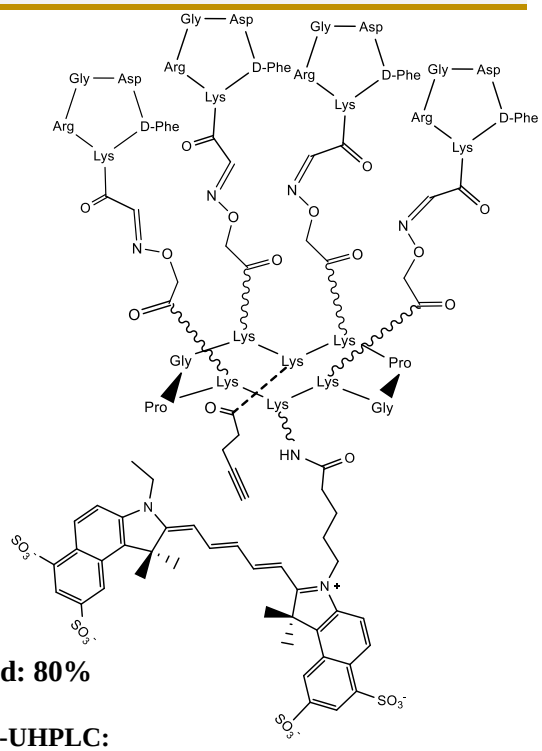
Yield: 41%

RP-UHPLC:
RT = 1.37 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{179}H_{264}N_{56}O_{51}$
Calcd MW = 4016.4 g.mol^{-1}
Found MW = 4016.0 g.mol^{-1}

Linear RAFT(4-acétimidate)-Cy5.5-NHalcyne — 39

Scaffold **38** (4.1 mg, 1 µmol) and 2 equiv of tetrasulfo-Cy5.5-mono-NHS-ester (3.4 mg, 2 µmol) were dissolved in 2 mL of a DMF/DIPEA (pH = 9) solution. The mixture was stirred for 30min and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **39** as a blue powder (3.2 mg, 0.8 µmol).



Yield: 80%

RP-UHPLC:
RT = 1.28 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{220}H_{307}N_{58}O_{64}S_4$
Calcd MW = 4916.5 g.mol^{-1}
Found MW = 4915.2 g.mol^{-1}

N_3-PEG$_{12}$-ATWLPPR-OH — 40

Peptide **40** is assembled on 2-chlorotrytilchloride® resin (20 mg, loading of 0,54 mmol/g) using the general procedure and N_3-PEG$_{12}$-OH. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) was performed following the standard procedure yielding a resin loading of 0.35 mmol/g. The protected peptide was released from the resin using a TFA/CH_2Cl_2 (1/99) cleavage solution, and stirred 4h in a TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) deprotection solution. The linear peptide **40** was obtained as a light powder after RP-HPLC, and lyophilisation (2.5 mg, 1.33 µmol).

N_3-PEG$_{(12)}$—A—T—W—L—P—P—R—OH

Yield: 19%

RP-UHPLC:
RT = 1.48 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{67}H_{112}N_{14}O_{22}$
Calcd MW = 1465.7 g.mol^{-1}
Found MW = 1466.1 g.mol^{-1}

N_3-PEG$_{24}$-ATWLPPR-OH — 41

Peptide **41** is assembled on 2-chlorotrytilchloride® resin (20 mg, loading of 0,54 mmol/g) using the general procedure and N_3-PEG$_{24}$-OH. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) was performed following the standard procedure yielding a resin loading of 0.35 mmol/g. The protected peptide was released from the resin using a TFA/CH_2Cl_2 (1/99) cleavage solution, and stirred 4h in a TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) deprotection solution. The linear peptide **41** was obtained as a light powder after RP-HPLC, and lyophilisation (3.3 mg, 1.4 µmol).

N_3-PEG$_{(24)}$–A—T—W—L—P—P—R—OH

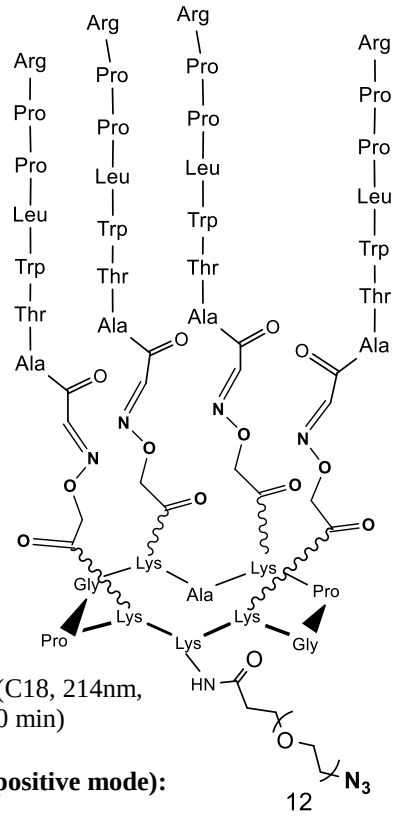
Yield: 20%

RP-UHPLC:
RT = 1.52 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{91}H_{160}N_{14}O_{34}$
Calcd MW = 1994.4 g.mol^{-1}
Found MW = 1994.8 g.mol^{-1}

RAFT(4-ATWLPPR)-PEG$_{12}$N$_3$ — 42

To a stirred solution of scaffold **35** (1.1 mg, 228 nmol) in DMF/DIPEA (pH = 9) was added N_3-PEG$_{12}$-NHS (203 µg, 270 nmol, 1.2 eq.). The solution is stirred 2h at room temperature.
The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to pH 8-9 by additions of DIPEA. The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to 8-9 by additions of DIPEA. The product **42** is obtained as a white powder after RP-HPLC purification and lyophilisation (1 mg, 183 nmol).



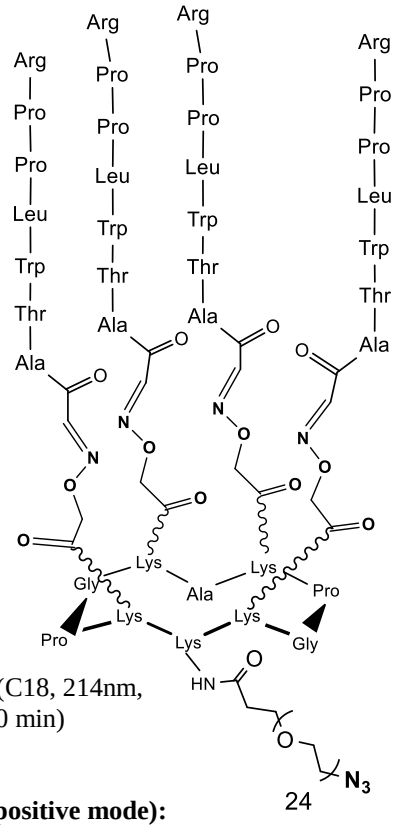
Yield : 80%

RP-UHPLC :
RT = 1.67 min (C18, 214nm, 5-60% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{250}H_{384}N_{66}O_{71}$
Calcd MW = 5450.3 g.mol^{-1}
Found MW = 5450.0 g.mol^{-1}

RAFT(4-ATWLPPR)-PEG$_{24}$N$_3$ — 43

To a stirred solution of scaffold **35** (1.6 mg, 330 nmol) in DMF/DIPEA (pH = 9) was added N$_3$-PEG$_{24}$-NHS (590 µg, 465 nmol, 1.4 eq.). The solution is stirred 2h at room temperature. The pH of the resulting mixture was regularly adjusted to 8-9 by additions of DIPEA. The product **43** is obtained as a white powder after RP-HPLC purification and lyophilisation (1.7 mg, 284 nmol).



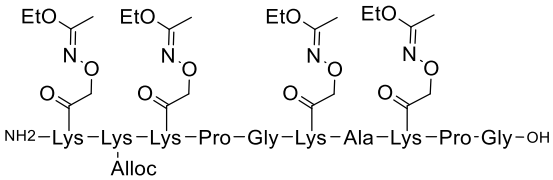
Yield : 86%

RP-UHPLC :
RT = 1.43 min (C18, 214nm, 5-60% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{274}H_{432}N_{66}O_{83}$
Calcd MW = 5978.9 g.mol^{-1}
Found MW = 5979.9 g.mol^{-1}

Linear RAFT(4-acim)-NHAlloc — 44

The linear decapeptide **44** was assembled on 2-chlorotritylchloride® resin (1.5 g) using the general procedure and modified amino acid **12**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 0.7 mmol/g. The peptide was released from the resin using a AcOH/TFE/DCM (1/2/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (1.78 g, 1.05 mmol).



Yield: Quantitative

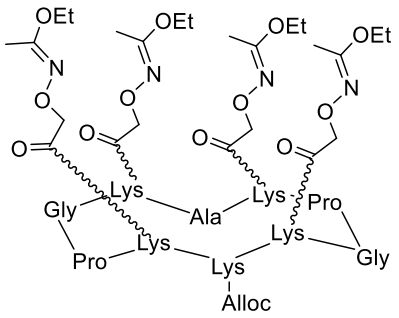
RP-HPLC:
RT = 13.0 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{75}H_{127}N_{19}O_{25}$
Calcd MW = 1694,9 g.mol^{-1}
Found MW = 1695.7 g.mol^{-1}

RAFT(4-acim)-NHAlloc — 45

The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using the crude linear peptide **44** (1.78 g, 1.05 mmol). Precipitation from Et_2O afforded cyclic peptide **45** as a light brown powder (1.76 g, 1.05 mmol). This crude material was used without further purification.

.



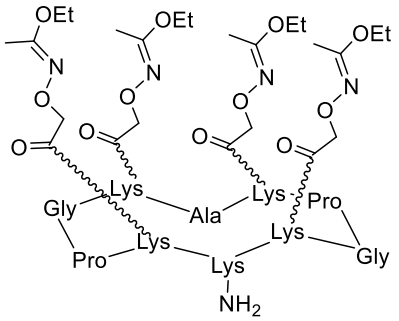
Yield: Quantitative

RP-HPLC:
RT = 14.9 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{75}H_{125}N_{19}O_{24}$
Calcd MW = 1676,9 g.mol^{-1}
Found MW = 1677.3 g.mol^{-1}

RAFT(4-acim)-NH_2 — 46

Peptide **45** (1.76 g, 1.05 mmol) was dissolved in 100 ml of anhydrous CH_2Cl_2/DMF (1/1) under argon. 50 eq. of phenylsilane and 0.2 equiv of $Pd(PPh_3)_4$ were added under argon. The reaction was stirred under argon for 30 min at room temperature. The mixture was treated with 6ml of methanol before solvent removal under reduced pressure. The deprotected peptide **53** was obtained as a brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (1.57 g, 0.99 mmol).



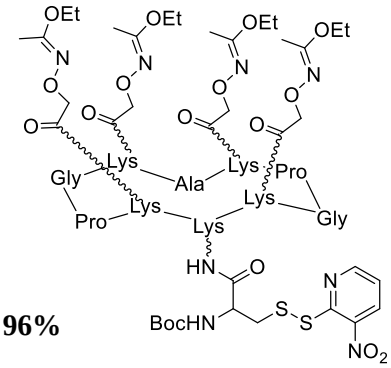
Yield: 94%

RP-HPLC:
RT = 13.2 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{71}H_{120}N_{19}O_{22}$
Calcd MW = 1591,8 g.mol^{-1}
Found MW = 1592.8 g.mol^{-1}

RAFT(4-acim)-NHBocCys(NPyS) — 47

Scaffold **46** (1.57 g, 0.99 mmol), 2 equiv of Boc-Cys(Npys)-OH (750 mg, 2 mmol) and 2 equiv of PyBOP (1.04 g, 2mmol) were dissolved in 5 mL of DMF. The pH of the solution was adjusted to 9 with DIPEA. The mixture was stirred for 2 h at room temperature. Peptide **47** was obtained as a dark brown powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (1.85 g, 0.95 mmol).



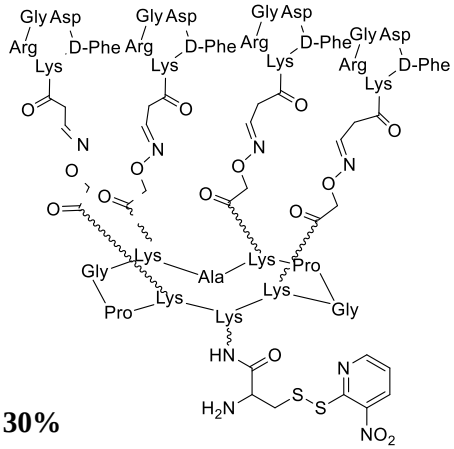
Yield: 96%

RP-HPLC:
RT = 16.5 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{84}H_{136}N_{22}O_{27}S_2$
Calcd MW = 1950,2 g.mol^{-1}
Found MW = 1950.2 g.mol^{-1}

RAFT(4-c[RGDfK])-NH$_2$Cys(NPyS) — 48

Scaffold **47** (24 mg, 12.3 µmol) and 5 equiv of c[-RGDfK(COCHO)-] **27** (42 mg, 64 µmol) were dissolved in 2 mL of a TFA/H_2O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **48** as a white powder (15 mg, 3.63 µmol).



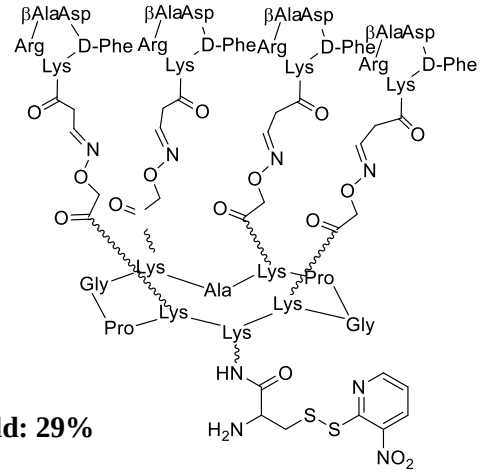
Yield: 30%

RP-UHPLC:
RT = 1.10 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{179}H_{260}N_{58}O_{53}S_2$
Calcd MW = 4136.5 g.mol^{-1}
Found MW = 4135.4 g.mol^{-1}

RAFT(4-c[RβADfK])-NH$_2$Cys(NPyS) — 49

Scaffold **47** (80 mg, 41 µmol) and 5.5 equiv of c[-R βADfK(COCHO)-] **28** (152 mg, 225.6 µmol) were dissolved in 6 mL of a TFA/H_2O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **49** as a white powder (50 mg, 12.1 µmol).



Yield: 29%

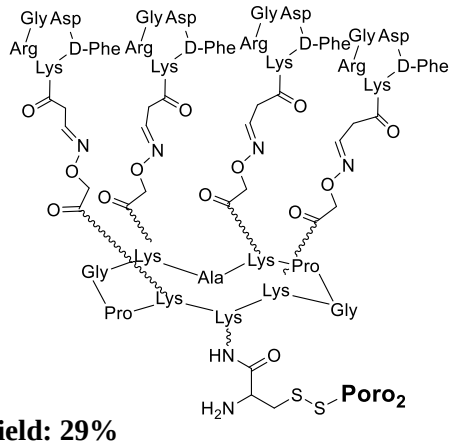
RP-UHPLC:
RT = 1.14 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{183}H_{268}N_{58}O_{53}S_2$
Calcd MW = 4192.6 g.mol^{-1}
Found MW = 4191.4 g.mol^{-1}

RAFT(4-c[RGDfK])Poro2 — 50

To scaffold **48** (46 mg, 7.34 µmol) in 0.4 mL of a CH_3CN / acetate buffer (pH = 4.8, 100µM) (1/2) solution degased under argon, was added 1.5 eq. of Poro2 (4.1 mg, 1.46 µmol). The yellow mixture was stirred for 5min and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure conjugate **50** as a yellow powder (13.5 mg, 2.13 µmol).

Poro2 : cggrvvalfyfasklvlkalst
Calc MW = 2343.9 g.mol^{-1}



Yield: 29%

RP-UHPLC:
RT = 1.18 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.30 min)

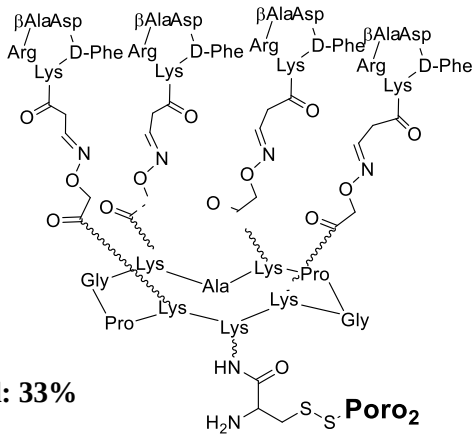
MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{284}H_{435}N_{83}O_{78}S_2$
Calcd MW = 6323.2 g.mol^{-1}
Found MW = 6321.9 g.mol^{-1}

RAFT(4-c[RβADfK])Poro2 — 51

To scaffold **49** (6 mg, 1.43 µmol) in 0.4 mL of a CH_3CN / acetate buffer (pH = 4.8, 100µM) (1/2) solution degased under argon, was added 1.1 eq. of Poro2 (4.5 mg, 1.61 µmol). The resulting yellow mixture was stirred for 5min and the product was directly purified by RP-HPLC affording pure conjugate **51** as a yellow powder (3 mg, 470 nmol).

Poro2 : cggrvvalfyfasklvlkalst

Calc MW = 2343.9 $g.mol^{-1}$



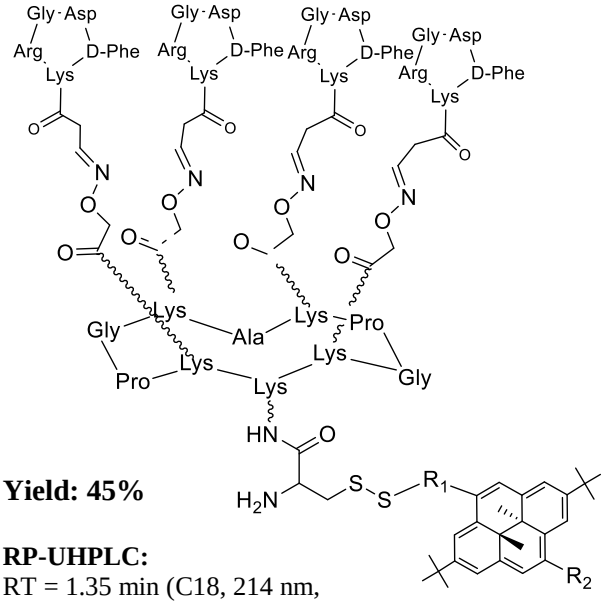
Yield: 33%

RP-UHPLC:
RT = 1.13 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{288}H_{443}N_{83}O_{78}S_2$
Calcd MW = 6379.3 $g.mol^{-1}$
Found MW = 6380.0 $g.mol^{-1}$

RAFT(4-c[RGDfK])DHP — 52

To scaffold **48** (8.5 mg, 2.06 µmol) in 1.8 mL of a CH_3CN / DMF / acetate buffer (pH = 4.8, 100µM) (4/3/2) solution degased under argon, was added 2 eq. of HS-DHP (2.54 mg, 4.12 µmol). The resulting brown mixture was degased under argon and stirred 2h at room temperature, protected from light. The product was directly purified by RP-HPLC affording pure conjugate **52** as a brown powder (4.17 mg, 923 nmol).



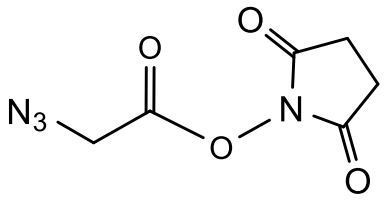
Yield: 45%

RP-UHPLC:
RT = 1.35 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{211}H_{304}N_{57}O_{51}S_2$
Calcd MW = 4119.3 $g.mol^{-1}$
Found MW = 4518.7 $g.mol^{-1}$

N-hydroxysuccinimic Azidoacetate ester — 53

To a stirred solution of azidoacetic acid (1 g, 9.9 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (1.5 g, 12.9 mmol, 1.3 eq.) in ethyl acetate/dioxane (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (2 g, 9.9 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5h. The formed DCU was filtered through Celite and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (300 mL), and the solution was washed with 5% aqueous $NaHCO_3$ (2x 75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na_2SO_4, filtered and concentrated. Recrystallization from CH_2Cl_2 / ether afforded **53** as white solid which was used without further purification (1.77 g, 8.9 mmol).



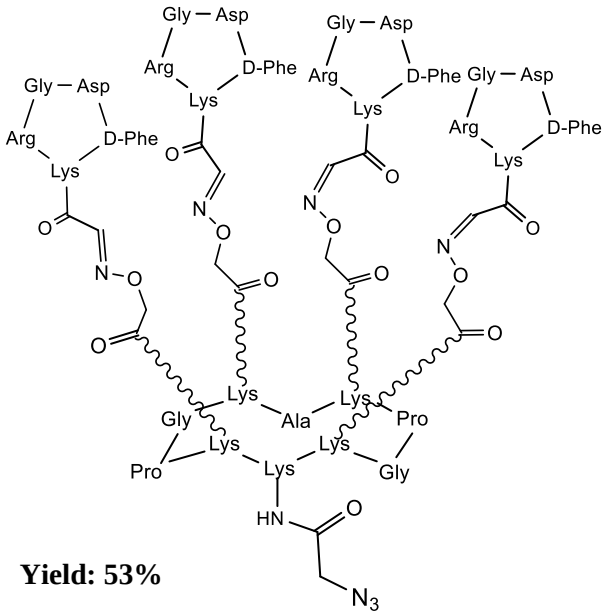
Yield: 90%

RP-UHPLC:
RT = 1.74 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_6H_6N_4O_4$
Calcd MW = 198.2 g.mol^{-1}
Found MW = 198.0 g.mol^{-1}

RAFT(4-c[RGDfK])-N_3 — 54

To a stirred solution of scaffold **30** (9.5 mg, 2.45 µmol) in 400 µL of DMF/DIPEA (pH = 9) was added 5 eq. of ester **53** (2.5 mg, 13 mmol, 5 eq). The pH was regularly adjusted to 9 by additions of DIPEA. The reaction mixture was stirred 2h at room temperature. The product **54** was obtained as a white powder after RP-HPLC purification and lyophilisation (5.1 mg, 1.29 µmol).



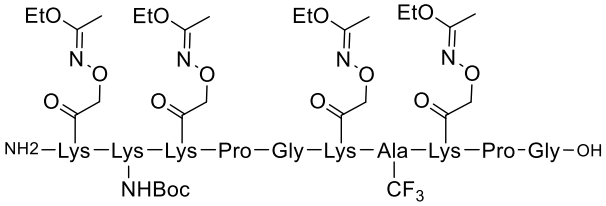
Yield: 53%

RP-UHPLC:
RT = 1.22 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{173}H_{254}N_{58}O_{51}$
Calcd MW = 3962.3 g.mol^{-1}
Found MW = 3963.2 g.mol^{-1}

Linear RAFT(4-acim)-CF_3-NHBoc — 55

The linear decapeptide **54** was assembled on 2-chlorotrytilchloride® resin (700 mg, loading = 1.52 mmol) using the general procedure, Fmoc-Ala(CF_3)-OH and modified amino acid **12**. The anchoring of the first amino acid (Fmoc-Gly-OH) was performed following the standard procedure yielding a convenient resin loading of 1.45 mmol/g. The peptide was released from the resin using a AcOH/TFE/DCM (1/2/7) cleavage solution. The linear protected peptide was obtained as a light white powder after precipitation, triturating and washing with diethyl ether (892 mg, 500 µmol).



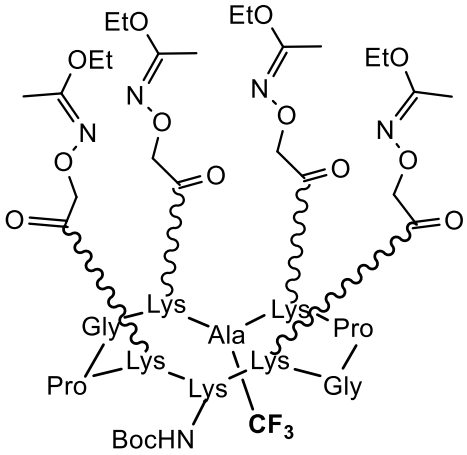
Yield: 47%

RP-UHPLC:
RT = 2.30 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{179}H_{260}N_{58}O_{53}S_2$
Calcd MW = 1779.0 g.mol^{-1}
Found MW = 1780.0 g.mol^{-1}

Linear RAFT(4-acim)-CF_3-NHBoc — 56

The cyclization reaction was carried out as described in the general procedure using the crude linear peptide **55** (892 mg, 500 µmol). Precipitation from Et_2O afforded cyclic peptide **56** as a light brown powder (262 mg, 148 µmol). This crude material was used without further purification.



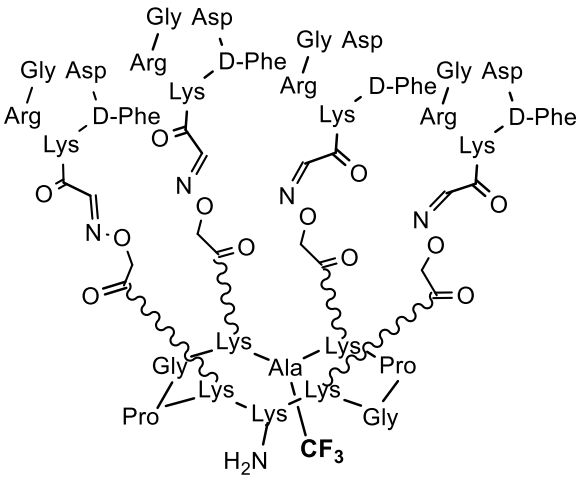
Yield: 30%

RP-UHPLC:
RT = 2.35 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.30 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{179}H_{260}N_{58}O_{53}S_2$
Calcd MW = 1761.0 g.mol^{-1}
Found MW = 1761.9 g.mol^{-1}

Linear RAFT(4-acim)-CF_3-NHBoc	57

Scaffold **56** (136 mg, 78 µmol) and 5 equiv of c[-RGDfK(COCHO)-] **27** (266 mg, 386 µmol) were dissolved in 4 mL of a TFA/H_2O (7/3) solution. The mixture was stirred for 1 h and the product was purified by RP-HPLC affording pure conjugate **57** as a white powder (33 mg, 8.2 µmol).



Yield: 11%

RP-HPLC:
RT = 1.59 min (C18, 214 nm, 5-100% B in 2.20 min)

MS (ESI-MS, positive mode):
$C_{172}H_{252}N_{55}O_{50}$
Calcd MW = 3947.3 g.mol^{-1}
Found MW = 3946.4 g.mol^{-1}

iv. *Protocoles des tests biologiques*

c. *Cell Culture*

All cells were maintained in American Type Culture Collection recommended cell culture media and conditions, which are listed in Table A. Cells were all cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2.

Cell line	Description	Source or Reference	Media
3T3	Mouse embryo fibroblast cell line	ATCC	DMEM+10% FBS
H358	Human lung bronchioalveolar carcinoma cell line; Non-small cell lung cancer cell line	ATCC	RPMI+10% FBS
MDA-MB-231	Human mammary gland adenocarcinoma cell line	ATCC	DMEM+10% FBS
U87	Human glioblastoma cell line	ATCC	DMEM+10% FBS

Table A. Cell lines tested in this study

d. *Particle binding efficiency assay by FACS*

After sonication of compounds in PBS for 30 seconds, they were added on 1 million of suspended cells in PBS Ca^{2+}/Mg^{2+}, at indicated concentrations at 37°C in 5% CO_2 for 30min. Samples were then centrifuged 5min and rinsed thoroughly with PBS. This cycle is repeated two times. Cells were then transferred to PBS for analysis by flow cytofluorometry (BD Biosciences).

e. *Confocal Microscopy experiments*

U87MG cells (20000 cells per well) in 40 µL of PBS Ca^{2+}/Mg^{2+} were put in each well of a 8 well Lab Tek plate. 260 µL of DMEM 10% SVF were added and the cells were incubated overnight at 37°C in 5% CO_2. After medium removal and washing with PBS Mg^{2+}/Ca^{2+}, 0.50 nmol of compounds in 200 µL of PBS Mg^{2+}/Ca^{2+} (final concentration = 2.5 µM) were added on adherent cells. They were incubated 30min at 37°C in 5% CO_2. Nucleus were labelled with Hoechst colorant and the cells were fixed with 2% PFA. Cells

were analysed in confocal microscopy with the Dynascope® (multiparametric confocal microscop). Objectives : Plan apochromat 63x1.40 oil DICIII. Filters : O1 LP (for DAPI) and Cy5 (for Cy5.5). Images analysed with ImageJ software®

f. Western Blotting

For each condition, 1M of U87MG adherent cells were incubated with 1µM of a fluorescent compound (**1**, **2**, **3**, **4**, **7** or **8**) for 30min at 37°C. The cells were harvested, washed in PBS, and incubated in lysis buffer (10 mmol/l Tris–HCl pH 7.5, 120 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l dithiothreitol, 0.5% Nonidet P-40, 0.05% sodium dodecyl sulfate, supplemented with protease and phosphatase inhibitors). After centrifugation at 13000 rpm for 30min at 4°C, the protein containing supernatant is taken off. Protein content was assessed by the Bio-Rad D C Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Ivry sur Seine, France). 20 µg of protein were loaded onto SDS-polyacrylamide gel (8% or 12%). Migration is realised at 0,25 A and 200 V for 50min. Transfer on nitrocellulose membranes is realised in 1h20 at 0,20 A and 90 V. Western blotting was done using the antibodies listed in table B. To ensure equal loading and transfer, membranes were also probed for actin using anti-tubulin antibody (1/1,000; Sigma). Horseradish peroxydase conjugated anti-IgG antibodies were used as secondary antibodies. ECL solution (peroxydase substrate) was added and time-course exposure of proteins to chemiluminescence was used to perform semi-quantification of signal. Intensity of each band was measured by Image J® (NIH software).

Antibody	Description	Reference	Application
VEGFR2	Rabbit monoclonal to VEGFR2	CST #2479	WB
p-VEGFR2 (Y1175)	Rabbit monoclonal to VEGFR2 (phospho tyrosine1175)	CST #2478	WB
Nrp1	Rabbit monoclonal to Neuropilin-1	Abcam #81321	WB
AKT	Rabbit monoclonal to AKT	CST #4691	WB
p-AKT (S473)	Rabbit monoclonal to AKT (phospho serine473)	CST #4060	WB, IH
β-actin	Mouse monoclonal to β-actin	Santa Cruz #47778	WB
Tubulin	Mouse monoclonal to tubulin	Santa Cruz #23948	WB

Table B. Primary antibodies tested in this study

g. Histochemical labelling of tumor slices

Tumor slices (7 µm) were submerged in hematoxyline solution for 2min before washing in water. The slices were then submerged in eosine for 3min and washed with water. They were fixed with EtOH (2x3min) and xylene (3min) before mounting them with Merckoglass®. Those slices were observed on microscop.
For the confocal microscopy, the tumor slices were prepared with Roti®-Mount FluorCare DAPI preparation.

h. In cell ELISA test

The U87MG cells were plated in a 96 well plate (10000 cells per plate). After incubation with 1µM of different chemical compounds, and washing, they were fixe using a 4% PFA solution. Endogenous peroxidase were quenched and non specific sites were blocked using the quenching solution and the blocking buffer from the kit. Half of the cells were incubated with anti-NRP1 antibody (1/1000, Abcam 81321) overnight at 4°C. After washing, all the cells are incubated for 30min with Horseradish peroxidase conjugated II^{ary} antibody (anti-Rabbit) at room temperature. After washing, TMB susbtrate is added at room temperature, protected from light. The reaction was stopped after 15min and the absorbance was measured at 450nm.
The cells were washed and incubated with Janus Green Whole-Cell stained for 5min at room temperature. After washing and 10min of incubation with Elution buffer from the kit, the absorbance was measured at 615nm.

i. Animals

Female Naval Medical Research Institute (NMRI) nude mice (5wk-old) weighting 24.0 ± 0.5 g were purchased from Janvier (Le Genest). Before the beginning of the experiment, the animals were acclimatized in a temperature-controlled environment for 1 wk. Facility rooms were maintained at constant temperature (25°C), humidity (30–50% relative humidity), and 12-h light: dark illumination cycle. Access to food and tap water was available ad libitum. Experiments were carried out following Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale guidelines regarding the fair treatment of animals with approval of the Comité d'Éthique en Expérimentation Animale de Grenoble.

j. Tumor implantation and treatment

10 million U87MG cells, suspended in 200µL PBS, were injected subcutaneously into female NMRI nude mice (6 weeks old). After 5 weeks, the animals were divided into five groups : group I (n=6, S1 to S6) was administered RAFT(4-c[RGDfK])Cy5.5, group II (n=6, S7 to S12) was administered RAFT(4-c[RGDfK])-Cy5.5-PEG_{24}-ATWLPPR, group III (n=3, S13 to S15) was administered Cy5.5-Ahx-LWRPTPA, group IV (n=3, S16 to S18) was administered RAFT(4-c[RβADfK])Cy5.5, group V (n=2, S19 to S20) was administered Cy5.5-Ahx-ATWLPPR. 10 nmol of compound in 200 µL of PBS were injected to each mouse. Fluorescence imaging was realised with Hamamatsu apparatus at t=0h, t=1h30, t=5h or t=24h post-injection. Mice S4 to S6 and S10 to S12 were sacrificed and dissected at t=5h, the other mice were sacrificed and dissected at t=24h post-injection. Organs and subcutaneous tumors were excised and imaged with Hamamatsu. Tumors were frozen in OCT in order to realize tumor slices (7 µm) on cryostat.

Bibliographie

[1] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57–70.

[2] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–674.

[3] F. Xing, J. Saidou, K. Watabe, *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **2010**, *15*, 166–179.

[4] L. A. Liotta, E. C. Kohn, *Nature* **2001**, *411*, 375–379.

[5] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O. C. Farokhzad, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 2–25.

[6] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.

[7] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 631–651.

[8] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. (Georgia) Chen, D. M. Shin, *Am. Assoc. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1310–1316.

[9] M. L. Biniossek, D. K. Nägler, C. Becker-Pauly, O. Schilling, *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 5363–5373.

[10] S. Rakash, *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **2012**, *7*, 90–101.

[11] Demchik, Sloane, *Proteases New Perspectives - Chap : Cell-Surface Proteases in Cancer*, Birkhäuser, **2012**.

[12] B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 785–799.

[13] K. Y. Choi, M. Swierczewska, S. Lee, X. Chen, *Theranostics* **2012**, *2*, 156–178.

[14] R. Weissleder, C. H. Tung, U. Mahmood, A. Bogdanov, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 375–378.

[15] T. Legigan, J. Clarhaut, I. Tranoy-Opalinski, A. Monvoisin, B. Renoux, M. Thomas, A. Le Pape, S. Lerondel, S. Papot, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11606–11610.

[16] A. J. Littlewood-Evans, G. Bilbe, W. B. Bowler, D. Farley, B. Wlodarski, T. Kokubo, T. Inaoka, J. Sloane, D. B. Evans, J. A. Gallagher, *Cancer Res.* **1997**, *57*, 5386–5390.

[17] B. Schmalfeldt, D. Prechtel, K. Härting, K. Späthe, S. Rutke, E. Konik, R. Fridman, U. Berger, M. Schmitt, W. Kuhn, et al., *Am. Assoc. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2396–2404.

[18] Chen, Schmuck, Tietze, Roffler, *Mol. Pharmaceutics* **2013**.

[19] D. Kalafatovic, M. Nobis, N. Javid, P. W. J. M. Frederix, K. I. Anderson, B. R. Saunders, R. V. Ulijn, *Biomater Sci* **2015**, *3*, 246–249.

[20] D. Kalafatovic, M. Nobis, J. Son, K. I. Anderson, R. V. Ulijn, *Biomaterials* **2016**, *98*, 192–202.

[21] M. Verhille, H. Benachour, A. Ibrahim, M. Achard, P. Arnoux, M. Barberi-Heyob, J.-C. Andre, X. Allonas, F. Baros, R. Vanderesse, et al., *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 5580–5594.

[22] L. M. Coussens, B. Fingleton, L. M. Matrisian, *Science* **2002**, *295*, 2387–2392.

[23] I. Niculescu-Duvaz, C. J. Springer, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *26*, 151–172.

[24] M. L. Macheda, S. Rogers, J. D. Best, *J. Cell. Physiol.* **2005**, *202*, 654–662.

[25] P. Rigo, P. Paulus, B. J. Kaschten, R. Hustinx, T. Bury, G. Jerusalem, T. Benoit, J. Foidart-Willems, *Eur. J. Nucl. Med.* **1996**, *23*, 1641–1674.

[26] P. M. R. Pereira, S. Silva, J. A. S. Cavaleiro, C. A. F. Ribeiro, J. P. C. Tomé, R. Fernandes, *PLOS ONE* **2014**, *9*, e95529.

[27] A. E. Pegg, *IUBMB Life* **2009**, *61*, 880–894.

[28] A. J. Palmer, H. M. Wallace, *Amino Acids* **2009**, *38*, 415–422.

[29] N. Seiler, *Curr. Drug Targets* **2003**, *4*, 537–564.

[30] F. L. Meyskens, C. E. McLaren, D. Pelot, S. Fujikawa-Brooks, P. M. Carpenter, E. Hawk, G. Kelloff, M. J. Lawson, J. Kidao, J. McCracken, et al., *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* **2008**, *1*, 32–38.

[31] R. Love, R. Jacoby, M. Newton, *Cancer Epidemiol Biomark. Prev* **1998**, *7*, 989–992.

[32] R. J. Bergeron, J. S. McManis, C. Z. Liu, Y. Feng, W. R. Weimar, G. R. Luchetta, Q. Wu, J. Ortiz-Ocasio, J. R. T. Vinson, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3464–3476.

[33] P. J. Creaven, R. Perez, L. Pendyala, N. J. Meropol, G. Loewen, E. Levine, E. Berghorn, D. Raghavan, *Invest. New Drugs* **n.d.**, *15*, 227–234.

[34] A. C. Wolff, D. K. Armstrong, J. H. Fetting, M. K. Carducci, C. D. Riley, J. F. Bender, R. A. Casero, N. E. Davidson, *Am. Assoc. Cancer Res.* **2003**, *9*, 5922–5928.

[35] B. Thibault, E. Clement, G. Zorza, S. Meignan, J.-P. Delord, B. Couderc, C. Bailly, F. Narducci, I. Vandenberghe, A. Kruczynski, et al., *Cancer Lett.* **2016**, *370*, 10–18.

[36] P. A. Stark, B. D. Thrall, G. G. Meadows, M. M. Abdel-Monem, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4264–4269.

[37] S. Renaud, V. Corce, I. Cannie, M. Ropert, S. Lepage, O. Loreal, D. Deniaud, F. Gaboriau, *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *96*, 179–189.

[38] C. Bechara, S. Sagan, *Febs Lett.* **2013**, *587*, 1693–1702.

[39] J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 585–590.

[40] A. D. Frankel, C. O. Pabo, *Cell* **1988**, *55*, 1189–1193.

[41] M. Green, P. M. Loewenstein, *Cell* **1988**, *55*, 1179–1188.

[42] E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010–16017.

[43] A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, A. Prochiantz, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 1864–1868.

[44] J. B. Rothbard, T. C. Jessop, R. S. Lewis, B. A. Murray, P. A. Wender, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9506–9507.

[45] A. Walrant, I. Correia, C.-Y. Jiao, O. Lequin, E. H. Bent, N. Goasdoué, C. Lacombe, G. Chassaing, S. Sagan, I. D. Alves, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2011**, *1808*, 382–393.

[46] D. I. Chan, E. J. Prenner, H. J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2006**, *1758*, 1184–1202.

[47] F. Wang, Y. Wang, X. Zhang, W. Zhang, S. Guo, F. Jin, *J. Controlled Release* **2014**, *174*, 126–136.

[48] B. Gupta, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 637–651.

[49] G. P. H. Dietz, M. Bähr, *Mol. Cell. Neurosci.* **2004**, *27*, 85–131.

[50] M. Mäe, Ü. Langel, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, *6*, 509–514.

[51] D. Zavaglia, N. Normand, N. Brewis, P. O'Hare, M.-C. Favrot, J. Coll, *Mol. Ther.* **2003**, *8*, 840–845.

[52] T. Jiang, E. S. Olson, Q. T. Nguyen, M. Roy, P. A. Jennings, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 17867–17872.

[53] E. S. Olson, T. Jiang, T. A. Aguilera, Q. T. Nguyen, L. G. Ellies, M. Scadeng, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 4311–4316.

[54] E. S. Olson, T. A. Aguilera, T. Jiang, L. G. Ellies, Q. T. Nguyen, E. H. Wong, L. A. Gross, R. Y. Tsien, *Integr. Biol.* **2009**, *1*, 382–393.

[55] E. Jin, B. Zhang, X. Sun, Z. Zhou, X. Ma, Q. Sun, J. Tang, Y. Shen, E. Van Kirk, W. J. Murdoch, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 933–940.

[56] J. Howl, S. Matou-Nasri, D. C. West, M. Farquhar, J. Slaninová, C.-G. Östenson, M. Zorko, P. Östlund, S. Kumar, Ü. Langel, et al., *Cell. Mol. Life Sci.* **2012**, *69*, 2951–2966.

[57] L. E. Kelemen, *Int. J. Cancer* **2006**, *119*, 243–250.

[58] N. Parker, M. J. Turk, E. Westrick, J. D. Lewis, P. S. Low, C. P. Leamon, *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 284–293.

[59] S. D. Weitman, R. H. Lark, L. R. Coney, D. W. Fort, V. Frasca, V. R. Zurawski, B. A. Kamen, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3396–3401.

[60] J. F. Ross, P. K. Chaudhuri, M. Ratnam, *Cancer* **1994**, *73*, 2432–2443.

[61] P. S. Low, A. C. Antony, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1055–1058.

[62] P. S. Low, W. A. Henne, D. D. Doorneweerd, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 120–129.

[63] A. Gabizon, D. Tzemach, J. Gorin, L. Mak, Y. Amitay, H. Shmeeda, S. Zalipsky, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *66*, 43–52.

[64] G. Pasut, F. Canal, L. Dalla Via, S. Arpicco, F. M. Veronese, O. Schiavon, *J. Controlled Release* **2008**, *127*, 239–248.

[65] R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J.-F. Müller, M. Barberi-Heyob, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2799–2808.

[66] Y. Lu, P. S. Low, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 675–693.

[67] B. A. Siegel, F. Dehdashti, D. G. Mutch, D. A. Podoloff, R. Wendt, G. P. Sutton, R. W. Burt, P. R. Ellis, C. J. Mathias, M. A. Green, et al., *J. Nucl. Med.* **2003**, *44*, 700–707.

[68] J. R. Woodburn, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 241–250.

[69] N. Normanno, A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M. R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro, D. S. Salomon, *Gene* **2006**, *366*, 2–16.

[70] Z. Li, R. Zhao, X. Wu, Y. Sun, M. Yao, J. Li, Y. Xu, J. Gu, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2005**, *19*, 1978–1985.

[71] C. M. Rocha-Lima, H. P. Soares, L. E. Raez, R. Singal, *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* **2007**, *14*, 295–304.

[72] S. Song, D. Liu, J. Peng, H. Deng, Y. Guo, L. X. Xu, A. D. Miller, Y. Xu, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2009**, *23*, 1396–1404.

[73] O. T. Dejesus, *Curr. Radiopharm.* **2012**, *5*, 15–18.

[74] S. Song, D. Liu, J. Peng, Y. Sun, Z. Li, J.-R. Gu, Y. Xu, *Int. J. Pharm.* **2008**, *363*, 155–161.

[75] P. Magadala, M. Amiji, *AAPS J.* **2008**, *10*, 565-576.

[76] L. Milane, Z. Duan, M. Amiji, *Mol. Pharm.* **2011**, *8*.

[77] K. Zarschler, K. Prapainop, E. Mahon, L. Rocks, M. Bramini, P. M. Kelly, H. Stephan, K. A. Dawson, *Nanoscale* **2014**, *6*, 6046–6056.

[78] K. Holmes, O. L. Roberts, A. M. Thomas, M. J. Cross, *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 2003–2012.

[79] A. Hoeben, B. Landuyt, M. S. Highley, H. Wildiers, A. T. V. Oosterom, E. A. D. Bruijn, *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 549–580.

[80] Y. Liu, S. R. Cox, T. Morita, S. Kourembanas, *Circ. Res.* **1995**, *77*, 638–643.

[81] N. Ferrara, K. J. Hillan, W. Novotny, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *333*, 328–335.

[82] K. Miller, M. Wang, J. Gralow, M. Dickler, M. Cobleigh, E. A. Perez, T. Shenkier, D. Cella, N. E. Davidson, *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 2666–2676.

[83] M. H. Cohen, J. Gootenberg, P. Keegan, R. Pazdur, *The Oncologist* **2007**, *12*, 713–718.

[84] D. Liu, F. Liu, Z. Liu, L. Wang, N. Zhang, *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 2291–2301.

[85] J.-M. Schlaeppi, J. M. Wood, *Cancer Metastasis Rev.* **1999**, *18*, 473–481.

[86] K. Kubo, T. Shimizu, S. Ohyama, H. Murooka, A. Iwai, K. Nakamura, K. Hasegawa, Y. Kobayashi, N. Takahashi, K. Takahashi, et al., *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1359–1366.

[87] S. R. Wedge, D. J. Ogilvie, M. Dukes, J. Kendrew, R. Chester, J. A. Jackson, S. J. Boffey, P. J. Valentine, J. O. Curwen, H. L. Musgrove, et al., *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4645–4655.

[88] S. Baka, A. R. Clamp, G. C. Jayson, *Expert Opin. Ther. Targets* **2006**, *10*, 867–876.

[89] R. K. Jain, D. G. Duda, J. W. Clark, J. S. Loeffler, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2006**, *3*, 24–40.

[90] F. M. Yakes, J. Chen, J. Tan, K. Yamaguchi, Y. Shi, P. Yu, F. Qian, F. Chu, F. Bentzien, B. Cancilla, et al., *Am. Assoc. Cancer Res.* **2011**, *10*, 2298–2308.

[91] T. Nakagawa, O. Tohyama, A. Yamaguchi, T. Matsushima, K. Takahashi, S. Funasaka, S. Shirotori, M. Asada, H. Obaishi, *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 210–215.

[92] S. Sarkar, A. Mazumdar, R. Dash, D. Sarkar, P. B. Fisher, M. Mandal, *Cancer Biol. Ther.* **2010**, *9*, 592–603.

[93] B. Herzog, C. Pellet-Many, G. Britton, B. Hartzoulakis, I. C. Zachary, *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 2766–2776.

[94] A. Starzec, R. Vassy, A. Martin, M. Lecouvey, M. Di Benedetto, M. Crépin, G. Y. Perret, *Life Sci.* **2006**, *79*, 2370–2381.

[95] A. Starzec, P. Ladam, R. Vassy, S. Badache, N. Bouchemal, A. Navaza, C. H. du Penhoat, G. Y. Perret, *Peptides* **2007**, *28*, 2397–2402.

[96] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715.

[97] R. Stupp, M. E. Hegi, T. Gorlia, S. C. Erridge, J. Perry, Y.-K. Hong, K. D. Aldape, B. Lhermitte, T. Pietsch, D. Grujicic, et al., *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 1100–1108.

[98] “Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments - American Family Physician,” http://www.aafp.org/afp/2008/0201/p311.html, **2008**.

[99] K. Bodoori, I. Matalka, R. Hayajnehi, Y. Haddad, W. Gharaibeh, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2012**, *13*, 3037–3046.

[100] M. M. Quigley, K. J. Bethel, R. W. Sharpe, A. Saven, *Am. J. Hematol.* **2003**, *74*, 227–230.

[101] L. M. Weiner, R. Surana, S. Wang, *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 317–327.

[102] B. Coiffier, E. Lepage, J. Briere, R. Herbrecht, H. Tilly, R. Bouabdallah, P. Morel, E. Van Den Neste, G. Salles, P. Gaulard, et al., *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 235–242.

[103] E. L. Sievers, F. R. Appelbaum, R. T. Spielberger, S. J. Forman, D. Flowers, F. O. Smith, K. Shannon-Dorcy, M. S. Berger, I. D. Bernstein, *Blood* **1999**, *93*, 3678–3684.

[104] H. Rus, C. Cudrici, F. Niculescu, *Immunol. Res.* **2005**, *33*, 103–112.

[105] J. P. M. Nunes, M. Morais, V. Vassileva, E. Robinson, V. S. Rajkumar, M. E. B. Smith, R. B. Pedley, S. Caddick, J. R. Baker, V. Chudasama, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10624–10627.

[106] S. Bouchet, R. Tang, F. Fava, O. Legrand, B. Bauvois, *Oncotarget* **2016**, *7*, 19445–19467.

[107] S. V. Garde, A. J. Forte, M. Ge, E. A. Lepekhin, C. J. Panchal, S. A. Rabbani, J. J. Wu, *Anticancer. Drugs* **2007**, *18*, 1189–1200.

[108] M. Wickstrom, R. Larsson, P. Nygren, J. Gullbo, *Cancer Sci.* **2011**, *102*, 501–508.

[109] C. Liu, Y. Yang, L. Chen, Y.-L. Lin, F. Li, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 34520–34529.

[110] J. C. Reubi, S. Wenger, J. Schmuckli-Maurer, J.-C. Schaer, M. Gugger, *Am. Assoc. Cancer Res.* **2002**, *8*, 1139–1146.

[111] H. Zhang, J. Schuhmacher, B. Waser, D. Wild, M. Eisenhut, J. C. Reubi, H. R. Maecke, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2007**, *34*, 1198–1208.

[112] M. Pourghiasian, J. Inkster, N. Hundal, B. Guerin, T. Ruth, K. Lin, F. Benard, *Soc. Nucl. Med. Annu. Meet. Abstr.* **2013**, *54*, 221.

[113] J. B. Engel, A. V. Schally, G. Halmos, B. Baker, A. Nagy, G. Keller, *Endocr. Relat. Cancer* **2005**, *12*, 999–1009.

[114] D. Naor, R. V. Sionov, D. Ish-Shalom, *Adv. Cancer Res.* **1997**, *71*, 241–319.

[115] F. Leonelli, A. La Bella, L. M. Migneco, R. M. Bettolo, *Mol. Basel Switz.* **2008**, *13*, 360–378.

[116] K. Y. Choi, E. J. Jeon, H. Y. Yoon, B. S. Lee, J. H. Na, K. H. Min, S. Y. Kim, S.-J. Myung, S. Lee, X. Chen, et al., *Biomaterials* **2012**, *33*, 6186–6193.

[117] S. Arpicco, P. Milla, B. Stella, F. Dosio, *Mol. Basel Switz.* **2014**, *19*, 3193–3230.

[118] E. Ryschich, G. Huszty, H. P. Knaebel, M. Hartel, M. W. Büchler, J. Schmidt, *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **2004**, *40*, 1418–1422.

[119] S. Kasibhatla, K. A. Jessen, S. Maliartchouk, J. Y. Wang, N. M. English, J. Drewe, L. Qiu, S. P. Archer, A. E. Ponce, N. Sirisoma, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 12095–12100.

[120] M. Kawamoto, T. Horibe, M. Kohno, K. Kawakami, *BMC Cancer* **2011**, *11*, 359.

[121] D. Polyak, C. Ryppa, A. Eldar-Boock, P. Ofek, A. Many, K. Licha, F. Kratz, R. Satchi-Fainaro, *Polym. Adv. Technol.* **2011**, *22*, 103–113.

[122] J. Cao, S. Cui, S. Li, C. Du, J. Tian, S. Wan, Z. Qian, Y. Gu, W. R. Chen, G. Wang, *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1362–1373.

[123] S. Renaud, V. Corcé, I. Cannie, M. Ropert, S. Lepage, O. Loréal, D. Deniaud, F. Gaboriau, *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *96*, 179–189.

[124] L. J. Zhang yadong, *Prog. Chem.* **2010**, *22*, 603–609.

[125] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348–2368.

[126] Arun Rasheed, *Sci. Pharm.* **2008**, *76*, 567–598.

[127] Stephen Hanessian, C. Laferrière, A. Benalil, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4786-4797.

[128] L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro, *Chem Soc Rev* **2007**, *36*, 254–266.

[129] J. Zhou, H. Ritter, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1552.

[130] D. Boturyn, E. Defrancq, G. T. Dolphin, J. Garcia, P. Labbe, O. Renaudet, P. Dumy, *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 224–240.

[131] D. Boturyn, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot, P. Dumy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5730–5739.

[132] Q. Zhao, C. E. Schafmeister, Springer Berlin Heidelberg, **2015**, pp. 1–30.

[133] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415.

[134] P. Chandna, J. J. Khandare, E. Ber, L. Rodriguez-Rodriguez, T. Minko, *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2296–2306.

[135] A. Chilkoti, M. R. Dreher, D. E. Meyer, D. Raucher, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 613–630.

[136] B. Taghizadeh, S. Taranejoo, S. A. Monemian, Z. Salehi Moghaddam, K. Daliri, H. Derakhshankhah, Z. Derakhshani, *Drug Deliv.* **2015**, *22*, 145–155.

[137] N. T. Zaman, Targeted and Stimuli-Responsive Polymers as Chemotherapeutic Delivery Systems, Massachusetts Institute of Technology, **2008**.

[138] A. H. Faraji, P. Wipf, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2950–2962.

[139] M. Sechi, V. Sanna, N. Pala, *Int. J. Nanomedicine* **2014**, 467.

[140] M. Elsabahy, K. L. Wooley, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2545.

[141] T. R. Daniels, E. Bernabeu, J. A. Rodríguez, S. Patel, M. Kozman, D. A. Chiappetta, E. Holler, J. Y. Ljubimova, G. Helguera, M. L. Penichet, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 291–317.

[142] J. Gao, K. Chen, R. Xie, J. Xie, Y. Yan, Z. Cheng, X. Peng, X. Chen, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 604–609.

[143] J. Ciccione, T. Jia, J.-L. Coll, K. Parra, M. Amblard, S. Jebors, J. Martinez, A. Mehdi, G. Subra, *Chem. Mater.* **2016**, *28*, 885–889.

[144] *http://www.nanobiotix.com/_fr*, **2016**

[145] A. Yahia-Ammar, D. Sierra, F. Mérola, N. Hildebrandt, X. Le Guével, *ACS Nano* **2016**, *10*, 2591–2599.

[146] L. Li, W. Jiang, K. Luo, H. Song, F. Lan, Y. Wu, Z. Gu, *Theranostics* **2013**, *3*, 595–615.

[147] S. Goodall, M. L. Jones, S. Mahler, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2015**, *90*, 1169–1176.

[148] J. M. Chan, P. M. Valencia, L. Zhang, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2010**, *624*, 163–175.

[149] M. Salvalaio, L. Rigon, D. Belletti, F. D'Avanzo, F. Pederzoli, B. Ruozi, O. Marin, M. A. Vandelli, F. Forni, M. Scarpa, et al., *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0156452.

[150] Y. Miura, T. Takenaka, K. Toh, S. Wu, H. Nishihara, M. R. Kano, Y. Ino, T. Nomoto, Y. Matsumoto, H. Koyama, et al., *ACS Nano* **2013**, *7*, 8583–8592.

[151] V. P. Torchilin, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2549–2559.

[152] D. Sutton, N. Nasongkla, E. Blanco, J. Gao, *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1029–1046.

[153] Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro, K. Kataoka, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 122–130.

[154] S. Ganta, H. Devalapally, A. Shahiwala, M. Amiji, *J. Controlled Release* **2008**, *126*, 187–204.

[155] K. Kostarelos, A. Bianco, M. Prato, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 627–633.

[156] S. M. Moghimi, C. A. Hunter, *Nat. Nanotech.*, **2010**, *5*, 382-383.

[157] A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504.

[158] T. I. Al-Warhi, H. M. A. Al-Hazimi, A. El-Faham, *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16*, 97–116.

[159] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1272–1279.

[160] M. F. Debets, S. S. van Berkel, J. Dommerholt, A. (Ton) J. Dirks, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 805–815.

[161] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074.

[162] P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776–779.

[163] M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8820–8828.

[164] N. Ollivier, J. Dheur, R. Mhidia, A. Blanpain, O. Melnyk, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5238–5241.

[165] W. Hou, X. Zhang, F. Li, C.-F. Liu, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 386–389.

[166] J. W. Bode, R. M. Fox, K. D. Baucom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248–1252.

[167] I. Pusterla, J. W. Bode, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 513–516.

[168] I. Pusterla, J. W. Bode, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 668–672.

[169] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.

[170] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.

[171] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.

[172] D. S. del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893–16899.

[173] D. C. Kennedy, C. S. McKay, M. C. B. Legault, D. C. Danielson, J. A. Blake, A. F. Pegoraro, A. Stolow, Z. Mester, J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17993–18001.

[174] Y. Su, L. Li, H. Wang, X. Wang, Z. Zhang, *Chem Commun* **2016**, *52*, 2185–2188.

[175] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.

[176] R. P. Temming, L. Eggermont, M. B. van Eldijk, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2772.

[177] A.-C. Knall, C. Slugovc, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131.

[178] Kurra, W. R. Liu, A. Deiters, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 173061738.

[179] K. Gutsmiedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2405–2408.

[180] A. V. Samoshin, C. J. Hawker, J. Read de Alaniz, *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 753–757.

[181] X. S. Wang, Y.-J. Lee, W. R. Liu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3176.

[182] M. R. Aronoff, B. Gold, R. T. Raines, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1538–1541.

[183] S. Kolodych, E. Rasolofonjatovo, M. Chaumontet, M.-C. Nevers, C. Créminon, F. Taran, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12056–12060.

[184] L. Plougastel, O. Koniev, S. Specklin, E. Decuypere, C. Créminon, D.-A. Buisson, A. Wagner, S. Kolodych, F. Taran, *Chem Commun* **2014**, *50*, 9376–9378.

[185] D. Forget, D. Boturyn, E. Defrancq, J. Lhomme, P. Dumy, *Chem. – Eur. J.* **2001**, *7*, 3976–3984.

[186] G. Casi, N. Huguenin-Dezot, K. Zuberbühler, J. Scheuermann, D. Neri, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5887–5892.

[187] O. El-Mahdi, O. Melnyk, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 735–765.

[188] M. King, A. Wagner, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 825–839.

[189] C. E. Hoyle, A. B. Lowe, C. N. Bowman, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1355.

[190] A. B. Lowe, *Polymer* **2014**, *55*, 5517–5549.

[191] A. Abbas, B. Xing, T.-P. Loh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7491–7494.

[192] J. W. Drijfhout, E. W. Perdijk, W. J. Weijer, W. Bloemhoff, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *32*, 161–166.

[193] O. Koniev, G. Leriche, M. Nothisen, J.-S. Remy, J.-M. Strub, C. Schaeffer-Reiss, A. Van Dorsselaer, R. Baati, A. Wagner, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 202–206.

[194] O. Koniev, S. Kolodych, Z. Baatarkhuu, J. Stojko, J. Eberova, J.-Y. Bonnefoy, S. Cianférani, A. Van Dorsselaer, A. Wagner, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 1863–1867.

[195] G. Liang, H. Ren, J. Rao, *Nat. Chem.* **2009**, *2*, 54–60.

[196] D. Y. Lewis, D. Soloviev, K. M. Brindle, *Cancer J. Sudbury Mass* **2015**, *21*, 129–136.

[197] M. Schwaiger, H.-J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 36S–41S.

[198] European Medicines Agency, G. B. Saylors, S. E. Spurgeon, B. D. Cheson, D. R. Greenwald, S. M. O'Brien, A. K. Liem, R. E. McIntyre, A. Joshi, E. Abella-Dominicis, et al., *Blood* **2016**.

[199] W. Gonzalez, “Nanotechnologies en IRM : les produits de contraste de demain ?,” http://www.sfrnet.org/rc/org/sfrnet/htm/Article/2012/20121009-083551-938/src/htm_fullText/fr/WGZ%20CERF-2013.pdf, **2013**.

[200] C. G. Hadjipanayis, H. Jiang, D. W. Roberts, L. Yang, *Semin. Oncol.* **2011**, *38*, 109–118.

[201] G. Barabino, J. P. Klein, J. Porcheron, A. Grichine, J.-L. Coll, M. Cottier, *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* **2016**, http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2016.06.389

[202] W. L. Byrne, A. DeLille, C. Kuo, J. S. de Jong, G. M. van Dam, K. P. Francis, M. Tangney, *J. Controlled Release* **2013**, *172*, 523–534.

[203] S. L. Troyan, V. Kianzad, S. L. Gibbs-Strauss, S. Gioux, A. Matsui, R. Oketokoun, L. Ngo, A. Khamene, F. Azar, J. V. Frangioni, *Ann. Surg. Oncol.* **2009**, *16*, 2943–2952.

[204] Fluoptics, http://lyonbiopole.com/wp/wp-content/uploads/2014/06/fluoptics-obtient-la-certification-fda-pour-la-mise-sur-le-marche-americain-du-fluobeam.pdf, **2014**.

[205] I. Stoffels, J. Leyh, T. Pöppel, D. Schadendorf, J. Klode, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *42*, 1631–1638.

[206] Z.-H. Jin, V. Josserand, J. Razkin, E. Garanger, D. Boturyn, M.-C. Favrot, P. Dumy, J.-L. Coll, *Mol. Imaging* **2006**, *5*, 188–197.

[207] H. Luo, R. Hernandez, H. Hong, S. A. Graves, Y. Yang, C. G. England, C. P. Theuer, R. J. Nickles, W. Cai, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 12806–12811.

[208] G. M. van Dam, G. Themelis, L. M. A. Crane, N. J. Harlaar, R. G. Pleijhuis, W. Kelder, A. Sarantopoulos, J. S. de Jong, H. J. G. Arts, A. G. J. van der Zee, et al., *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1315–1319.

[209] E. D. Wold, V. V. Smider, B. H. Felding, *Immunother. Los Angel. Calif* **2016**, *2*.

[210] http://adcreview.com/brentuximab-vedotin-sgn35/, **2016**.

[211] R. Abramson, https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/overview-of-targeted-therapies-for-cancer/, **2016**.

[212] https://www.doxil.com/hcp/mechanism-of-action, **2015**.

[213] M. Galibert, P. Dumy, D. Boturyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2576–2579.

[214] C. Kumar, *Curr. Drug Targets* **2003**, *4*, 123–131.

[215] P. C. Brooks, R. A. Clark, D. A. Cheresh, *Science* **1994**, *264*, 569–571.

[216] S. M. Weis, D. A. Cheresh, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2011**, *1*, a006478.

[217] I. D. Campbell, M. J. Humphries, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, DOI 10.1101/cshperspect.a004994.

[218] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151–155.

[219] C. Xie, J. Zhu, X. Chen, L. Mi, N. Nishida, T. A. Springer, *EMBO J.* **2010**, *29*, 666–679.

[220] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673–687.

[221] C. K. Miranti, J. S. Brugge, *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, E83–E90.

[222] S. Hehlgans, M. Haase, N. Cordes, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **2007**, *1775*, 163–180.

[223] M. A. Schwartz, M. H. Ginsberg, *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, E65–E68.

[224] C. van Waes, *Head Neck* **1995**, *17*, 140–147.

[225] P. C. Brooks, A. M. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell* **1994**, *79*, 1157–1164.

[226] D. A. Reardon, K. L. Fink, T. Mikkelsen, T. F. Cloughesy, A. O'Neill, S. Plotkin, M. Glantz, P. Ravin, J. J. Raizer, K. M. Rich, et al., *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 5610–5617.

[227] G. Eisele, A. Wick, A.-C. Eisele, P. M. Clément, J. Tonn, G. Tabatabai, A. Ochsenbein, U. Schlegel, B. Neyns, D. Krex, et al., *J. Neurooncol.* **2014**, *117*, 141–145.

[228] C. H. F. Wenk, F. Ponce, S. Guillermet, C. Tenaud, D. Boturyn, P. Dumy, D. Watrelot-Virieux, C. Carozzo, V. Josserand, J.-L. Coll, *Nanotherapeutics* **2013**, *334*, 188–195.

[229] S. Djordjevic, P. C. Driscoll, *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 447–455.

[230] Q. Pan, Y. Chanthery, W.-C. Liang, S. Stawicki, J. Mak, N. Rathore, R. K. Tong, J. Kowalski, S. F. Yee, G. Pacheco, et al., *Cancer Cell* **2007**, *11*, 53–67.

[231] A. M. Jubb, L. A. Strickland, S. D. Liu, J. Mak, M. Schmidt, H. Koeppen, *J. Pathol.* **2012**, *226*, 50–60.

[232] P. Hamerlik, J. D. Lathia, R. Rasmussen, Q. Wu, J. Bartkova, M. Lee, P. Moudry, J. Bartek, W. Fischer, J. Lukas, et al., *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 507–520.

[233] R. Soldi, S. Mitola, M. Strasly, P. Defilippi, G. Tarone, F. Bussolino, *EMBO J.* **1999**, *18*, 882–892.

[234] S. Soker, H.-Q. Miao, M. Nomi, S. Takashima, M. Klagsbrun, *J. Cell. Biochem.* **2002**, *85*, 357–368.

[235] P. R. Somanath, N. L. Malinin, T. V. Byzova, *Angiogenesis* **2009**, *12*, 177–185.

[236] G. H. Mahabeleshwar, W. Feng, D. R. Phillips, T. V. Byzova, *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 2495–2507.

[237] S. D. Robinson, L. E. Reynolds, V. Kostourou, A. R. Reynolds, R. G. da Silva, B. Tavora, M. Baker, J. F. Marshall, K. M. Hodivala-Dilke, *J. Biol. Chem.* **2009**, jbc.M109.030700.

[238] T. S. Ellison, S. J. Atkinson, V. Steri, B. M. Kirkup, M. E. J. Preedy, R. T. Johnson, C. Ruhrberg, D. R. Edwards, J. G. Schneider, K. Weilbaecher, et al., *Dis. Model. Mech.* **2015**, *8*, 1105–1119.

[239] X. Yi, F. Wang, W. Qin, X. Yang, J. Yuan, *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 1347–1365.

[240] N. Kosaka, M. Ogawa, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Future Oncol. Lond. Engl.* **2009**, *5*, 1501–1511.

[241] X. Chen, P. S. Conti, R. A. Moats, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 8009–8014.

[242] Z. Cheng, Y. Wu, Z. Xiong, S. S. Gambhir, X. Chen, *Bioconjug. Chem.* **2005**, *16*, 1433–1441.

[243] Y. Wu, W. Cai, X. Chen, *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* **2006**, *8*, 226–236.

[244] A. R. Hsu, L. C. Hou, A. Veeravagu, J. M. Greve, H. Vogel, V. Tse, X. Chen, *Mol. Imaging Biol. MIB Off. Publ. Acad. Mol. Imaging* **2006**, *8*, 315–323.

[245] J. Cao, S. Wan, J. Tian, S. Li, D. Deng, Z. Qian, Y. Gu, *Contrast Media Mol. Imaging* **2012**, *7*, 390–402.

[246] L. Liu, G. Lin, F. Yin, W.-C. Law, K.-T. Yong, *J. Biomed. Mater. Res. A* **2016**, *104*, 910–916.

[247] D. Chen, B. Li, S. Cai, P. Wang, S. Peng, Y. Sheng, Y. He, Y. Gu, H. Chen, *Biomaterials* **2016**, *100*, 1–16.

[248] S. Zanella, M. Mingozzi, A. Dal Corso, R. Fanelli, D. Arosio, M. Cosentino, L. Schembri, F. Marino, M. De Zotti, F. Formaggio, et al., *ChemistryOpen* **2015**, *4*, 633–641.

[249] S. Liang, Y. Ma, J. Guo, R. Guo, H. Wang, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2014**, *303*, 1891–1896.

[250] G. Y. Perret, A. Starzec, N. Hauet, J. Vergote, M. L. Pecheur, R. Vassy, G. Léger, K. A. Verbeke, G. Bormans, P. Nicolas, et al., *Nucl. Med. Biol.* **2004**, *31*, 575–581.

[251] N. Thomas, D. Bechet, P. Becuwe, L. Tirand, R. Vanderesse, C. Frochot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, *96*, 101–108.

[252] H. Wu, Z. Wang, Q. Wang, Y. Han, M. Wang, W. Zhou, H. Li, *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0137676.

[253] H. Wu, H. Chen, D. Pan, Y. Ma, S. Liang, Y. Wan, Y. Fang, *Mol. Imaging Biol.* **2014**, *16*, 781–792.

[254] Y. Ma, S. Liang, J. Guo, R. Guo, H. Wang, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2014**, *57*, 627–631.

[255] Y. Ye, L. Zhu, Y. Ma, G. Niu, X. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1146–1150.

[256] E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 16157–16162.

[257] K. N. Sugahara, T. Teesalu, P. P. Karmali, V. R. Kotamraju, L. Agemy, O. M. Girard, D. Hanahan, R. F. Mattrey, E. Ruoslahti, *Cancer Cell* **2009**, *16*, 510–520.

[258] E. Ruoslahti, *Mol. Cancer Ther.* **2014**, molcanther.0366.2014.

[259] K. N. Sugahara, T. Teesalu, P. P. Karmali, V. R. Kotamraju, L. Agemy, D. R. Greenwald, E. Ruoslahti, *Science* **2010**, *328*, 1031–1035.

[260] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30–33.

[261] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54.

[262] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033–3040.

[263] S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983–991.

[264] R. Behrendt, P. White, J. Offer, *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 4–27.

[265] J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523–7526.

[266] M. Wendeler, L. Grinberg, X. Wang, P. E. Dawson, M. Baca, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 93–101.

[267] O. Melnyk, J. S. Fruchart, C. Grandjean, H. Gras-Masse, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4153–4160.

[268] F. Wahl, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6861–6864.

[269] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128–1137.

[270] A. Le Chevalier Isaad, F. Barbetti, P. Rovero, A. M. D'Ursi, M. Chelli, M. Chorev, A. M. Papini, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*, 5308–5314.

[271] E. D. Goddard-Borger, R. V. Stick, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3797–3800.

[272] A. K. Pandiakumar, S. P. Sarma, A. G. Samuelson, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2917–2920.

[273] E. Garanger, D. Boturyn, J.-L. Coll, M.-C. Favrot, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1958–1965.

[274] A. C. Conibear, K. Farbiarz, R. L. Mayer, M. Matveenko, H. Kählig, C. F. W. Becker, *Org Biomol Chem* **2016**, *14*, 6205–6211.

[275] L. Sancey, E. Garanger, S. Foillard, G. Schoehn, A. Hurbin, C. Albiges-Rizo, D. Boturyn, C. Souchier, A. Grichine, P. Dumy, et al., *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 1301–1301.

[276] E. Garanger, D. Boturyn, Z. Jin, P. Dumy, M.-C. Favrot, J.-L. Coll, *Mol. Ther.* **2005**, *12*, 1168–1175.

[277] X. Chen, P. S. Conti, R. A. Moats, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 8009–8014.

[278] W. Wang, S. Ke, Q. Wu, C. Charnsangavej, M. Gurfinkel, J. G. Gelovani, J. L. Abbruzzese, E. M. Sevick-Muraca, C. Li, *Mol. Imaging* **2004**, *3*, 343–351.

[279] S. Dufort, L. Sancey, A. Hurbin, S. Foillard, D. Boturyn, P. Dumy, J.-L. Coll, *J. Drug Target.* **2011**, *19*, 582–588.

[280] Z.-H. Jin, V. Josserand, S. Foillard, D. Boturyn, P. Dumy, M.-C. Favrot, J.-L. Coll, *Mol. Cancer* **2007**, *6*, 41.

[281] J. G. Valero, L. Sancey, J. Kucharczak, Y. Guillemin, D. Gimenez, J. Prudent, G. Gillet, J. Salgado, J.-L. Coll, A. Aouacheria, *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 556–564.

[282] G. Tuchscherer, A. Chandravarkar, M.-S. Camus, J. Bérard, K. Murat, A. Schmid, R. Mimna, H. A. Lashuel, M. Mutter, *Biopolymers* **2007**, *88*, 239–252.

[283] Y. Sohma, Y. Kiso, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1549–1557.

[284] S. Cobo, F. Lafolet, E. Saint-Aman, C. Philouze, C. Bucher, S. Silvi, A. Credi, G. Royal, *Chem Commun* **2015**, *51*, 13886–13889.

[285] S. Eißler, T. Bogner, M. Nahrwold, N. Sewald, *Chem. – Eur. J.* **2009**, *15*, 11273–11287.

[286] M. Nahrwold, C. Weiß, T. Bogner, F. Mertink, J. Conradi, B. Sammet, R. Palmisano, S. Royo Gracia, T. Preuße, N. Sewald, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1853–1864.

[287] G. M. Dubowchik, R. A. Firestone, L. Padilla, D. Willner, S. J. Hofstead, K. Mosure, J. O. Knipe, S. J. Lasch, P. A. Trail, *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 855–869.

[288] A. Grassin, M. Jourdan, P. Dumy, D. Boturyn, *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2016**, *17*, 515–520.

Résumé

Ces travaux de thèse portent sur la conception, la synthèse et l'étude biologique de vecteurs peptidiques pour des applications en diagnostic et/ou thérapie du cancer.

Nous avons utilisé des châssis cyclodécapeptidiques fonctionnalisés de façon chimiosélective par des éléments de ciblage et des effecteurs. Ces châssis, dotés de quatre ligands c[RGDfK], possèdent une forte affinité pour les récepteurs intégrine avB3 qui sont surexprimés dans de nombreux cancers et par les cellules endothéliales de l'environnement tumoral. Ils sont en revanche peu exprimés par les tissus sains. La présentation multivalente des ligands -RGD- permet également au châssis d'être internalisé par les cellules tumorales.

Nous avons donc mis au point des molécules composées du châssis peptidique, de quatre ligands -RGD- pour le ciblage tumoral, et de différents effecteurs pour plusieurs applications. A travers de multiples collaborations, nous avons relié ce vecteur à un agent hautement toxique (cryptophycine), un photosensibilisateur (DHP), un peptide pro-apoptotique (BAX), un complexe de Gallium 68 (pour une étude clinique de phase I pour une application en imagerie TEP). Nous avons également greffé ces châssis présentant quatre motifs -RGD- à des polymères ou à des nanoparticules de silice, tous deux fluorescents.

Le projet principal de cette thèse était la conception de vecteurs ciblant deux récepteurs tumoraux de manière simultanée. En plus de cibler l'intégrine avB3, nous avons ciblé le récepteur NRP1 qui est lui aussi surexprimé lors de l'angiogenèse tumorale. Nous avons exploité divers réactions chimiosélectives (oxime, cycloaddition de Huisgen, amidation) pour concevoir des vecteurs fluorescents ciblant l'un des deux récepteurs ou les deux à la fois. Des tests biologiques in vitro et in vivo ont été réalisés. Il s'avère que les composés à double ciblage permettent une très bonne détection de la tumeur, mais non supérieure à des composés à mono ciblage. En revanche, la réponse cellulaire déclenchée par les composés à double ciblage est unique, et totalement différente d'une co-injection. Nous avons plusieurs éléments qui tendent à prouver qu'un complexe NRP1 / vecteur / Intégrine se formerait et resterait ancré au niveau de la membrane cellulaire, bloquant son internalisation.

Mots-clefs : Vectorisation, vecteur, peptides, réaction click, CuAAC, oxime, ligation, chimiosélectivité, orthogonalité, RGD, intégrine $\alpha v\beta_3$, ATWLPPR, neuropiline-1, angiogenèse, cancer, imagerie optique, fluorescence, cyanine 5.5.

Summary

This thesis work is about conception, synthesis and biological activities of peptide vectors for diagnostic and/or therapeutic applications against cancer.

We used cyclodecapeptidic scaffolds chemoselectively handled with targeting elements and effectors. Those scaffolds presenting four c[RGDfK] ligands have a strong affinity for integrin avB3 receptors, wich are overexpressed in various cancers and by endothelial cells from the tumor surrounding. They are poorly expressed in healthy tissues. The multivalent presentation of -RGD- motifs higly increases the internalisation of the scaffold by tumor cells.

Thus we developed molecules composed by four -RGD- motifs for tumor targeting, and different effectors for various applications. Thanks to multiple collaborations, we linked the vector to a highly cytotoxic compound (cryptophycine), a photosensitiser (DHP), a pro-apoptotic peptide (BAX), a DOTA complex (for 68-Ga complexation, for PET applications). We also grafted the cyclodecapeptide bearing four -RGD- motifs to polymers or silica nanoparticles, both fluorescent.

The main project of this thesis was the conception of dual targeting vectors. Our objective was to simultaneously target two receptors overexpressed in the tumor periphery. Besides the targeting of avB3, we decided to target the NRP1 receptor, which is also overexpressed during tumor angiogenesis. We exploited various chemoselective reactions (oxime, huisgen cycloaddition, peptide coupling) to synthesise fluorescent vectors targeting one of the two receptors, or both. *In vitro* and *in vivo* biological experiments were realised. We discovered that dual targeting compounds allow a really good tumor detection, but inferior to mono targeting ones. Nevertheless, the cellular answer triggered by dual targeting compounds is totally different from those obtained with other compounds, including co-injection. We found different elements that tend to show that a NRP1 / vector / integrin complex could be formed, and would be blocked inside the cellular membrane, resulting in its internalisation's blocking

Key words: Vectorisation, vector, peptides, click reaction, CuAAC, oxime, ligation, chemoselectivity, orthogonality, RGD, $\alpha v\beta_3$ integrin, ATWLPPR, neuropilin-1, angiogenesis, cancer, optical imaging, fluorescence, cyanine 5.5.