



HAL
open science

Ciblage des protéoglycanes par la fonction ammonium quaternaire. : Développement de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques pour la prise en charge du chondrosarcome.

Caroline Peyrode

► **To cite this version:**

Caroline Peyrode. Ciblage des protéoglycanes par la fonction ammonium quaternaire. : Développement de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques pour la prise en charge du chondrosarcome.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2011. Français. NNT : 2011CLF1MM26 . tel-01875782

HAL Id: tel-01875782

<https://theses.hal.science/tel-01875782v1>

Submitted on 17 Sep 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.

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université

Spécialité : Pharmacochimie et Pharmacologie Anticancéreuses

Soutenue le 12 décembre 2011

Par

Caroline PEYRODE

**Ciblage des protéoglycanes par la fonction ammonium quaternaire :
Développement de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques
pour la prise en charge du chondrosarcome.**

Rapporteurs : Pr Gérard Coudert, PU Emérite, Université des Sciences
d'Orléans
Dr Jean-Claude Monboisse, PH-MCU, Université de Reims

Membres du Jury : Dr Françoise Rédini, DR Inserm, UMR S957, Université de
Nantes
Pr Michel Madesclaire, PU, Université Clermont1

Directeur de thèse : Dr Elisabeth Miot-Noiraut, MCU, Université Clermont1

Co-directeur de thèse : Dr Valérie Weber, MCU, Université Clermont1

Université d'Auvergne
UMR 990 Inserm Imagerie Moléculaire et Thérapie Vectorisée
58 Rue Montalembert, 63005 Clermont-Ferrand cedex

Remerciements

Il me reste une dernière page à écrire très importante à mes yeux et par laquelle je souhaite remercier tous mes amis, mes collègues de travail ainsi que toutes les personnes qui m'ont entourée et soutenue et qui ont fait que ces trois années de thèse resteront un excellent souvenir.

Je remercie :

L'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Le Professeur Jean-Michel Chezal de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour réaliser cette thèse. Merci pour tes conseils, ton soutien, tes encouragements.

L'ensemble des personnes ayant fait partie de mon jury de thèse :

Le Docteur Elisabeth Miot-Noirault, ma directrice. Merci de m'avoir fait confiance dans mon travail, merci pour tous tes conseils, tes idées, tes encouragements. Je ne regrette qu'une chose : que nous n'ayons pas pu faire de la voiture à pédale ensemble...

Le Docteur Valérie Weber, ma co-directrice qui a commencé à m'encadrer en 3^{ème} année de pharmacie, il y a déjà neuf ans... Valérie, c'est peut-être grâce à toi que j'en suis là. Je te remercie pour tout, pour tes conseils, ta rigueur et j'espère que nous pourrions continuer à travailler ensemble.

Le Docteur Françoise Rédini. Merci pour tous vos conseils et vos idées nouvelles que vous m'apportiez lors des rassemblements du comité de thèse.

Le Docteur Yves Communal. Je me souviendrai surtout de vous pour les descentes mémorables au pas de course jusqu'à l'Hôtel Dieu, portant des bombonnes d'azote liquide pour la cytométrie de flux et pour la bonne ambiance lors des manipulations.

Je voudrais également remercier toutes les personnes ayant collaborées à différents moments de ma thèse qu'elles fassent partie de l'unité ou d'un autre laboratoire.

Le docteur Marie-Mélanie Dauplat du Centre Jean Perrin pour les analyses anatomopathologiques et toutes les explications.

Aurélien Vidal et Philippe Auzeloux pour le radiomarquage

Michèle Borel et Fernand Léal pour les études par RMN

Marie-Joséphine Galmier pour les analyses par CLP-MS

Mathilde Bonnet-Duquennoy pour les conseils concernant la RT/PCR

Je tenais également à remercier Sophie Barillot, stagiaire de MI.

Une personne que je tiens à remercier particulièrement : Sophie Besse. Sophie, tu as été mon binôme sur de nombreuses manipulations et ma collègue de bureau pendant deux ans. J'ai adoré travailler avec toi. Merci pour ta joie de vivre, ta motivation. Je te souhaite bon courage pour la suite.

Un grand merci à Aurélie Maisonial. Aurélie, tu as toujours été présente dans les bons moments comme dans les moments de doute que tu sois en France ou en Allemagne... Vive internet ! J'aimerais te remercier pour tout cela.

Merci à tout le personnel de l'UMR 990 Inserm/Uda, les personnes encore présentes dans l'unité comme les personnes qui ne sont plus là mais qui ont croisé ma route et qui m'ont parfois aidée ou conseillée. Je ne peux pas citer tous les noms mais chacun se reconnaîtra. Un petit clin d'œil, cependant, à notre super secrétaire Jacqueline. Il faut également que je souhaite bon courage à tous les thésards qui me suivront. Mathieu, Zied, Radia et puis mes deux co-équipières de squash, Emilie et Claire : attention les filles, je reviens parmi vous !

Mes remerciements vont également à l'ensemble de ma famille, ma sœur Isabelle et Jérôme, mon frère Thierry et Ioz, ainsi qu'à mes parents qui m'ont toujours soutenue et que j'adore. Tous mes cousins, cousines, oncles et tantes. Merci pour toutes les réunions de familles, les noëls merci pour votre présence à chaque occasion. Je sais vraiment que j'ai de la chance d'appartenir à une famille comme la mienne.

Merci à ma mamie, ma super mamie, la meilleure, celle qui m'a fait découvrir l'Ipod et qui m'a appris à me servir d'un Iphone. Mamie, cette thèse est pour toi.

Je remercie aussi tous mes amis dont la liste serait trop longue à énumérer. Parmi eux, j'aimerais plus particulièrement remercier Cindy, Marielle, Camille avec qui j'ai partagé de super moments. Mais aussi mes amis de la musique, mon ancien groupe, mon nouveau groupe. Je vous adore tous.

Guillaume, mon chéri. Merci pour ton soutien, ta patience, merci pour les livraisons de sushis au laboratoire. Je sais que toi aussi, tu garderas en mémoire ces derniers mois de thèse. Tu auras quand même survécu, bravo... Je t'aime.

"Une suite de petites volontés fait un gros résultat "

Charles Baudelaire

Soutiens

L'ensemble de ce travail a été réalisé en collaboration avec l'UMR S957 Inserm de Nantes (le Professeur François Gouin, le Professeur Dominique Heymann et le Docteur Françoise Rédini).

Les travaux réalisés ont bénéficié du soutien de l'Institut National du Cancer, de la Ligue Contre le Cancer, du Fond Régional d'Innovation et du Contrat Plan Etat Région (CPER 2008-2011).

Cette thèse a été financée par une bourse dans le cadre du Contrat de Plan Etat Région (CPER 2008-2011).

Résumé

Le travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans une stratégie de vectorisation d'agents diagnostiques et thérapeutiques, vers les protéoglycanes du chondrosarcome, via une structure chimique de reconnaissance : un ammonium quaternaire.

Nous nous sommes intéressés aux deux aspects de la prise en charge du chondrosarcome : l'aspect diagnostique par imagerie scintigraphique et l'aspect thérapeutique.

Pour l'imagerie, nous avons validé l'intérêt du radiotracer ^{99m}Tc -NTP 15-5 dans le diagnostic précoce, le staging et le suivi de la réponse au traitement dans un modèle de chondrosarcome de rat. Ce dernier démontre une accumulation spécifique et rapide au niveau du tissu tumoral, et ce, dès les stades précoces de la pathologie. Actuellement en phase de transfert vers la clinique pour la pathologie de l'arthrose, nos résultats ont permis de proposer une extension de l'application au chondrosarcome.

Pour la thérapie, nous avons confirmé, *in vitro*, que la greffe du vecteur ammonium quaternaire, sur un agent alkylant, le melphalan, ne modifiait pas son activité cytotoxique. *In vivo*, les résultats obtenus avec le dérivé ammonium quaternaire du melphalan, ont mis en évidence un ralentissement net de la croissance tumorale associée à une diminution considérable du syndrome myélodysplasique associé au traitement. Ces résultats prouvent tout l'intérêt de la vectorisation pour l'amélioration de l'index thérapeutique et nous ont permis de valider la preuve de concept pour la vectorisation d'agent cytotoxique.

Une autre approche de thérapie a consisté à greffer le vecteur sur des dérivés du cyclophosphamide clivables en hypoxie. Parmi les composés synthétisés, l'un d'entre eux a montré, *in vitro*, un différentiel de cytotoxicité hypoxie/normoxie intéressant. Son évaluation *in vivo* dans le modèle de xénogreffe de chondrosarcome HEMC-SS a démontré une inhibition importante de la croissance tumorale. En nous intéressant à l'environnement hypoxique de la tumeur, nous offrons ainsi une approche encore plus spécifique de la thérapie.

L'ensemble de ces travaux offrent un véritable espoir pour le management du chondrosarcome, pathologie, certes rare mais néanmoins redoutable.

Subventions obtenues pour ce travail : INCa, Ligue Contre le Cancer, Contrat de Plan Etat Région, Fond Régional d'Innovation / FRI2/OSEO

Abstract

Our strategy consists in using the quaternary ammonium function, that exhibits a high affinity for proteoglycans of extracellular matrix, as a selective carrier to chondrosarcoma of (i) radioisotopes for a targeted *in vivo* imaging or (i) cytotoxics for a targeted therapeutic approach.

For diagnosis application, a radiotracer radiolabeled with ^{99m}Tc (^{99m}Tc -NTP 15-5) was designed and tested *in vivo* in an orthotopic Swarm chondrosarcoma model. For therapeutic application, a quaternary ammonium derivative of melphalan, Melphalan-AQ, was synthesized and assessed *in vitro* (cytotoxic activity, cell cycle distribution) and *in vivo* in the orthotopic Swarm chondrosarcome model (antitumor efficacy, toxicity). Since chondrosarcoma is characterized by hypoxia, research was focused on the vectorization of hypoxia-activated prodrugs.

For diagnosis, ^{99m}Tc -NTP 15-5 radiotracer highly accumulated in tumoral tissue at very early stage of pathology while no palpable nor measurable tumor could be assessed.

For therapy, chondrosarcoma bearing rats treated with Melphalan-AQ showed a significant tumor growth inhibition with associated hematological side effects being significantly reduced as compared to Melphalan.

Among all phosphoramidate-AQ derivatives synthetised, one was selected on the basis of cytotoxic activity improvement under hypoxia respectively to normoxia. *In vivo*, this compound demonstrated a significant tumoral growth inhibition in the hypoxic HEMC-SS chondrosarcoma model.

This work underlines the potential of the proteoglycans vectorization strategy developed in our lab, for a targeted management of chondrosarcoma including: (i) the first and only radiopharmaceutical able to provide *in vivo* a specific diagnosis and staging of the tumoral pathology of cartilage and (ii) a promising targeted antineoplastic approach exploiting both the chondrogenic and hypoxic features of chondrosarcoma.

Grants: INCa, Ligue Contre le Cancer, Contrat de Plan Etat Région, Fond Régional d'Innovation / FRI2/OSEO

LISTE DES COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS

Les résultats des travaux obtenus au cours de cette thèse ont fait l'objet de trois publications, quatre communications orales, six communications par posters et ont été récompensés par un prix de communication orale et deux prix de poster.

Publications:

Peyrode C, Gouin F, Vidal A, Auzeloux P, Besse S, Dauplat MM, Askienazy S, Heymann D, Chezal JM, Rédini F, Miot-Noirault E. (2011) *A "proteoglycan targeting strategy" for the scintigraphic imaging and monitoring of the swarm rat chondrosarcoma orthotopic model.* "Special focus issue on chondrosarcoma" in *Sarcoma*. vol. 2011, Article ID 691608. doi:10.1155/2011/691608.

Peyrode C, Weber V, David E, Vidal A, Auzeloux P, Communal Y, Dauplat MM, Besse S, Gouin F, Heymann D, Chezal JM, Rédini F, Miot-Noirault E. (2011) *Quaternary ammonium-melphalan conjugate for anticancer therapy of chondrosarcoma: in vitro and in vivo preclinical studies.* Invest New Drugs. DOI 10.1007/s10637-011-9663-z

Miot-Noirault E, Vidal A, Auzeloux P, **Peyrode C**, et al. (2011) *In Vivo Scintigraphic imaging of proteoglycans.* *Methods Mol Biol*, sous presse

Communications orales :

Journées de l'IFR, 29 octobre 2009 – Clermont-Ferrand – Ciblage des protéoglycans du chondrosarcome par la fonction ammonium quaternaire **C. Peyrode**, V. Weber, F. Gouin, A. Vidal, M. Bonnet-Duquennoy, P. Auzeloux, A. Cayre, N. Moins, E. Debiton, D. Heymann, J.M. Chezal, F. Rédini, E. Miot-Noirault. *Communication orale 7 p27*

Biology of Ionizing Radiation Workshop, 22 au 25 septembre 2010 - Berder - Quaternary ammonium as vector of radioisotopes toward cartilage proteoglycans: in vivo imaging and monitoring of chondrosarcoma. **C. Peyrode**, V. Weber, A. Vidal, P. Auzeloux, F. Gouin, M.M. Dauplat, S. Besse, J.M. Chezal, F. Rédini, E. Miot-Noirault. *Page 44*

XIII Journée Jeune Chercheur de chimie Thérapeutique, 4 février 2011- Paris Développement d'une stratégie innovante de vectorisation d'agents diagnostiques et thérapeutiques vers les protéoglycans du chondrosarcome. **C. Peyrode**, V. Weber, A. Vidal, E. David, F. Gouin, M.M. Dauplat, M. Bonnet-Duquennoy, Y. Communal, S. Besse, J.M. Chezal, F. Rédini, E. Miot-Noirault. *CO12*

XIXème congrès annuel de la SFBMEc, Toulouse, 24-26 mars 2011 Développement d'une stratégie innovante de vectorisation d'agents diagnostiques et thérapeutiques vers les protéoglycans du chondrosarcome. **C. Peyrode**, V. Weber, A. Vidal, E. David, F. Gouin, M. M. Dauplat, M. Bonnet-Duquennoy, Y. Communal, S. Besse, J.M. Chezal, F. Rédini, E. Miot-Noirault. *Page 35. 1^{er} prix de communication orale*

Communications par poster

5^{ème} journées scientifiques du CLARA, 30 et 31 mars 2010, Lyon *Développement d'une stratégie innovante de vectorisation d'agents diagnostiques et thérapeutiques vers les protéoglycanes du chondrosarcome.* **C. Peyrode**, V. Weber, A. Vidal, F. Gouin, M. Bonnet-Duquennoy, M.M. Dauplat, Y. Communal, J.M. Chezal, F. Rédini, E. Miot-Noirault. *Bull. Cancer* 2010, 97, S18-19

J.E.D, 6 et 7 mai 2010, Clermont-Ferrand *Développement d'une stratégie innovante de vectorisation d'agents diagnostiques et thérapeutiques vers les protéoglycanes du chondrosarcome.* **C. Peyrode**, V. Weber, A. Vidal, F. Gouin, M. Bonnet-Duquennoy, M.M. Dauplat, Y. Communal, J.M. Chezal, F. Rédini, E. Miot-Noirault.

Journée de cancérologie, 20 janvier 2011, Clermont-Ferrand *Une nouvelle stratégie de vectorisation d'agents cytotoxiques par la fonction ammonium quaternaire vers les protéoglycanes du chondrosarcome.* **C. Peyrode**, V. Weber, A. Vidal, F. Gouin, M.M. Dauplat, M. Bonnet-Duquennoy, Y. Communal, S. Besse, J.M. Chezal, F. Rédini, E. Miot-Noirault. **1^{er} prix de poster**

J.E.D, 21 et 22 avril 2011, Clermont-Ferrand *Une nouvelle stratégie de vectorisation d'agents cytotoxiques par la fonction ammonium quaternaire vers les protéoglycanes du chondrosarcome.* **C. Peyrode**, V. Weber, A. Vidal, F. Gouin, M.M. Dauplat, M. Bonnet-Duquennoy, Y. Communal, S. Besse, J.M. Chezal, F. Rédini, E. Miot-Noirault.

47th International Conference on Medicinal Chemistry « Drug Discovery and Selection », Lyon, 6-8 juillet 2011 *A new promising strategy in chondrosarcoma: quaternary ammonium as vector of alkylating agents toward cartilage proteoglycans.* **C. Peyrode**, V. Weber, E. David, A. Vidal, Y. Communal, M.M. Dauplat, S. Besse, J.M. Chezal, F. Rédini, E. Miot-Noirault. *Poster OI26 page 274.* **1^{er} prix de poster**

European Mulidisciplinary Cancer Congress, Stockholm, Suède, 23-27 septembre 2011 *A new promising strategy in chondrosarcoma: quaternary ammonium as vector of radioisotopes and cytotoxics toward cartilage proteoglycans.* **C. Peyrode**, V. Weber, E. David, A. Vidal, Y. Communal, M.M. Dauplat, S. Besse, J.M. Chezal, F. Rédini, E. Miot-Noirault. *Poster 028, Session "Sarcoma: Soft Tissue and Bone".*

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I	
Revue bibliographique	4
I. Classification des chondrosarcomes	6
A. Les chondrosarcomes dits "conventionnels"	6
1. Epidémiologie et localisation	6
2. Classification	6
3. Clinique	7
4. Imagerie	8
5. Anatomopathologie	8
a. Analyse macroscopique	8
b. Analyse histologique	8
c. Critères de malignité	8
5. Pronostic	9
6. Chondrosarcome de bas grade et chondrome, un diagnostic délicat	10
B. Les chondrosarcomes "non conventionnels"	11
1. Le chondrosarcome mésoenchymateux	11
a. Définition, épidémiologie	11
b. Diagnostic par imagerie	11
c. Anatomopathologie	11
d. Marqueurs moléculaires	11
e. Pronostic	12
2. Le chondrosarcome à cellules claires	12
a. Définition, épidémiologie	12
b. Imagerie	12
c. Anatomopathologie	12
d. Marqueurs moléculaires	13
d. Pronostic	13
3. Le chondrosarcome dédifférencié	13
a. Définition, épidémiologie	13
b. Imagerie	13
c. Anatomopathologie	13
d. Pronostic	14

Sommaire

II. Diagnostic du chondrosarcome par l'imagerie	14
A. L'examen radiologique	14
B. L'examen tomodensitométrie, le scanner	14
C. L'imagerie par résonance magnétique, l'IRM	14
D. La scintigraphie	15
1. Les rayonnements	15
2. La détection	15
3. Les radiotraceurs	15
III. Traitement du chondrosarcome	21
A. La chimiothérapie	21
B. La radiothérapie	21
C. Les thérapies ciblées	23
1. Le ciblage de l'angiogénèse	23
2. Le ciblage des gènes suppresseur de tumeur	24
3. Le ciblage des proto-oncogènes Myc	24
4. L'inhibition de la voie mTOR	24
5. Les métalloprotéinases	25
6. L'inhibition de la voie de signalisation PTHLH	25
D. La chirurgie	26
1. La résection large	26
2. L'amputation	26
IV. Environnement hypoxique et présence de protéoglycanes : Deux caractéristiques du tissu chondrosarcome	27
A. L'hypoxie	27
1. La faible perfusion intratumorale à l'origine de l'hypoxie	27
2. L'hypoxie responsable de la résistance aux thérapies par l'activation du facteur HIF-1	28
3. L'exploitation de l'hypoxie comme avantage thérapeutique.	29
a. Les quinones	30
b. Les nitroaromatiques	31
c. Les N-oxydes	32
B. Les protéoglycanes	33
1. Structure et classification des protéoglycanes	33

Sommaire

2. L'agrécane et le versicane _____	34
3. Les petits protéoglycanes riches en leucine _____	35
4. Les protéoglycanes de surface _____	36
5. Stratégies de ciblage des protéoglycanes _____	38
V. Présentation et contexte du sujet _____	41
A. Intérêt du radiotracer ^{99m} Tc-NTP 15-5 pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome _____	41
B. Validation de la stratégie de vectorisation d'agents cytotoxiques par la fonction ammonium quaternaire _____	43
C. Amélioration de la spécificité des molécules vectorisées par la fonction ammonium quaternaire _____	44

Chapitre II

<i>Intérêt du radiotracer ^{99m}Tc-NTP 15-5 pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome</i> _____	46
I. Etude de captation cellulaire du radiotracer ^{99m}Tc-NTP 15-5 _____	47
A. Culture cellulaire _____	47
B. Protocole de l'étude _____	47
C. Résultats _____	48
II. Etudes <i>in vivo</i> _____	49
A. Les modèles d'études _____	49
1. Le modèle Swarm _____	49
a. Présentation et réalisation du modèle _____	49
b. Caractérisation du modèle Swarm implanté en situation orthotopique _____	49
<i>La croissance tumorale</i> _____	49
<i>L'anatomo-pathologie du tissu</i> _____	50
<i>Le dosage des protéoglycanes</i> _____	50
2. Le modèle sham _____	50
3. Le modèle de xélogreffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) sur souris SCID _____	51
a. Réalisation du modèle _____	51
b. Caractérisation du modèle _____	51

Sommaire

<i>La croissance tumorale</i>	51
<i>L'anatomopathologie du tissu</i>	51
<i>Le dosage des protéoglycanes</i>	51
B. Les scintigraphies au ^{99m}Tc-NTP 15-5 pour le modèle Swarm orthotopique	52
C. L'accumulation du radiotracer au niveau du tissu tumoral	53
1. Une accumulation rapide <i>in vivo</i>	53
a. Les animaux	53
b. Les résultats	53
2. Une accumulation tissulaire spécifique	53
a. Les animaux	53
b. Les résultats	53
3. L'imagerie et le développement tumoral	54
4. Une accumulation spécifique	55
a. Absence de fixation chez les Shams	55
b. Absence de fixation au niveau des tumeurs exprimant peu les protéoglycanes	56
<i>Absence de fixation sur le modèle de xélogreffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS)</i>	56
<i>Absence de fixation sur le mélanome</i>	56
5. Une fixation permettant d'évaluer, <i>in vivo</i> , la réponse à un traitement antitumoral.	57
6. La fixation est due à la fonction ammonium quaternaire	57
a. Etude <i>in vitro</i>	58
b. Etude <i>in vivo</i>	58
D. Intérêt et positionnement du radiotracer en scintigraphie	59
1. Chondrosarcome et ^{99m} Tc-HMDP	59
2. Chondrosarcome et ¹⁸ F-FDG	59
III. Conclusion	60
IV. Publication	62
Chapitre III	
Application à la vectorisation d'agents cytotoxiques avec le melphalan ammonium quaternaire	66
I. Synthèses des dérivés du melphalan	67
A. Synthèse du melphalan-AQ 5	67
B. Synthèse du melphalan chlorhydrate 6	68

Sommaire

II. Etudes <i>in vitro</i> du melphalan-AQ et du melphalan,HCl	70
A. Modes opératoires	70
1. Détermination du pouvoir alkylant par le test à la NBP	70
2. Culture cellulaire	70
3. Evaluation de la cytotoxicité par le test à la résazurine	71
4. Cytométrie en flux	71
B. Résultats	73
1. Evaluation du pouvoir alkylant	73
2. Détermination de la cytotoxicité par le test à la résazurine	73
3. Caractérisation de l'activité cytotoxique	73
III. Etudes <i>in vivo</i>	75
A. Dose Maximale Tolérée (DMT) du melphalan-AQ 5 et du melphalan,HCl 6	75
B. Efficacité antitumorale et toxicité <i>in vivo</i> du melphalan-AQ 5 comparativement au melphalan,HCl 6	76
1. Modes opératoires	76
a. Analyses hématologiques	76
b. Evaluation de l'effet antitumoral	77
<i>Mesure du volume tumoral au pied à coulisse</i>	77
<i>Imagerie scintigraphique</i>	78
c. Dosage des protéoglycanes	78
2. Comparaison des deux traitements à dose équimolaire	78
a. Evaluation de l'effet antitumoral	78
<i>Evaluation par mesure du volume tumoral au pied à coulisse</i>	78
<i>Scintigraphie avec le radiotracteur ^{99m}Tc-NTP 15-5</i>	79
b. Les effets indésirables	80
c. Les modifications du tissu tumoral engendrées par le traitement	80
3. Comparaison des deux traitements à la dose correspondant à 50 % de leur DMT respective	83
a. L'efficacité antitumorale	83
b. Les effets indésirables	84
c. Les modifications du tissu tumoral engendrées par le traitement	85
IV. Conclusion	86

V. Publication	88
-----------------------	-----------

Chapitre IV

Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides	93
--	-----------

I. Synthèses des dérivés phosphoramides	94
--	-----------

A. Synthèse de dérivés portant le vecteur sur l'entité active	94
---	----

1. Synthèse d'un dérivé non activable en hypoxie : le dérivé benzyle 11	94
--	----

2. Synthèse des prodrogues vectorisées et activables en hypoxie 15a-c	96
--	----

a. Préparation des alcools 12a et 12b utilisés comme synthon de départ	97
--	----

Synthèse du 2-hydroxyméthyl-5-nitrofurane 12a	97
--	----

Synthèse du 5-hydroxyméthyl-1- <i>N</i> -méthyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazole 12b	97
--	----

b. Couplage des alcools 12 avec le dichlorure de l'acide <i>N,N</i> -bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique 8	98
---	----

d. Quaternisation	101
-------------------	-----

3. Synthèse du composé 23 , l'équivalent non vectorisé du composé 15b	103
---	-----

B. Synthèse d'un dérivé portant le vecteur ammonium quaternaire sur l'entité clivable	104
---	-----

1. Synthèse de l'alcool 26 , le [2-{2-(diméthylamino)éthoxy}-4-nitrophényl]méthanol	104
--	-----

2. Formation du dérivé phosphoramide 28	105
--	-----

3. Quaternisation du composé 28	107
--	-----

II. Etude cinétique du clivage des prodrogues par RMN ³¹P	108
---	------------

A. Modes Opératoires	108
----------------------	-----

1. Etude de stabilité	108
-----------------------	-----

2. Suivi du clivage des composés par RMN ³¹ P	108
--	-----

B. Etude de stabilité des prodrogues	109
--------------------------------------	-----

1. A 37°C, dans le tampon cacodylate	109
--------------------------------------	-----

2. A 20°C, dans le sérum physiologique	109
--	-----

C. Etude du clivage et de la libération de l'entité active	109
--	-----

1. Disparition de la prodrogue	110
--------------------------------	-----

2. Cinétique de l'entité active	110
---------------------------------	-----

a. L'hypothèse	110
----------------	-----

b. Validation de l'hypothèse	110
------------------------------	-----

c. Cinétique de l'entité active libérée	112
---	-----

Sommaire

III. Evaluation <i>in vitro</i> – Etude de cytotoxicité en hypoxie et normoxie	112
A. Modes opératoires	112
B. Résultats	113
IV. Evaluation <i>in vivo</i>	114
A. ¹⁸ F-FMISO – Validation du modèle d'étude	114
1. Le ¹⁸ F-FMISO ne fixe pas la tumeur du modèle SRC	114
2. Le ¹⁸ F-FMISO fixe la tumeur de xéno greffe de chondrosarcome humain HEMC-SS sur souris SCID	114
B. Détermination de la DMT	115
C. Etude <i>in vivo</i> sur le modèle de xéno greffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS)	116
1. Protocole de traitement	116
2. Résultats	116
V. Conclusions du chapitre	118

Chapitre V

Discussion et conclusion générale	119
Matériel et méthodes - Chimie	129
Indications générales	129
Synthèses chimiques	131
I - Synthèses des dérivés du melphalan	131
1-({N-(tert-Butyloxycarbonyl)-4-[bis(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl}amino)-3-(diméthylamino)propane 3	131
Iodure de [3-({N-(tert-butyloxycarbonyl)-4-[bis(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanyl}amino)propyl]triméthylammonium 4	261

Sommaire

Chlorhydrate du chlorure de [3-({4-[bis(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylanyl}amino)propyl]triméthylammonium, melphalan-AQ 5	262
Chlorhydrate de la 4-[bis(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine, melphalan chlorhydrate 6	263
II – Synthèse du dérivé non clivable en hypoxie, le composé 11	264
Dichlorure de l'acide <i>N,N</i> -bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique 8	264
<i>O</i> -Benzyl <i>N,N</i> -bis(2-chloroéthyl)- <i>N'</i> -[3-(diméthylamino)propyl]phosphorodiamidate 10	265
Iodure de 3-({(benzyloxy)[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl}amino)- <i>N,N,N</i> -triméthylpropane-1-aminium 11	267
III- Synthèses des prodrogues vectorisées et activables en hypoxie, les composés 15a-c	268
2-hydroxyméthyl-5-nitrofurane 12a	268
Chlorhydrate de l'ester éthylique de la sarcosine 17	269
Ester éthylique de la <i>N</i> -formylsarcosine 18	270
Ester éthylique de l'acide 2-amino-1- <i>N</i> -méthyl-1 <i>H</i> -imidazole-5-carboxylique 20	271
Acide 1- <i>N</i> -méthyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazole-5-carboxylique 22	272
5-hydroxyméthyl-1- <i>N</i> -méthyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazole 12b	273
<i>O</i> -{(5-nitrofurane-2-yl)méthyl}- <i>N,N</i> -bis(2-chloroéthyl)- <i>N'</i> -[3-diméthylamino)propyl]phosphorodiamidate 14a	274
<i>O</i> -{(1-méthyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazole-5-yl)méthyl}- <i>N,N</i> -bis(2-chloroéthyl)- <i>N'</i> -[3-diméthylamino)propyl]phosphorodiamidate 14b	276
<i>O</i> -(4-nitro)benzyl <i>N,N</i> -bis(2-chloroéthyl)- <i>N'</i> -[3-(diméthylamino)propyl]phosphorodiamidate 14c	278
Iodure de 3-({[bis(2(chloroéthyl)amino)][(5-nitrofurane-2-yl)méthoxy]phosphoryl}amino)- <i>N,N,N</i> -triméthylpropane-1-aminium 15a	280
Iodure de 3-({[bis(2(chloroéthyl)amino)][(1-méthyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazole-5-yl)méthoxy]phosphoryl}amino)- <i>N,N,N</i> -triméthylpropane-1-aminium 15b	281
Iodure de 3-({(4-nitrobenzyloxy)[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl}amino)- <i>N,N,N</i> -triméthylpropane-1-aminium 15c	282
IV- Synthèse d'un équivalent non vectorisé du composé 15b, le composé 23	283
<i>O</i> -{(1-méthyl-2-nitro-1 <i>H</i> -imidazole-5-yl)méthyl}- <i>N,N</i> -bis(2-chloroéthyl)- <i>N'</i> -propylphosphorodiamidate 23	283
V – Synthèse du dérivé portant le vecteur ammonium quaternaire sur l'entité clivable, le composé 29	284
Ester méthylique de l'acide 2-hydroxy-4-nitrobenzoïque 24	284

Sommaire

Ester méthylique de l'acide 2-[2-(diméthylamino)éthoxy]-4-nitrobenzoïque 25	285
[2-{2-(diméthylamino)éthoxy}-4-nitrophényl]méthanol 26	286
<i>O</i> -([2-{2-(diméthylamino)éthoxy}-4-nitrophényl]méthyl) <i>N,N</i> -bis-(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate 28	287
Iodure de 2-{2-([<i>N,N</i> -bis-(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl) oxyméthyl)-5-nitrophénoxy}- <i>N,N,N</i> -triméthyléthane-1-aminium 29	289
Table des abréviations	146
Table des illustrations	147
Références bibliographiques	151

Sommaire



Introduction

Introduction



Introduction

Ce travail de thèse s'inscrit dans la stratégie de vectorisation, développée par l'unité UMR 990 Inserm, d'agents diagnostiques et thérapeutiques vers les protéoglycanes du cartilage via une structure chimique de reconnaissance, un ammonium quaternaire. Cette stratégie qui a fait l'objet d'un brevet mondial, a déjà démontré que les dérivés ammonium quaternaire de principes actifs tels que des anti-inflammatoires, des chondroprotecteurs et ou encore des anticancéreux, s'accumulaient de façon sélective dans le cartilage [1-3].

L'application de cette démarche pour la vectorisation de radioisotopes comme le technétium 99m est, d'ailleurs, à l'origine du transfert clinique du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$, pour l'imagerie diagnostique d'une pathologie dégénérative du cartilage, l'arthrose (*Projet OSEO/Fond Régional d'Innovation*).

Compte tenu du manque de radiotraceurs précoces et spécifiques disponibles actuellement en clinique pour le chondrosarcome, le développement de nouveaux outils permettant un diagnostic précoce et spécifique de cette pathologie est essentiel pour sa prise en charge thérapeutique.

Il faut également souligner la faible efficacité de la chimiothérapie, en partie, due à l'absence de vascularisation et à la nature chondrogénique du tissu qui limitent la diffusion des agents cytotoxiques jusqu'à la tumeur. Cette accessibilité doit être améliorée et une spécificité recherchée.

Dans la mesure où les cellules de chondrosarcome synthétisent une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes comparable à la matrice extracellulaire du cartilage, leur ciblage par une fonction ammonium quaternaire semble être adaptée :

- à l'adressage spécifique, en médecine nucléaire, de radioisotopes, tels que le technétium 99m, pour l'imagerie diagnostique, le suivi et la réponse au traitement du chondrosarcome, mais aussi,
- à l'adressage de cytotoxiques en vue d'une chimiothérapie sélective de cette pathologie. Cette approche permettrait ainsi d'améliorer l'accessibilité des principes actifs vers le tissu tumoral, de minimiser les effets secondaires et finalement d'augmenter l'index thérapeutique des principes actifs.

Par ailleurs, le chondrosarcome étant caractérisé par un environnement hypoxique, la double exploitation des caractéristiques de la matrice extracellulaire : hypoxie et protéoglycanes, avec le développement de prodrogues vectorisées par un ammonium quaternaire et activables spécifiquement en milieu hypoxique constitue une stratégie

Introduction



Introduction

innovante et très prometteuse.

L'objectif de ce travail fut donc de valider le concept de ciblage des protéoglycanes du chondrosarcome pour l'application diagnostique avec le radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$, mais aussi pour l'application thérapeutique avec un dérivé ammonium quaternaire du melphalan dont l'activité cytotoxique a été caractérisée in vitro et démontrée in vivo. Cette stratégie a ensuite été appliquée à la vectorisation de prodrogues dérivées des phosphoramides et activables en hypoxie, de leur synthèse jusqu'à leur évaluation in vitro et in vivo en passant par des études de clivage en milieu réducteur suivis par RMN ^{31}P .

Introduction



Chapitre I

Revue bibliographique

Chapitre I – Revue bibliographique



Chapitre I – Revue bibliographique

Le chondrosarcome, ou tumeur maligne du cartilage, a été décrit pour la première fois par Jaffe et Liechtenstein en 1943 [4]. Bien que rare, cette tumeur représente 20 à 25 % des tumeurs osseuses primitives et se classe en troisième position après l'ostéosarcome. Environ, 120 cas par an sont recensés en France et concernent généralement des personnes âgées de 30 à 60 ans [5] avec un pic de survenue à 50 ans et une prédominance masculine discrète [6].

Le chondrosarcome se caractérise par la production d'un tissu cartilagineux, une croissance relativement lente et l'apparition de métastases rares. Du fait de la nature chondrogénique du tissu et de l'absence de vascularisation, le chondrosarcome est généralement résistant à la chimiothérapie et à la radiothérapie ; la meilleure alternative proposée aux patients est la chirurgie qui consiste en une exérèse large de la tumeur pouvant aller jusqu'à l'amputation. Malgré tout, ces tumeurs ont un risque de récurrence élevé, avec un plus mauvais pronostic que la tumeur initiale.

Le pronostic sera fortement conditionné par la rapidité de la prise en charge du chondrosarcome et l'efficacité de la chirurgie.

Vers le milieu du XX^{ème} siècle Lichtenstein et Jaff isolent le chondrosarcome du groupe des sarcomes ostéogéniques et établissent les critères diagnostiques et cytologiques. Les années suivantes, des formes particulières sont décrites.

Les chondrosarcomes se classent, aujourd'hui, selon des critères histologiques en :

- ↪ Chondrosarcome conventionnel
- ↪ Chondrosarcome dédifférencié
- ↪ Chondrosarcome mésenchymateux
- ↪ Chondrosarcome à cellules claires

Chapitre I – Revue bibliographique

TABLE 2: Summary of frequency, age, sex, and prognosis of CHSs.

Subtype	Frequency	Gender (M:F)	Peak age	5-year survival
Conventional	85%	1.5-2:1	40-60	G1:89%, G2, and G3:57%
Periosteal	<2%	Slight male predilection	20-30	83%
Dedifferentiated	10%	1:1	50-60	<10%
Mesenchymal	<2-13%	1:1	10-20	54.6%
Clear cell	1-2%	2.6:1	20-30	>80%

Tableau 1 : Les différents types de chondrosarcomes, leur fréquence, l'âge moyen et le taux de survie à 5 ans [7]

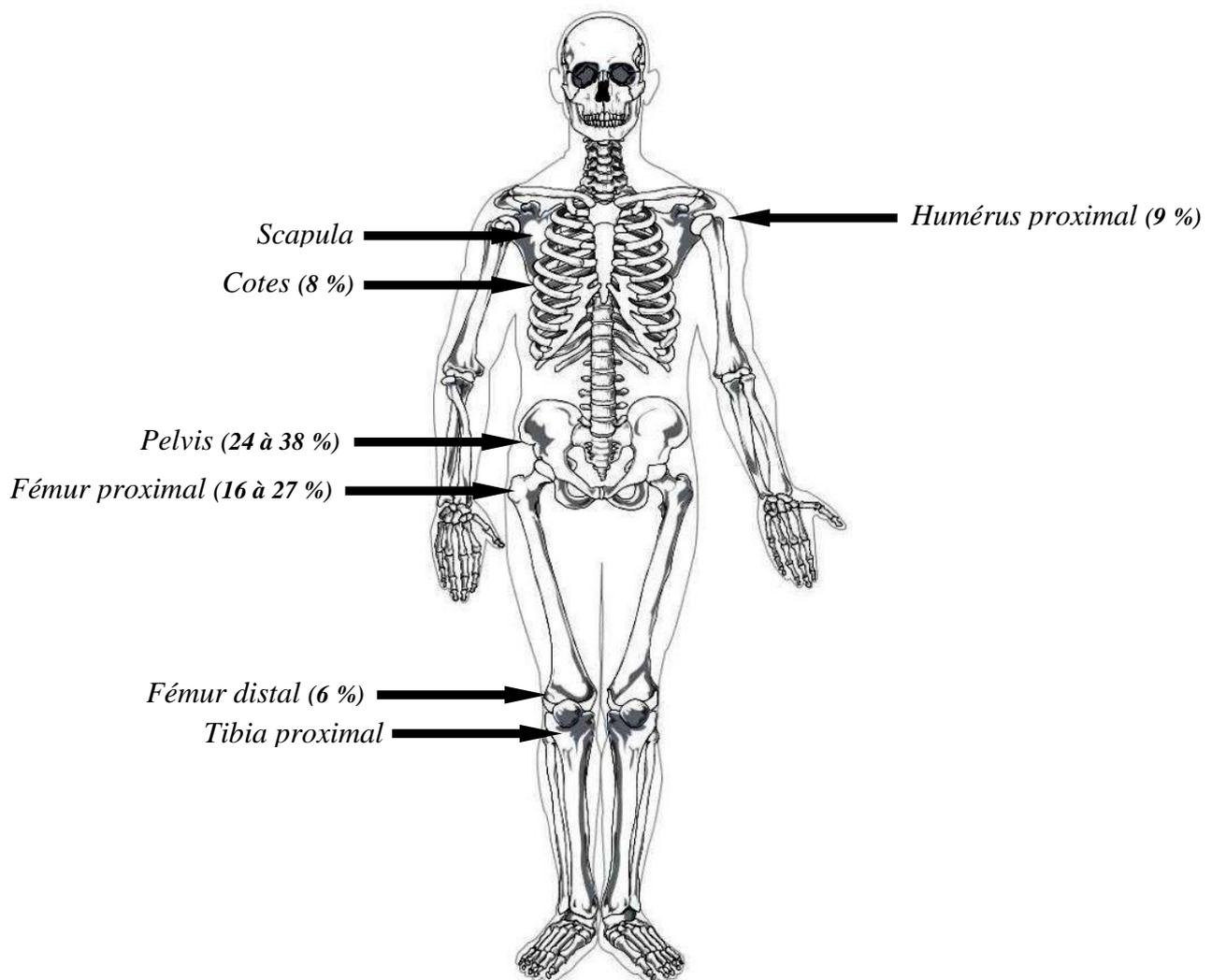


Figure 1 : Localisations fréquentes des chondrosarcomes

I. Classification des chondrosarcomes

A. Les chondrosarcomes dits "conventionnels"

1. Epidémiologie et localisation

Les chondrosarcomes dits conventionnels concernent en majorité les personnes âgées de 40 à 60 ans (90 %) avec une prédominance discrète chez les hommes (1.5-2 / 1) (*Tableau I*).

Bien que tous les os puissent être touchés, les plus généralement atteints sont les os longs au niveau métaphyse (49 %) ou diaphyse (36 %) [7]. Les tumeurs sont plus fréquemment situées au niveau (*Figure 1*):

- du pelvis (24 à 38%),
- du fémur proximal (16 à 27 %),
- de l'humérus proximal (9 %),
- des côtes (8 %),
- du fémur distal (6 %),
- de la scapula,
- du tibia proximal.

Les chondrosarcomes des mains et des pieds sont rares et représentent moins de 1 % de tous les chondrosarcomes.

La majorité des chondrosarcomes conventionnels (75%) se localisent principalement au niveau de la zone intramédullaire des os longs (chondrosarcome central). Si ils se développent à la surface de l'os, ils sont dits périphériques ou juxtacorticales.

2. Classification

Lorsqu'ils ne sont pas associés avec une lésion préexistante, les chondrosarcomes sont dits « primitifs », ils sont alors toujours centraux. Dans le cas contraire, ils sont dits « secondaires », sont soit centraux soit périphériques et représentent 10 % des tumeurs malignes cartilagineuses. Les tumeurs bénignes du cartilage peuvent parfois évoluer en chondrosarcome. On note parmi elles, l'ostéochondrome qui correspond à une excroissance osseuse localisée principalement au niveau de la métaphyse des os longs et recouverte d'une coiffe cartilagineuse rappelant le cartilage de conjugaison [8], ou, l'enchondrome qui est une tumeur osseuse bénigne localisée dans la région médullaire des petits os long.

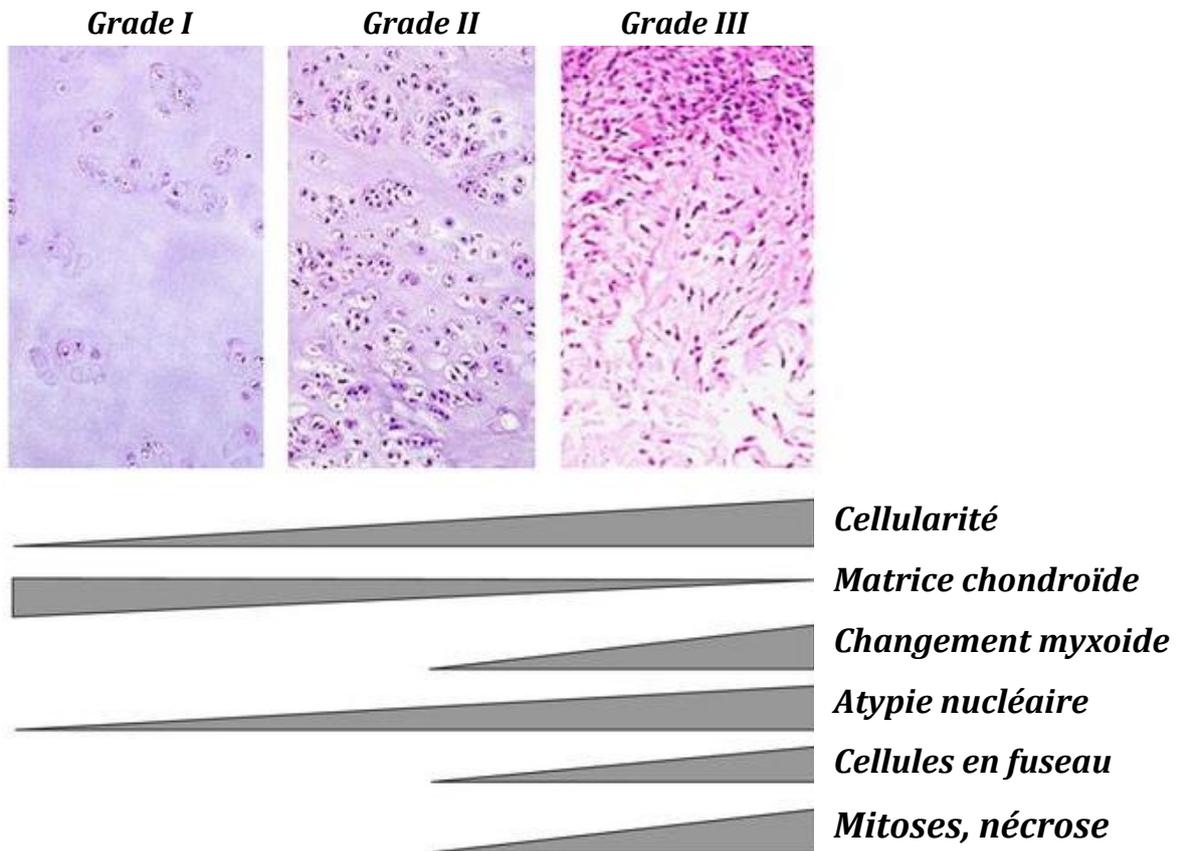


Figure 2 : Représentation schématique illustrant les principaux critères de classification d'un chondrosarcome conventionnel [7]

Il existe un grading histologique des chondrosarcomes dits « conventionnels » qui repose principalement sur les caractéristiques cytologiques de la lésion. Cette classification fut proposée en 1997 par Evans [9] mais est toujours d'actualité. Ce grading prend en compte la densité cellulaire, la taille des noyaux, le degré d'hyper-chromatisme nucléaire, l'index mitotique et la nature de la matrice extracellulaire (*Figure 2*).

Les grades vont du grade I, le plus bénin, jusqu'au grade III, le plus malin :

- ↳ **Grade I** : Le grade I, présente un faible degré de malignité. Le tissu est composé d'une matrice semblable au cartilage hyalin dans laquelle se trouve une faible densité de chondrocytes. On observe occasionnellement des cellules binucléées ou présentant un noyau atypique [10]. Le taux de survie à dix ans est d'environ 83 %.
- ↳ **Grade II** : Le grade II, intermédiaire, présente quelques lésions cellulaires caractéristiques telles qu'une augmentation nette de la cellularité avec des noyaux atypiques, pléiomorphes et dont la taille est légèrement plus importante. L'activité mitotique est rarement visible.

L'apparition d'un stroma myxoïde indique que la tumeur devient agressive, plus maligne. Le taux de survie à dix ans, pour le grade II, est d'environ 60 % [11].

Les grades I et II présentent un faible potentiel métastatique.

- ↳ **Grade III** : Le grade III, environ 10 % des chondrosarcomes, présente un haut degré de malignité et un fort potentiel métastatique (plus de 70 % des patients), essentiellement au niveau des poumons. Il se caractérise par la présence d'un tissu muco-myxoïde associé à des cellules en fuseau ou pléiomorphes. L'activité mitotique est très importante. De la nécrose peut parfois être observée. A un stade très avancé, le tissu peut se différencier et présenter des caractéristiques de fibrosarcome ou d'ostéosarcome.

Pour le grade III, le taux de survie à dix ans est d'environ 5 % [11].

3. Clinique

La symptomatologie est habituellement d'installation progressive. Le chondrosarcome s'exprime surtout par une douleur localisée dans 80 % des cas, et/ou l'apparition d'une grosseur.

Chapitre I – Revue bibliographique

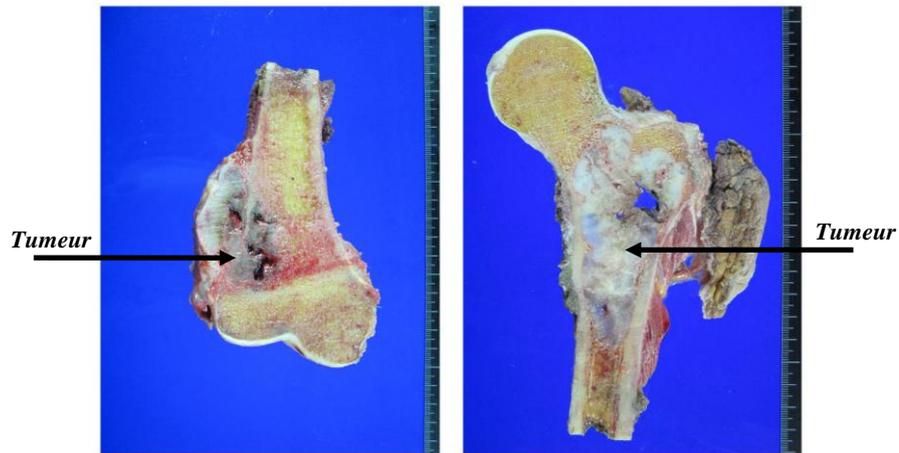


Figure 3 : Photographie de chondrosarcomes conventionnels localisés au niveau de la métaphyse du fémur [7]

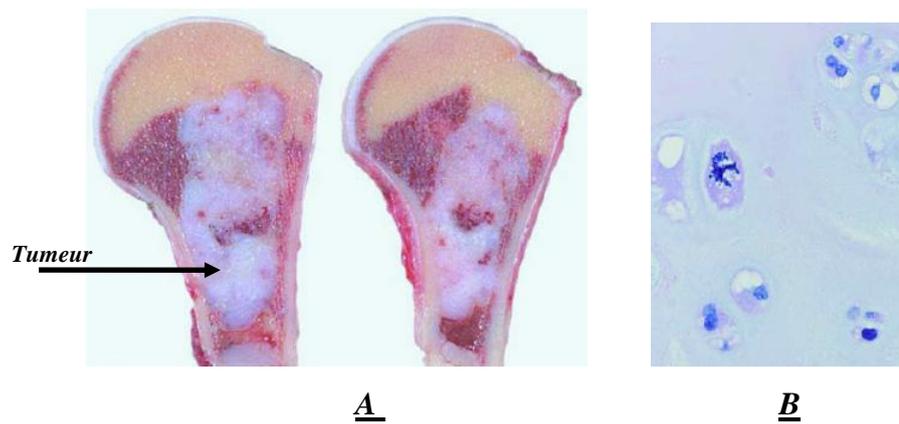


Figure 4 : Chondrosarcome conventionnel central [12]

A : Observation macroscopique après résection ; B : Analyse histologique après coloration HE

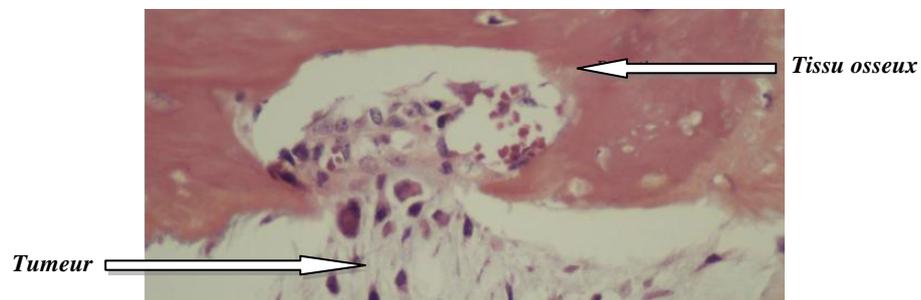


Figure 5 : Envahissement du tissu osseux par le chondrosarcome, coloration HES, grossissement x 40 [13]

4. Imagerie

L'imagerie du chondrosarcome sera développée dans le paragraphe II : "*Diagnostic du chondrosarcome par l'imagerie*" p14.

5. Anatomopathologie

a. Analyse macroscopique

La tumeur présente une architecture lobulaire "effet pop-corn", molle et de nature mucoïde ou gélatineuse. Les lobules tumoraux sont blanc nacré, gris-bleu parfois mixoïdes (*Figure 3 et Figure 4*). Des phénomènes d'ossification endochondrale, de nécrose ou de kystisation peuvent être observés. L'extension dans les parties molles est fréquente [6]. Des phénomènes d'ostéolyse peuvent être également mis en évidence (*Figure 5*).

b. Analyse histologique

Les lobules tumoraux sont de tailles et de formes irrégulières, délimités par des septa conjonctifs. Des fragments d'os spongieux résiduels peuvent parfois persister au sein des globules et témoignent de la perméation du tissu ostéomédullaire.

Au sein des lobules, la cellularité est souvent importante et prédominante en périphérie. Les chondrocytes sont plus atypiques et présentent des binucléations et un polymorphisme. Le noyau des cellules tumorales est important, la chromatine dense. Lorsque des zones myxoïdes sont observées et que l'activité métabolique est importante, le diagnostic s'oriente vers un chondrosarcome de haut grade [12].

c. Critères de malignité

Les critères de malignité sont des critères :

↳ Cytologiques :

- Cellularité
- Taille importante des noyaux
- Densification de la chromatine
- Pluri-nucléations
- Mitoses

↳ Architecturaux :

- Organisation en lobules de grande taille, irréguliers, séparés d'épais septums

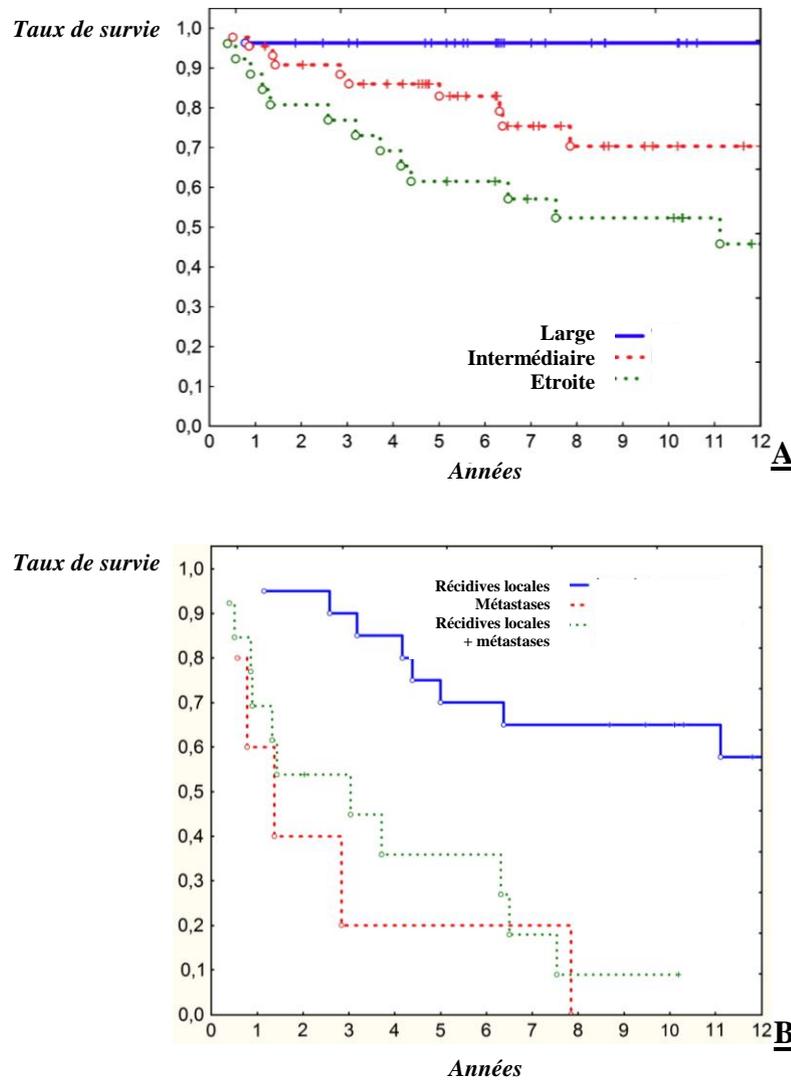


Figure 6 : Espérance de vie pour des patients atteints d'un chondrosarcome conventionnel [14]

A : La survie dépend de l'intervention chirurgical

B : Les métastases sont associées à un très mauvais pronostic vital

Chapitre I – Revue bibliographique

- fibreux
- Résorption des travées osseuses médullaires et englobement des travées osseuses résiduelles par la tumeur
- Atteinte corticale (rupture, résorption, perméation)
- Extension aux parties molles

↳ Remaniements :

- Remaniements myxoides extensifs
- Nécrose spontanée
- Présence de kystes

Ces caractéristiques cytologiques et histologiques sont utilisées pour établir le grade du chondrosarcome.

Une corrélation entre les signes cliniques, les radiographies et les analyses histologiques sont essentielles pour un diagnostic optimal, une bonne évaluation de l'agressivité de la tumeur et du potentiel métastatique. A partir d'un seul critère d'agressivité, la chirurgie est recommandée.

5. Pronostic

Le pronostic vital, le risque de récurrence et le développement de métastases dépendent du stade histologique de la tumeur ainsi que de sa prise en charge. Les sites préférentiels pour les métastases sont les poumons, mais aussi les os, le cerveau, les nodules lymphatiques et le foie [15].

Une étude clinique a évalué le devenir de patients atteints d'un chondrosarcome conventionnel de la paroi thoracique après traitement chirurgical (*Figure 6*). Dans cette étude, pour 97 patients opérés, le taux de survie à dix ans était de 67 % et le taux de récurrence de 34 %. Les récurrences apparaissaient environ trois ans après l'intervention. Des métastases étaient observées chez 14 % des patients, pour la quasi-totalité au niveau pulmonaire [14]. Les auteurs soulignent, de plus, l'intérêt de la marge chirurgicale lors de l'exérèse de la tumeur. En effet, plus la marge chirurgicale est importante (*Figure 6, A*), plus le taux de survie augmente. De plus, lorsque la marge chirurgicale est large, les risques de métastases et de récurrences locales sont diminués (*Figure 6, B*).

Dans certains cas, l'amputation peut s'avérer nécessaire mais il s'agit d'un cas extrême.

Chapitre I – Revue bibliographique

Active	Aggressive
Pain related to the lesion	Pathologic fracture arising with minimal trauma
Endosteal scalloping > 2/3 of the cortical thickness	Pluri-lamellar or spiculated periosteal reaction
Extent of endosteal scalloping along > 2/3 of the lesion length	Moth-eaten or permeative osteolysis
Cortical thickening or hyperostosis	Cortical destruction
Cortical remodelling with enlargement of the diameter of the medullary cavity	Presence of a soft tissue mass
Delayed bone scintigram showing an intense uptake greater than that of the AIC in the absence of fracture	
Early and exponential enhancement on dynamic gadolinium-enhanced MR sequences	

Figure 7 : Critères d'agressivité visibles en radiographie dans le cas d'une tumeur cartilagineuse [16]

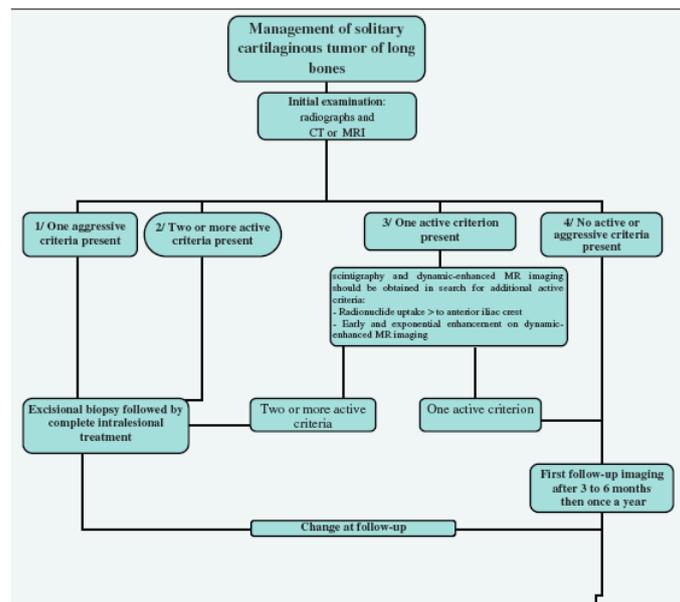


Figure 8 : Management d'une tumeur cartilagineuse proposé par Parlier-Cuaa [16]

6. Chondrosarcome de bas grade et chondrome, un diagnostic délicat

L'un des problèmes les plus difficiles à résoudre durant le diagnostic est de faire la différence entre un chondrome (tumeur bénigne du cartilage) et un chondrosarcome de bas grade (tumeur maligne du cartilage), un chondrosarcome de bas grade se montrant plus agressif et devant être traité immédiatement par la chirurgie, avec des contrôles réguliers.

Actuellement aucun marqueur moléculaire ne permet la distinction entre ces deux tumeurs cartilagineuses. Leur séparation se fait, par conséquent, d'après les observations cliniques.

Parlier-Cuaua *et al* propose un management pour la prise en charge de ces tumeurs lorsque la distinction entre le caractère bénin ou malin est difficile [16] :

« Est un chondrosarcome plutôt qu'un chondrome, jusqu'à preuve anatomo-pathologique du contraire, toute tumeur cartilagineuse :

- ▶ *douloureuse de l'adulte,*
- ▶ *localisée aux ceintures ou aux segments proximaux,*
- ▶ *dont la taille est supérieure à 5 cm,*
- ▶ *hétérogène, à contours flous,*
- ▶ *entraînant une soufflure, un épaissement cortical, un scalloping (encoche sur la corticale par atteinte de contiguïté d'une quelconque lésion tumorale)*
- ▶ *comportant une réaction périostée, un envahissement des parties molles,*
- ▶ *entraînant une hyperfixation scintigraphique. »*

Le management doit se faire d'après des critères d'agressivité cliniques, radiologiques ou histologiques tels que des fractures pathologiques, une destruction de la corticale, *etc...* (**Figure 7 et Figure 8**). En l'absence de tout critère, un suivi régulier par l'imagerie (IRM, scanner, scintigraphie) est préconisé.

Chapitre I – Revue bibliographique



B. Les chondrosarcomes "non conventionnels"

Les chondrosarcomes dits non conventionnels sont rares, on distingue les mésoenchymateux, à cellules claires ou encore différenciés (de haut grade).

1. Le chondrosarcome mésoenchymateux

a. Définition, épidémiologie

Il s'agit d'un chondrosarcome très agressif qui représente environ 2 % de tous les chondrosarcomes. Il peut se produire à tout âge avec, cependant, un pic d'incidence aux alentours de 20 - 30 ans [11]. Ce type de chondrosarcome a été décrit par Jacobson en 1977 [12]. Il se localise majoritairement au niveau région cranofacial (15 à 30 %) [7]. Le taux de survie à dix ans se situe bien en-dessous de 50 %.

b. Diagnostic par imagerie

Le chondrosarcome mésoenchymateux est relativement proche d'un chondrosarcome conventionnel. Des lésions ostéolytiques et zones de calcifications peuvent être observées en IRM. L'extension au niveau des tissus mous est fréquente. Les examens d'imagerie sont, cependant, les mêmes que pour le chondrosarcome conventionnel et seront présentés dans le paragraphe II " *Diagnostic du chondrosarcome par l'imagerie*" p14.

c. Anatomopathologie

Il s'agit d'un tissu constitué de deux zones morphologiquement distinctes : des cellules mésoenchymateuses primitives indifférenciées entremêlées d'îlots de cartilage.

d. Marqueurs moléculaires

Certains marqueurs moléculaires peuvent être utilisés dans le cas du chondrosarcome mésoenchymateux :

- ↳ La protéine S-100 intervient dans la régulation de processus cellulaires tels que la croissance et la motilité, la régulation du cycle cellulaire, la transcription et la différenciation.
- ↳ Le facteur de transcription SOX9 joue un rôle important dans le développement du squelette. Cette protéine se fixe à des régions spécifiques de l'ADN et régule l'activité d'un certain nombre de gènes.

Chapitre I – Revue bibliographique

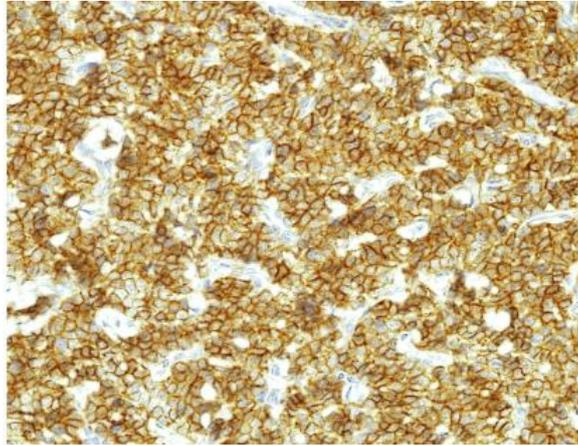


Figure 9 : Les petites cellules indifférenciées qui composent le tissu d'un chondrosarcome mésoenchymateux sont positives à CD99 [7]



Figure 10 : Scanner d'un chondrosarcome à cellules claires localisé en épiphyse métaphyse du fémur proximal.

↳ Le cluster de différenciation CD99 est exprimé dans tous les leucocytes et les cellules vasculaires endothéliales, il intervient notamment dans l'extravasation des leucocytes vers les tissus enflammés.

Dans le cas d'un chondrosarcome mésoenchymateux, la zone cartilagineuse est positive pour la protéine S-100 [17], et les petites cellules indifférenciées sont positives pour CD99 [18] (*Figure 9*). Les deux zones sont positives à SOX9 [19].

e. Pronostic

Le pronostic pour cette tumeur est mauvais. Des récurrences et des métastases peuvent s'observer majoritairement au niveau pulmonaire et, cela, plus de vingt ans après le diagnostic de la tumeur primitive [7]. Enfin, la chirurgie ablative reste le traitement de choix.

2. Le chondrosarcome à cellules claires

a. Définition, épidémiologie

Il s'agit d'un chondrosarcome rare (environ 1 à 2 % de tous les chondrosarcomes) décrit en 1976 par Unni *et al* [20] qui présente un faible degré de malignité. Il existe une prédominance masculine (2,6 / 1) et le pic d'incidence est compris entre trente et quarante ans. Il se retrouve généralement localisé au niveau de la zone épiphysaire des os longs. Les sites les plus affectés sont le fémur proximal et la tête humérale.

b. Imagerie

La lésion est localisée typiquement au niveau épiphysaire des os longs (*Figure 10*). La marge entre la tumeur et l'os normal est étroite. Des calcifications intra-tumorales radio-opaques peuvent être présentes. Des destructions de la corticale sont très peu observées.

La encore, les examens d'imagerie ne sont pas différents du chondrosarcome conventionnel et seront développés dans le chapitre suivant.

c. Anatomopathologie

Les cellules tumorales contiennent un important noyau rond localisé au centre et un cytoplasme riche en glycogène qui est responsable de son apparence claire (*Figure 11, B*) [28, 30]. Les membranes cytoplasmiques sont bien délimitées. Les mitoses sont rares.

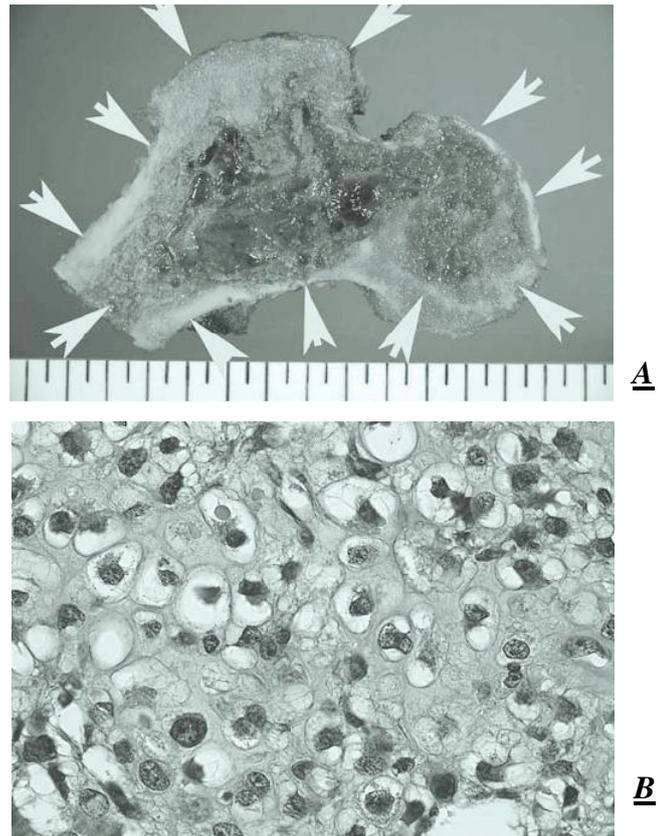


Figure 11 : Pièce chirurgicale d'un chondrosarcome à cellules claires, observation macro et microscopique [21]

A : Observation macroscopique, la tumeur est localisée au niveau de la région épiphysaire du fémur.

B : Observation microscopique, les cellules montrent un cytoplasme d'aspect clair.

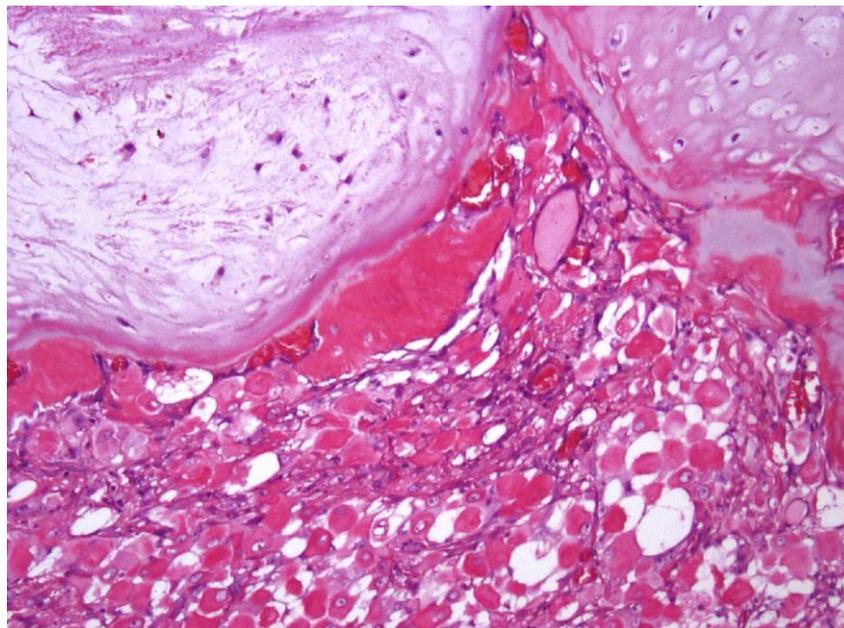


Figure 12 : Observation microscopique d'un chondrosarcome dédifférencié avec deux composantes histologiques : un chondrosarcome de grade I juxtaposé à un rhabdomyosarcome de haut grade. Grossissement x 100 [22].

d. Marqueurs moléculaires

Les cellules de ce type de chondrosarcome sont positives pour le collagène II et pour la protéine S-100 [17].

d. Pronostic

Ce type de chondrosarcome est faiblement malin et se traite par une résection complète. On peut néanmoins observer des récurrences et des métastases (poumon, cerveau et os) chez environ 25 % des patients [7].

3. Le chondrosarcome dédifférencié

a. Définition, épidémiologie

Dahlin et Beabout furent les premiers, en 1971 [23], à décrire le phénomène de dédifférenciation du chondrosarcome. Ce phénomène se traduit par l'évolution de l'organisation d'un tissu tumoral bien différencié en un tissu de haut grade exprimant souvent des caractéristiques d'ostéosarcome ou de fibrosarcome.

Ce type de chondrosarcome représente 10 % de tous les chondrosarcomes. La moyenne d'âge se situe entre cinquante et soixante ans. Les sites les plus touchés sont le fémur et le pelvis [24].

b. Imagerie

Un chondrosarcome dédifférencié apparaît radiologiquement comme un tissu non homogène. Un dimorphisme tumoral avec, à la fois, une composante cartilagineuse et une composante agressive, ostéolytique et envahissant les tissus mous est souvent observé [25]. La présence d'une fracture pathologique survient dans 13 à 25 % des cas.

c. Anatomopathologie

On distingue classiquement deux composantes : l'une présente un aspect cartilagineux bleu-gris et correspond à un chondrosarcome bien différencié de bas grade, l'autre correspond à une composante sarcomateuse de haut grade, non cartilagineuse (*Figure 12*). Cette dernière prend le plus souvent l'aspect d'un histiocytofibrome malin, mais peut aussi correspondre à un ostéosarcome ou à un sarcome d'origine musculaire.

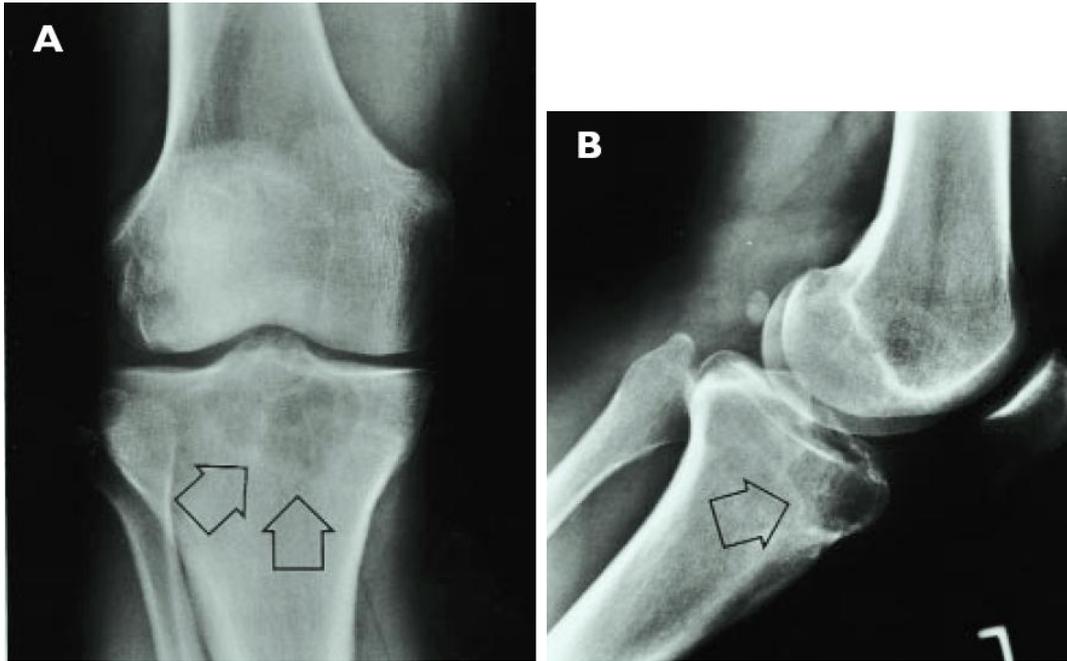


Figure 13 : Visualisation par radiographie d'un chondrosarcome localisé au niveau tibia proximal [26]
A : Visualisation antéro-postérieur ; **B** : Visualisation latérale

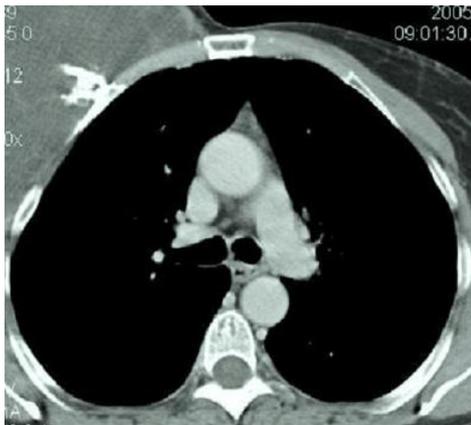


Figure 14 : Scanner, coupe axiale d'un chondrosarcome d'une femme de 56 ans [27]
Visualisation d'une tumeur importante de la 6^{ème} côte droite, avec des calcifications centrales.

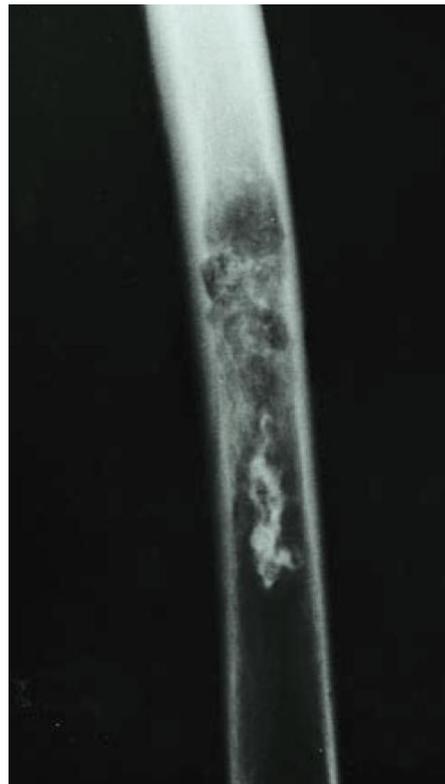


Figure 15 : Radiographie d'un chondrosarcome central du fémur [26].
Visualisation d'une lésion lytique bien définie avec une zone de transition et des calcifications.

d. Pronostic

A moins d'un traitement très agressif, le taux de survie à cinq ans est de 13 % avec une médiane de survie de 7,5 mois [28]. Les métastases sont fréquentes et localisées essentiellement au niveau pulmonaire mais aussi au niveau viscéral et osseux.

II. Diagnostic du chondrosarcome par l'imagerie

A. L'examen radiologique

L'examen radiologique permet une première visualisation et localisation de la tumeur (*Figure 13*), il donne des informations relatives à sa taille et à l'aspect de sa matrice (visualisation des calcifications intra-tumorales donnant un aspect floconneux ou en « pop corn »). Dans le cas d'un chondrosarcome central, la radiologie permet de visualiser une lésion lytique bien définie avec une zone de transition étroite encerclant de la sclérose avec peu de calcifications (*Figure 15*). Le développement d'une telle lésion peut entraîner une rupture corticale et une destruction des tissus mous [26].

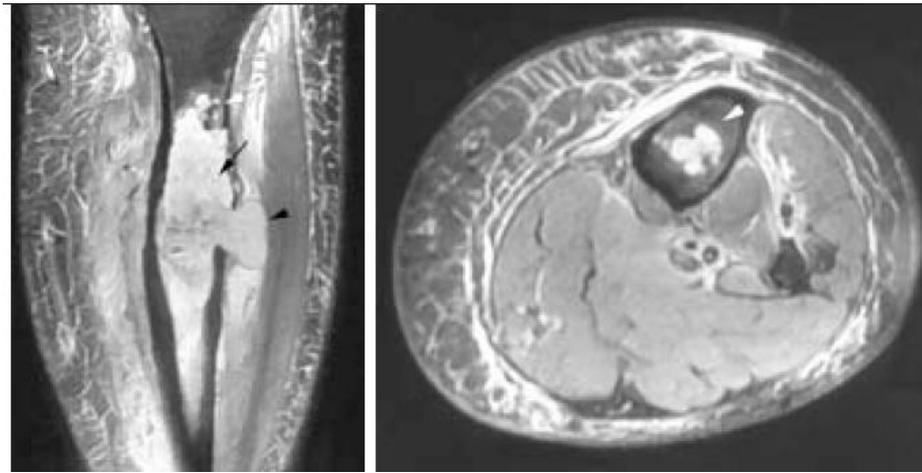
B. L'examen tomodensitométrique, le scanner

Le scanner (ou tomodensitométrie) est la seconde étape si les clichés standards ne suffisent pas. Il permet une meilleure visualisation de la matrice tumorale ainsi que des éléments favorables au diagnostic tels que des petites calcifications et une matrice floconneuse, qui sont des critères permettant d'affirmer la nature cartilagineuse, une lyse de la corticale et un envahissement des parties molles (*Figure 14*). Il est, de plus, possible de mesurer l'épaisseur de la coiffe non calcifiée d'une tumeur : fine dans le cas de tumeurs bénignes et, épaisse (plus de 3 cm) dans le cas d'un chondrosarcome.

C. L'imagerie par résonance magnétique, l'IRM

Le principal avantage de l'IRM est sa résolution spatiale. Même si elle analyse mal les calcifications et les lyses corticales limitées, elle peut détecter, plus aisément que les techniques précédentes, des niveaux liquides dans des cavités à fort contenu protéique et de l'oedème péri-tumoral. Elle permet également l'évaluation de l'extension intra-osseuse, la mise en évidence du dimorphisme tumoral et la détection d'un envahissement des parties molles. L'aspect lobulaire du tissu chondrosarcome peut ainsi être visualisé [29], les lobules

Chapitre I – Revue bibliographique



A

B

Figure 16 : Visualisation d'un chondrosarcome dédifférencié de la diaphyse tibiale gauche par IRM [25].

B : IRM coupe coronale pondérée T2

C : IRM coupe axiale pondérée T2 passant par la composante cartilagineuse (flèche) ayant un aspect en logettes de haut signal T2.

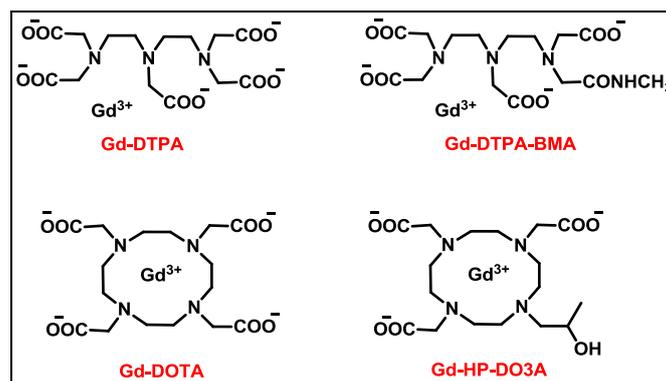


Figure 17 : Structure des principaux agents de contraste au gadolinium commercialisé

apparaissant sous forme de logettes (*Figure 16, B et C*).

Parmi les techniques d'IRM, nous pouvons citer une technique appelée "Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging" (dGEMRIC) qui utilise un agent de contraste, le gadolinium (*Figure 17*) [30-32]. Après injection en i.v. de l'agent de contraste anionique de gadolinium, ce dernier atteint le cartilage et se distribue inversement à la concentration en protéoglycanes car il est repoussé par les charges négatives de ces macromolécules. En revanche, en cas de lésion et dégradation du cartilage, le produit de contraste persiste [33]. Cette technique est donc une méthode non invasive d'évaluation indirecte de la concentration en protéoglycanes du tissu cartilagineux [34]. Cependant, elle ne semble pas avoir été exploitée pour l'imagerie du chondrosarcome.

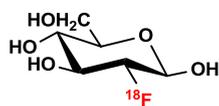
D. La scintigraphie

Alors que les techniques d'imageries morphologiques telles que la radiographie, le scanner ou l'IRM permettent d'obtenir des informations quant à la localisation et la taille de la tumeur, la scintigraphie va apporter l'information fonctionnelle et aide au diagnostic, au staging et à l'évaluation de la réponse à la thérapie. Ce type d'imagerie est complémentaire de l'imagerie anatomique, puisqu'il permet d'étudier certains processus physiologiques et peut ainsi mettre en évidence des dysfonctionnements relatifs à une pathologie avant même que des anomalies morphologiques ne soient visualisables en imagerie anatomique.

Cette technique consiste à injecter un radiotracer qui peut être soit, un radionucléide libre tel que l'iode 123 ou le Thallium 201, soit l'association d'un ligand et d'un radionucléide, le ligand ayant une affinité sélective pour un organe, un tissu ou une fonction. Quelque soit le radiotracer, il doit répondre à un certain nombre de critères :

- ↪ Il doit être le plus stable possible dans l'organisme.
- ↪ Il doit être capable de franchir les barrières pour atteindre sa cible.
- ↪ Il ne doit pas perturber les processus physiologiques et doit donc être administré à une très faible concentration (dose traceuse).
- ↪ Il doit rester lié à sa cible et, au contraire, être éliminé très rapidement lorsqu'il est libre.
- ↪ Il doit être de très faible toxicité sur le plan biologique et radiotoxicologique.
- ↪ La liaison entre le ligand et le radionucléide doit être stable *in vivo* de manière à ce que le signal du radionucléide détecté reflète bien la présence du ligand dans l'organisme.

Chapitre I – Revue bibliographique



^{18}F -FDG

Figure 18 : Structure du ^{18}F -FDG



Le radionucléide émet un rayonnement adapté à sa détection *in vivo* par les équipements d'imagerie. De plus, la période effective du radiotraceur, prenant en compte la période physique et biologique, doit être à la fois, suffisamment longue pour permettre l'examen d'imagerie, mais aussi, suffisamment courte pour ne pas entraîner d'exposition excessive pour le patient.

1. Les rayonnements

Les rayonnements α ayant un parcours extrêmement faible, ils ne peuvent pas être détectés par des dispositifs externes de détection. Ils ne sont donc pas utilisés en scintigraphie. En revanche, les rayonnements γ et β sont utilisés :

- ↳ **Les rayonnements γ** , tels que ceux émis par le technétium 99m, le thallium 201 et l'iode 123, interviennent dans l'imagerie TEMP "Tomographie par Emission Mono-Photonique". L'une des principales limites à l'imagerie TEMP est l'atténuation du rayonnement lors de la traversée de la matière qui ne permet pas une analyse quantitative absolue.
- ↳ **Les rayonnements β** , plus particulièrement les rayonnements β^+ , tels que ceux émis le fluor 18, le carbone 11 et le cuivre 64, interviennent dans l'imagerie TEP "Tomographie par Emission de Positons". Les rayonnements détectés sont des paires de photons émis à 180 ° l'un de l'autre, suite à des phénomènes d'annihilation entre un positon et un électron. Ces photons possèdent une énergie de 511 keV et sont émis en coïncidence ce qui permet de localiser l'émission.

2. La détection

La détection s'effectue par l'intermédiaire d'un détecteur externe adapté au rayonnement, et permet d'évaluer la répartition topographique de la radioactivité dans l'organisme. On parle d'imagerie monophotonique lors de la détection directe des rayonnements γ ou d'imagerie TEP lors de la détection indirecte des photons de 511 keV résultant de l'annihilation des positons.

3. Les radiotraceurs

Plusieurs traceurs sont actuellement utilisés en clinique pour l'imagerie du chondrosarcome:

- ↳ **Le ^{18}F -fluorodésoxyglucose (^{18}F -FDG) (Figure 18)**, utilisé en imagerie TEP, et qui est un analogue du glucose marqué au ^{18}F dont la période physique est de 112 minutes.

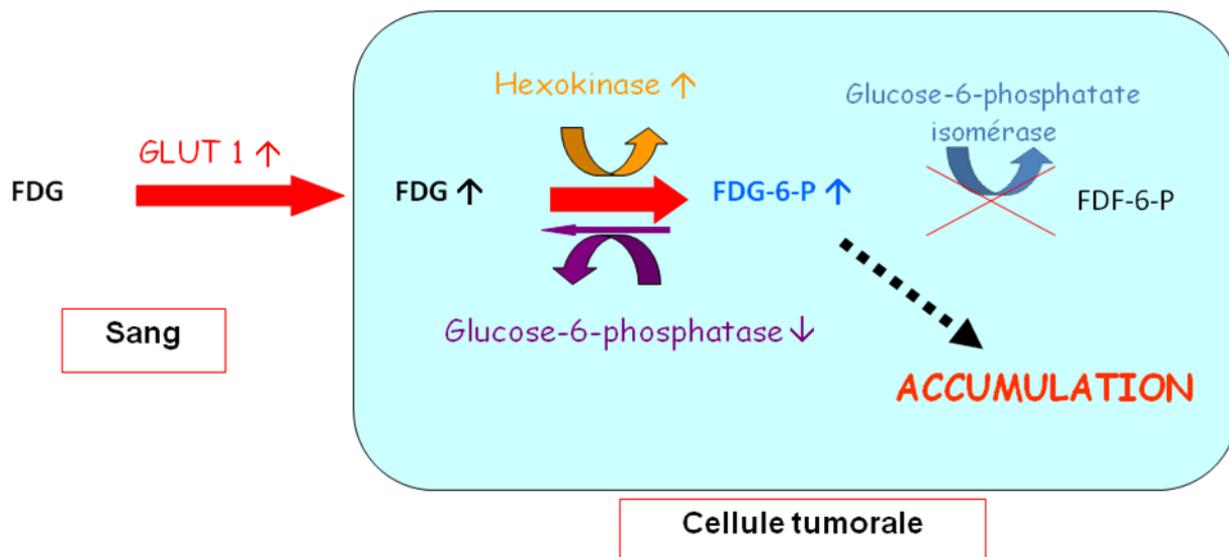


Figure 19 : Pénétration intracellulaire du ^{18}F -FDG dans les cellules tumorales et accumulation

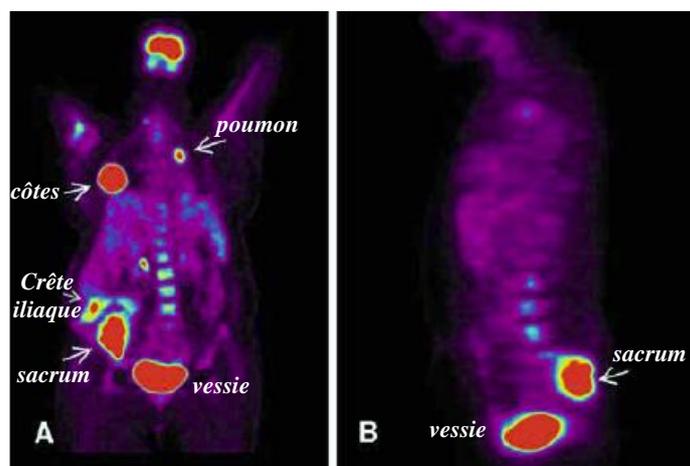


Figure 20 : Imagerie TEP au ^{18}F -FDG, récurrence d'un chondrosarcome maxillaire [35].

Femme ayant eu un chondrosarcome traité par chirurgie 5 ans auparavant. L'imagerie PET met en évidence des métastases hypermétaboliques au niveau du sacrum et de l'ilium droit ainsi que des lésions au niveau des côtes droites, des poumons et au niveau de la colonne.

Histologie : chondrosarcome mésenchymateux de grade II

Chapitre I – Revue bibliographique

Ce dernier est fortement capté par les tissus dont le métabolisme glucidique est très important (cerveau, tissu tumoral...) (**Figure 19**). Il pénètre dans la cellule en utilisant les mêmes transporteurs membranaires que le glucose (les GLUT 1) puis commence à subir les mêmes processus enzymatiques. Toutefois, une fois transformé en FDG-6-phosphate par les hexoquinases, la présence du fluor en position empêche la poursuite de la réaction de glycolyse. Le ^{18}F -FDG, sous sa forme phosphorylée, s'accumule alors dans la cellule. Sa captation est donc un bon reflet de la consommation du glucose dans l'organisme, elle augmente avec le grade de la tumeur. Dans le cas d'un chondrosarcome, le ^{18}F -FDG pourra imager très difficilement un chondrosarcome de bas grade à un stade précoce puisque sa fixation est liée à l'activité métabolique du tissu. L'activation métabolique augmentant avec le grade, l'utilisation du ^{18}F -FDG sera plus adaptée à des chondrosarcomes de haut grade. De plus, il peut être utilisé pour localiser d'éventuelles métastases (**Figure 20**).

- ↪ Les traceurs osseux tels que *les diphosphonates marqués au technétium $^{99\text{m}}$* et utilisés en imagerie TEMP, par exemple l'hydroxy-méthylène diphosphonate ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP) qui peut mettre en évidence un remodelage osseux et des métastases osseuses [36]. La fixation de ce radiotracer est conditionnée par le métabolisme et la vascularisation de l'os. Elle est essentiellement représentée par la fraction minérale (hydroxyapatite) avec une affinité particulière pour les sites où l'activité ostéoblastique est plus importante.
- ↪ *Le ^{201}Tl* (thallium), un analogue du potassium dont la captation dépend de la pompe Na/K ATPase dépendante qui est présente au niveau des membranes des cellules viables, et peut être surexprimée au niveau de certains carcinomes peu différenciés. Kaya *et al.* [37] rapportent une fixation du ^{201}Tl pour chondrosarcomes à partir du grade II, les tumeurs de grade I ne fixant pas.
- ↪ *Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI* [38], $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 2-methoxy-isobutyl-isonitrile, est un traceur cationique lipophile. Sa captation s'effectue de manière passive selon le gradient du potentiel transmembranaire et dépend de l'activité mitochondriale. De ce fait, le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI peut être considéré comme un marqueur de viabilité cellulaire et d'activité métabolique. Par ailleurs, la mise en évidence de l'affinité du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI pour

Chapitre I – Revue bibliographique



Chapitre I – Revue bibliographique

certaines protéines exprimées par les gènes MDR "Multi-Drug Resistance", telles que la glycoprotéine P, rendent l'interprétation de l'imagerie difficile, avec la possibilité d'avoir de faux-négatifs.

↳ **Le ^{99m}Tc -tetrofosmine** [38], est un autre traceur lipophile et sa captation est semblable à celle du ^{99m}Tc -MIBI.

Toutefois, puisque leur fixation dépend de la cellularité et du flux sanguin, ces trois derniers traceurs ne sont pas de bons outils dans le diagnostic des chondrosarcomes de bas grade.

↳ Enfin, nous pouvons citer le **^{99m}Tc -DMSA V**, l'acide dimercaptosuccinique marqué au technétium 99m qui peut être utilisé pour détecter les métastases osseuses des tissus mous. Choong *et al.* [39] ont d'ailleurs étudié l'intérêt de réaliser un double diagnostic au ^{201}Tl et au ^{99m}Tc -DMSA pour l'évaluation du grade du chondrosarcome et la différenciation avec une tumeur bénigne. Une fixation positive au ^{201}Tl et au ^{99m}Tc -DMSA orienterait vers un chondrosarcome de grade II ou III, une fixation positive au ^{99m}Tc -DMSA mais négative au ^{201}Tl orienterait vers un chondrosarcome de grade I ou une tumeur bénigne. Enfin, dans le cas où aucun traceur ne fixerait, le diagnostic s'orienterait vers une tumeur bénigne.

La fixation des traceurs dépend principalement de la vascularisation et de la cellularité du tissu tumoral. Un chondrosarcome de bas-grade sera ainsi difficilement visualisé par scintigraphie quelque soit le radiotracteur.

Le chondrosarcome étant avasculaire et hypoxique, nous pouvons également souligner le développement de traceurs en imagerie TEP spécifiques de l'hypoxie :

↳ **Le ^{18}F -FMISO**, dérivé nitroimidazolé, marqué au ^{18}F , émetteur β^+ est utilisé avec la technologie TEP (**Figure 21**). Ce traceur diffuse de façon homogène dans la plupart des tissus et est éliminé par voie hépatobiliaire et urinaire. La rétention du traceur est due à l'action de nitroréductases intracellulaires qui convertissent le ^{18}F -FMSIO en un dérivé hydroxylamine ou amine qui peut alors se lier au niveau d'un site nucléophile d'une macromolécule intracellulaire par liaison covalente (**Schéma 1**) [40]. Sa rétention

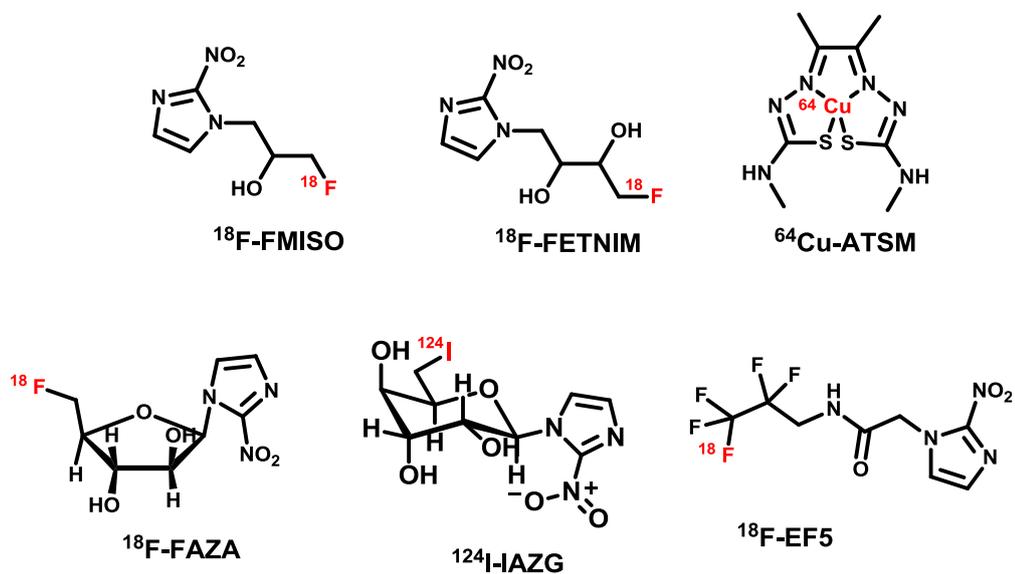


Figure 21 : Structures de différents radiotraceurs spécifiques de l'hypoxie

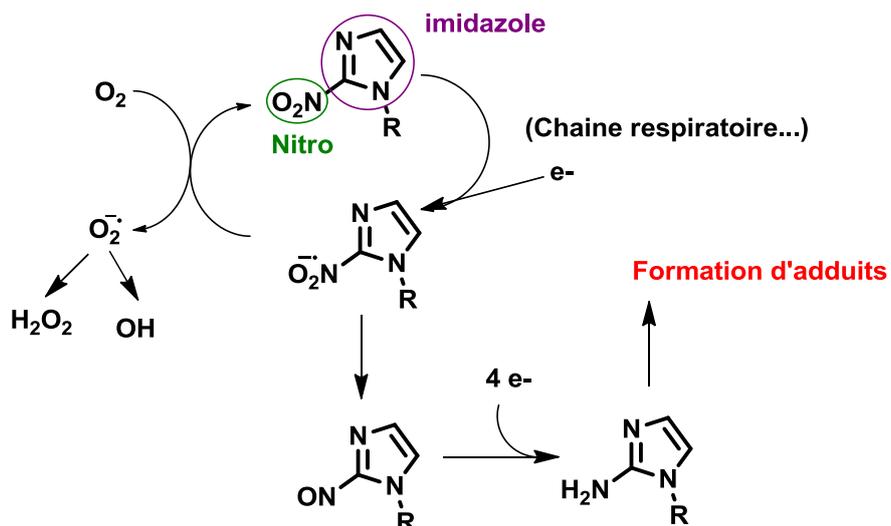


Schéma 1 : Réduction intracellulaire des nitro-imidazolés conduisant à la rétention de ces composés [40]

est donc liée à la tension en O₂ du tissu, car il peut être réoxydé en présence d'oxygène et regagner la circulation générale.

En clinique, le ¹⁸F-FMISO est très bien toléré, l'acquisition nécessite 20 à 30 min et débute de 75 à 150 minutes après injection du traceur.

Cependant, son emploi en routine se heurte à plusieurs limitations : une fixation aux cellules hypoxiques assez lente, un rapport signal sur bruit faible et la présence de métabolites radioactifs parasites. De ce fait, des dérivés nitroimidazoles marqués de 2nd génération ont été développés. C'est le cas du ¹⁸F-fluoroérythronitroimidazole (¹⁸F-FETNIM) et du ¹⁸F-EF5 (*Figure 21*), plus hydrophiles, plus stables et qui présentent un meilleur contraste que le ¹⁸F-FMISO [41].

↪ **Le traceur Cu-diacétyl-bis(N-4-méthylthiosemicarbazone) (Cu-ATSM)** est un complexe métallique qui vient chélater un atome de cuivre (*Figure 21*). Plusieurs isotopes du cuivre émetteurs β⁺ sont disponibles : ⁶⁰Cu (T_{1/2} = 23,7 minutes), ⁶¹Cu (T_{1/2} = 201 minutes), ⁶²Cu (T_{1/2} = 9,7 minutes) et ⁶⁴Cu (T_{1/2} = 762 minutes). Ce complexe est suffisamment lipophile pour franchir les membranes cellulaires. La captation de ce complexe est rapide et caractéristique des cellules hypoxiques. Le complexe est électriquement neutre lorsqu'il s'agit du Cu(II). Le cuivre II est naturellement réduit par le NADPH ou le NADH cytoplasmique en présence de réductases, et immédiatement réoxydé en présence d'oxygène. En hypoxie, le cytoplasme est acidifié et pauvre en oxygène. Le complexe reste donc chargé négativement. Il y a alors captation d'un proton du milieu, ce qui provoque la libération du Cu(I) dans le cytoplasme et formation d'adduits cellulaires. [42,40].

Comparativement au ¹⁸F-FMISO, il offre un meilleur contraste sur les images précoces. Lorsque l'isotope est un atome de ⁶⁴Cu, la molécule peut être utilisée à la fois en imagerie et en radiothérapie [43,44]. Le ⁶⁴Cu étant émetteur d'électrons Auger peut créer des lésions à l'ADN et induire l'apoptose.

↪ **Le ¹⁸F-FAZA** correspond à l'azomycine arabinoside marqué au ¹⁸F (*Figure 21*). Comparativement au ¹⁸F-FMISO, le ¹⁸F-FAZA offre un meilleur contraste, évoquant une clairance rapide du traceur dans les tissus sains [45,46]. L'intérêt de la TEP au ¹⁸F-FAZA a été montré pour la radiothérapie ciblée dans les cancers du col de l'utérus [47].

Chapitre I – Revue bibliographique



Chapitre I – Revue bibliographique

Des analogues iodés, tels que le ^{124}I -iodoazomycine galactopyranoside (^{124}I -IAZG) (*Figure 21*), ont été développés en tant que radiotraceurs spécifiques de l'hypoxie. Cependant, comparativement aux radiotraceurs fluorés, ces analogues iodés n'offrent pas d'avantages : la résolution est plus faible, la biodistribution est variable et le risque d'irradiation par l'iode 124 est élevé [48,49].

Il existe donc un certain nombre de radiotraceurs spécifiques de l'hypoxie. Néanmoins, leur utilisation ne permet pas d'évaluer ni d'affirmer la nature cartilagineuse de la tumeur, une information essentielle pour l'orientation de la thérapie. Ces traceurs, pourraient, en revanche, permettre d'évaluer la fraction hypoxique d'une tumeur et ainsi prévoir la résistance à la radiothérapie.

Aucune imagerie spécifique de l'hypoxie du chondrosarcome n'a été trouvée dans la littérature.

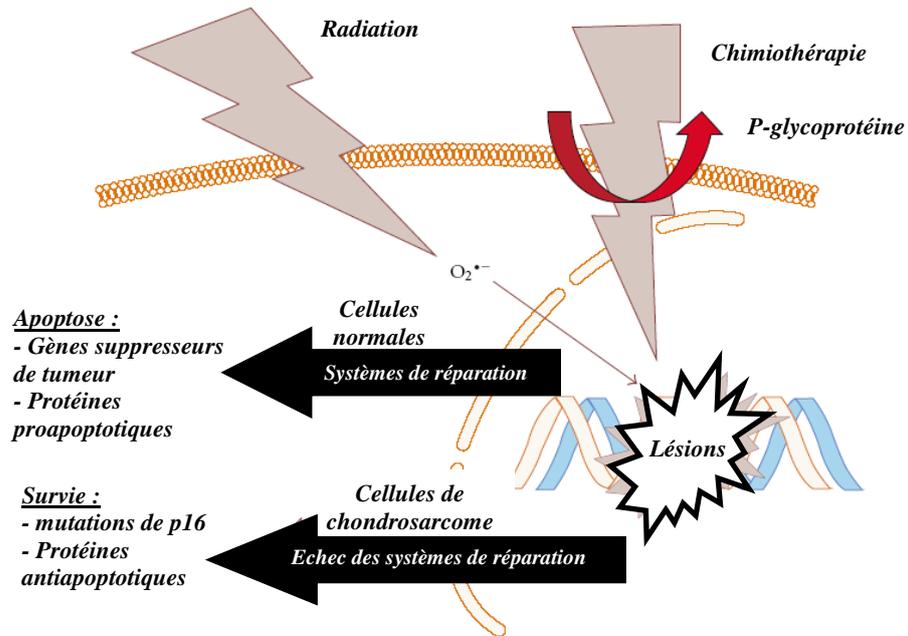


Figure 22 : Mécanisme de radio et de chimiorésistance pour le chondrosarcome [50]

III. Traitement du chondrosarcome

A. La chimiothérapie

L'utilisation de chimiothérapie en adjuvant ou néoadjuvant est controversée du fait d'une faible réponse. En effet, le chondrosarcome est résistant à la chimiothérapie.

Plusieurs raisons peuvent expliquer cette chimiorésistance :

- ↪ L'absence de vascularisation et la matrice extracellulaire très importante qui limitent la diffusion des molécules jusqu'au tissu tumoral.
- ↪ La nature hypoxique du tissu qui entraîne l'activation d'un certain nombre de voies :
 - diminution de la sensibilité à l'apoptose,
 - augmentation de nombreuses protéines impliquées dans la résistance aux molécules de chimiothérapie (augmentation du phénotype de multirésistance MDR "*multidrug resistance*", accroissement du glutathion ou de la métallothionine cellulaire).

Les mécanismes de l'hypoxie seront développés dans le chapitre IV.A. "*L'hypoxie*" p27.

- ↪ Il existe une protéine, la P-glycoprotéine, fortement exprimée dans les chondrosarcomes qui intervient dans les phénomènes de chimiorésistance (**Figure 22**). Cette protéine est encodée par le gène MDR-1 "*Multi Drug Resistance-1*". Il s'agit du principal mécanisme de défense des cellules de chondrosarcome contre les agents chimiothérapeutiques. Elle agit comme une pompe ATPase capable d'expulser, grâce à l'énergie fournie par l'ATP, les agents anticancéreux [50]. Elle diminue ainsi considérablement les concentrations intracellulaires des cytotoxiques.
- ↪ Enfin, les chondrosarcomes se développent lentement alors que la plupart des anticancéreux agissent sur des cellules qui se divisent rapidement [17,51].

B. La radiothérapie

En ce qui concerne la radiothérapie, aucune véritable efficacité n'a été recensée à ce jour. Le mécanisme de radiorésistance du chondrosarcome n'est pas totalement élucidé. La radiorésistance pourrait être due à l'hypoxie, comme décrit dans de nombreuses tumeurs, qui limiterait les effets des radiations ionisantes.

Chapitre I – Revue bibliographique

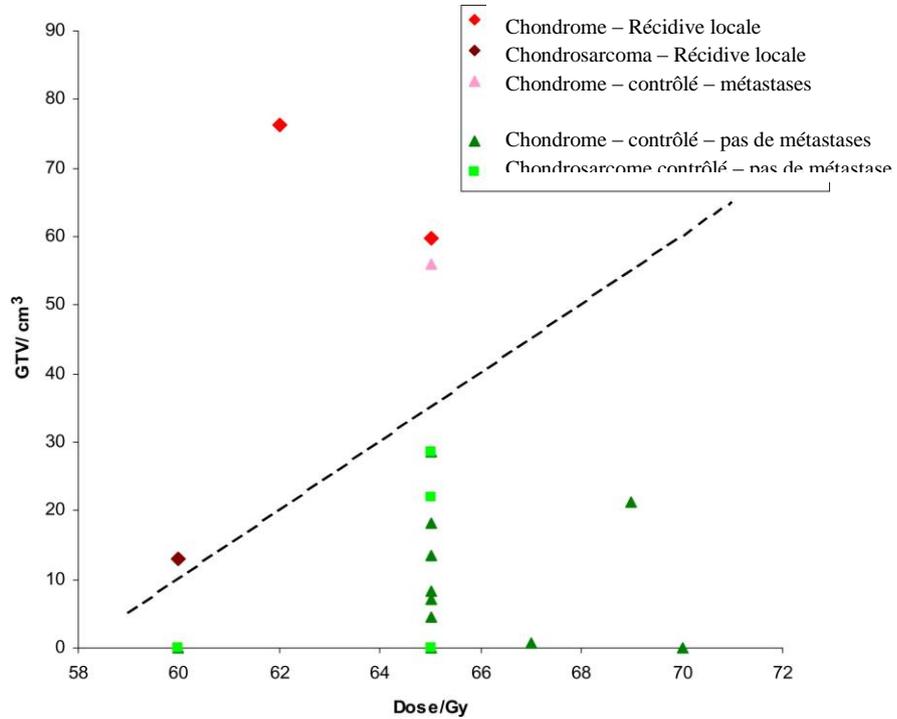


Figure 23 : Résultats de l'étude clinique de Potluri et al. concernant la dose administrée en radiothérapie et le volume tumoral [52]

Des récurrences ont été observées pour tous quatre patients situés au dessus de la ligne. Pour tous les autres aucune récurrence n'a été observée. La dose administrée, généralement de 65 Gy, doit prendre en compte la taille de la tumeur.

Chapitre I – Revue bibliographique

Les radiations ionisantes entraînent deux types d'effets:

- ↳ **Ionisation directe** : Très rapidement, les cellules subissent des altérations atomiques et moléculaires au niveau de l'ADN (coupures simples et doubles brin).
- ↳ **Ionisation indirecte** (la majorité des effets dus au rayonnement) : Les rayons ionisants réagissent avec la matière en formant des radicaux libres. Ces radicaux libres sont capables de réagir avec les molécules d'O₂ et de générer des espèces réactives tels que des anions superoxydes O₂^{•-}, des radicaux hydroxyles OH[•] et du peroxyde d'oxygène H₂O₂. Ces espèces réactives de l'oxygène sont, elles-mêmes, responsables des dommages observés au niveau de macromolécules tel que l'ADN [53]. L'efficacité de ce processus est, par conséquent, maximale si des molécules d'O₂ sont présentes au moment de la radiation. En milieu anaérobie, les radicaux libres peuvent se recombinaison entre eux sans engendrer de lésions au niveau de l'ADN [54] ce qui explique la radiorésistance des fractions hypoxiques tumorales; la dose nécessaire pour détruire une cellule doit alors être augmentée de 2,5 à 3 fois plus pour avoir le même effet qu'en milieu aérobie.

Plusieurs méthodes ont été testées pour pallier cette forme de radiorésistance :

- L'hyperthermie [55]
- L'oxygénation forcée
- Des agents cytotoxiques spécifiques de l'hypoxie et radiosensibilisants [56-58].

Bien que les chondrosarcomes répondent faiblement à la radiothérapie, la radiothérapie peut avoir un intérêt pour les chondrosarcomes de taille importante ou localisés dans des zones où les marges de résections ne peuvent pas être suffisamment larges pour que la chirurgie soit véritablement efficace, la base du crâne par exemple. Dans ce cas, la radiothérapie est proposée en tant que traitement adjuvant à la chirurgie et permet un allongement de l'espérance de vie [52,59,60].

Du fait de la résistance du chondrosarcome vis à vis de la radiothérapie, les doses minimales efficaces administrées sont généralement de 65 Gy mais peuvent varier selon la taille de la tumeur (*Figure 23*).

Chapitre I – Revue bibliographique



Les protéines antiapoptotiques telles que Bcl-2 peuvent intervenir dans les phénomènes de radiorésistance. Les radiations induiraient une surexpression de Bcl-2 dose dépendante et donc une diminution de la réponse à la radiothérapie [61]. Le ciblage de l'expression de Bcl-2 semble être une piste intéressante pour améliorer la sensibilité aux radiations ionisantes.

Enfin, la protéine p16, une protéine suppresseur de tumeur, pourrait également avoir un rôle dans la radiorésistance du chondrosarcome [62]. Il a été démontré que pour 41 % des chondrosarcomes, le gène CDKN2 codant pour la protéine p16 était altéré [63].

C. Les thérapies ciblées

Depuis quelques années, la recherche s'intéresse au développement de thérapies ciblées avec notamment le contrôle de l'expression de certaines molécules ayant une action sur la mort, la survie ou la prolifération cellulaire. Cibler la voie de signalisation de l'apoptose et induire la mort cellulaire permettrait d'améliorer la réponse à la chimiothérapie ou la radiothérapie. L'expression de gènes contrôlant la mort et la survie cellulaire, tels que les membres de la famille Bcl-2, sont bien documentés dans la pathologie du chondrosarcome [64].

1. Le ciblage de l'angiogénèse

La croissance et la progression tumorale nécessitant un apport adéquat en nutriments et oxygène, l'angiogénèse joue un rôle primordial dans les tissus néoplasiques.

Dans le cas des tumeurs cartilagineuses, les vaisseaux sanguins s'organisent autour des lobules tumoraux. La densité de ces microvaisseaux est en général faible à l'exception des chondrosarcomes dédifférenciés de haut grade. L'angiogénèse est également induite, en réponse à l'hypoxie, par le factor HIF-1 qui active de nombreux facteurs proangiogéniques dont le facteur de croissance VEGF "*Vascular Endothelium Growth Factor*", elle permet la prolifération, la croissance et le développement de métastases. Cette voie est donc une cible thérapeutique potentielle. Les principes actifs inhibant les différents signaux intervenant dans la cascade angiogénique et notamment les inhibiteurs des récepteurs Tyrosine Kinase ont montré des résultats précliniques prometteurs :

↳ Morioka *et al.* ont mis en évidence que l'association d'un traitement ciblant l'angiogénèse (le PRPR-B) et de la chimiothérapie (l'ecteinascidine 743), entraîne de la nécrose [65].

Chapitre I – Revue bibliographique

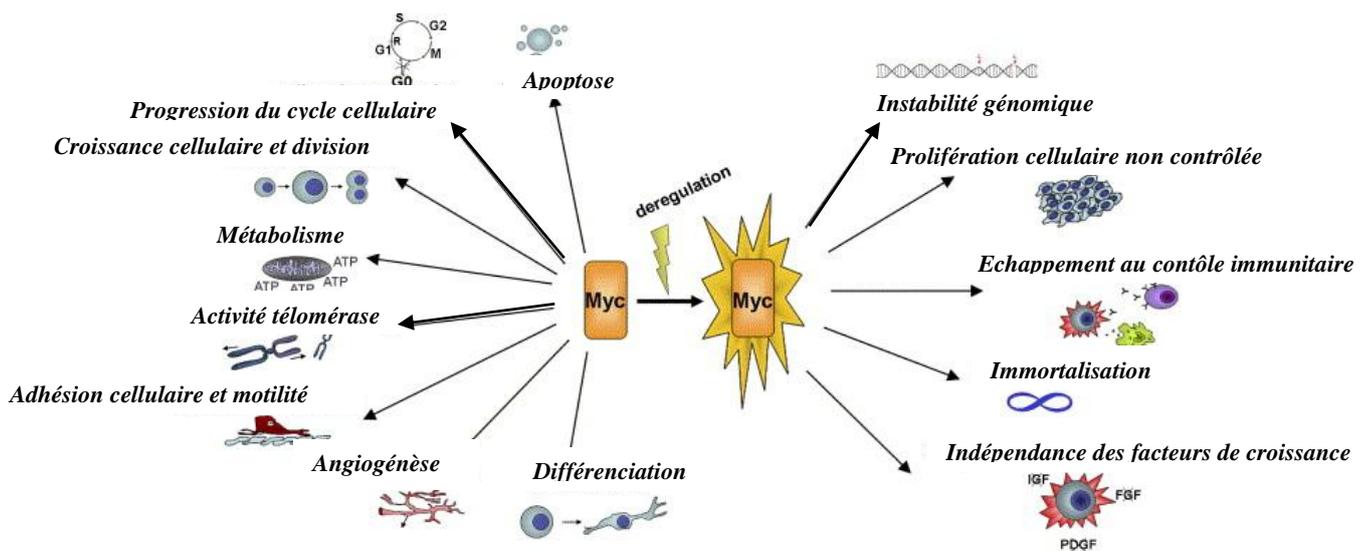


Figure 24 : Contrôle de différents processus cellulaires par le proto-oncogène Myc en conditions normales ou lors de la tumorigénèse [66].

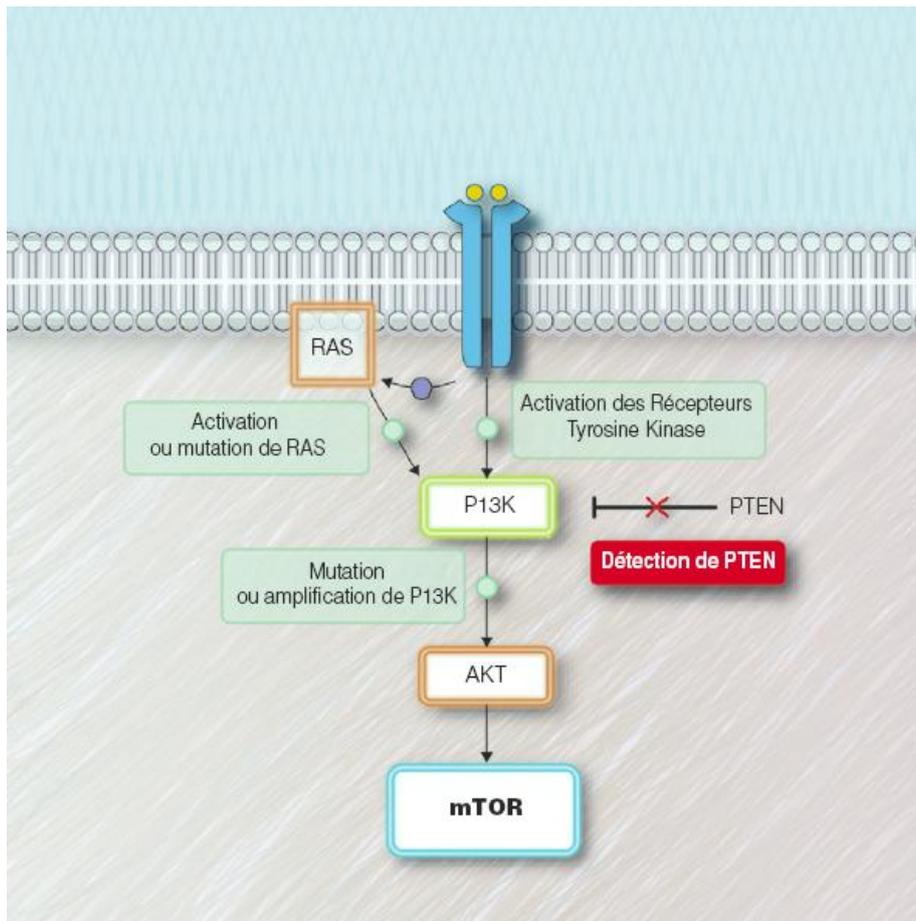


Figure 25 : Activation de la voie PI3K/Akt/mTOR [67]

↳ Klenke *et al* ont démontré que l'inhibition du récepteur tyrosine kinase pour les facteurs de croissance VEGF, FGF "*Fibroblast Growth Factor*" et PDGF "*Platelet-Derived Growth Factor*", tous trois médiateurs de l'angiogénèse tumorale, entraînent un effet antitumoral. Les auteurs ont étudié l'inhibiteur SU6668. Lorsque des modèles de xélogreffe de chondrosarcome humain (SW1353) sur souris SCID étaient traités en sous-cutané par l'inhibiteur angiogénique SU6668 : une inhibition de la croissance tumorale associée à une diminution de la néovascularisation étaient observées [68].

2. Le ciblage des gènes suppresseur de tumeur

Le gène p53 est un gène suppresseur de tumeur qui induit l'apoptose et/ou inhibe efficacement la croissance cellulaire en empêchant la transition entre la phase G1 et la phase S [69]. En réponse à un stress, p53 est stabilisé. Son rôle reste encore mal élucidé dans la pathologie du chondrosarcome. Toutefois, des mutations de ce gène ont pu être observées dans des chondrosarcomes de haut grade et associées à la progression de ce cancer [10,70].

La protéine MDM2 intervient dans l'ubiquitination et la dégradation de p53 et est également retrouvée dans des chondrosarcomes de haut grade. Le ciblage de MDM2 constitue donc une cible thérapeutique potentielle.

3. Le ciblage des proto-oncogènes Myc

Les proto-oncogènes myc (c-myc, N-myc, L-myc) sont activés dans 20 % des cancers humains. Ce sont des facteurs de transcription qui activent l'expression d'un grand nombre de gènes (*Figure 24*) et qui sont eux-même activés par certaines protéines ou facteurs de croissance épidermiques. Ils interviennent dans la prolifération, la régulation et la différenciation cellulaire, dans l'apoptose etc... Une étude a révélé une amplification du proto-oncogène c-myc dans les chondrosarcomes de haut grade [71]. Ce proto-oncogène constitue donc une cible thérapeutique attrayante. Des inhibiteurs sélectifs en association avec des traitements chimiothérapeutiques usuels pourraient permettre d'améliorer la réponse au traitement [66].

4. L'inhibition de la voie mTOR

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR joue un rôle essentiel dans la prolifération et la survie des cellules tumorales [72]. La protéine mTOR est une sérine/thréonine-kinase. Son activation peut être effectuée en réponse à l'activation de récepteurs membranaires à activité tyrosine-kinase tels qu'EGFR "*Epidermal Growth Factor Receptor*", HER2 "*Human*

Chapitre I – Revue bibliographique

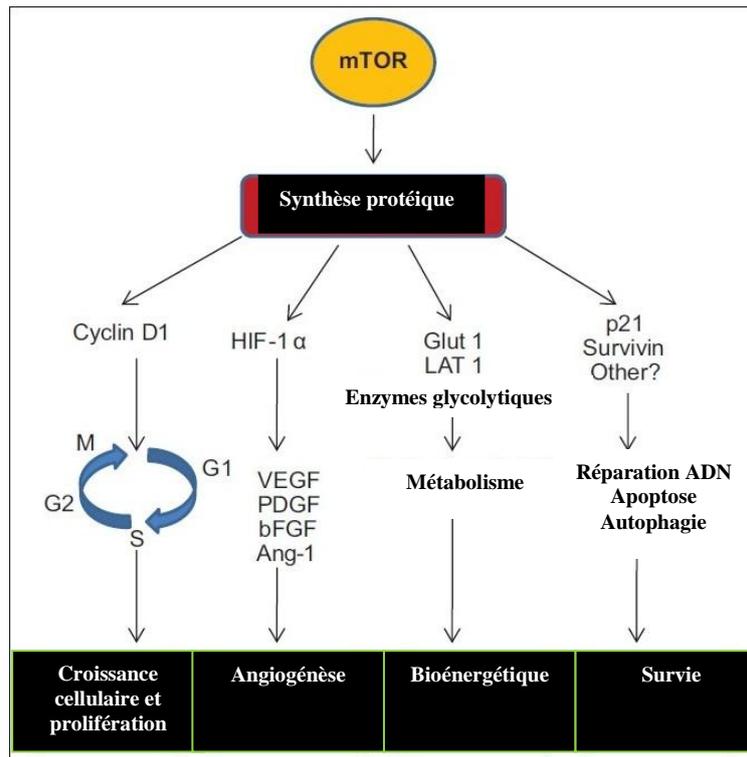


Figure 26 : Les différents rôles de mTOR [73]

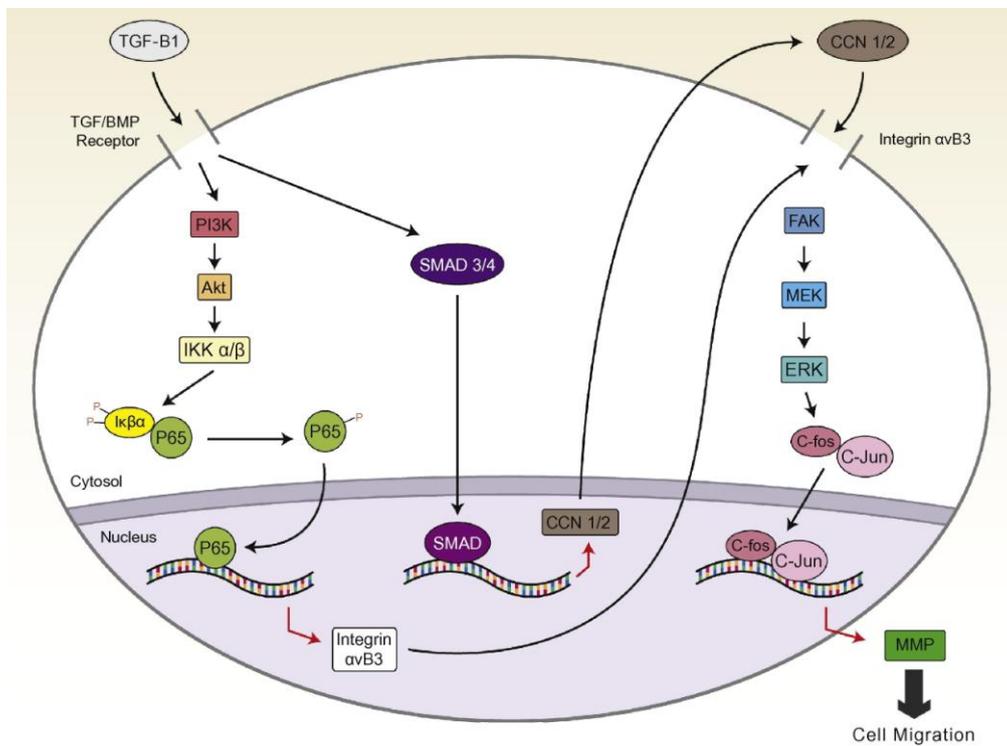


Figure 27 : Activation des MMPs au niveau du tissu chondrosarcome [74]

Epidermal Receptor 2" ou IGF-1R "Insulin-Like Growth Factor Receptor 1", à l'activation de Ras ou à des mutations (**Figure 25**). mTOR intervient dans la croissance et la prolifération cellulaire, dans l'angiogénèse et dans la survie cellulaire (**Figure 26**). Elle se trouve impliquée dans de nombreux cancers et peut être associée à un mauvais pronostic. mTOR constitue une cible potentielle thérapeutique. De nombreuses études cliniques rapportent les effets bénéfiques des inhibiteurs de mTOR en oncologie, que ce soit en monothérapie ou en combinaison, pour différents types de tumeurs dont les tumeurs osseuses [75-77].

5. Les métalloprotéinases

Les métalloprotéinases sont une famille d'enzymes protéolytiques zinc-dépendantes qui dégradent les composants de la matrice extracellulaire. Les collagénases MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 et MMP-13 sont surexprimées dans les chondrosarcomes invasifs et sont responsables de la dégradation du collagène [78,79]. L'expression de MMP-1 est corrélée avec le taux de récurrence et d'invasion du chondrosarcome [80].

Avec le développement tumoral, l'inflammation du tissu entraîne la libération de protéines pro-inflammatoires, telles que TGF- β 1 et BMP-2, qui se lient à leur récepteur et activent l'expression de CCN1/2 par la voie SMAD (**Figure 27**). CCN1/2, en se liant à son récepteur à la surface cellulaire, entraîne l'activation des MMPs par la voie FAK-MEK-ERK. L'expression des MM-Ps entraîne la dégradation du collagène et l'augmentation du potentiel migratoire des cellules de chondrosarcome.

Actuellement, des inhibiteurs de PI3K et MEK sont en essai clinique de phase I pour l'application à de nombreux types de cancers. Ils devraient bientôt entrer en phase II/III pour inhiber la croissance des chondrosarcomes craniens [74].

6. L'inhibition de la voie de signalisation PTHLH

La voie PTHLH, "Parathyroid Hormone-Like Hormone", intervient dans la différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance ce qui aboutit à la croissance longitudinale de l'os. PTHLH fut, à l'origine, identifiée comme un produit du tissu tumoral associé à la malignité. En se liant à son récepteur, PTHLH surexprime Bcl-2 qui inhibe la différenciation des chondrocytes. Bcl-2 est surexprimé dans les chondrosarcomes de haut grade et pourrait être une cible thérapeutique. Mayaji *et al.* ont démontré *in vitro* que l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-PTHLH induisait la différenciation et l'apoptose des cellules de chondrosarcome [81].

Chapitre I – Revue bibliographique



Figure 28 : Radiographie d'un chondrosarcome de grade I au niveau fémoral avant et après cryothérapie
A : Avant traitement ; **B** : après cryothérapie, ostéosynthèse and allogreffe

"Proton Beam Therapy for Chondrosarcoma" (2006-2012)	
Pathologie:	Chondrosarcome
Intervention:	Protonthérapie
Phase:	Phase II
"Study of Pazopanib in the Treatment of Surgically Unresectable or Metastatic Chondrosarcoma" (2011-2014)	
Pathologie:	Chondrosarcome ; Chondrosarcome métastatique
Intervention:	Chimiothérapie : pazopanib
Phase:	Phase II
"Trial of Proton Versus Carbon Ion Radiation Therapy in Patients With Low and Inter-mediate Grade Chondrosarcoma of the Skull Base" (2010-2022)	
Pathologie:	Chondrosarcome
Interventions:	Radiation: Radiothérapie carbonique ; Protonthérapie
Phase:	Phase III
"A Safety and Efficacy Study of Patients With Metastatic or Locally Advanced (Unresectable) Chondrosarcoma" (2006-2056)	
Pathologie:	Chondrosarcome Conventionel
Interventions:	Chimiothérapie : IPI-926
Phase:	Phase II
"Proton Radiation for Chordomas and Chondrosarcomas" (2010-2014)	
Pathologie:	Chondromes; Chondrosarcomes
Intervention:	Radiation: Protonthérapie
Phases:	Phase I / Phase II
"GDC-0449 in Treating Patients With Advanced Chondrosarcomas (2010-2012)"	
Pathologie:	Sarcome
Interventions:	Chimiothérapie: Hedgehog antagoniste GDC-0449
Phase:	Phase II
"High Dose Intensity Modulated Proton Radiation Treatment +/- Surgical Resection of Sarcomas of the Spine, Sacrum and Base of Skull" (2011-2014)	
Pathologie:	Chondrome de la moelle épinière, du sacrum ou de la base du crâne ; Chondrosarcome de la moelle épinière ou du sacrum
Intervention:	Radiation: Protonthérapie
Phase:	Phase II

Figure 29 : Quelques études cliniques actuellement en cours pour le traitement du chondrosarcome [82]

D. La chirurgie

1. La résection large

Le chondrosarcome étant résistant à la chimiothérapie et la radiothérapie, la chirurgie ablative reste actuellement le choix privilégié de traitement [83] et s'adresse à tous les types de chondrosarcomes. Elle consiste en une exérèse large de la tumeur après avoir réalisé un bilan complet en imagerie pour évaluer l'extension intraosseuse et extraosseuse. Une résection incomplète expose aux récurrences locales, très difficiles à réopérer. Un grand nombre de chondrosarcomes, situés notamment au niveau du pelvis ou de la colonne [84,85], sont très difficiles à opérer avec une marge chirurgicale suffisamment importante et donne lieu à des récurrences locales inévitables.

La chirurgie est de plus en plus conservatrice et est associée à des stratégies de reconstructions comprenant des techniques d'ostéosynthèses, d'auto et d'allogreffes osseuses et la mise en place de prothèses massives.

Dans certains cas, l'utilisation d'azote liquide (cryothérapie) peut être envisagée. Cette récente technique est moins invasive et donne des résultats très encourageants sur les chondrosarcomes (*Figure 28*) [86-88]. Une étude montre d'ailleurs que sur neuf patients atteints de chondrosarcome, traités par la cryothérapie et suivis tous les deux ans minimum, une seule récurrence a été observée (11 %) [89].

2. L'amputation

L'amputation est indiquée dans le cas de tumeurs très volumineuses et envahissantes ou lors de récurrences après de multiples interventions. Il s'agit d'un cas extrême.

Bien que la chirurgie reste, actuellement, le traitement privilégié pour le chondrosarcome, de nombreuses études cliniques sont en cours (*Figure 29*).

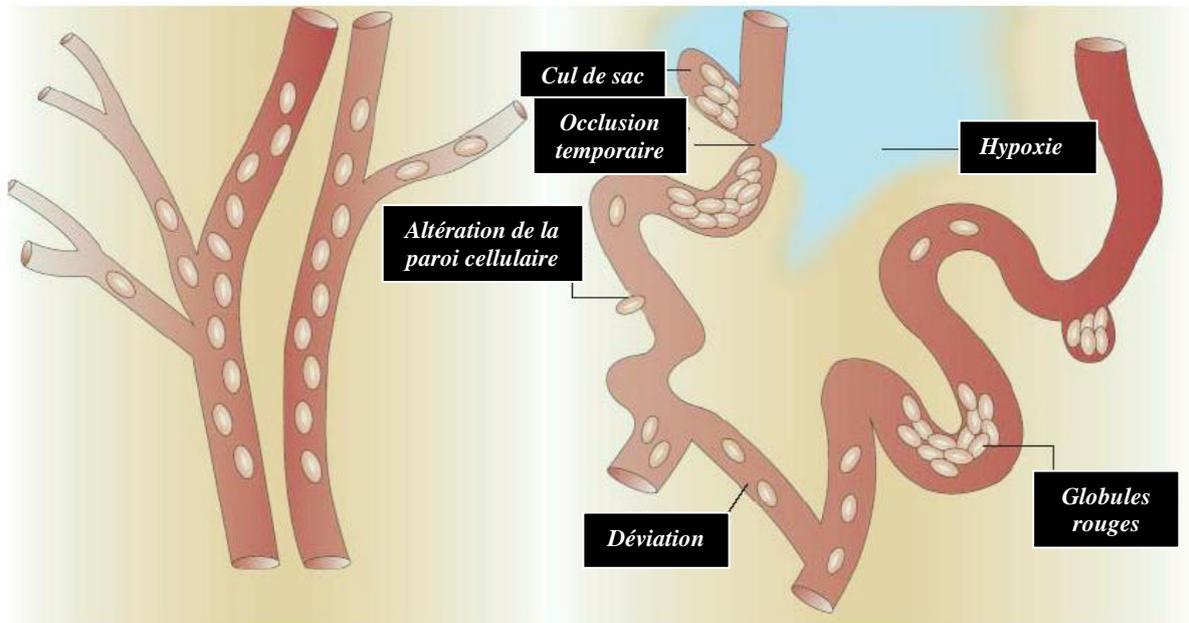


Figure 30 : Altération du réseau vasculaire dans un tissu tumoral [90]

IV. Environnement hypoxique et présence de protéoglycanes : Deux caractéristiques du tissu chondrosarcome

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux deux principales caractéristiques du chondrosarcome, auxquelles nous nous sommes intéressés pour ce travail : la nature hypoxique et la densité importante en protéoglycanes.

A. L'hypoxie

1. La faible perfusion intratumorale à l'origine de l'hypoxie

L'absence de vascularisation organisée au sein d'une tumeur aboutit à la présence de zones hypoxiques (approvisionnement en oxygène insuffisant et créant des carences) ou anoxiques (privation totale d'oxygène). Même si une néovascularisation se met en place, elle n'assure pas, au niveau du tissu tumoral, un approvisionnement suffisant en oxygène et nutriments. En effet, son organisation est très hétérogène avec des vaisseaux sanguins dilatés, tortueux et la présence de culs de sac (*Figure 30*) [90]. De plus, la structure des vaisseaux est elle-même anormale (fenestrations, absence de membranes basales). Il faut également noter qu'avec le développement tumoral, les vaisseaux peuvent se retrouver comprimés. Par conséquent, il existe une hétérogénéité de perfusion [91] et donc une variabilité de la quantité d'oxygène arrivant au tissu. Cette vascularisation anormale est à l'origine de la limitation de la quantité de chimiothérapie délivrée au sein de la tumeur [92,93].

Après avoir quitté le compartiment vasculaire, les molécules anticancéreuses doivent parfois parcourir une distance allant jusqu'à 200 μm (à cause de la distance intercapillaire augmentée) pour atteindre toutes les cellules tumorales [94]. La pénétration se fait alors soit par convection, soit par diffusion mais dans la majorité des cas, cette pénétration est faible et lente. Les régions les plus éloignées des capillaires sont, par conséquent, beaucoup moins exposées aux chimiothérapies [93].

L'hypoxie entraîne un certain nombre de processus et notamment l'activation du facteur HIF-1. Ce facteur de transcription régule la réponse engendrée par le stress hypoxique. Il joue un rôle primordial, notamment, pour la croissance des tumeurs solides, dont fait partie le chondrosarcome.

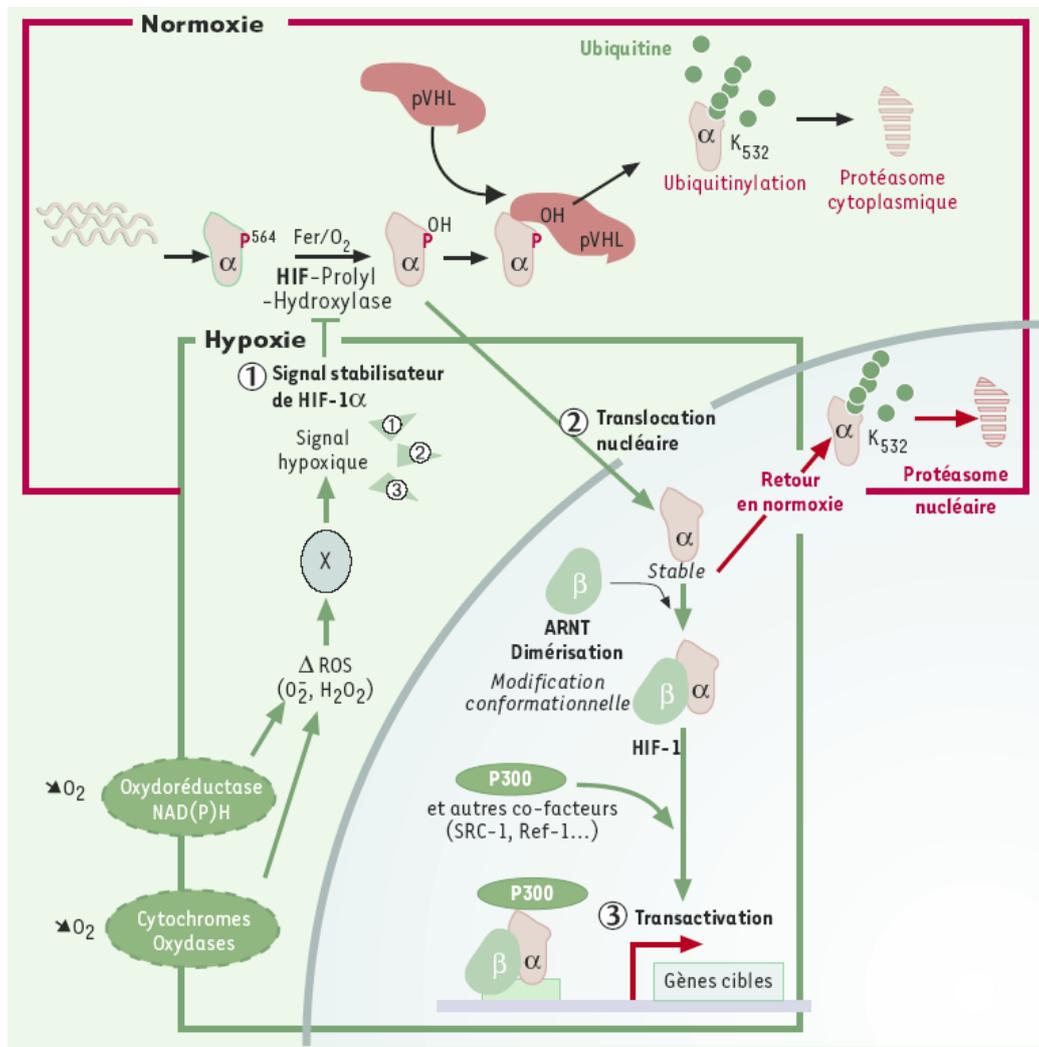


Figure 31 : Régulation de l'activité HIF-1 [95]

2. L'hypoxie responsable de la résistance aux thérapies par l'activation du facteur HIF-1

Le facteur HIF-1, "*Hypoxia-inductible factor*", est un facteur de transcription hétérodimérique activé en conditions hypoxiques et constitué de deux sous unités HIF-1 α et HIF-1 β . Cette protéine est impliquée dans la régulation d'un grand nombre de gènes jouant un rôle important dans la tumorigénèse, l'angiogénèse, la glycolyse, la survie cellulaire, la croissance tumorale, l'invasion, les métastases et la résistance aux thérapies [96,95]. Les ARNm des deux sous-unités sont exprimées de façon constitutive et stable. Au niveau protéique par contre, alors que HIF-1 β est stable quelques soient les conditions, HIF-1 α est rapidement dégradé en normoxie avec un temps de demi-vie de cinq minutes [97]. L'expression de HIF-1 α est, par conséquent, induite par l'hypoxie.

En condition normoxique, la sous unité HIF-1 α subit une hydroxylation au niveau d'un résidu proline (Pro 564), sous l'action d'une hydroxylase (PHD, "*prolyl-4-hydroxylase*") qui utilise de l'oxygène, des ions ferreux Fe²⁺ et du 2-oxoglutarate. Sous sa forme hydroxylée, la sous-unité HIF-1 α est reconnue par une protéine suppresseur de tumeur (pVHL, "*Protéine Von Hippel-Lindau*") qui dirige l'ubiquitinylation de HIF-1 α puis sa dégradation par le protéasome 26S (**Figure 31**).

En condition hypoxique, PHD n'est pas activée et le facteur de transcription de HIF-1 α est stabilisé, ce qui entraîne une accumulation de la sous-unité α qui migre alors vers le noyau et forme un hétérodimère avec la sous unité β et certains cofacteurs, comme le p300/CBV acétyltransférase, co-activateur transcriptionnel très important impliqué dans la régulation d'un grand nombre de processus biologiques dont la transcription de l'ADN, le SRC-1 "*steroid-receptor co-activators*" ou encore le TIF2 "*Transcription intermediary factor 2*" [95]. De plus, en hypoxie, l'activation d'oncogène ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur peuvent aider l'activation de HIF-1. Le complexe, ainsi formé, est responsable de l'activation d'un grand nombre de gènes permettant l'adaptation au déficit en oxygène et intervenant dans l'angiogénèse tels que VEGF, "*Vascular endothelial Growth Factor*", l'érythropoïèse (EPO), la glycolyse (GLUT-1 et GLUT-3, transporteurs du glucose)... etc (**Figure 32**). La cytokine angiogénique la plus importante activée par HIF-1 est la cytokine angiogénique VEGF.

L'interaction de VEGF avec son récepteur tyrosine kinase entraîne l'activation de

Chapitre I – Revue bibliographique

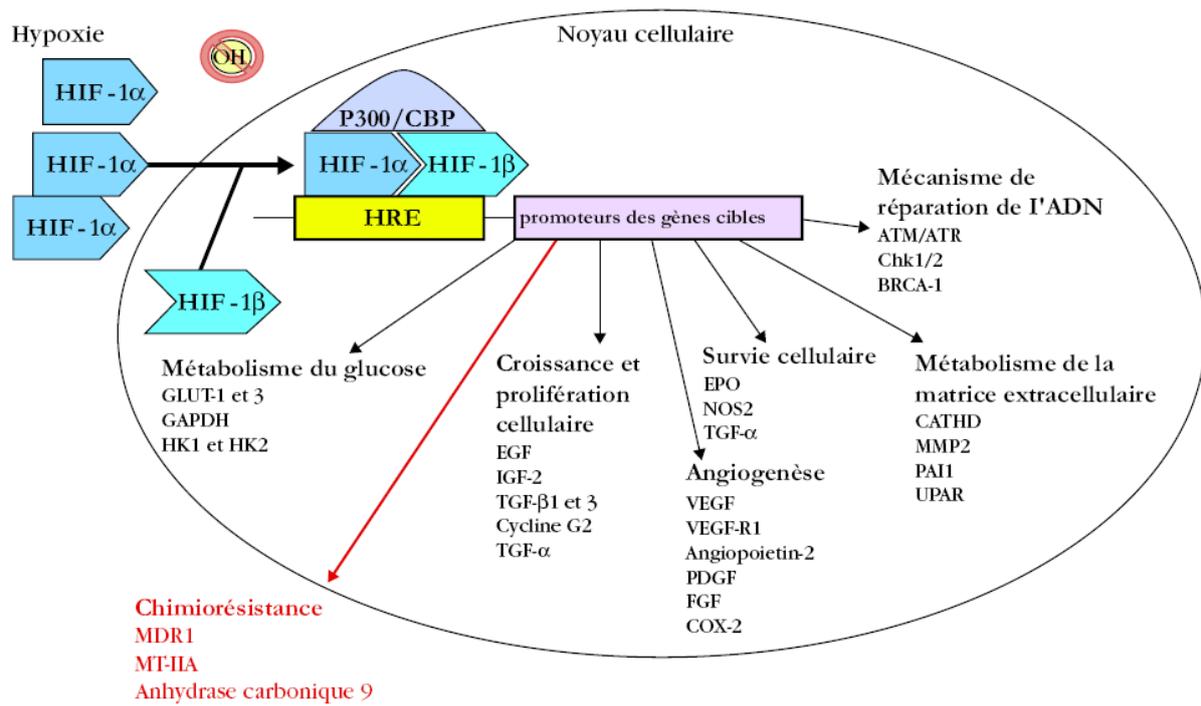


Figure 32 : Activation des gènes par le complexe hétérodimérique HIF-1 [94]

nombreuses voies de signalisation intracellulaire dont :

- ↗ la voie RAS qui induit la prolifération cellulaire et l'induction de gènes cibles,
- ↗ la voie FOCAL, "*focal adhesion kinase*", qui entraîne la migration cellulaire,
- ↗ la voie PI(3)K "*phosphatidylinositol-3-OH kinase*" qui active la prolifération et la survie cellulaire et enfin,
- ↗ la voie PLC δ : "*Phospholipase C delta*" qui est responsable de la perméabilité vasculaire et de la prolifération [98].

Dans de nombreuses localisations tumorales, la détection de HIF-1 α est corrélée à un stade avancé du cancer, à un mauvais pronostic et à une moindre chimio- et radiosensibilité. HIF-1 α est aujourd'hui considéré comme une cible potentielle puisqu'elle se retrouve surexprimée dans un certain nombre de tumeurs solides [99].

Des études ont démontré notamment que le facteur HIF-1 α était plus exprimé dans des chondrosarcomes de haut grade que dans des chondrosarcomes de bas grade et qu'il était corrélé avec la mise en place d'un réseau vasculaire et le développement de métastases pulmonaires [100-102] :

Chen *et al.* [101] ont, par exemple, mis en évidence une expression accrue de HIF-1, en réponse à des conditions hypoxiques, dans les tumeurs malignes du cartilage comparativement aux tissus sains, ainsi qu'une corrélation entre l'expression de HIF-1 et le grade du chondrosarcome.

Kubo *et al.* [102] ont quant à eux, établi une relation entre la microvascularisation des tumeurs du cartilage et l'expression de HIF-1.

3. L'exploitation de l'hypoxie comme avantage thérapeutique.

Etant donné son rôle majeur dans le développement de la chimiorésistance, l'hypoxie tumorale représente une cible thérapeutique attrayante. Un certain nombre de stratégies, et notamment le recours aux prodrogues activables en hypoxie, ont donc été envisagées. Ces prodrogues sont basées sur l'utilisation de structures chimiques sensibles à une réduction et appartiennent essentiellement à trois familles : les quinones, les nitro-aromatiques et les *N*-oxydes.

Chapitre I – Revue bibliographique

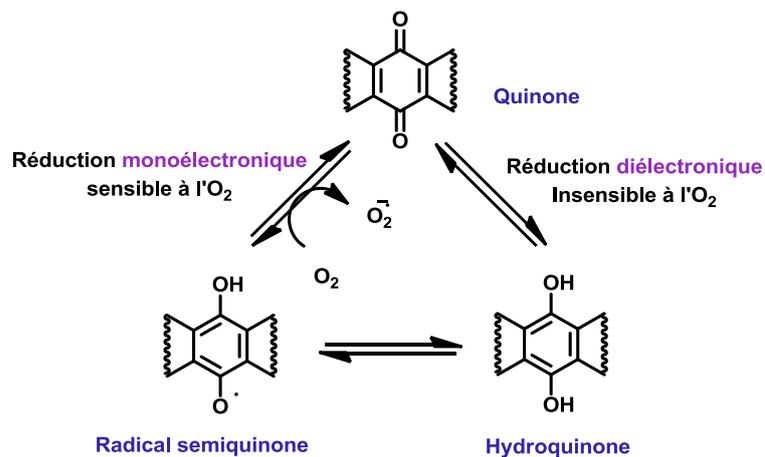


Schéma 2 : Schéma général de bioréduction des quinones [90]

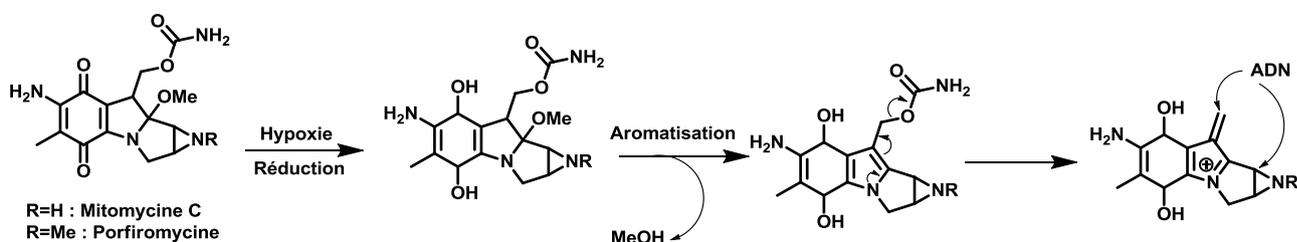


Schéma 3 : Activation de la mitomycine C en milieu hypoxique

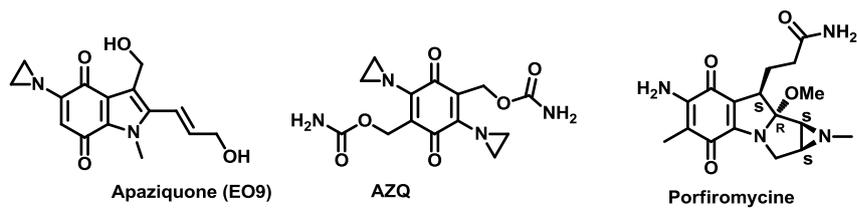
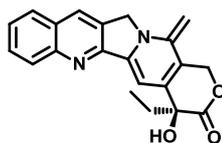


Figure 33 : Exemple de quinones activées en hypoxie



Camptothécine

Figure 34 : Structure de la camptothécine

a. Les quinones

Les quinones sont des composés naturels ou synthétiques appartenant à une importante classe de composés biologiquement actifs, allant des coenzymes Q et des vitamines K jusqu'à la doxorubicine, un antibiotique ayant démontré une activité anticancéreuse. Les quinones peuvent être réduites facilement par des enzymes selon une réduction monoélectronique ou diélectronique (*Schéma 2*) [90].

↳ **La réduction monoélectronique** conduit à un radical semiquinone et fait intervenir des enzymes tels que le cytochrome P450 réductase, le cytochrome b5 réductase ou l'ubiquinone oxydoréductase [103]. Cette voie peut être réversible en présence d'oxygène. L'anion radical libéré agit en inhibant la topoisomérase II ce qui entraîne des coupures au niveau de l'ADN.

↳ **La voie diélectronique** conduit à une hydroquinone et fait intervenir des enzymes tels que la DT-diaphorase (NADPH quinone oxydoréductase). Le radical ainsi formé interagit par liaison covalente à l'ADN entraînant des lésions majeures responsables de la cytotoxicité des composés. Les prodrogues substrats de cette enzyme sont, en général, plus cytotoxiques mais moins sélectifs que les substrats de la voie monoélectronique.

Le premier composé de cette famille à avoir été exploité est un agent alkylant, la mitomycine C (MMC). Cette quinone est substrat du cytochrome P450 réductase (voie monoélectronique) mais aussi de la DT-diaphorase (voie diélectronique) ce qui explique sa faible sélectivité vis à vis de l'hypoxie [104]. Sa cytotoxicité dérive d'un métabolisme réducteur suivi d'une fragmentation en une espèce alkylante (*Schéma 3*).

De nombreux dérivés de la mitomycine C ont par la suite été développés :

↳ **La porfiromycine (Figure 33)** est un analogue méthylé de la mitomycine C. Ce dérivé, présentant moins d'affinité avec la DT-diaphorase, est beaucoup plus sélectif vis à vis de l'environnement hypoxique que la mitomycine C.

↳ **L'apaziquone "EO9" (Figure 33)** a été identifié comme étant un bon substrat pour la DT-diaphorase [105]. EO9 démontre une excellente activité dans les tumeurs solides de modèles animaux. Cependant les études cliniques de phase II sur l'homme ont mis en évidence un faible bénéfice thérapeutique [106,107] qui serait dû à ses propriétés pharmacocinétiques (courte $\frac{1}{2}$ vie et faible pénétration tissulaire). Des analogues de EO9, comme le composé AZQ [108] (*Figure 33*), ont alors été développés pour amé-

Chapitre I – Revue bibliographique

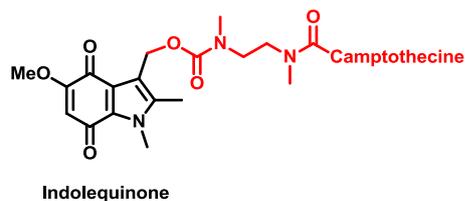


Figure 35 : Stratégie d'amélioration des propriétés physicochimiques et de la sélectivité de la camptothécine

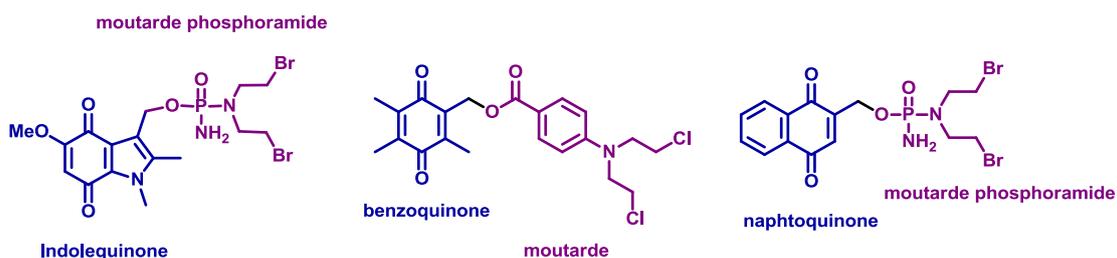


Figure 36 : Exemple de quinones greffées à des moutardes azotées

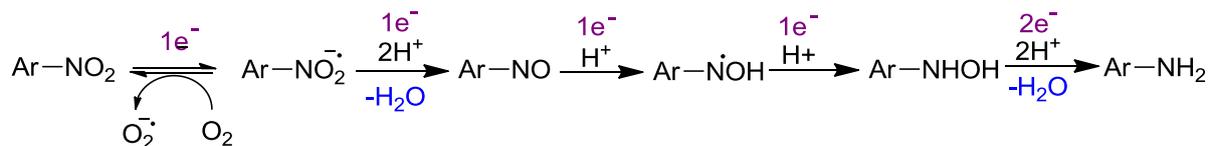


Schéma 4 : Réduction des composés nitroaromatiques et réoxygénation du radical anion en présence d'oxygène [109]

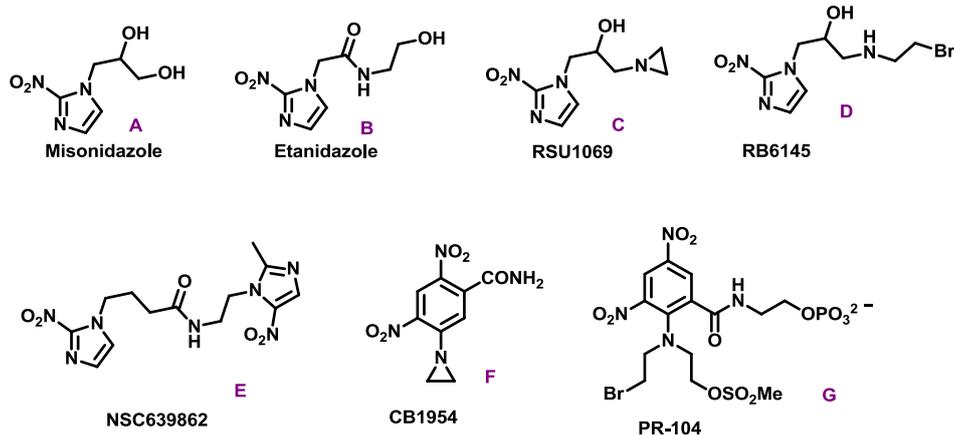


Figure 37 : Structures de quelques nitroaromatiques

liorer ses propriétés.

En utilisant le cycle indolequinone de la mitomycine, certaines stratégies ont consisté à greffer, en position 3, un composé cytotoxique, susceptible de se libérer après réduction de la quinone, pour en améliorer la sélectivité ou les propriétés physicochimiques.

La camptothécine est un très bon exemple (*Figure 34*). En effet, cet alcaloïde pentacyclique, inhibiteur de la topoisomérase I, est très peu soluble. Le fait de greffer la camptothécine en position 3 de l'indolquinone par l'intermédiaire d'un bras espaceur (*N,N*-diméthyl-2-aminoéthylcarbamate) (*Figure 35*) améliore cette solubilité. En condition anaérobie, une bioréduction suivie d'une cyclisation permet de libérer la camptothécine. Cette stratégie permet donc à la fois d'améliorer les propriétés physicochimiques et la sélectivité vis à vis de l'hypoxie [110-112].

Cette stratégie a été également appliquée à d'autres agents cytotoxiques tels que des moutardes azotées et à d'autres quinones comme des benzoquinones et des naphthoquinones [113-115] (*Figure 36*).

b. Les nitroaromatiques

Les nitroaromatiques sont des composés pouvant être réduits par une suite de réactions monoélectroniques (*Schéma 4*). La première étape, permettant d'obtenir le radical anion susceptible de créer des liaisons covalentes avec l'ADN, est réversible en présence d'oxygène et conduit donc à une sélectivité de ces composés en milieu hypoxique.

Les premiers composés nitroaromatiques à avoir été exploités sont le misonidazole et l'éthanidazole (*Figure 37*). Ces deux composés sont capables de produire des radicaux libres et ont une action radiosensibilisante. Cependant le misonidazole et l'éthanidazole sont caractérisés par une cytotoxicité et une sélectivité vis à vis de l'hypoxie faibles [116].

Afin d'améliorer ces propriétés, des modifications structurales du misonidazole ont été effectuées (*Figure 37*) :

- ↳ Une première stratégie a consisté à greffer un ou plusieurs résidus alkylants au misonidazole. C'est le cas du composé RSU1069 **C** qui démontre une amélioration de la sélectivité hypoxique [117] ou encore, du composé RB6145 **D** qui présente une plus faible toxicité et un meilleur profil pharmacocinétique que le RSU1069 [118]. Cependant, du fait de leur toxicité rétinale, ces dérivés n'ont pas été testés en clinique.
- ↳ Une seconde stratégie a consisté à combiner deux nitroaromatiques, via un espaceur de type carboxamide. C'est le cas du NSC639862 **E**. Dans ce cas, la sélectivité vis à vis

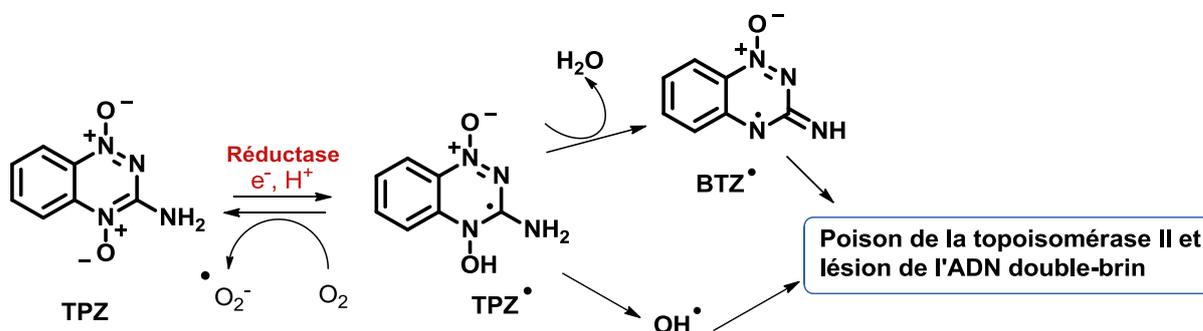


Schéma 5 : Schéma d'activation de la tirapazamine TPZ

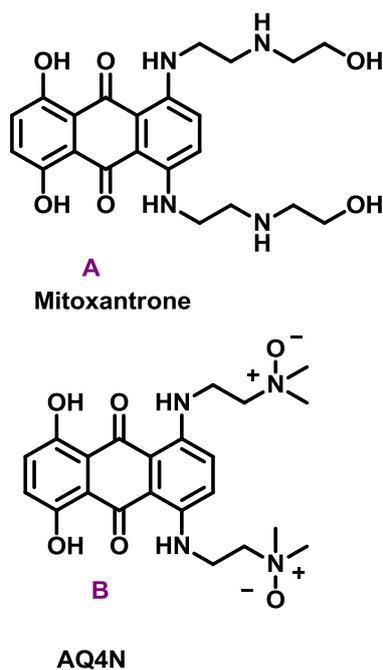


Figure 38 : Exemples de structures de dérivés N-oxydes

de l'hypoxie était améliorée mais les lésions engendrées au niveau de l'ADN étaient diminuées.

- ↪ Un autre groupe important rassemble des molécules comprenant un nitrobenzène greffé à un agent alkylant (**F** et **G**). Parmi eux, la prodrogue PR-104 **G** [119,120] s'est révélée très intéressante et est rentrée en phase clinique. Actuellement le PR-104 est entré en étude clinique de phase II pour le traitement du carcinome pulmonaire non à petites cellules et pour le traitement du carcinome hépatocellulaire avancé [121].

Tout comme les quinones, les nitroaromatiques peuvent être greffés, par l'intermédiaire de bras espaceur de nature variable, à des agents cytotoxiques pour améliorer leur sélectivité et diminuer leur toxicité.

Cette stratégie appliquée à la famille des phosphoramides sera développée ultérieurement dans le paragraphe V.C. : "*Amélioration de la spécificité des molécules vectorisées par la fonction ammonium quaternaire*" p44.

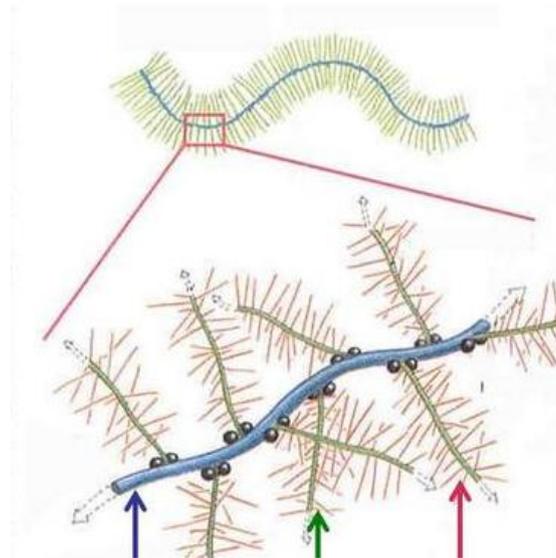
c. Les N-oxydes

Les deux représentants essentiels de cette famille sont la tirapazamine et le AQ4N qui sont tous deux entrés en phase clinique [122].

La tirapazamine est une prodrogue qui est convertie en un radical anion cytotoxique par l'action d'une réductase intracellulaire monoélectronique. En présence d'oxygène, le radical peut être réoxydé en tirapazamine non active (*Schéma 5*) [123]. Sous sa forme radicalaire, la tirapazamine entraîne des lésions au niveau de l'ADN (formation de ponts intrabrins ou interbrins) et inhibe la topoisomérase II, qui intervient notamment dans la réplication et la transcription de l'ADN. Cette inhibition se traduit par de nombreuses coupures des deux brins de l'ADN. La molécule a démontré une activité cytotoxique significative lors d'essais cliniques de phase II et III en association avec la radiothérapie et la chimiothérapie au cisplatine [57,124,125]. Il faut toutefois noter la toxicité systémique de ce composé qui a conduit au développement de nouvelles molécules [126,127] (*Figure 38*).

L'AQ4N est activée par une réduction diélectronique et est similaire, d'un point de vue structural, à la mitoxantrone (*Figure 38*), une anthracycline antinéoplasique utilisée dans le traitement de divers cancers tels que le cancer du sein métastasé, la leucémie myéloïde aigüe et le lymphome non-hodgkinien. Ce composé agit comme un intercalant de l'ADN et poison de la topoisomérase II [128].

Chapitre I – Revue bibliographique



Acide hyaluronique *Core protein* *Glycosaminoglycanes sulfatés*

Figure 39 : Structure d'un agrégat de protéoglycanes

Familles	Dénomination	Localisation
Lecticanes	Agrécannes	Cartilage hyalin, ménisques, disque intervertébral
	Versicannes	Autres tissus conjonctifs (peau, tendons, capsule et synoviale, os)
	Neurocannes	Tissu nerveux central
	brévicanes	Tissu nerveux central
Petits PGs riches en leucine	Biglicanne	
	Décorine	
	Fibromoduline	
PGs associés à la membrane cellulaire	Syndécannes, glypicannes	La portion extra-cellulaire porte des chaînes d'héparane-sulfate. La portion intra-cellulaire, connectée au cytosquelette, transmet à celui-ci les informations venant de l'environnement péro-cellulaire.

Tableau 2 : Localisation des différents protéoglycanes

B. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des molécules à localisation extracellulaire, membranaire ou intracellulaire, constituées d'une protéine appelée "core protein" sur laquelle sont greffées des chaînes polyosidiques dénommées glycosaminoglycanes (*Figure 39*). Cette double nature biochimique leur permet d'interagir avec de multiples constituants matriciels et cellulaires. Présents dans les tissus conjonctifs et le cartilage (*Tableau 2*), ils ont un rôle structural dans l'organisation cellulaire et tissulaire. Si le rôle des protéoglycanes est particulièrement bien démontré dans les pathologies du cartilage, la liste de leurs fonctions physiologiques et physiopathologiques qu'on leur prête ne cesse de s'allonger, ceci est particulièrement valable en cancérogénèse avec notamment leur rôle dans la dissémination.

1. Structure et classification des protéoglycanes

Un protéoglycane est constitué d'une protéine axiale liée de manière covalente à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) de type chondroïtine sulfate (CS), héparane sulfate (HS), kératane sulfate (KS) ou encore dermatane sulfate (DS) (*Figure 40*). Ces GAG correspondent à de longues chaînes polysaccharidiques formées par la répétition d'unités disaccharides composées d'un sucre aminé, une *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) ou une *N*-acétyl-D-galactosamine (GalNAc), et d'un acide uronique, l'acide D-glucuronique (GlcA) ou l'acide L-iduronique (IdoA). Chaque unité disaccharidique contient au minimum une charge négative sur le groupement carboxylate ou sulfate, faisant de ces molécules de longues chaînes anioniques, repoussant les molécules négatives, et captant les ions Ca^{2+} et Na^+ qui attirent les molécules d'eau. Les protéoglycanes peuvent se retrouver au niveau extracellulaire (agrécan, versicane...), péricellulaire (syndécane) ou intracellulaire (serglycine) et interviennent, de façons variées, dans la régulation du métabolisme cellulaire. Ils peuvent intervenir en tant que régulateurs de la fibrillogénèse des collagènes, peuvent agir comme des filtres biologiques (perlécane au niveau de la membrane basale glomérulaire), interviennent dans le développement neuronal, peuvent, en se liant à des facteurs de croissance, réguler leur biodisponibilité, leur stabilité [129]. Enfin, ils peuvent être impliqués dans la régulation de la croissance et de l'invasion des cellules tumorales.

Nous nous intéresserons ici, plus particulièrement aux protéoglycanes de la matrice extracellulaire du cartilage.

Les protéoglycanes de la matrice extracellulaire du cartilage sont représentés essentiellement par des protéoglycanes de haut poids moléculaire, surtout de l'agrécan, et, par de petits protéoglycanes riches en leucine tels que la décorine, le biglycane et la fibromoduline. Des protéoglycanes peuvent toutefois être retrouvés à la surface des chondrocytes. Il s'agit des syndécans (1, 2 et 4), du bêtaglycane et du glypicane.

2. L'agrécan et le versicane

L'agrécan fait partie de la famille des hyalectanes qui comprend l'agrécan, le versicane, le neurocane et le brévican.

L'agrécan est le protéoglycane prédominant de la matrice extracellulaire du cartilage. Sa partie protéique est composée de trois domaines globulaires G1, G2 et G3 contenant chacun des résidus cystéines qui établissent entre eux des ponts disulfures (**Figure 41**) :

- ↪ Le domaine G1, situé à l'extrémité *N*-terminale, est constitué de 335 acides aminés. Il interagit avec la matrice extracellulaire en se liant à l'acide hyaluronique par l'intermédiaire d'une protéine de liaison. Plusieurs agrécans peuvent se lier à une même molécule d'acide hyaluronique, ce qui crée des agrégats de grande taille.
- ↪ Le domaine G2 a une structure proche du domaine G1 et se compose de 200 acides aminés. Sa fonction est peu connue.
- ↪ Le domaine G3, situé à l'extrémité *C*-terminale, est apparenté à la famille "LEC-CAMS" (Lectin, EGF, complément-regulatory-cell-adhesion-molecules). Ce domaine présente une structure identique à la lectine hépatique, au facteur de croissance épidermique (EGF) et au complément de type C3.
- ↪ Les régions G1 et G2 sont séparées par un court domaine interglobulaire E1 qui joue un rôle important dans le cas de pathologies telles que l'arthrose. En effet, il possède deux sites de clivage respectivement pour les agrécagénases (Glu³⁷³-Ala³⁷⁴) et les métalloprotéinase (Asn³⁴¹-Phe³⁴²) [130].
- ↪ Les régions G2 et G3 sont séparées, quant à elles, par une région de grande taille (domaine interglobulaire E2) sur laquelle sont fixées les chaînes de GAGs (chondroïtine sulfate et kératane sulfate). La structure de cette région varie selon les espèces.

Chapitre I – Revue bibliographique



Le versicane est un autre membre de la famille des hyalectanes. Il est présent essentiellement dans les tissus mous. Sa structure est proche de celle de l'agrécan avec des domaines globulaires G1 et G3 semblables. L'agrécan et le versicane se différencient l'un de l'autre par les chaînes de GAGs qui sont attachées à la protéine centrale. Des épissages alternatifs du versicane génèrent quatre isoformes V0, V1, V2 et V3. Le versicane est un protéoglycane inductible sous certaines conditions pathologiques ou physiologiques [131]. Il intervient dans la prolifération, l'adhésion, la migration et l'invasion [132,133]. De nombreuses études ont mis en évidence une corrélation entre le développement tumoral de nombreux cancers (cancer de la prostate, cancer du colon, mélanome...) et la surexpression du versicane [134-136].

Concernant le chondrosarcome, Wasa *et al.* sont les seuls, à ce jour, à avoir étudié *in vitro* un lien entre l'expression du versicane et le chondrosarcome. Par des techniques d'immunohistochimie, ces derniers ont mis en évidence une corrélation entre le degré de malignité des tumeurs et l'expression du versicane [131].

2. Les petits protéoglycanes riches en leucine

Un grand nombre de petits protéoglycanes riches en leucine ont été observés au niveau de la matrice extracellulaire du cartilage [137]. Ces petits protéoglycanes sont la décorine, le biglycane, le lumican et la fibromoduline [138,139]. Leur caractéristique commune réside dans leur structure qui consiste en la répétition de motifs de longueur variable possédant de nombreux résidus leucines. La région N-terminale contient deux ponts disulfures alors que la C-terminale n'en contient qu'un seul. A l'exception de la chondroadhérine, tous les protéoglycanes riches en leucine ont une extension N-terminale. Ils se lient au collagène au niveau des domaines répétés et riches en leucines et interviennent dans la modification, le dépôt et l'arrangement des fibres de collagène [140].

Concernant la décorine et le biglycane, ces deux protéoglycanes n'ont pas la même localisation. Alors que la décorine est située au sein de la matrice extracellulaire, le biglycane est situé en périphérie et intervient dans les phénomènes d'adhérence [129].

Chapitre I – Revue bibliographique

Proteoglycan cell surface					
Syndecan-1	1-3	Chondroitin sulfate Heparan sulfate	31	Epithelia, plasma cells	Mediate cell binding, cell signaling, and cytoskeletal organization
Syndecan-2	1-2	Heparan sulfate	22	Endothelia, fibroblasts	
Syndecan-4	1-2	Heparan sulfate	22	Ubiquitous on adherent cells	
Betaglycan	1-4	Chondroitin sulfate/heparan sulfate	94	Fibroblasts	TGF- β type III Receptor
Glypican-3	1-2	Heparan sulfate	65	Highly expressed in lung, liver and kidney	Modulating ligand-receptor interactions

Figure 42 : Structure et fonctions des protéoglycanes de surface [141]

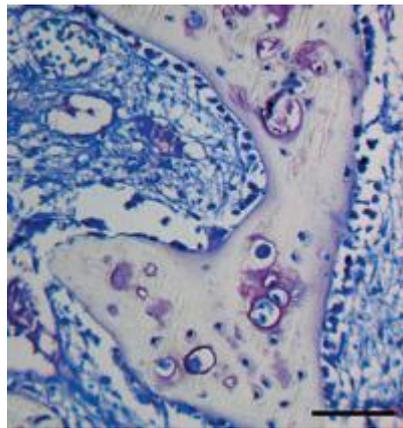


Figure 43 : Chondrosarcome dédifférencié - Coloration bleu de toluidine [142]
On distingue deux zones : une zone tumorale dédifférenciée en ostéosarcome et une zone tumorale cartilagineuse (coloration intense qui témoigne de la densité en protéoglycanes)

3. Les protéoglycanes de surface

Ces protéoglycanes sont essentiellement représentés par les syndécanes (1,2, 3 et 4) mais aussi par le bêtaglycane et le glypicane. Ces derniers s'associent à la membrane plasmique et régulent la transduction de signaux intracellulaires [143]. Les protéoglycanes membranaires régulent la prolifération et la différenciation cellulaire en interagissant avec certaines cytokines. De plus, ils peuvent être impliqués dans le stockage et la protection de certaines protéases (*Figure 42*).

Le syndécane est une protéine transmembranaire de type I qui comprend :

- ↳ un domaine extracellulaire, l'ectodomaine, sur lequel est greffé un certain nombre de chaînes d'héparanes sulfates pouvant être substitués, dans le cas des syndécanes 1 et 3, par des chondroïtines ou dermatanes sulfates. Les chaînes d'héparanes sulfates sont capables d'interagir avec un grand nombre de ligands tels que des glycoprotéines extracellulaires, des fibres de collagène, des cytokines, des facteurs de croissance, des enzymes...
- ↳ un domaine transmembranaire,
- ↳ un domaine cytoplasmique, très court, constitué de deux régions invariantes, C1 et C2, séparées par une région variable V. La région C1 peut lier des éléments du cytosquelette tels que l'ezrine, au moins pour le syndécane-2. La région C2 peut lier un certain nombre de protéines telles que la synténine [144].

Depuis quelques années, il est devenu clair que les protéoglycanes, riches en héparanes sulfates (HSPGs), avaient un rôle important dans la régulation de processus pathologiques, y compris le cancer.

La littérature rescence un certain nombre d'auteurs qui se sont intéressés à la composition de la matrice extracellulaire du chondrosarcome, plus particulièrement au collagène et aux protéoglycanes :

- ↳ Söder *et al.* [145] ont étudié, par des techniques d'immunohistochimie, des marqueurs susceptibles de permettre un diagnostic différentiel entre un chondroblastome, tumeur bénigne du cartilage, et un chondrosarcome à cellules claires, tumeur maligne du

Chapitre I – Revue bibliographique



Chapitre I – Revue bibliographique

cartilage. Alors que l'aggrécane est présent dans les deux types de tumeur, le collagène de type II est, quant à lui, absent dans les chondroblastomes mais exprimé dans les chondrosarcomes à cellules claires. Il pourrait ainsi être considéré comme un marqueur sensible permettant la distinction entre un chondroblastome et un chondrosarcome à cellules claires.

↳ Dornauer *et al.* [146], se sont intéressés, plus particulièrement, à la matrice des chondrosarcomes humains dédifférenciés. Par des techniques d'immunohistochimie, ils ont localisé l'aggrécane et les différents types de collagène. L'aggrécane et le collagène II sont, tous deux, retrouvés dans les chondrosarcomes bien différenciés, de bas grade, comme dans les chondrosarcomes dédifférenciés, au niveau de la composante chondrogénique. Concernant l'aggrécane, cette observation a également été mise en évidence par Aigner *et al.* [147] par une coloration au bleu alcian.

Les collagène de type I et III apparaissent avec la dédifférenciation du chondrosarcome, contrairement au collagène de type X qui est retrouvé uniquement au niveau des chondrosarcomes bien différenciés.

↳ Hamm *et al.* [148] ont étudié l'expression de différents gènes exprimés dans les tumeurs de rats porteurs de chondrosarcome Swarm (modèle SRC). Ces tumeurs ont été implantées en sous-cutané, au niveau du tibia ou au niveau du poumon. L'intérêt était ici de mettre en évidence l'influence de l'environnement quant à l'expression du phénotype. Le modèle utilisé pour cette étude, le modèle SRC, est semblable du point de vue histologique à un chondrosarcome humain [149] ; il est d'ailleurs très utilisé pour les études précliniques du chondrosarcome. Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence une expression forte de l'aggrécane et du collagène de type II aussi bien dans le cartilage sain que dans le chondrosarcome quelque soit sa localisation. L'expression du collagène de type X et l'expression du procollagène de type III sont, quant à eux, très faibles dans les chondrosarcomes mais élevées dans le cartilage normal. Enfin, le procollagène de type XI et le procollagène de type IX sont fortement exprimés dans les tissus cartilagineux sains comme tumoraux.

Chapitre I – Revue bibliographique



Le niveau d'expression des protéoglycanes dans le chondrosarcome varie en fonction du grade de la tumeur. Pour les chondrosarcomes de grade I, la matrice extracellulaire est bien différenciée et, tout à fait comparable à celle du cartilage hyalin. En effet, elle est riche en agrécane et en collagène II, mais aussi, en collagène X et XI. Avec l'évolution du chondrosarcome, la teneur en protéoglycanes, dont l'agrécane, diminue. Ils sont alors moins présents sauf dans les chondrosarcomes dédifférenciés, au niveau de la composante cartilagineuse.

3. Stratégies de ciblage des protéoglycanes

Dans la littérature, un certain nombre d'auteurs ont développé différentes stratégies de ciblage des protéoglycanes pour l'imagerie du cartilage que ce soit par l'utilisation d'un anticorps monoclonal (Kairemo *et al.*) ou bien par l'utilisation d'une entité chargée positivement telle qu'un ammonium quaternaire pour cibler les charges négatives des protéoglycanes :

- ↳ Se basant sur une étude de Kuiper *et al.* [150] qui mettait en évidence une corrélation entre le taux de kératane sulfate dans le sérum et une dégradation des disques intervertébraux, Kairemo *et al.* [151] ont développé une stratégie de ciblage des disques intervertébraux en utilisant un anticorps monoclonal anti-kératane sulfate marqué à l'iode 125. L'étude de biodistribution de la molécule marquée sur un modèle de rats, ayant subi des incisions au niveau des disques intervertébraux a montré une accumulation importante de l'anticorps au niveau des disques intervertébraux lésés.

Le caractère fortement anionique des protéoglycanes leur confère un rôle primordial dans l'organisation structurale et les propriétés mécaniques du cartilage. En effet, les charges négatives immobilisées dans le réseau de collagène sont à l'origine d'un appel d'eau dans le tissu généré par les différences de pressions osmotiques. Les agrégats d'agrécane sont donc à la base de l'hydratation et de la résistance aux forces compressives. Cette importante densité de charge négatives a été exploitée, par un certain nombre d'auteurs, pour adresser spécifiquement une molécule, qu'elle soit thérapeutique ou diagnostique, au niveau du

Chapitre I – Revue bibliographique

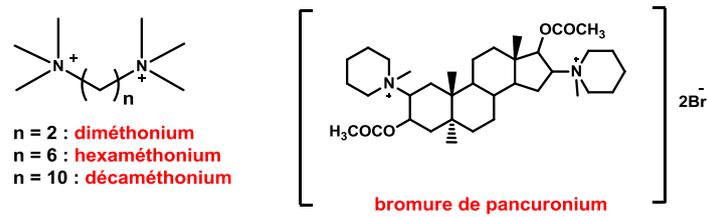
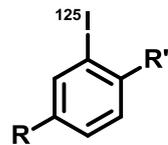


Figure 44 : Exemples de molécules vectorisées par des ammoniums quaternaires synthétisées par Shindo et al.



- 1, R = R' = CH₂NH₂
- 2, R = R' = CH₂N(CH₃)₂
- 3, R = R' = CH₂N⁺(CH₃)₃
- 4, R = H ; R' = CH₂N⁺(CH₃)

Figure 45 : Dérivés synthétisés et évalués par Huang et al.

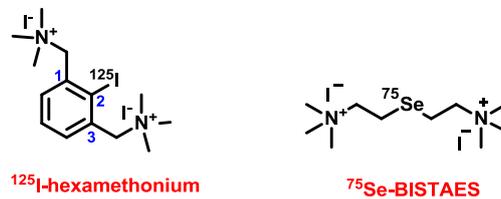


Figure 46 : Exemples de molécules vectorisées par un ammonium quaternaire

cartilage.

En effet, dès les années 70, certains auteurs commencent à développer une stratégie de ciblage du cartilage en vectorisant des molécules radioactives par une fonction ammonium quaternaire [152-155]. La charge positive de cette fonction présente une bonne affinité pour les charges négatives des protéoglycanes :

- ↳ Shindo *et al.* [156-158] réalisent des études de biodistribution de composés possédant deux fonctions ammonium quaternaire et marqués au carbone 14, tels que le décaméthonium, l'hexaméthonium, le diméthonium, le pancuronium (**Figure 44**). Ils démontrent alors une accumulation rapide du radiotracer au niveau des sites riches en protéoglycanes tels que le cartilage.
- ↳ Huang *et al.*, quant à eux, développent d'autres analogues de l'hexaméthonium (**Figure 45**). Les études de biodistribution, chez le rat, de ces molécules marquées au carbone 14 démontrent également une bonne affinité pour les tissus cartilagineux tels que la trachée, les disques intervertébraux. Le composé 3 (**Figure 45**), possédant deux fonctions ammonium quaternaire, semble d'ailleurs posséder la meilleure affinité.
- ↳ Korn *et al.* [152] synthétisent et étudient la biodistribution de l'hexaméthonium marqué à l'iode 125 (**Figure 46**) sur des rats porteurs de chondrosarcome Swarm. Ils mettent ainsi en évidence une accumulation du traceur au niveau de la tumeur de l'ordre de 0,60 % de D.I. par gramme de tumeur.
- ↳ Yu *et al.* [154,155,159] développent un composé possédant deux fonctions ammonium quaternaire et marqué au sélénium 75 (**Figure 46**), le ⁷⁵Se-BISTAES. Ils étudient sa biodistribution chez le lapin et le cobaye sain et mettent ainsi en évidence une accumulation importante du traceur au niveau du cartilage. Par la suite, cette stratégie a été appliquée au suivi de certaines pathologies évolutives telles que l'arthrose. Les radiotraceurs vectorisés par un ammonium quaternaire et marqués sélénium 75 démontraient une bonne accumulation au niveau du cartilage et un intérêt dans le suivi de l'arthrose [154]. Cependant, le sélénium 75 présente une haute énergie et une longue demi-vie. Il ne constitue pas un isotope idéal pour la scintigraphie.

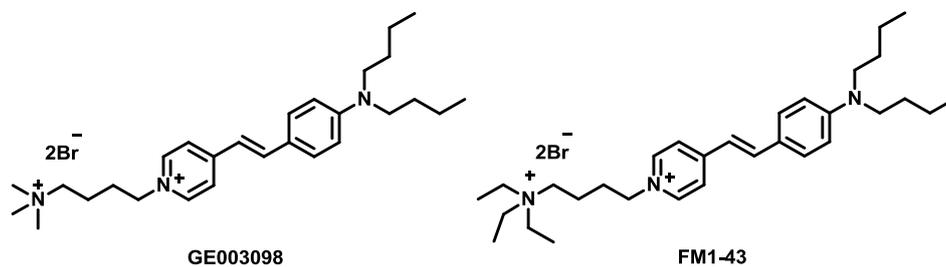


Figure 47 : Exemple de fluorophores vectorisés par un ammonium quaternaire développés par Gibbs-Strauss et al. [160]

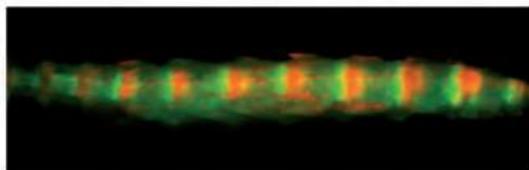


Figure 48 : Colonne vertébrale de rat après injection du GE003098 et du Pam800, un traceur osseux [160]

En rouge : localisation du GE003098 au niveau des disques intervertébraux

En vert : localisation du Pam800 au niveau des vertèbres

Il n'y a pas de superposition des deux marqueurs

↳ Depuis les années 1990, le laboratoire UMR 990 Inserm / Uda a choisi d'exploiter cette stratégie de ciblage par une fonction ammonium quaternaire pour la vectorisation d'agents diagnostiques et thérapeutiques [1,161-164] :

- Nicolas *et al.* [163] développent des dérivés ammonium quaternaire d'antiinflammatoires. Le marquage au carbone 14 et l'étude de biodistribution qui a suivi ont permis de mettre en évidence un tropisme spécifique vis-à-vis du cartilage beaucoup plus important pour les molécules vectorisées que les non vectorisées.
- Giraud *et al.* [164], quant à eux, développent des dérivés ammonium quaternaire d'un agent chondroprotecteur : la glucosamine. L'étude de biodistribution après marquage de la molécule au carbone 14 a également mis en évidence un tropisme spécifique vis-à-vis du cartilage beaucoup plus important pour les molécules vectorisées que pour la glucosamine non vectorisée. De plus, d'après les auteurs, la nature de la fonction ammonium quaternaire ne semblerait pas avoir d'influence.
- Vidal *et al.* se sont intéressés à la vectorisation, par une fonction ammonium quaternaire, de la tétracycline, en tant qu'inhibiteur des MMPs [1].

↳ Plus récemment, Gibbs-Strauss *et al.* ont greffé une fonction ammonium quaternaire à une molécule fluorescente afin de proposer une visualisation claire de la colonne lors d'interventions chirurgicales pour des pathologies liées à l'anneau fibreux du disque intervertébral (*Figure 47 et Figure 48*) [160]. Huit fluorophores vectorisés ont ainsi été synthétisés, dont le **GE003098** et le **FM1-43** illustrés *Figure 47*. Des relations de structures-activités ont révélé une spécificité plus importante vis à vis des disques intervertébraux pour le composé **GE003098** vectorisé par une chaîne de type triméthylpropylammonium.

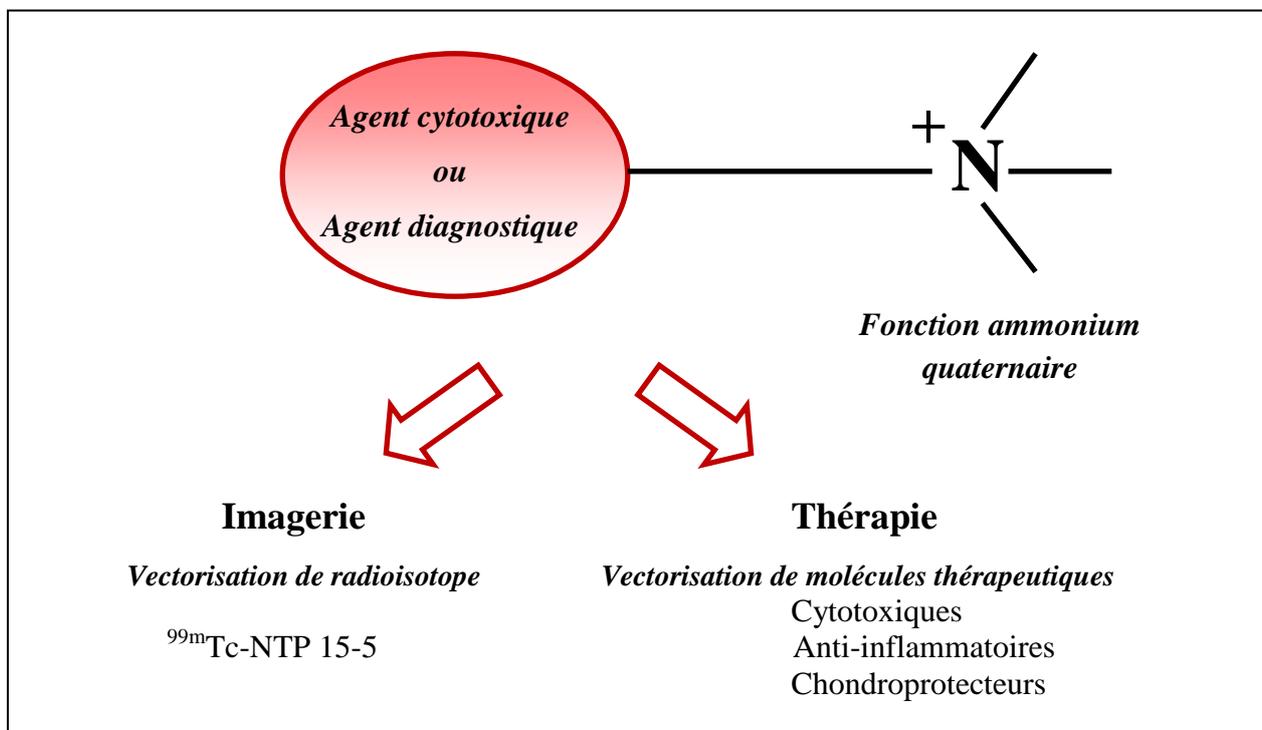


Figure 49 : Stratégie de ciblage des protéoglycanes par la fonction ammonium quaternaire

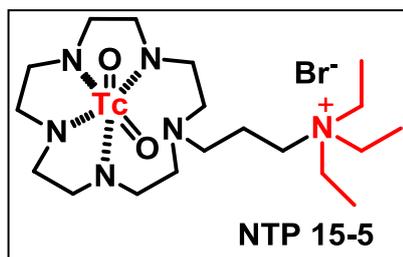


Figure 50 : Structure du $^{99m}\text{Tc-1-}[(\text{triéthylammonio})\text{propyl}]-1,4,7,10,13\text{-pentaazacyclopentadécane}$, le $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$

V. Présentation et contexte du sujet

Le chondrosarcome est une tumeur pour laquelle la prise en charge diagnostique et thérapeutique est particulièrement difficile. A l'heure actuelle aucun traitement chimiothérapeutique ni radiothérapeutique n'a démontré une réelle efficacité. La seule alternative pour les patients reste la chirurgie qui consiste en une exérèse large de la tumeur qui est le plus souvent invalidante. Malheureusement, en cas de récurrence, le pronostic vital des patients est très mauvais.

Dans ce contexte, la stratégie de vectorisation d'agents diagnostiques ou thérapeutiques, par l'intermédiaire d'une fonction ammonium quaternaire qui présente une excellente affinité pour les protéoglycanes du cartilage, revêt alors tout son intérêt [1,3,161,164]. Cette stratégie a été bien développée pour une pathologie dégénérative du cartilage : l'arthrose [165-167].

L'objectif général de ce travail de thèse fut de valider cette stratégie de vectorisation pour la prise en charge du chondrosarcome tant sur le plan diagnostique, avec la validation du radiotracer ^{99m}Tc -NTP 15-5 pour l'imagerie du chondrosarcome, que sur le plan thérapeutique, avec la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux agents cytotoxiques vectorisés par un vecteur ammonium quaternaire.

A. Intérêt du radiotracer ^{99m}Tc -NTP 15-5 pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

Le ^{99m}Tc -1-[(triéthylammonio)propyl]-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécane, ^{99m}Tc -NTP 15-5, est un radiotracer qui combine, via un espaceur (chaîne alkyle) :

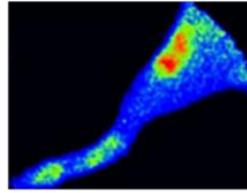
- ↳ une partie vectrice : la fonction ammonium quaternaire responsable de l'affinité pour les protéoglycanes
- ↳ et un macrocycle polyazoté qui vient chélater le technétium 99m (*Figure 50*), isotope de choix pour l'imagerie en médecine nucléaire.

Le ^{99m}Tc -NTP 15-5 a été sélectionné sur la base d'un bon profil pharmacocinétique et d'une bonne stabilité du complexe technétié, tant *in vitro* qu'*in vivo* [161]. En effet, ce dernier ayant été comparé à des radiotraceurs équivalents mais dont le macrocycle possédait moins d'amines secondaires, il a été démontré qu'au moins quatre amines secondaires étaient nécessaires à la stabilité du complexe. Dans ce cas, une quantité moindre de ^{99m}Tc libre dans

Chapitre I – Revue bibliographique



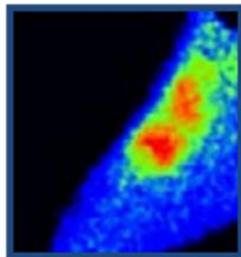
Genou de cobaye,
Autoradiographie



Genou de cobaye sain in vivo
Scintigraphie au $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$

Genou de cobaye in vivo:

Avant méniscectomie



6 mois
après méniscectomie

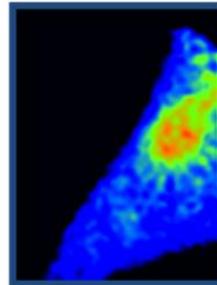


Figure 51 : Images scintigraphiques réalisées après injection de $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ sur des cobayes aux stades J_{50} et J_{180} après méniscectomie du genou de l'articulation arrière gauche [165] 25 MBq par animal, acquisition planaire réalisée à $t + 30$ minutes post injection, durée d'acquisition : 10 minutes

Chapitre I – Revue bibliographique

les urines était retrouvée [161].

Les potentialités du radiopharmaceutique $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$, pour l'imagerie moléculaire *in vivo* du cartilage, ont été validées par notre équipe par de nombreuses études précliniques chez l'animal [165,168,169] :

Chez l'animal sain, l'accumulation et la localisation sélective du traceur au niveau des structures cartilagineuses (à raison de $5,1 \pm 1,7$ % DI/g de tissu) sont à l'origine d'un excellent contraste en imagerie *in vivo* avec un rapport de fixation cartilage / muscle $> 2,5$, et ce, dans différentes espèces animales (rat, souris, cobayes). La fixation sur le cartilage est rapide (dès la 15^{ème} minute post injection) et se maintient au moins 1 h 30. Cette fixation est altérée en situation d'arthrose expérimentale, tant pour le modèle de pathologie aiguë (à la papaine [170]) que pour le modèle chronique (ménisectomie partielle [165]).

Dans le modèle chronique (**Figure 51**), le suivi sur six mois, du rapport scintigraphique (fixation du genou pathologique / fixation du genou contrôle), met en évidence l'existence de deux périodes consécutives : une hyperfixation corrélée à une réaction de compensation réparatrice caractérisée par une synthèse de protéoglycanes, ainsi qu'une hypofixation visualisée aux stades tardifs et corrélée aux défauts du cartilage mise en évidence par analyse anatomopathologique.

Sur des spécimens de genoux humains, l'imagerie TEP / TDM (Tomographie par Emission de Positons couplée à la Tomodensitométrie) réalisée après incubation *ex vivo* a montré une fixation intense et sélective du traceur sur le cartilage [169].

La première partie de ce travail de thèse a donc consisté à évaluer le potentiel et l'intérêt du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ dans la pathologie tumorale du cartilage, le chondrosarcome. Comme développé plus haut, cette tumeur du cartilage se caractérise notamment par une surexpression de protéoglycanes, présentant ainsi une densité accrue de charges négatives. La fixation du radiotracer devrait donc être corrélée au développement tumoral.

Dans le chapitre II "*Intérêt du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome*", nous nous intéressons à la fixation du radiotracer du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ sur différents modèles *in vivo*. Nous étudions sa spécificité de liaison vis à vis de l'agrécan et nous validons son intérêt dans le diagnostic précoce et spécifique du chondrosarcome, le suivi de la pathologie évolutive, ainsi que, l'évaluation de la réponse à la thérapie.

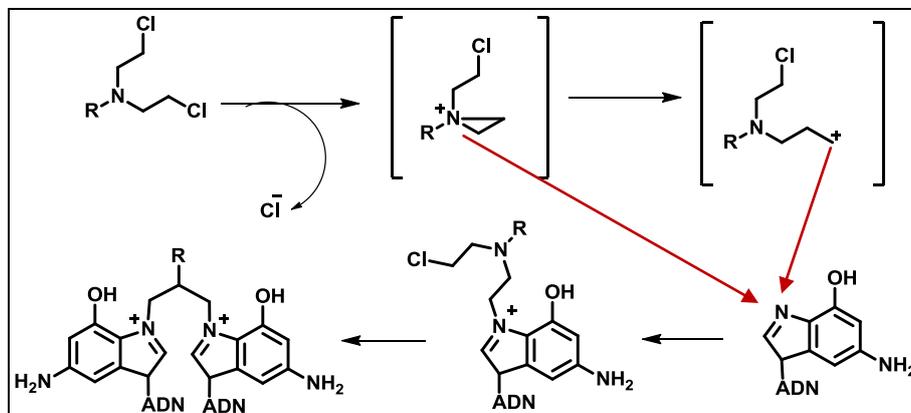


Figure 52 : Mécanisme de l'alkylation bifonctionnelle d'une guanine par une moutarde azotée

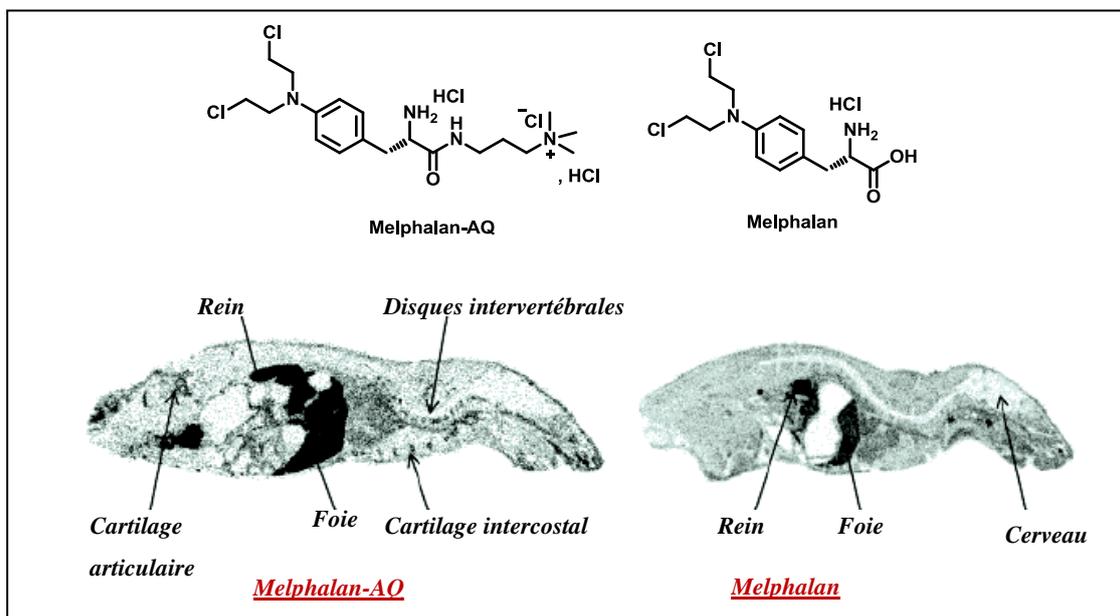


Figure 53 : Etude de biodistribution du melphalan-AQ et du melphalan marqués au carbone 14, Rapp et al. [2]

B. Validation de la stratégie de vectorisation d'agents cytotoxiques par la fonction ammonium quaternaire

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité appliquer la stratégie de vectorisation par la fonction ammonium quaternaire à la vectorisation d'agents cytotoxiques.

Nous espérons ainsi proposer une approche thérapeutique innovante du chondrosarcome.

Afin de valider la preuve de concept de la stratégie de vectorisation, nous avons choisi de vectoriser un agent alkylant, le melphalan.

Le melphalan fait partie des moutardes azotées dont la caractéristique est de posséder deux groupements chloro-éthyle (**Figure 52**). Lors de l'alkylation de l'ADN, les moutardes azotées subissent une cyclisation intramoléculaire de l'une des deux chaînes chloroéthyle formant un ion aziridinium. Cet ion aziridinium peut interagir avec un site nucléophile de l'ADN ce qui peut perturber sa réplication. Le second bras chloroéthyle peut réagir à son tour formant un pont intra-brin ou inter-brin. Les atomes N7 et O6 de la guanine, N1 et N3 de l'adénine et N3 de la cytosine et de la thymine sont les atomes les plus réactifs de l'ADN.

Nous avons choisi le melphalan pour plusieurs raisons : Le melphalan est un agent très cytotoxique et non sélectif. De plus, il possède une structure se prêtant facilement à une fonctionnalisation "ammonium quaternaire" (présence de l'entité amino-acide) et enfin une étude de biodistribution de melphalan quaternisé marqué au carbone 14 avait été réalisée (**Figure 53**) [2] et avait mis en évidence un tropisme très intéressant pour les structures cartilagineuses comparativement au melphalan non vectorisé.

La seconde partie de ce travail de thèse a donc consisté à synthétiser le melphalan-AQ, à évaluer ses propriétés antitumorales comparativement à la molécule parent, (i) *in vitro* en terme de cytotoxicité et d'activité sur le cycle cellulaire puis, (ii) *in vivo*, sur un modèle orthotopique de chondrosarcome de grade II développé chez le rat en terme d'amélioration de l'efficacité antitumorale et de diminution des effets indésirables.

Chapitre I – Revue bibliographique

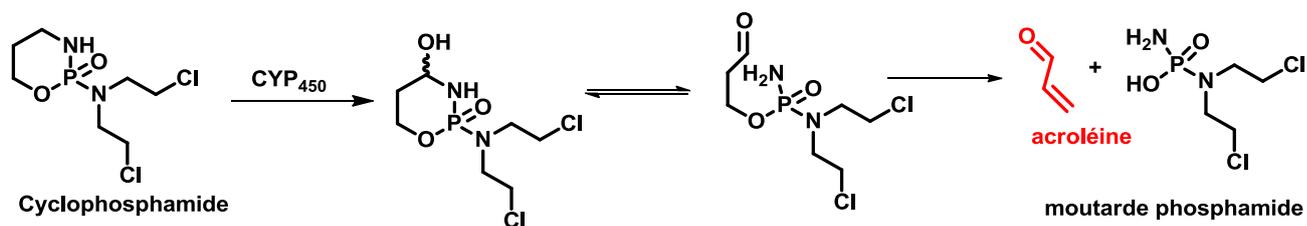


Schéma 6 : Mécanisme d'activation hépatique du cyclophosphamide

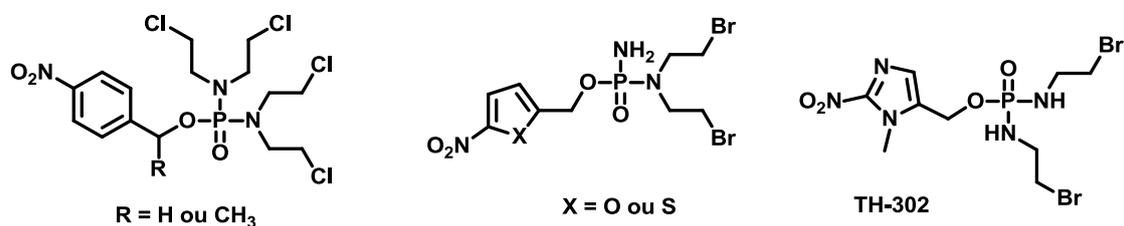


Figure 54 : Exemples de dérivés des phosphoramides

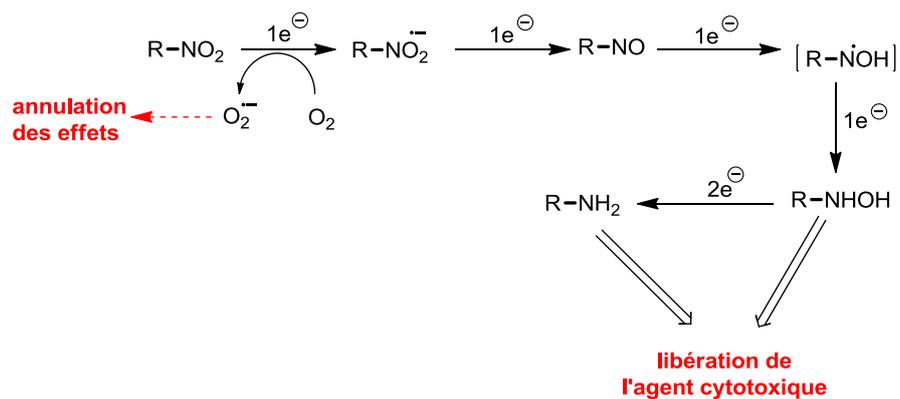


Schéma 7 : Activation réductrice des nitroaromatiques [171]

C. Amélioration de la spécificité des molécules vectorisées par la fonction ammonium quaternaire.

La troisième partie de ce travail de thèse a consisté à appliquer la stratégie de vectorisation par la fonction ammonium quaternaire à une autre famille d'agents alkylants : la famille des phosphoramides, largement utilisés en cancérologie, et dont l'efficacité a été démontrée sur les tumeurs osseuses [172,173].

La famille des phosphoramides comprend, entre autre, le cyclophosphamide (CP), connu sous la spécialité ENDOXAN® et l'ifosfamide (IF), sous la spécialité HOLOXAN®.

Le CP, comme l'IF, sont deux bioprécurseurs. Ce sont des prodrogues qui doivent être métabolisées au niveau hépatique pour exercer leur activité thérapeutique (*Schéma 6*). Cette activation se fait par l'intermédiaire des enzymes de la chaîne oxydative des cytochromes P450 (CYP450) hépatiques qui permettent l'hydroxylation du CP et de l'IF respectivement en 4-hydroxycyclophosphamide et 4-hydroxyifosfamide [174]. Les composés oxydés s'équilibrent avec leurs tautomères, l'aldophosphamide et l'aldoifosfamide, par ouverture du cycle. La β -élimination qui suit permet de libérer les moutardes actives et un composé toxique pour le système urothélial, l'acroléine, qui est responsable d'effets indésirables tels que des cystites hémorragiques. Elle entraîne une inflammation caractérisée par un œdème sous-hépithélial, une infiltration et une activation des cellules inflammatoires, des hémorragies et de la nécrose [175]. Chez les patients atteints d'un cancer, le CP et l'IF sont métabolisés au niveau hépatique, tissu dont l'activité du cytochrome P450 est très importante, puis les moutardes actives sont transportées au niveau tumoral par le flux sanguin.

Afin de diminuer la toxicité des composés de cette famille, Borch *et al.* ont appliqué le concept de prodrogues activables en hypoxie par bioréduction [176,177] à cette famille. Ce concept fut repris et un certain nombre de composés nitroaromatiques activables en hypoxie ont été développés (*Figure 54*) [178,179]. Le TH-302 en est un exemple, cette molécule est dérivée de l'ifosfamide et possède une entité clivable de type nitroimidazole. Elle est actuellement en étude clinique de phase I, en association avec la doxorubicine pour, notamment, le traitement des sarcomes des tissus mous [180].

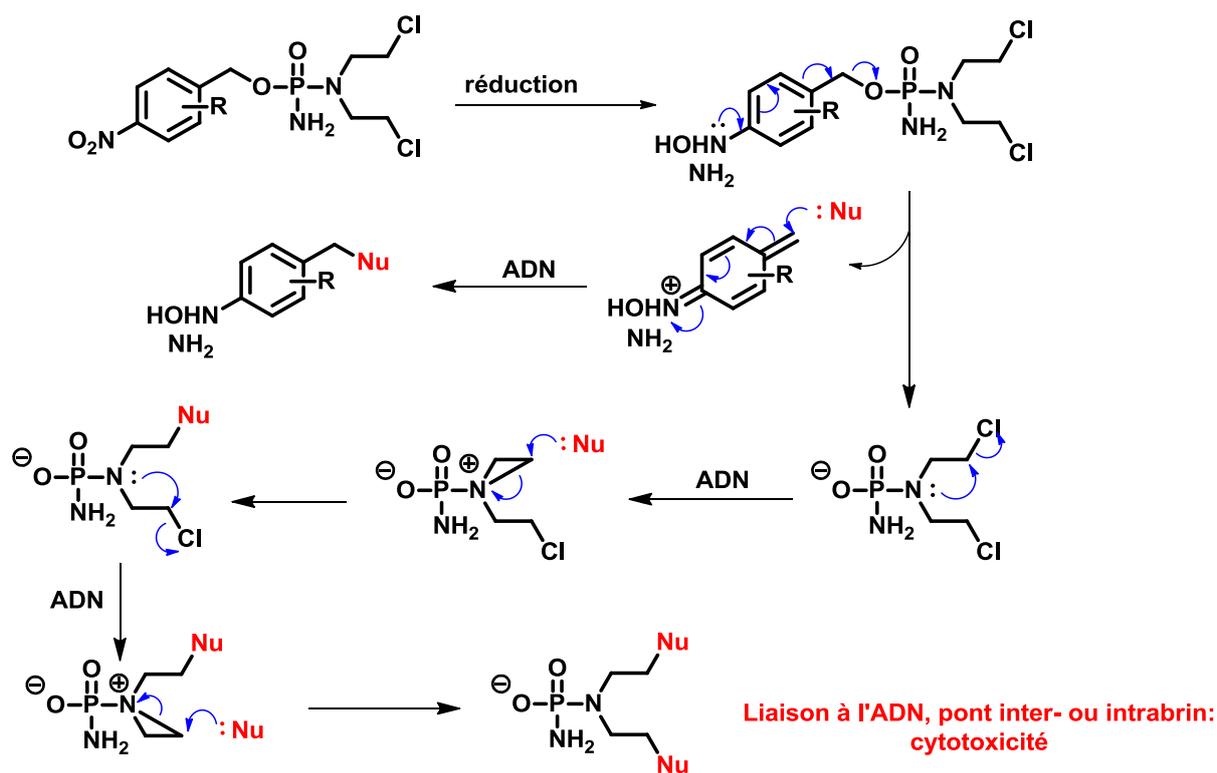


Schéma 8 : Mécanisme d'activation, proposé par Hu et al., d'un dérivé nitobenzylé du cyclophosphamide [181]

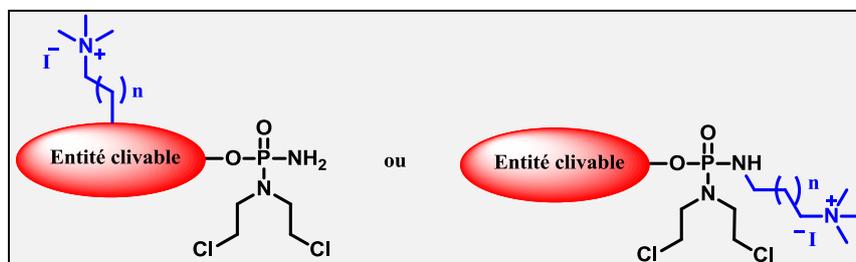


Figure 55 : Vectorisation par la fonction ammonium quaternaire de prodrogues dérivées ducyclophosphamide et activables en hypoxie

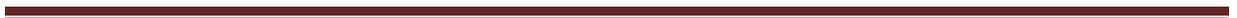
Chapitre I – Revue bibliographique

L'activation des composés s'effectue dans un environnement réducteur (hypoxie ou enzymes réductrices), le groupement nitro des prodrogues est alors réduit par une série de réductions en hydroxylamine (4 électrons nécessaires) et en amine (6 électrons nécessaires) (*Schéma 7*). Cette modification entraîne une délocalisation électronique qui conduit au clivage de la liaison C-O et s'ensuit alors la libération de l'agent cytotoxique (*Schéma 8*) [181]. Notons qu'en aérobie, la première étape de la réduction est réversible et ne permet pas la réduction de la molécule et donc la libération de l'entité active.

Ce travail de thèse a consisté à exploiter ce concept de prodrogues activables en hypoxie et à la combiner avec notre stratégie de vectorisation pour la famille des phosphoramides. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à des dérivés du cyclophosphamide (*Figure 55*) et avons greffé le vecteur ammonium quaternaire soit sur la partie clivable, soit sur la partie alkylante, la position du vecteur pouvant influencer la pénétration intracellulaire et donc l'activité cytotoxique. En effet, le clivage libérerait soit une entité active seule, soit une entité active portant le vecteur ammonium quaternaire..

Le chapitre IV décrit la synthèse de dérivés du cyclophosphamide vectorisés par un ammonium quaternaire et possédant des entités clivables de type nitrophényle, nitroimidazole ou nitrofurane. Ce chapitre présente également l'évaluation biologique des dérivés portant le vecteur sur l'entité active avec l'évaluation de leur stabilité *in vitro*, la détermination de leur cinétique de clivage en milieu réducteur suivie par RMN ^{31}P , les résultats de leur étude *in vitro* en terme de cytotoxicité en condition hypoxique et normoxique, ainsi que de leur évaluation *in vivo* sur un modèle de xénogreffe de chondrosarcome humain sur souris SCID.

Chapitre I – Revue bibliographique



Chapitre II

***Intérêt du radiotracteur
 $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le
diagnostic et le suivi du
chondrosarcome***

Chapitre II – *Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome*



I. Etude de captation cellulaire du radiotracer

$^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$

A. Culture cellulaire

Les études de captation ont été réalisées sur trois lignées cellulaires :

- ↪ **La lignée HEMC-SS** (chondrosarcome humain, ECACC, Salisbury, UK) cultivée dans un milieu DMEM/F12 (v/v) (Dutcher, Brumath, France) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (Biowest, Nuaille, France), 4 mg/L de gentamicine (Dutcher) et 2 mM de glutamine (Fischer, Illkirch, France).
- ↪ **La lignée B16F0** (mélanome murin, ATCC, Manassas, USA) cultivée dans un milieu DMEM+glutamax (Gibco) supplémenté par 4 mg/L de gentamicine, 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % mL de vitamines 100 X (Gibco), 1 % de pyruvate de sodium 100 mM et 1 % d'acide aminés non essentiels 100 X.
- ↪ **La lignée SWARM** (chondrosarcome de rat) obtenue après prélèvement de la tumeur d'un rat porteur de chondrosarcome Swarm. La mise en culture a été réalisée comme suit : Un fragment de tumeur était prélevé le plus stérilement possible. L'échantillon de tumeur était alors haché finement à l'aide d'un scalpel dans une boîte de pétri stérile puis transféré dans un tube falcon stérile. 1 mL de collagénase A (1 mg/mL dans du PBS) était alors ajouté puis la suspension était laissée à 37 °C pendant 45 minutes en agitant toutes les dix minutes. 10 mL de trypsine 0,25 % étaient ensuite ajoutés et la suspension était remise une heure à 37 °C en agitant, de nouveau, toutes les dix minutes. Le milieu était finalement centrifugé cinq minutes à 1600 g, puis lavé deux fois avec du milieu DMEM/F12. Le culot était alors repris par le même milieu de culture que la lignée HEMC-SS, puis les flasquesensemencées à raison de 50 000 cellules par cm^2 . Les cellules étaient cultivées à 37 °C, 5 % de CO_2 .

B. Protocole de l'étude

Des boîtes de pétri de 20 cm^2 ont étéensemencées à raison de 100000 cellules dans 5 ml de milieu, puis, laissées à l'étuve pendant 24 heures. Le lendemain, après changement du

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

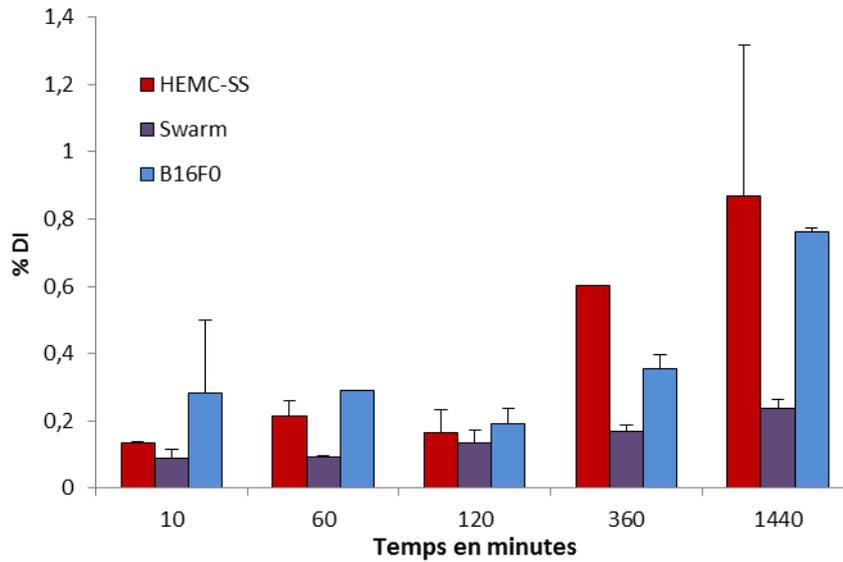


Figure 56 : Pourcentage de Dose Incubée (compartiment 1 + 2) pour les lignées HEMC-SS, Swarm et B16F0

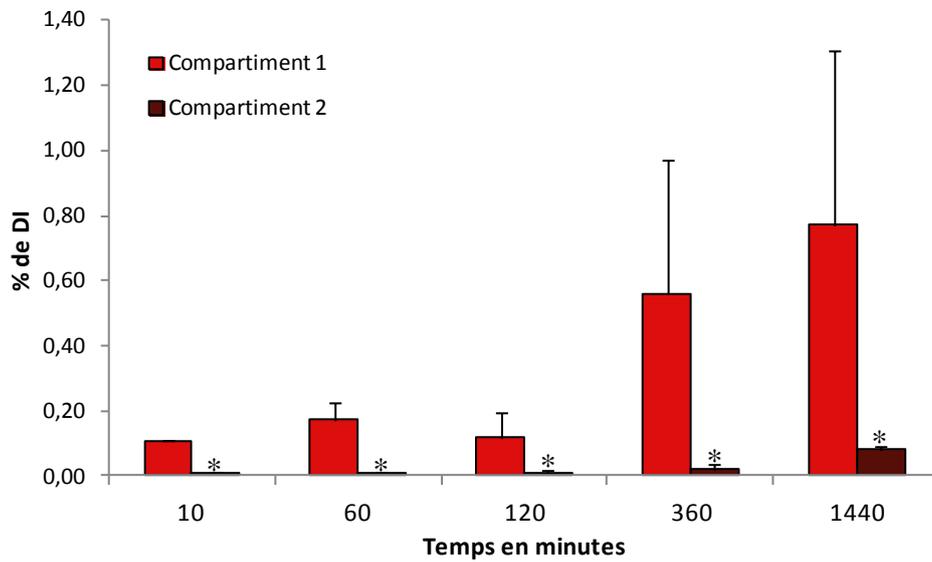


Figure 57 : Pourcentage de D.I. (Dose Incubée) du compartiment 1 et du compartiment 2 après centrifugation pour la lignée HEMC-SS

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

milieu, 20 μCi de $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ étaient ajoutés dans chacune des boîtes de pétri qui étaient ensuite incubées à 37 °C. Après le temps d'incubation désiré (10 minutes, 1 heure, 2 heures ou six heures), le surnageant était rapidement éliminé et le tapis cellulaire rincé par 2 x 5 ml de PBS à 4 °C.

Dans un premier temps, le tapis cellulaire était décollé à l'aide d'un grattoir, récupéré puis l'activité de l'échantillon était compté au compteur 1480 WIZARD 3"Automatic Gamma Counter" (Perkin Elmer) (compartiment 1 + 2).

Dans un deuxième temps, l'ensemble était centrifugé (10000 rpm, 5 minutes, 4°C). Ainsi, le surnageant (compartiment 1) et le culot cellulaire repris dans 1 ml de PBS (compartiment 2) étaient comptés séparément.

C. Résultats

Nous nous sommes intéressés, dans un premier temps à l'activité du culot avec son surnageant (compartiment 1 + 2) (**Figure 56**). Les résultats montrent que le pourcentage de dose incubée augmente au cours du temps pour les trois lignées. Au temps 24 h, ce pourcentage atteint $0,87 \pm 0,45$ % pour la lignée HEMC-SS, $0,24 \pm 0,03$ % pour la lignée Swarm et $0,76 \pm 0,01$ % pour la lignée B16F0.

Après centrifugation, les activités du culot (compartiment 1) et du surnageant (compartiment 2) sont comptés (**Figure 57**). Les résultats montrent, pour la lignée HEMC-SS, une importante accumulation du radiotracteur dans le surnageant. En effet, le pourcentage de DI est de $0,85 \pm 0,53$ % pour le surnageant et de $0,07 \pm 0,01$ % pour le culot. Le radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ ne semble pas pénétrer dans les cellules, la quasi-totalité de l'activité se retrouvant dans le surnageant.

Chapitre II – Intérêt du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

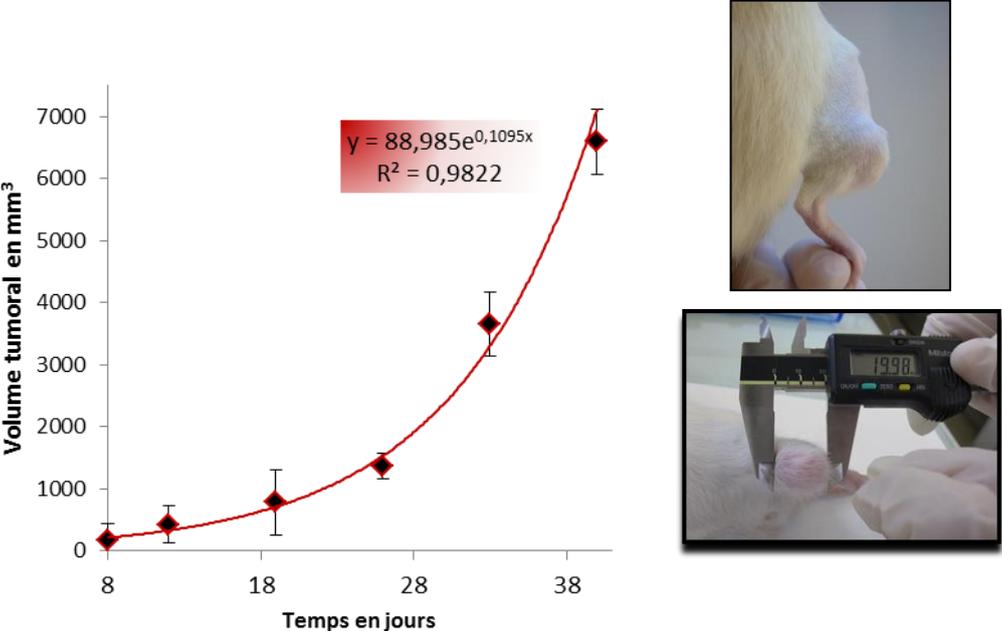


Figure 58 : Evolution du volume tumoral mesuré au pied à coulisse du modèle SRC
L'évolution suit une croissance exponentielle

II. Etudes in vivo

A. Les modèles d'études

Les expérimentations ont été réalisées selon les lignes directrices pour les soins et l'utilisation des animaux de laboratoire (National Research Council, 1996), ainsi que les directives européennes 86/809/EEC. Les protocoles ont été réalisés avec l'autorisation de la direction des services vétérinaires (Autorisation N°C63-113-10), selon les recommandations des institutions pour l'utilisation des animaux de laboratoires et les guidelines relatives à l'expérimentation en cancérologie [182].

1. Le modèle Swarm

a. Présentation et réalisation du modèle

La tumeur a été décrite dans les années 60 [183] et provient d'une tumeur étant apparue subitement sur une femelle Sprague Dawley. Cette tumeur a été maintenue durant plusieurs années par une série de transplantations sous-cutanées.

Un modèle orthotopique a été développé par l'UMR S957 Inserm. Il consiste à implanter sous anesthésie générale, un fragment de tumeur Swarm au contact de la surface corticale de la diaphyse du tibia, après avivement du périoste. L'implantation est réalisée à l'UMR S957 Inserm (Dr F. Rédini, Nantes). Les fragments de tumeur du modèle swarm de chondrosarcome (SRC) proviennent du DCTD Tumor Repository (Frederick, Maryland, USA) et sont conservés congelés jusqu'à utilisation. Lors de l'implantation des tumeurs, les rats sont anesthésiés par inhalation d'une combinaison d'isoflurane (Abbott, France)/air (1,5 %, 1 L/min) avec injection en intramusculaire d'une dose de kétamine à 100 mg/kg (Imalgène, Rhône Mérieux, France). La transplantation est réalisée sur chaque rat au niveau de la patte arrière droite, l'autre patte servant de contrôle [149]. Ce modèle est bien décrit et très utilisé pour l'étude du chondrosarcome [148,149,184]

b. Caractérisation du modèle Swarm implanté en situation orthotopique

La croissance tumorale

Après l'implantation, les animaux (n = 12) sont suivis pendant une période de quarante jours par mesure du volume tumoral au pied à coulisse (**Figure 58**). Le volume tumoral (**VT**), à un

Chapitre II – Intérêt du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

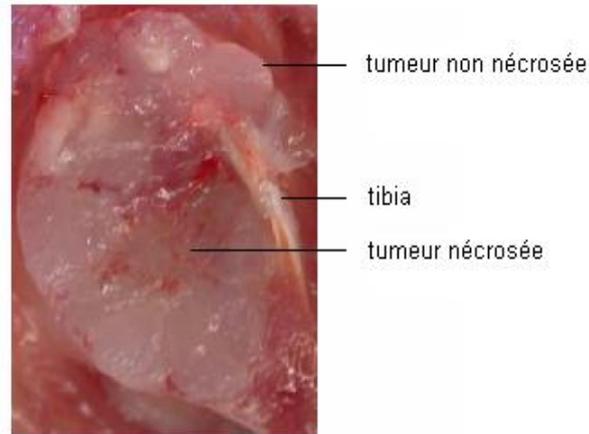


Figure 59 : Architecture lobulaire d'un chondrosarcome de rat Swarm

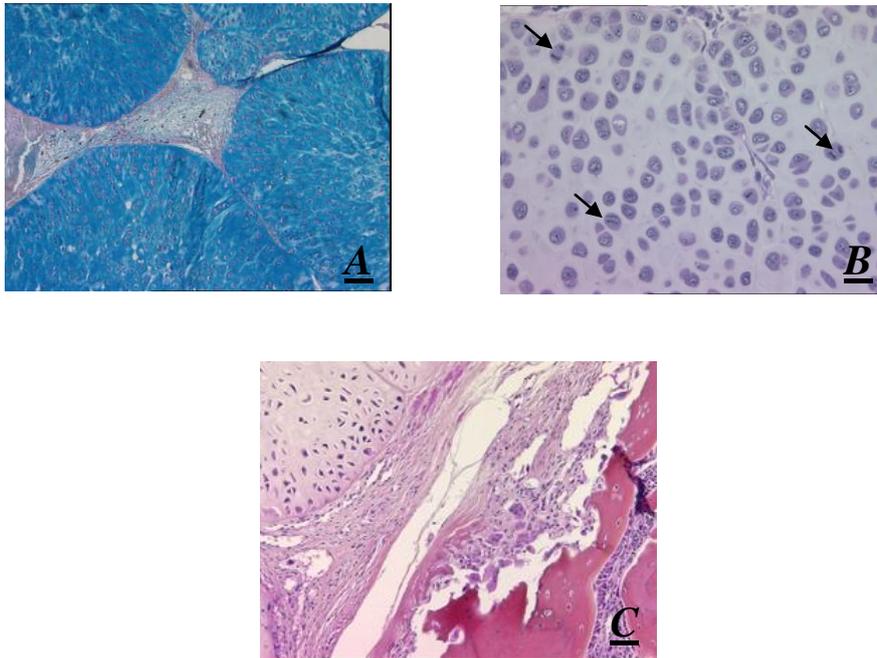


Figure 60 : Analyses histologiques de tumeur de SRC

A : Coloration au bleu alcian, grossissement x 5 : Importante densité en protéoglycanes.

B : Coloration HES (Haematoxyline Eosine Safran), grossissement x 20 : Activité mitotique importante.

C : Coloration HES, grossissement x 10 : Observation de phénomènes ostéolytiques

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

stade donné, est estimé par la mesure au pied à coulisse des deux dimensions de la tumeur, selon la formule : $VT (mm^3) = (L \times l^2)/2$, avec "L" : longueur en mm et "l" : largeur en mm.

La tumeur devient palpable et mesurable entre le stade J₈ et J₁₀ post implantation (*Figure 58*). La croissance tumorale suit alors une loi exponentielle avec un très bon coefficient de corrélation ($r = 0,9911$) et un temps de doublement d'environ 6,3 jours. Au stade J₄₀, la tumeur atteint un volume de $6594 \pm 523 \text{ mm}^3$.

L'anatomopathologie du tissu

Les analyses anatomopathologiques des tissus ont été réalisées par le Dr M.M. Dauplat au Centre Jean Perrin de Clermont-Ferrand.

Macroscopiquement, le tissu tumoral présente un aspect lobulaire (*Figure 59*) délimité par de fins septa.

La cellularité et l'activité mitotique observées sont très importantes (critères de malignité) (*Figure 60, B*). La vascularisation est peu présente. Le tissu ressemble, histologiquement, à un chondrosarcome humain bien différencié présentant des atypies cellulaires (grade II) et contenant du collagène (essentiellement de type II) pour 50 % de la totalité des protéines. Ce tissu possède également des caractéristiques chondrogéniques, et notamment, une densité importante en protéoglycanes mise en évidence par coloration au bleu alcian (*Figure 60, A*).

A un stade avancé, J₄₀, des phénomènes d'envahissement des tissus environnants et d'ostéolyse sont observés (*Figure 60, C*).

Le dosage des protéoglycanes

Le dosage biochimique des protéoglycanes du tissu tumoral pour le modèle Swarm (cf. protocole expliqué p 79) a été réalisé au stade tardif J₄₅ (*Figure 61*). Le taux moyen de protéoglycanes pour ce modèle est alors de $7,46 \pm 2,01 \mu\text{g}$ de PG/mg de tumeur soit, un taux 16,5 fois plus important que le taux moyen de protéoglycanes dans un modèle tumoral non chondrogénique de mélanome murin implanté sur souris C57BL6J (inoculation en sous cutanée de 3.10^5 cellules pour 100 μL de PBS) et dont la teneur est de $0,45 \pm 0,12 \mu\text{g}$ de PG/mg de tumeur au stade avancé J₂₀ post inoculation.

2. Le modèle sham

Des rats sprague Dawley ($n = 5$) sont opérés, au niveau de la patte droite postérieure

Chapitre II – Intérêt du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

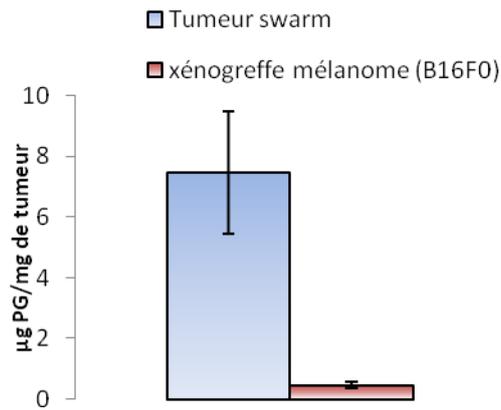


Figure 61 : Dosage biochimique du taux de protéoglycanes de tumeurs de chondrosarcome (SRC) au stade J_{45} post implantation et de tumeurs de mélanome murin B16F0 au stade J_{20} post inoculation

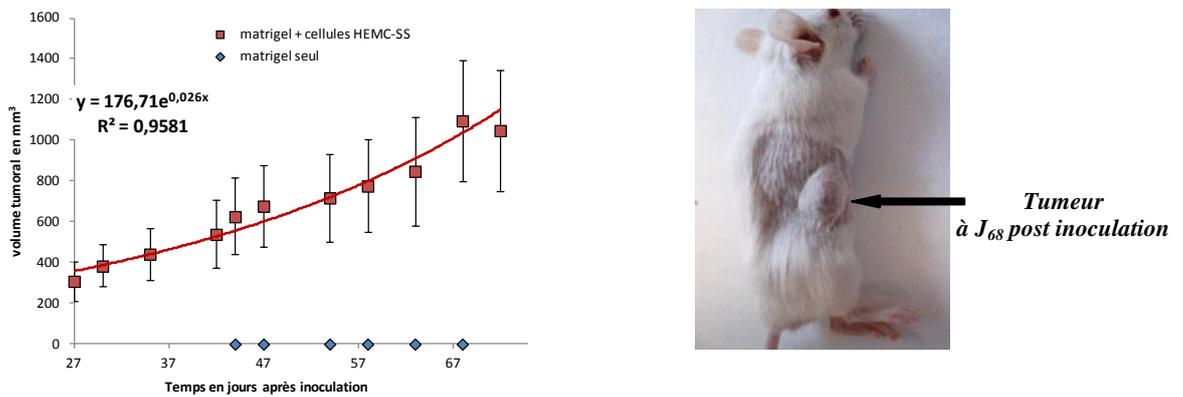


Figure 62 : Croissance du modèle de xénogreffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) sur souris SCID au cours du temps

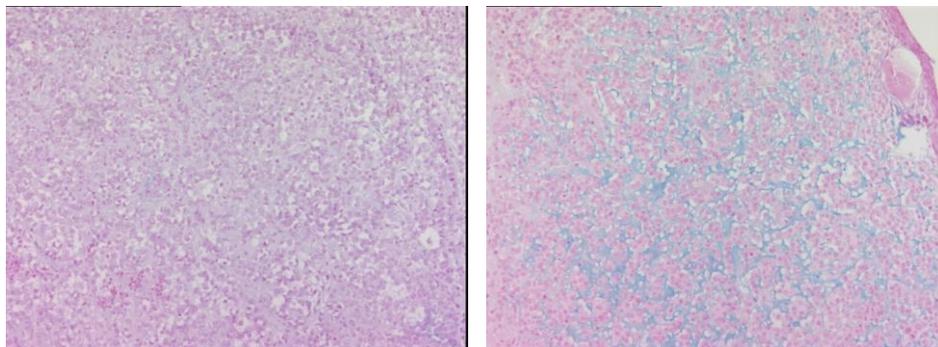


Figure 63 : Analyse anatomopathologique d'une xénogreffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) implantée sur souris SCID – coloration au bleu alcian, grossissement x 10
La fixation du bleu alcian est faible

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

mais, pour ce modèle, aucun fragment de tumeur n'est implanté.

3. Le modèle de xéno greffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) sur souris SCID

a. Réalisation du modèle

Une suspension, de dix millions de cellules HEMC-SS réalisée dans 100 μL de PBS ajoutés à 100 μL de matrigel (BD Biosciences), est inoculée en situation sous cutanée à des souris immunodéprimée SCID (Charles River). L'intervention est réalisée sous anesthésie par inhalation d'isoflurane (CSP, Cournon d'Auvergne, France) dans l'air (1,5 %, 1 L/min).

b. Caractérisation du modèle

La croissance tumorale

Le suivi du volume tumoral est réalisé sur dix animaux par la mesure des deux dimensions de la tumeur au pied à coulisse (**Figure 62**). Pour ce modèle, la tumeur apparaît tardivement, elle n'est palpable qu'à partir du 27^{ème} jour. Sa croissance, qui suit une loi exponentielle avec un très bon coefficient de corrélation ($r = 0,9788$), est relativement lente puisque le temps de doublement estimé est de 26,7 jours. Deux mois après inoculation des cellules, au stade J₆₃, le volume moyen de la tumeur atteint $849 \pm 267 \text{ mm}^3$.

L'anatomopathologie du tissu

Les analyses anatomopathologiques du tissu mettent en évidence une cellularité importante. La coloration au bleu alcian est faible (**Figure 63**).

Le dosage des protéoglycanes

Le dosage biochimique des tumeurs montre que les tissus contiennent peu de protéoglycanes, en effet la valeur moyenne du taux du protéoglycanes est évaluée à $0,23 \pm 0,04 \mu\text{g}$ de protéoglycanes/mg de tumeur. Ce résultat est en accord avec la faible intensité de fixation au bleu alcian observé ci-dessus.

Contrairement au modèle Swarm, le modèle de xéno greffe de chondrosarcome humain sur souris SCID serait donc caractérisé par une densité faible en protéoglycanes.

Chapitre II – *Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome*



B. Les scintigraphies au $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le modèle Swarm orthotopique

Les imageries scintigraphiques *in vivo* sont réalisées en utilisant une gamma-caméra petit animal (CsI(Na)crystal) équipée d'un collimateur à trous parallèles 1,3/0,2/35 (diamètre du trou / épaisseur des septa / hauteur en mm) (gammaimager, Biospace, France). Toutes les acquisitions sont réalisées avec une fenêtre de 15 % centrée sur le pic photoélectrique du ^{99m}Tc à 140 keV. Chaque rat est soumis à des examens scintigraphiques à différents stades au cours du développement tumoral. Le radiotracer est préparé et marqué comme publié précédemment [108,109], puis administré en i.v. (30 MBq/animal) à des animaux anesthésiés en intrapéritonéal (i.p.) avec un mélange de kétamine (50 mg/kg) (Imalgène 500, Merial, France) et de xylazine (10 mg/kg) (Rompun 2 %, Bayer, France). Deux types d'acquisitions planaires sont réalisées :

- ↳ Des acquisitions statiques d'une durée de dix minutes réalisées trente minutes après injection du traceur.
- ↳ Des acquisitions dynamiques réalisées dès l'injection du radiotracer sur quatre-vingt-dix minutes échantillonnées par tranches de trente secondes.

Les scintigraphies sont considérées comme positives lorsqu'une fixation est observée au niveau du site d'implantation tumorale. Toutes les images sont évaluées par le même expérimentateur et en utilisant des régions d'intérêt fixes (ROIs) délimitées au niveau tumoral, cartilage ou musculaire. Pour chaque ROI, l'activité totale en coups par minute (cpm) est normalisée par rapport à la dose injectée et corrigée de la décroissance.

A un stade déterminé et pour chaque animal, deux paramètres sont calculés :

$$T/M = \text{Activité surfacique tumorale} / \text{Activité surfacique musculaire}$$

$$T/C = \text{Activité surfacique tumorale} / \text{activité surfacique du cartilage.}$$

Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm la déviation standard.

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

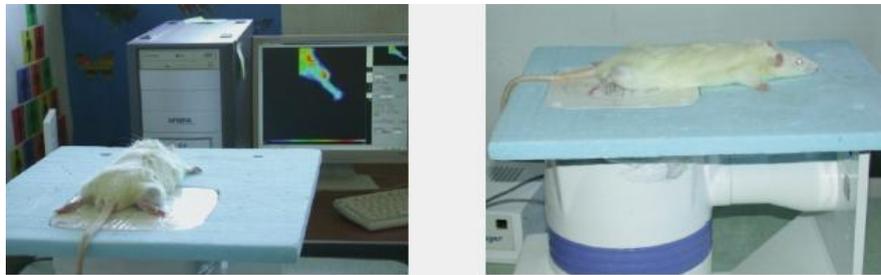


Figure 64 : Positionnement d'un rat sur la gamma-camera pour l'imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$

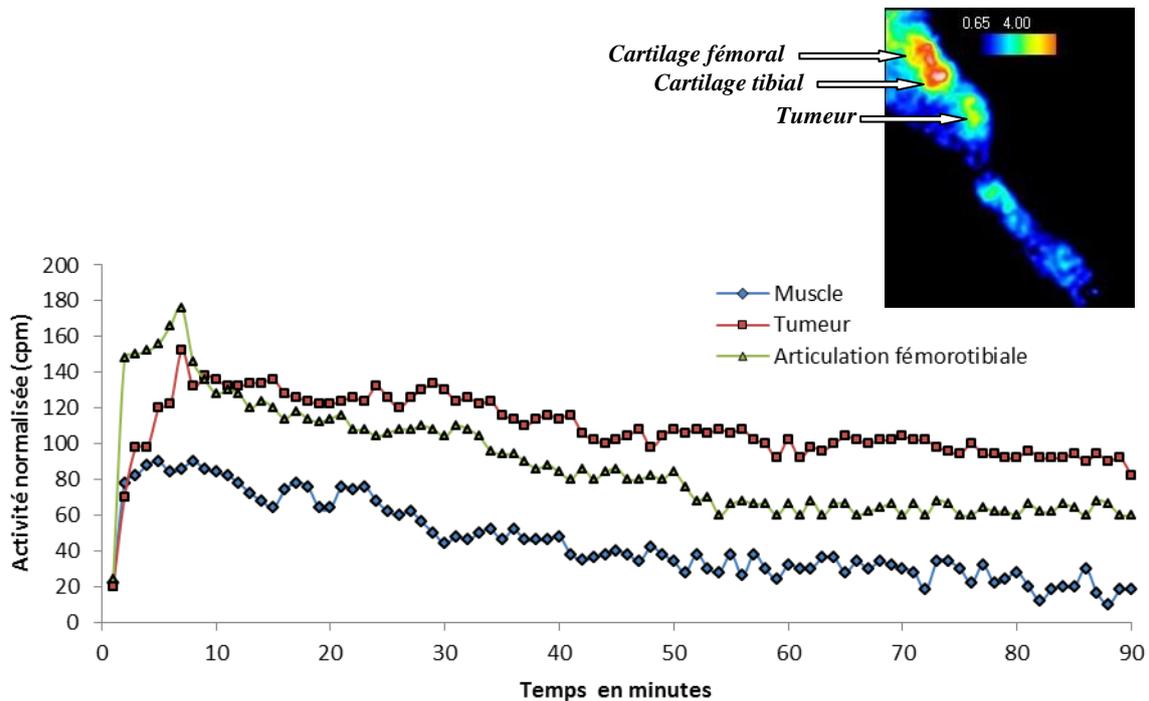


Figure 65 : Distribution in vivo du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ chez des rats porteurs de chondrosarcome, acquisitions planaires et dynamiques

Les valeurs présentées correspondent à la moyenne déterminée sur cinq animaux. Pour des raisons de lisibilité, les écarts types n'ont pas été représentés.

C. L'accumulation du radiotracteur au niveau du tissu tumoral

1. Une accumulation rapide in vivo

a. Les animaux

Une étude de distribution du radiotracteur en temps réel sur quatre-vingt-dix minutes a été réalisée, sur cinq rats au stade tumoral J₂₀ post implantation. Le volume moyen des tumeurs était alors de $949 \pm 223 \text{ mm}^3$.

b. Les résultats

Les courbes "activité-temps" obtenues (**Figure 65**) mettent en évidence une accumulation rapide du traceur au niveau de la tumeur avec un pic atteint sept minutes après l'injection et un plateau qui débute vers quinze minutes et qui se poursuit jusqu'à la fin des acquisitions. La valeur moyenne du rapport T/M, paramètre gouvernant le contraste de l'imagerie, se maintient à une valeur de $2,91 \pm 0,58$ sur la totalité du suivi. A partir du temps trente minutes, l'activité tumorale est supérieure à l'activité de l'articulation fémorotibiale ($T/C = 1,43 \pm 0,16$).

2. Une accumulation tissulaire spécifique

a. Les animaux

Une étude de distribution par prélèvement du radiotracteur a été réalisée sur le modèle SRC au stade J₄₀ post implantation à 30, 60 et 180 minutes après injection du radiotracteur. A ce stade, les tumeurs pesaient entre 4 et 6 g. Nous avons alors déterminé, pour différents organes, le pourcentage de Dose Injectée (DI).

b. Les résultats

Les résultats (**Figure 66**) mettent en évidence une accumulation spécifique au niveau du cartilage articulaire (tête humérale, articulation fémorotibiale) et au niveau de la tumeur, ainsi qu'une accumulation non-spécifique au niveau des reins. Les os et le muscle, quant à eux, ne semblent pas fixer le traceur.

Chapitre II – Intérêt du radiotraceur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

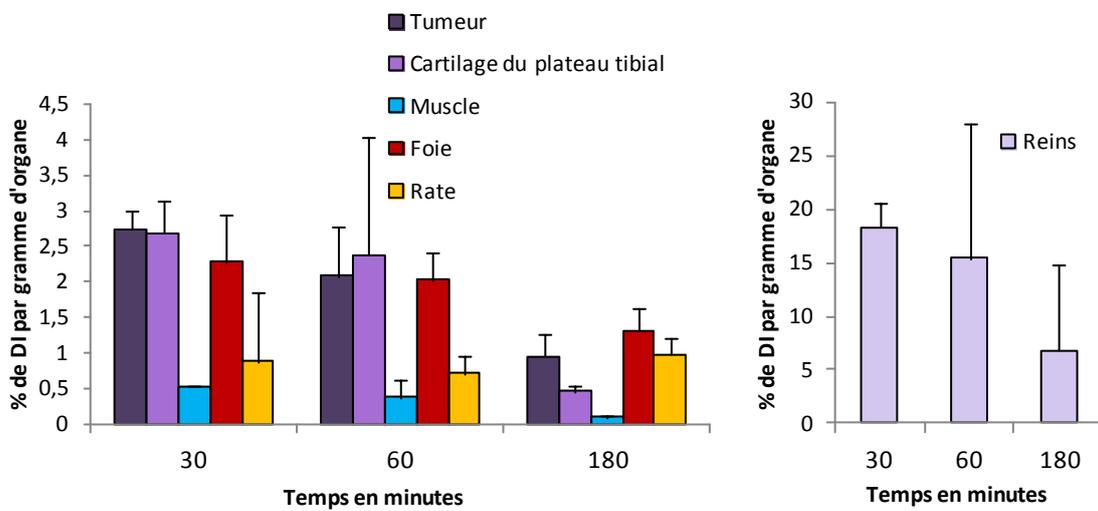
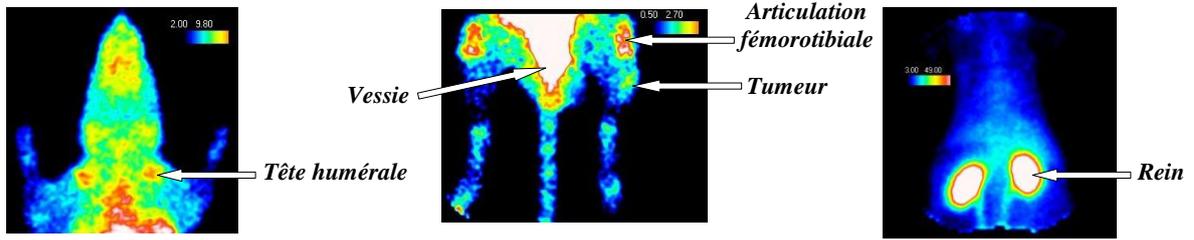


Figure 66 : Pourcentage de DI (Dose Injectée) par gramme de tumeur à 30, 60 et 180 minutes après l'injection.

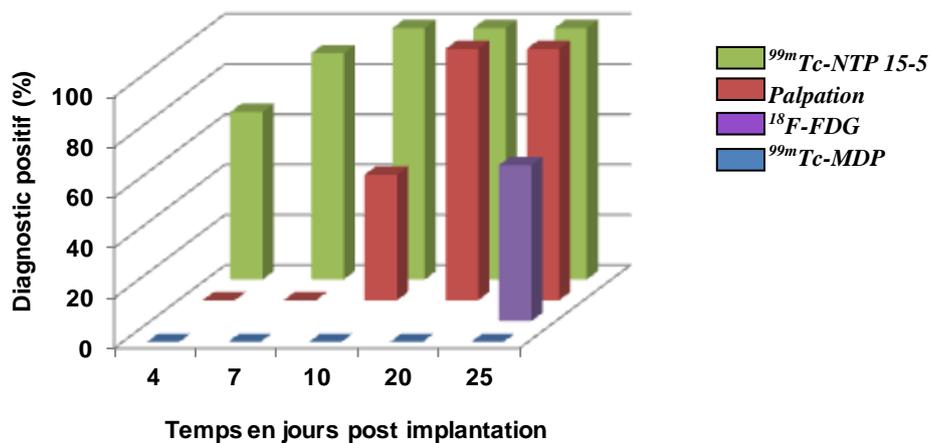


Figure 67 : Taux de rats diagnostiqués positifs au chondrosarcome selon le stade du développement tumoral et la technique : Scintigraphies au $^{99m}\text{Tc-HMDP}$, Scintigraphies au $^{18}\text{F-FDG}$, palpation, ou Scintigraphies au $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

Trente minutes après l'injection du radiotracteur, la captation tumorale est évaluée à $2,75 \pm 0,25$ % DI/g de tissu contre $0,52 \pm 0,02$ % DI/g de tissu pour le muscle. De plus, les résultats montrent qu'au temps 180 minutes, la fixation est toujours plus importante dans les structures cartilagineuses que dans le muscle (tumeur : $0,95 \pm 0,32$ % DI/g de tissu ; muscle : $0,10 \pm 0,01$ % DI/g de tissu).

La fixation importante au niveau du rein et de la vessie témoigne d'une élimination urinaire rapide. En effet, dès le temps trente minutes, le pourcentage de DI/g de tissu pour les reins est de $18,3 \pm 2,27$ %.

3. L'imagerie et le développement tumoral

Des rats porteurs de chondrosarcome sont suivis régulièrement au cours du développement tumoral à partir du stade J₄ post implantation par (i) des scintigraphies au $^{99m}\text{Tc NTP 15-5}$, par (ii) la mesure du volume tumoral au pied à coulisse, par (iii) des scintigraphies au $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ et, enfin, (iv) par imagerie TEP au $^{18}\text{F-FDG}$ (*Figure 67 et Figure 68*).

Les caractéristiques de l'imagerie sont les suivantes :

- **Imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$:** Injection en i.v. de 30 MBq par animal, acquisitions planaires à t + 30 minutes post injection, acquisition sur chaque patte positionnée sur le collimateur de la gamma-caméra, durée d'acquisition : 10 minutes, fenêtre d'énergie : $140 \text{ keV} \pm 15$ %.
- **Imagerie $^{99m}\text{Tc-HMDP}$:** Injection en i.v. de 30 MBq par animal, acquisitions à t + 2 heures post injection.
- **Imagerie $^{18}\text{F-FDG}$:** Injection en i.v. de 20 MBq par animal, acquisitions à t + 45 minutes post injection, acquisitions centrée sur les deux pattes / deux positions de lit, durée d'acquisition : 15 à 20 minutes, fenêtre d'énergie : [250 – 700] keV.

Capacités de diagnostic de l'imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ (*Figure 67*)

Alors que la tumeur n'est palpable qu'à partir du stade J₁₀ pour 50 % des rats, une fixation du radiotracteur est observée à un stade précoce lors du développement tumoral, le stade J₄ post implantation, et ce, pour 67 % des rats.

En ce qui concerne le $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ et le $^{18}\text{F-FDG}$ qui font tous deux partie des

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

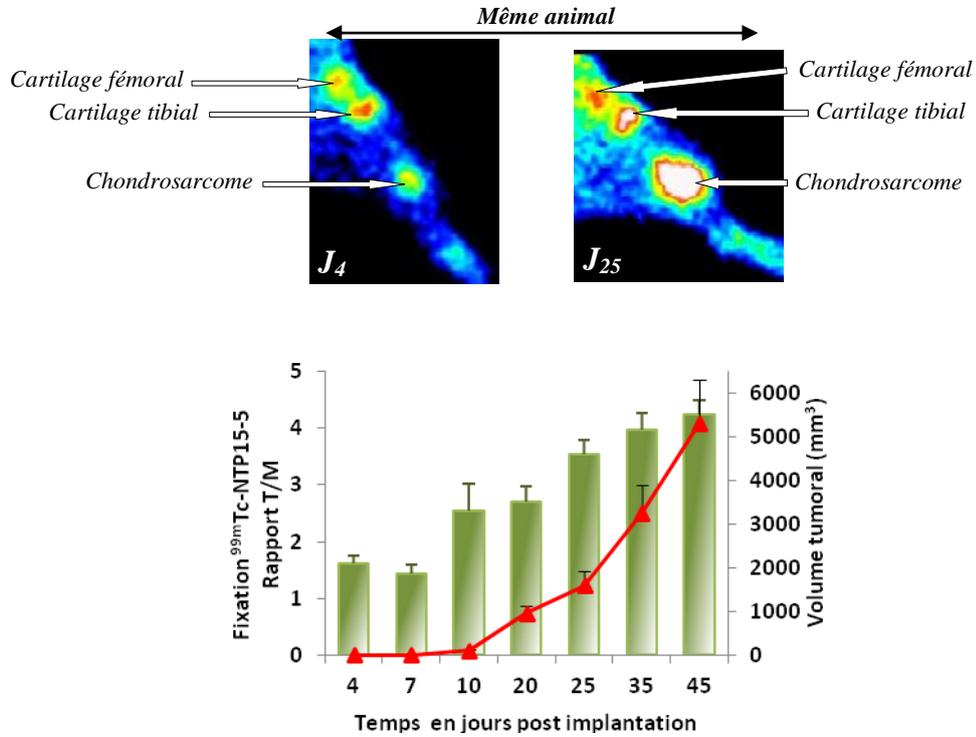


Figure 68 : Fixation du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ au cours du développement tumoral

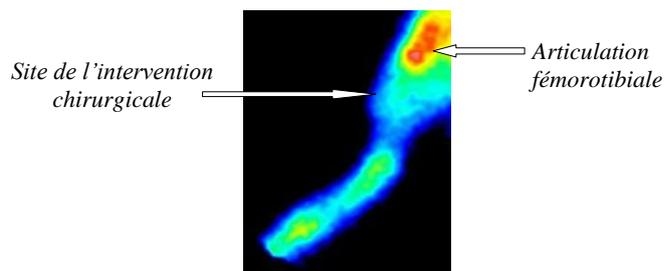


Figure 69 : Imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ des rats Shams au stade J_4 post intervention
Aucune fixation du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ n'est observée au niveau du site de l'intervention chirurgicale

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

radiotraceurs disponibles actuellement pour l'imagerie du chondrosarcome, leur fixation respective se révèle être relativement faible, voir absente.

En effet, concernant l'imagerie $^{99m}\text{Tc-HMDP}$, les scintigraphies se révèlent être négatives quelque soit le stade tumoral. Pour le $^{18}\text{F-FDG}$, l'imagerie réalisée au stade J₂₅ post implantation permet de diagnostiquer 62 % des rats alors que la tumeur est pourtant palpable chez tous les animaux.

Capacités de suivi du développement tumoral de l'imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ (Figure 68)

La fixation du radiotracteur est étroitement corrélée avec le développement tumoral. En effet, au stade J₄, le rapport T/M est de $1,61 \pm 0,14$ alors que la tumeur est non palpable. Ce rapport de fixation augmente ensuite avec le développement tumoral jusqu'à atteindre, au stade J₄₅, une valeur de $4,25 \pm 0,25$ pour un volume tumoral de $5,31.10^3 \pm 1,31.10^3 \text{ mm}^3$.

Contrairement au $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ et au $^{18}\text{F-FDG}$, le $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ peut donc fixer une tumeur de chondrosarcome dès le stade J₄, alors que cette tumeur n'est ni palpable, ni mesurable. De plus sa fixation est corrélée avec le développement tumoral. Ces résultats soulignent ainsi le potentiel du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome.

4. Une accumulation spécifique

a. Absence de fixation chez les Shams

Nous avons souhaité vérifier, ici, que la fixation du tissu observée à partir du stade J₄ post implantation n'était pas due à l'intervention chirurgicale qui aurait pu engendrer un phénomène inflammatoire. Des scintigraphies ont donc été réalisées régulièrement pendant cinquante jours sur le modèle de rat Sham décrit précédemment p50.

Aucune fixation n'est observée au niveau du site de l'intervention chirurgicale au stade J₄, ni, d'ailleurs, à aucun stade post chirurgie (**Figure 69**).

Chapitre II – Intérêt du radiotraceur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

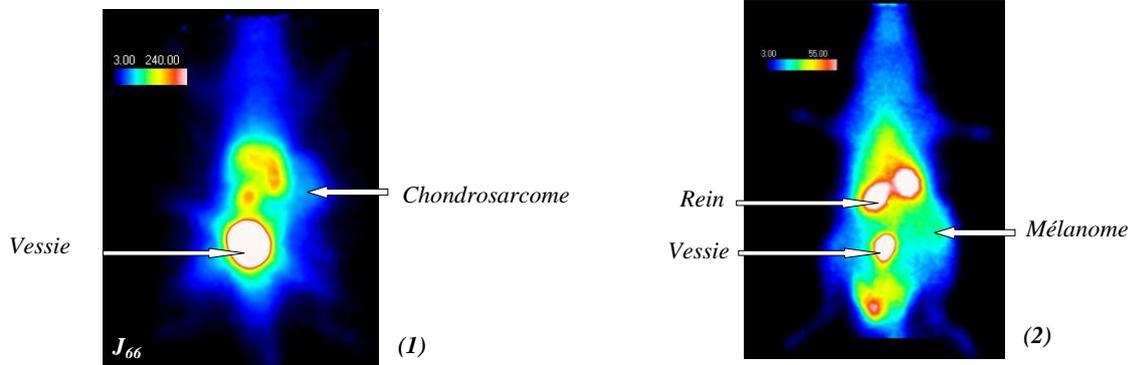


Figure 70 : Imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ sur une xéno greffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) implantée sur souris SCID (1) au stade J_{66} post inoculation, et sur un modèle de mélanome murin sur souris C57BL6J au stade J_{20} post inoculation (2)

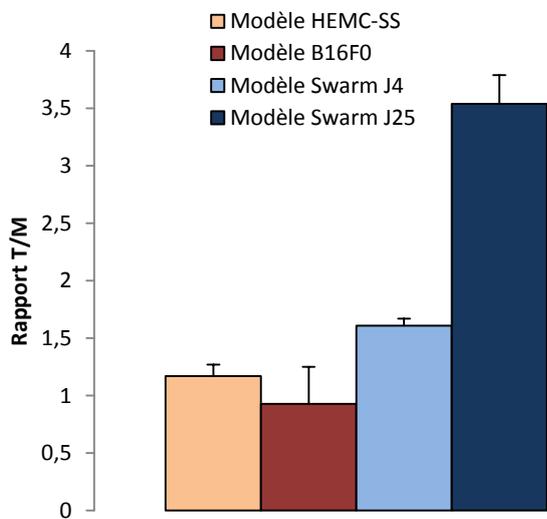


Figure 71 : Rapport T/M de la fixation du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour la tumeur Swarm (Stade J_4 et J_{25}), B16F0 (Stade J_{20}) et HEMC-SS (Stade J_{66})

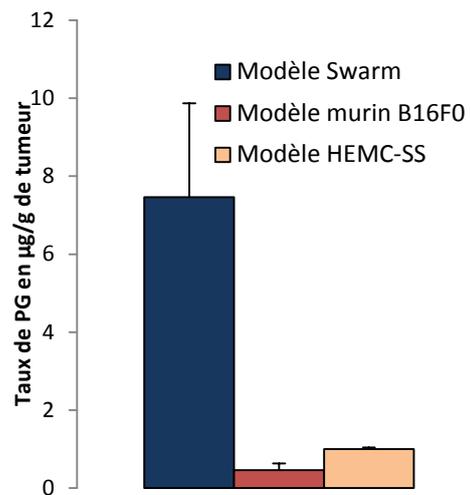


Figure 72 : Taux de protéoglycanes dans les tumeurs Swarm (J_{45}), B16F0 (J_{20}) et HEMC-SS (J_{66})

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

b. Absence de fixation au niveau des tumeurs exprimant peu les protéoglycanes

Absence de fixation sur le modèle de xéno greffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS)

Des scintigraphies au $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ sont réalisées sur le modèle de xéno greffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) présenté plus haut à un stade tumoral avancé (J₆₆ post inoculation) (*Figure 70*). A ce stade, la tumeur est bien développée, palpable et facilement mesurable. Les images scintigraphiques obtenues mettent en évidence une très faible fixation tumorale avec un rapport T/M de $1,17 \pm 0,10$. Cette faible fixation peut être liée à la faible densité en protéoglycanes de ces tumeurs démontrée plus haut dans l'étude du modèle.

Absence de fixation sur le mélanome

Une étude identique a été réalisée sur le modèle murin de mélanome (B16F0) implanté sur souris C57BL6J (*Figure 70*). Des scintigraphies au $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ ont été réalisées *in vivo* au stade J₂₀ post inoculation, à ce stade les tumeurs pèsent entre 200 et 500 mg.

Les images obtenues démontrent une fixation relativement faible au niveau de la tumeur mélanique, le mélanome fixant autant que le muscle, avec un rapport T/M évalué à $0,93 \pm 0,32$.

Les imageries scintigraphiques réalisées sur les deux modèles précédents révèlent donc une fixation très faible du radiotracteur au niveau tumoral comparativement à celle observée pour le modèle Swarm (*Figure 71*). En effet, le rapport T/M pour le modèle Swarm, même au stade précoce J₄ post implantation (stade pour lequel la tumeur n'est pas palpable) est plus important que pour les deux modèles de xéno greffes, même à un stade avancé (T/M_{Swarm} à J₄ = $1,61 \pm 0,06$; $T/M_{\text{HEMC-SS}}$ à J₆₆ = $1,17 \pm 0,10$ et T/M_{B16F0} à J₂₀ = $0,93 \pm 0,32$). Au stade J₂₅ post implantation, ce rapport est d'ailleurs presque quatre fois plus important pour la tumeur Swarm puisqu'il atteint la valeur de $T/M = 3,34 \pm 0,25$.

Les deux modèles de xéno greffe étant caractérisés par une faible densité en protéoglycanes (*Figure 72*), ces études permettent de conclure que *la fixation du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ est liée à la densité en protéoglycanes du tissu.*

Chapitre II – Intérêt du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

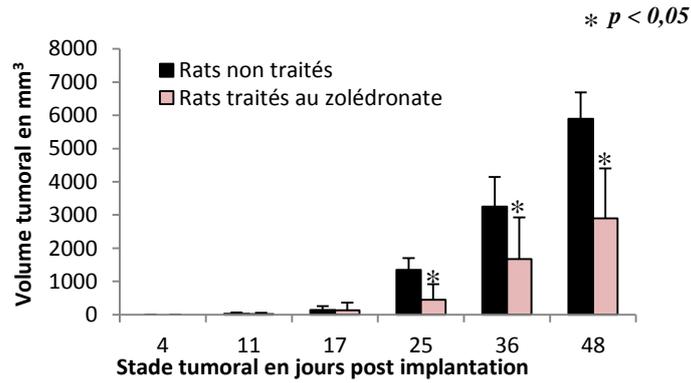


Figure 73 : Evolution du volume tumoral, mesuré au pied à coulisse, chez des rats porteurs de chondrosarcome et traités par du zolédronate comparativement aux rats non traités

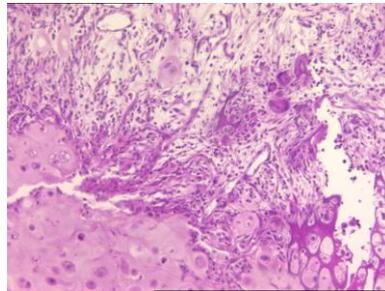


Figure 74 : Analyse histologique de la tumeur d'un rat traité au zolédronate, coloration HES, grossissement x 10
Observation d'un infiltrat inflammatoire très important

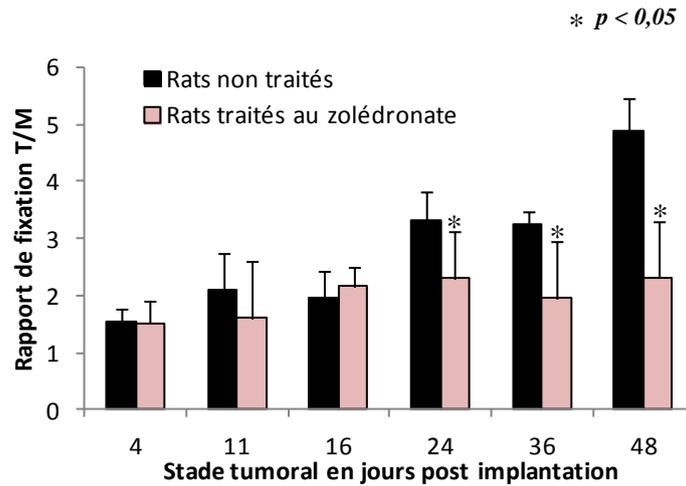


Figure 75 : Rapport T/M de la fixation du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ chez des rats porteurs de chondrosarcome et traités par du zolédronate comparativement aux rats non traités

5. Une fixation permettant d'évaluer, in vivo, la réponse à un traitement antitumoral.

Afin de pousser plus loin nos investigations, nous avons souhaité évaluer l'intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ dans le suivi de la réponse à un traitement. Pour cela, des rats porteurs de chondrosarcome Swarm ont été traités par du zolédronate à raison de deux administrations de 100 $\mu\text{g/kg}$ par semaine en sous-cutané. Gouin *et al.* avaient déjà démontré une efficacité antitumorale du zolédronate pour le même modèle et selon un protocole identique [185]. Le protocole de traitement débute quatre jours après un premier examen scintigraphique au $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$. Les animaux sont ensuite suivis régulièrement par mesure du volume tumoral au pied à coulisse et par imagerie scintigraphique au $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$.

Concernant le suivi par la mesure du volume tumoral (**Figure 73**), nous observons un ralentissement significatif ($p < 0,001$) de la croissance tumorale à partir du stade J₂₅ chez les rats traités ($n = 12$) comparativement aux rats non traités ($n = 12$). De plus, au stade J₄₈, le volume tumoral moyen des rats non traités ($5,89 \cdot 10^3 \pm 1,51 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$) est deux fois plus important que celui des rats traités ($2,90 \cdot 10^3 \pm 0,80 \cdot 10^3 \text{ mm}^3$). Cette activité antitumorale a été confirmée par la mise en évidence de critères anatomopathologiques de régression tumorale, dont notamment, un infiltrat inflammatoire très dense (**Figure 74**).

En ce qui concerne le suivi par imagerie scintigraphique (**Figure 75**), une diminution significative ($p < 0,001$) du rapport T/M est observée à partir du stade J₂₄ chez les rats traités. Au stade J₄₈, ce rapport est, d'ailleurs, deux fois plus important chez les rats non traités ($T/M = 4,90 \pm 0,99$) que chez les rats traités au zolédronate ($T/M = 2,32 \pm 0,58$).

L'inhibition de la croissance tumorale, engendrée ici par le traitement au zolédronate, est associée à une diminution de la fixation tumorale du radiotracteur. **Ces résultats soulignent ainsi le potentiel du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour la prise en charge du chondrosarcome et plus particulièrement pour le suivi et l'évaluation de la réponse à un traitement.**

6. La fixation est due à la fonction ammonium quaternaire

Nous avons souhaité vérifier, ici, que la fixation observée était bien due à l'affinité du vecteur ammonium quaternaire pour les protéoglycanes, et non, à une quelconque interaction avec la couronne 15-5.

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

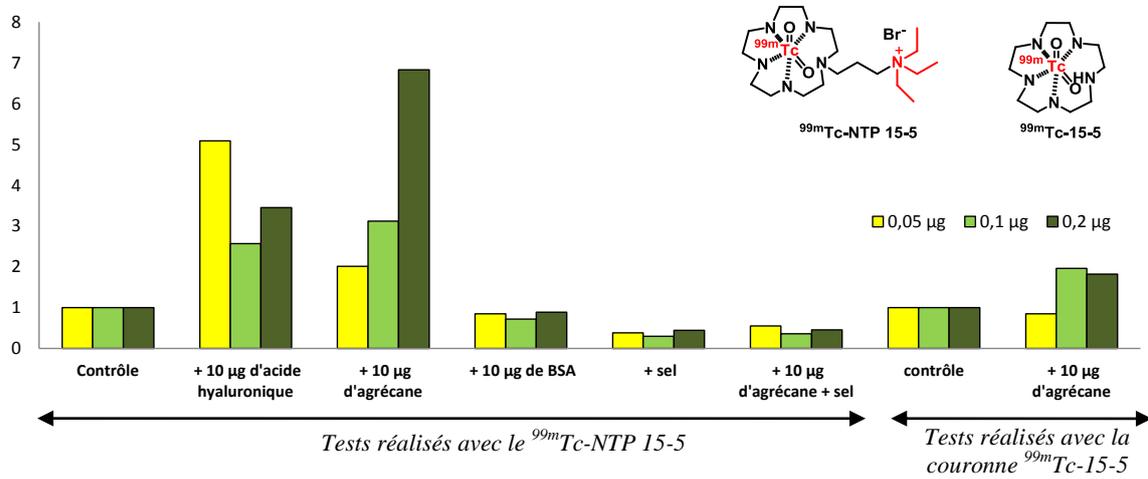


Figure 76 : Etude de la fixation du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ aux protéoglycanes

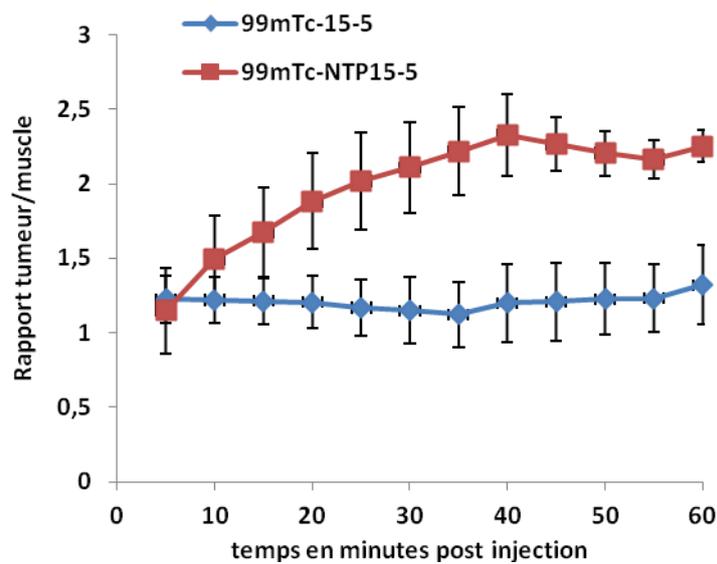


Figure 77 : Rapport de fixation tumeur/muscle du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ comparativement à la couronne $^{99m}\text{Tc-15-5}$ au cours du temps sur le modèle de rat Swarm

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

a. Etude *in vitro*

Les capacités de liaison du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ aux protéoglycanes ont été évaluées, *in vitro*, par une méthode analytique sur microcolonne ZipTipC18 comparativement à la couronne marquée sans vecteur la $^{99m}\text{Tc-15-5}$. Nous nous sommes également intéressés à la dissociation du complexe $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ -agrécane.

Le principe consiste à réaliser une solution de protéoglycanes dans du PBS sans Mg^{2+} et à ajouter des quantités variables de produit radioactif. Les mélanges sont ensuite passés sur de la silice C18. Les molécules marquées libres ne sont pas retenues par la silice. Les complexes formés par les molécules marquées et les protéoglycanes sont quant à eux retenus. Après plusieurs lavages à l'eau, la silice est comptée. Les témoins correspondent à des solutions dépourvues de protéoglycanes contenant le produit marqué et passées sur silice. Les résultats sont exprimés par le rapport de l'activité de la silice après passage des solutions tests (protéoglycanes + traceur) sur l'activité de la silice après passage de la solution témoin (traceur sans protéoglycanes).

D'après les résultats obtenus (**Figure 76**), l'agrécane fixe le radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$, alors que la couronne $^{99m}\text{Tc-15-5}$ ne le fixe que très peu. En effet, lorsque le $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ est mis en présence d'agrécane, il y a formation d'un complexe retenu par la silice et qui dépend de la quantité de traceur testée. Le ratio atteint alors 6,8 pour une quantité de 0,2 μg de $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$. Lorsque la même expérience est réalisée avec la couronne marquée mais non vectorisée, la quantité de complexe retenue est presque quatre fois moins importante. Le ratio atteint 1,8 pour une quantité de 0,2 μg de $^{99m}\text{Tc-15-5}$. Une fixation est également observée entre le $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ et l'acide hyaluronique (ratio de 3,5 pour une quantité de 0,2 μg de traceur). Ces résultats mettent en évidence également une absence de fixation du traceur à l'albumine (BSA : "Bovine Serum Albumin"), le ratio étant de proche de 1.

Concernant la dissociation du complexe, la fixation du traceur sur l'agrécane est déplacée par des sels d'iodure de butylammonium à 50 mM, indiquant que **la liaison ionique entre le traceur et l'agrécane est une liaison ionique plutôt forte.**

b. Etude *in vivo*

Des injections de 30 MBq du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ ou, de la couronne $^{99m}\text{Tc-15-5}$, ont été administrées en i.v. à des rats porteurs de chondrosarcome (n = 10) au stade J₂₀.

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

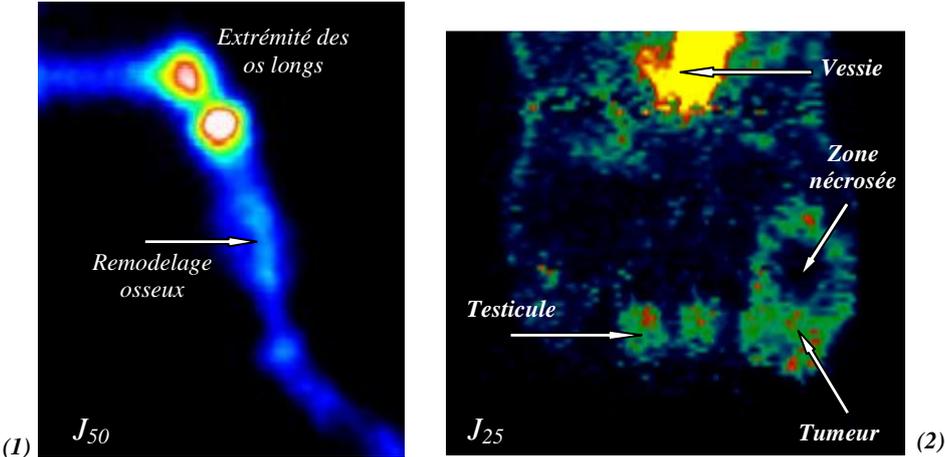


Figure 78 : Scintigraphies obtenues avec les radiotraceurs $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ (1) et $^{18}\text{F-FDG}$ (2) chez le modèle SRC



Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

Une acquisition dynamique d'une heure par tranche de cinq minutes a ensuite été lancée. Le rapport T/M a été déterminé à chaque temps (*Figure 77*).

Au temps cinq minutes, aucune différence significative n'est observée entre le radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ ($T/M = 1,15 \pm 0,29$) et la couronne $^{99m}\text{Tc-15-5}$ ($T/M = 1,22 \pm 0,16$). Cependant, l'expérience démontre qu'au cours du temps, le rapport T/M augmente pour le $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ contrairement au rapport T/M relatif à la couronne $^{99m}\text{Tc-15-5}$. En effet, une heure après l'injection, la fixation est presque deux fois plus importante ($p < 0,05$) pour le $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ ($T/M = 2,25 \pm 0,11$) que pour la $^{99m}\text{Tc-15-5}$ ($T/M = 1,32 \pm 0,27$).

Ces résultats permettent de confirmer le rôle de l'ammonium quaternaire dans le processus de vectorisation vers le chondrosarcome.

D. Intérêt et positionnement du radiotracteur en scintigraphie

1. Chondrosarcome et $^{99m}\text{Tc-HMDP}$

Le $^{99m}\text{Tc-HMDP}$, marqué au technétium 99m, est un traceur couramment utilisé pour les scintigraphies osseuses (cf. Chapitre I, *p18*). Il s'agit d'un biphosphonate qui fixe fortement les zones où l'activité ostéoblastique est importante. Nous avons réalisé l'imagerie $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ chez de la rat porteur de chondrosarcome Swarm à un stade tumoral très avancé (J_{50}) (*Figure 78, (1)*).

Aucune fixation spécifique du traceur $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ au niveau du tissu tumoral n'est observée. Seule, une légère fixation est visible au niveau tibial et correspond à un remodelage osseux engendré par le processus ostéolytique associé au développement tumoral.

Le $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ ne fixe donc pas de façon spécifique le chondrosarcome, il peut en revanche évaluer de façon indirecte l'évolution de la tumeur lorsque celle-ci entraîne un phénomène d'ostéolyse.

5. Chondrosarcome et $^{18}\text{F-FDG}$

Comme explicité plus haut (Chapitre I, *p16*), le $^{18}\text{F-FDG}$, marqué au Fluore 18, est un marqueur d'activité métabolique.

Nous avons réalisé des imageries scintigraphiques au $^{18}\text{F-FDG}$ sur des rats porteurs de chondrosarcome au stade J_{25} et J_{50} . Treize animaux ont été inclus dans cette étude.

Chapitre II – *Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome*



Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

Au stade J₂₅, aucune fixation n'est visualisée chez cinq rats, pour les huit autres une très légère fixation peut être distinguée. Dans ce cas, le rapport T/M moyen est de $1,17 \pm 0,23$, ce qui reste relativement faible et très proche de la fixation du muscle.

A un stade plus tardif, J₅₀, deux rats ont été imagés. Pour ces deux rats un ratio T/M plus important a été observé : $T/M = 2,75 \pm 0,12$.

Le $^{18}\text{F-FDG}$ ne permet donc pas le diagnostic des chondrosarcomes de bas grade, ces derniers possédant une activité métabolique trop faible.

III. Conclusion

Dans cette partie, nous avons mis en évidence ***l'accumulation rapide et spécifique du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ au niveau des tissus de nature chondrogénique*** (cartilage sain et tumoral). En effet, nous avons démontré que l'accumulation du traceur dépendait de la densité en protéoglycanes d'un tissu. Pour les organes tels que les os ou le muscle, la fixation est très faible. De plus, lorsque l'imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ est réalisée sur un modèle de xéno greffe de chondrosarcome humain HEMC-SS sur souris SCID ou de mélanome murin implanté sur souris nude (tous deux caractérisés par une faible densité en protéoglycanes), le rapport Tumeur/Muscle est très proche de 1, et ce, même à un stade avancé de la pathologie. ***Cette accumulation spécifique permet d'obtenir un contraste élevé en scintigraphie.***

Nous avons également confirmé, par une étude *in vitro* et une étude *in vivo*, que ***le vecteur ammonium quaternaire est à l'origine de cette fixation. Son interaction avec les protéoglycanes, dont fait partie l'agrécan, est une liaison ionique plutôt forte.***

De plus le $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$, permet de suivre l'évolution de la pathologie, l'importance de sa fixation étant corrélée avec le développement tumoral. En cas d'inhibition tumorale, suite à un traitement tel que le zolédronate, la fixation du radiotracteur diminue. ***Le $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ peut donc permettre le suivi du chondrosarcome et la réponse au traitement.***

Enfin, nous avons démontré tout l'intérêt de l'imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ dans le diagnostic du chondrosarcome, les radiotraceurs couramment utilisés en clinique ($^{18}\text{F-FDG}$ et $^{99m}\text{Tc-HMDP}$) ne permettant pas de diagnostiquer le chondrosarcome au stade précoce de la pathologie. ***L'imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ permet, quant à elle, de visualiser un chondrosarcome au stade précoce,*** dès J₄ post implantation et ce, alors que la tumeur n'est ni palpable, ni mesurable.

Chapitre II – *Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome*



Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

L'ensemble de ces résultats permettent de mettre en évidence la potentialité du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ dans le diagnostic, le staging et le suivi du chondrosarcome.

Nous pouvons toutefois ouvrir une parenthèse concernant la fixation du $^{18}\text{F-FDG}$ observée à un stade avancé du chondrosarcome. Cette fixation est liée à l'augmentation de l'activité métabolique du tissu tumoral. Or pour des chondrosarcomes de haut grade et dédifférenciés, le tissu tumoral a tendance à synthétiser moins de protéoglycanes ; il s'agit peut être là d'une des limites de notre radiotracteur. Les deux traceurs seraient donc complémentaires. Dans le cas d'un chondrosarcome de grade élevé, nous pourrions envisager l'imagerie $^{18}\text{F-FDG}$ comme une alternative à l'imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$.

Chapitre II – *Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome*



Publication

Hindawi Publishing Corporation
Sarcoma
Volume 2011, Article ID 691608, 8 pages
doi:10.1155/2011/691608

Research Article

A “Proteoglycan Targeting Strategy” for the Scintigraphic Imaging and Monitoring of the Swarm Rat Chondrosarcoma Orthotopic Model

Caroline Peyrode,¹ François Gouin,² Aurélien Vidal,¹ Philippe Auzeloux,¹ Sophie Besse,¹ Marie-Mélanie Dauplat,³ Serge Askienazy,⁴ Dominique Heymann,² Jean-Michel Chezal,¹ Françoise Redini,² and Elisabeth Miot-Noirault¹

¹INSERM (UMR 990) Université d'Auvergne, rue Montalembert, BP 184, 63005 Clermont-Ferrand Cédex, France

²INSERM (UMR S957), Université de Nantes, 44035 Nantes, France

³Service d'Anatomo-Pathologie, CLCC Jean Perrin, 63001 Clermont-Ferrand, France

⁴Cyclopharma Laboratoires, 63360 Saint-Beauzire, France

Correspondence should be addressed to Elisabeth Miot-Noirault, elisabeth.noirault@inserm.fr

Received 1 October 2010; Revised 24 December 2010; Accepted 4 January 2011

Academic Editor: Irene Andrulis

Copyright © 2011 Caroline Peyrode et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Our lab developed $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ radiotracer as targeting proteoglycans (PGs) for the scintigraphic imaging of joint. This paper reports preclinical results of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging of an orthotopic model of Swarm rat chondrosarcoma (SRC). $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging of SRC-bearing and sham-operated animals was performed and quantified at regular intervals after surgery and compared to bone scintigraphy and tumoural volume. Tumours were characterized by histology and PG assay. SRC exhibited a significant $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ uptake at very early stage after implant (with tumour/muscle ratio of 1.61 ± 0.14), whereas no measurable tumour was evidenced. As tumour grew, mean tumour/muscle ratio was increased by 2.4, between the early and late stage of pathology. Bone scintigraphy failed to image chondrosarcoma, even at the later stage of study. $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging provided a suitable set of quantitative criteria for the *in vivo* characterization of chondrosarcoma behaviour in bone environment, useful for achieving a greater understanding of the pathology.

1. Introduction

Our laboratory has developed the $^{99m}\text{Tc-N-}[\text{triethylammonium-3-propyl-}^{15}\text{N}]$ ($^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$) radiotracer able to link proteoglycans (PGs) of cartilage, which was demonstrated to allow scintigraphic imaging of joint [1–6]. PG appear also as key partners in bone cell biology, and might represent interesting targets for the assessment of malignant pathological processes [7]. Chondrosarcoma represent 25% of all bone sarcoma and are characterized by the formation of a cartilage like extracellular matrix [8–10]. To the orthopedic oncologists, it is essential to identify the lesions that are thought to constitute the “cartilage tumour group”, through the presence of identifiable elements that resemble the cells and matrix of cartilage. For such analysis,

the three-grade histopathologic classification of Evans is based on cell type/differentiation, matrix formation and architecture, and is at present considered useful for the prediction of clinical behaviour [11–13]. To date, many questions still remain unanswered and there is an urgent need for markers of biologic phenotypic features, that could be determined in a noninvasive manner, and could be used as objective criteria of grading, followup, response to therapy and detection of recurrence. CT and MRI define morphology, but are limited in distinguished postoperative residual and postchemotherapeutic lesions due to altered tissue planes, edema and fibrosis. Contrast-enhanced MRI, while providing data for local staging and extraosseous involvement, appears also limiting in determining biologic behaviour of lesions [14–16]. SPECT by the use of highly

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

specific radiolabelled probes, allows a noninvasive and quantitative assessment of many biochemical pathways *in vivo* [17]. In such context, scintigraphic imaging with $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ would be a powerful tool for a direct *in vivo* quantitative evaluation of chondrosarcoma at the PG level, allowing therefore the detection of changes in relation to pathological processes and/or response to therapies. We therefore initiated preclinical studies aiming at determining whether $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging could be useful for the evaluation of the tumoural pathology of cartilage *in vivo*. In the present study, the $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging was characterized in the Swarm rat chondrosarcoma implanted in paratibial location.

2. Materials and Methods

2.1. Animals. Male Sprague Dawley (Charles River, France) were included in this study. They were handled and cared for in accordance with the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council, 1996) and European Directive 86/809/EEC. They were maintained at 21°C with a 12 h/12 h light/dark cycle. Protocols were performed under the authorisation of the French Direction of Veterinary Services (Authorisation N° C63-113-10) and conducted by authorized investigators in accordance with the institution's recommendations for the use of laboratory animals.

2.2. Chondrosarcoma Model. The Swarm rat chondrosarcoma (SRC) line was a generous gift from Dr. P. A. Guerne (Geneva, Switzerland) as tissue fragments that were frozen until use.

For tumoural implant, the rats were anaesthetized by inhalation of a combination isoflurane (Abbott, France)/air (1.5%, 1 L/min) associated with an intramuscular injection of 100 mg/kg ketamine (Imalgene, Rhone Merieux, France).

Allgraft transplantation of a tumour fragment (10 animals) was performed on the right paw, the other paw being used as the controlateral reference, as previously published [18].

Using a lateral approach, the cortical surface of the diaphysis was scarified laterally on 10 mm, a 10 mm³ fragment of SRC was placed contiguous to the scarified surface, and the muscular and cutaneous wounds were sutured. The same procedure was performed for the controlateral paw, but no tumour fragment was implanted. Tumours appeared at the graft site 7–11 days later.

2.3. Establishment of the Sham Model. Five animals underwent sham surgery, in which the right paw was submitted to the same surgery procedure as SRC animals, but no tumour fragment was implanted.

2.4. Acquisitions for $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ Imaging. Scintigraphic *in vivo* imaging was performed using a small-animal γ camera (CsI(Na) crystal) equipped with a 1.3/0.2/35 parallel-hole collimator (hole diameter/septum thickness/height in mm) (Gammaimager, Biospace, France). The energy resolution

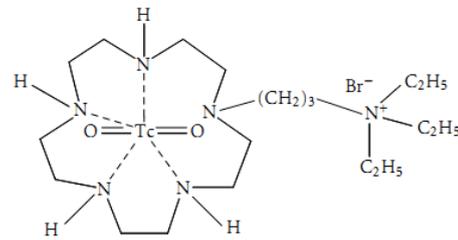


FIGURE 1: Chemical structure of $^{99m}\text{Tc-N-[triethylammonium]-3-propyl-[15]ane-N5}$ ($^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$).

and intrinsic planar resolution of the system are given as 11% at 140 keV and <2 mm full width at half maximum (FWHM), respectively.

The radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ (Figure 1) radiotracer was prepared and radiolabelled as previously published [1–6], and administered by IV route to vigil animals (25 Mbq/animal) using dedicated contention box.

First of all, a 10-min planar acquisition (with a 15% window centered on the 140 keV photopeak of ^{99m}Tc) was performed on 3 animals with a well-established tumour (volume = $949.35 \pm 223 \text{ mm}^3$) at several intervals (30, 60, 90 and 120 mins) to determine kinetics of tracer accumulation within chondrosarcoma, respectively, to articular cartilage and muscle. For acquisition, each posterior paw of animals was positioned over the collimator of the camera as illustrated in Figure 2. Quantitative analysis of scintigraphic scans was performed using the GAMMAVISION+ software (Biospace, France). Regions of interest (ROIs) were delineated over tumour, femorotibial cartilage and muscle patterns. For each animal and each ROI, average count in cpm per pixel was obtained. Two semiquantitative parameters were determined:

$$\frac{T}{M} = \frac{\text{average count in tumour}}{\text{average count in muscle}}, \quad (1)$$

$$\frac{T}{C} = \frac{\text{average count in tumour}}{\text{average count in femorotibial cartilage}}.$$

Data were expressed as mean \pm standard deviation.

A serial imaging was then performed on primary chondrosarcoma-bearing rats ($n = 10$) and sham-operated animals ($n = 5$) at regular intervals after surgery (from day 4 to day 35), with 10-min planar acquisition being started 30 mins after iv administration of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$. Scintigrams were considered positive when tracer uptake areas corresponded to sites of implant. All the positive scans were evaluated using the ROI method as described above, with T/C and T/M parameters being determined for each animal at each time point, and data expressed as mean \pm standard deviation. Semi-quantitative parameters determined at day 4 were used as the “threshold reference value” and were compared to the mean values determined at each time point of study (paired 2-sided Student *t*-test with a level of significance set at $P < .05$).

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

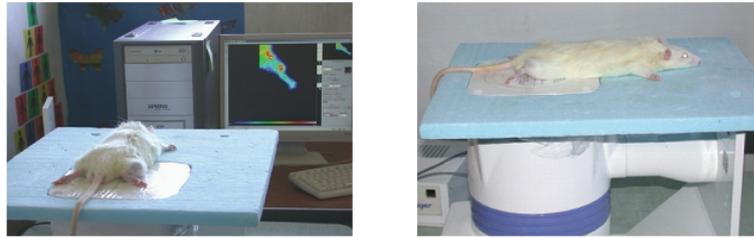


FIGURE 2: *In vivo* scintigraphic acquisition of chondrosarcoma bearing rats using a small animal dedicated gamma camera.

2.5. Acquisitions for $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ Bone Imaging. Primary chondrosarcoma-bearing rats were also submitted to bone scintigraphies at day 12, day 38, and day 48 after implant. For each paw, “delayed images” (10-minute duration) were acquired 2 hours post injection of $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ radiotracer (Osteocys, IBA, France; 30 MBq/animal).

Bone scintigrams were considered positive when tracer uptake areas corresponded to sites of implant.

2.6. Tumour Growth Assessment. The tumour volume was determined from the measurement of 2 perpendicular diameters using a calliper. Tumour volumes (V) were calculated according to the following formula:

$$V(\text{mm}^3) = 0.5 \times L \times (S)^2, \quad (2)$$

where L and S are, respectively, the largest and smallest perpendicular tumour diameters in mm [19].

2.7. Histology of SRC Tissue. At the end of the study, three chondrosarcoma-bearing rats were killed for histological characterization of the tumours. The femora and tumour of each rat were removed and fixed at 4°C for 48 hours in formol buffer (pH 7.4). The femora were cut longitudinally or transversally. Decalcified femoral fragments were embedded in paraffin and $5\ \mu\text{m}$ sections were mounted on glass slides for staining with Hematoxylin-Eosin-Safran (HES) and Alcian blue.

2.8. PG Content of SRC Tissue. At the end of the study, SRC were removed ($n = 3$ animals), dissected and digested for 24 h at 60°C with EDTA-phosphate buffer solution containing Papaine 0.60 mg/mL (Sigma-Aldrich, France) and DL-dithiothreitol (DTT) 0.25 mg/mL (Sigma-Aldrich, France). Digests were then assessed for PG content using the dimethylene blue protocol [20].

PG content of SRC tissue was compared to PG content of mouse B16F0 melanoma as negative control: B16F0 melanoma were removed from bearing mice ($n = 3$) (stage day 15 after subcutaneous inoculation of 300000 B16F0 cells), and submitted to the same procedure of extraction and digestion as SRC tumours.

3. Results

3.1. SRC Characterisation: Tumoural Growth, Histology and PG Assay. Tumour volumes were followed for 35 days

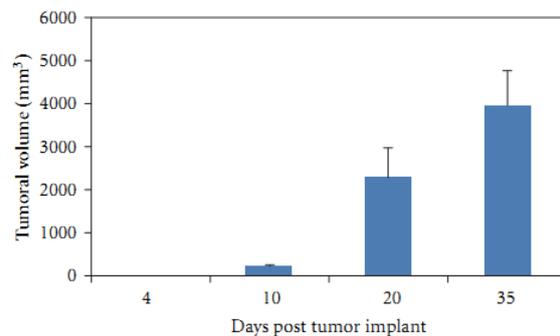


FIGURE 3: Tumour volume growth for Swarm rat chondrosarcoma (SRC) implanted in paratibial location. Mean values + standard deviation are presented at each time point.

after primary implant (Figure 3). All the animals developed a tumour that became palpable from day 10. Histological examination (Figure 4(a)) at study end evidenced a chondroid tumoural tissue, poorly vascularized, lobular in organization with lobules containing chondroid stroma and delimited by fine fibrous septa. Hypercellularity was also observed. At this later stage of pathology, an extensive invasion of bone and surrounding tissues was present, as well as osteolysis.

The overall presence of PG was first investigated by Alcian blue staining: as shown in Figure 4(b), a high density of stained areas were observed in SRC tissue, revealing the presence of PG in this tumour.

PG content of SRC tumour tissue was also assessed by biochemical dosage. PG content of SRC tissue was compared with PG of murine B16F0 melanoma tumour as negative control: As shown in Figure 5, a high PG content was observed in SRC tissue ($7.46 \pm 2.41\ \mu\text{g}$ of PG/mg of tissue), respectively, to melanoma ($0.45 \pm 0.16\ \mu\text{g}$ of PG/mg of tissue).

3.2. $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ Distribution in SRC Tissue, Respectively, to Muscle and Cartilage. $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ distribution in well-established primary chondrosarcomas was characterized at 30, 60, 90 and 120 mins after $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ administration, on the basis of tumour/muscle (T/M) and tumour/cartilage (T/C) ratios. As shown in Figure 6(a), $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ rapidly accumulated within SRC tissue,

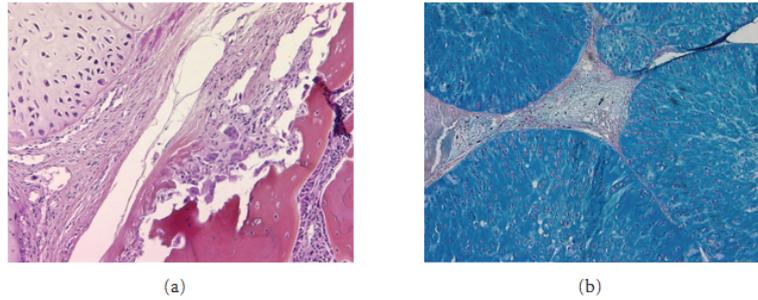


FIGURE 4: Histomorphological features of the SRC model at study end showing: (a) a tumoural tissue with hypercellularity, and bone osteolysis (x10); (b) a high density of blue Alcian stained areas as a reflect of proteoglycan content (x5).

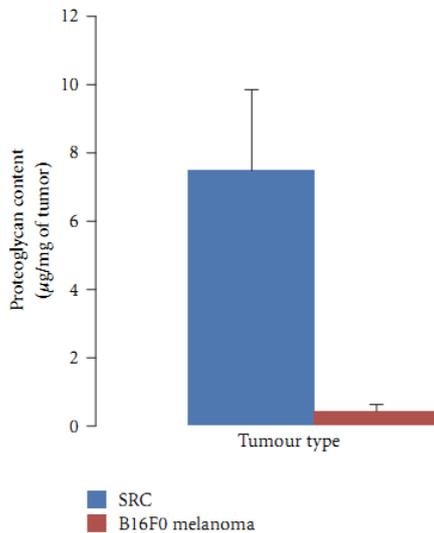


FIGURE 5: PG content of SRC tissue, respectively, to murine melanoma tumour (as negative control); Mean values + standard deviation are presented.

with T/M and T/C ratios being 1.44 ± 0.27 and 0.78 ± 0.03 from 30 mins post injection. Radiotracer accumulation within tumoural tissue was observed to be as high as in cartilage tissue from 60 mins pi, with T/C value of 0.90 ± 0.23 . No significant changes were observed in T/M and T/C ratios from 60 to 120 mins pi.

This high and selective accumulation of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ within tumour was at the origin of the highly contrasted chondrosarcoma imaging *in vivo*, as shown in (Figure 6(b)) for a representative animal.

3.3. Diagnosis Capability of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ Imaging, Respectively, to $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ Bone Scintigraphy and Calliper Measurement. All the implanted animals were positive for chondrosarcoma at necropsy.

Figure 7 shows the disease incidence according to $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ scintigraphy, $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging, and calliper measurement during the whole study of monitoring.

A palpable and measurable tumour was observed from day 10 after implant for 50% of the animals. From day 20, 100% of the animals evidenced measurable tumours.

$^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ scintigraphy was positive for 66.66% of the animals as early as day 4 post implant, and for 100% of the animals from day 10.

$^{99m}\text{Tc-HMDP}$ bone scintigraphy was negative for SRC imaging during the whole duration of study, and even later (48 days post implant).

3.4. Monitoring of SRC Growth In Vivo Using $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ Imaging.

As shown in Figure 8 for a representative animal, $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ radiotracer was observed to accumulate within tumoural tissue, respectively, to the contralateral paw (Figure 8(a)), as early as day 4 after implant: scintigram of the tumour bearing paw (Figure 8(b)) evidenced (i) uptake areas in femorotibial articular cartilage, with the tibial plateau uptake clearly distinguished from the femoral condyle uptake, (ii) accumulation at the site of implant. $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ examination of the same animal at late stage of pathology (day 35, Figure 8(c)) evidenced that radiotracer accumulation within the tumour-bearing paw was highly increased, respectively, to day 4.

$^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ accumulation was quantitatively assessed *in vivo* in the tumour, respectively, to muscle and cartilage (as T/M and T/C uptake ratios, resp.) as a function of time after implant (Figure 9): As early as day 4 post implant, the mean T/M and T/C values were 1.61 ± 0.14 and 0.57 ± 0.06 , respectively. From day 10, tumoural uptake of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ was as high as cartilage uptake with T/C = 1.08 ± 0.09 ; T/M value was 2.55 ± 1.15 .

At study ending (day 35), mean T/C and T/ M values were 1.61 ± 0.06 and 3.97 ± 0.74 , respectively.

3.5. Monitoring of Sham-Operated Animals Using $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ Imaging. Serial $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging of sham-operated animals ($n = 5$) performed over 50 days after

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

Sarcoma

5

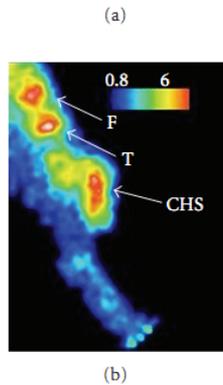
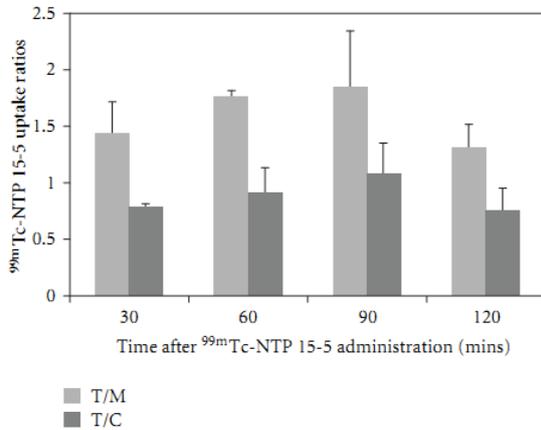


FIGURE 6: $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ *in vivo* distribution in chondrosarcoma; (a) $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ uptake ratios as a function of delay between iv administration of tracer and acquisition; (b) Scintigraphic image obtained for a representative animal, for a delay of 30 min between injection and acquisition. Abbreviations: F: femoral condyle; T: tibial plateau; CHS: chondrosarcoma.

surgery did not evidence any accumulation of the tracer at site of surgery.

4. Discussion

This experimental study was conducted in the syngeneic model of SRC that has been the subject of extensive biochemical studies on extracellular matrix and chondrocyte metabolism [21, 22]. Histological characterization of SRC implanted in paratibial location, evidenced a chondroid tumoural tissue, poorly vascularized, lobular in organization with lobules containing chondroid stroma delimited by fine fibrous septa. In the present study PG were confirmed (by both alcian blue staining and biochemical assay) as being a major component of SRC tissue. The high concentration of PG in the tumour is at the origin of a high density of ECM strong negative charges that may interact with the positively charged quaternary ammonium moiety of the $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ radiotracer. The ability of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ to image SRC tissue was therefore demonstrated from 30 mins post

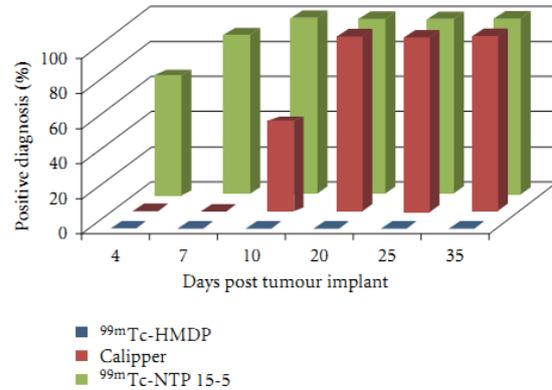


FIGURE 7: Disease incidence at each time point of study, according to $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ scintigraphy, $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging, and calliper measurement.

injection with T/M and T/C ratios being 1.44 ± 0.27 and 0.78 ± 0.03 .

Interestingly, tracer accumulation was detected at early stage (day 4) and for about 70% of the animals investigated, whereas no palpable nor measurable tumour was evidenced. Such early accumulation raised the question of whether the imaging pattern represented an effective tumoural uptake or a surgery-induced inflammation. Negative $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging observed for sham-operated animals definitely ruled out the hypothesis of inflammation contribution.

$^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ accumulation within SRC was assessed at multiple time-points of tumoural growth using a semi-quantitative method. As tumour developed over time, mean T/M and T/C values were observed to be increased by a factor of 2.4 and 2.8, respectively, between the early stage day 4 and the late stage day 35. Tumour to femorotibial cartilage uptake ratio (T/C parameter) is of particular importance for clinical application (in patients, tumour is located in the joint). From our results, the increase in T/C with pathology argued in favour of a high tumour/cartilage contrast which would expect diagnosis of tumour occurrence within the joint.

Another interesting result of this study is that $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ bone scintigraphy commonly used in clinical practise failed to image tumoural tissue throughout the study, whereas $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging was positive.

These preclinical results underlined the suitability and high sensitivity of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ scintigraphic imaging for assessing *in vivo* the PG component of chondrosarcomas, providing therefore criteria for a quantitative and functional assessment of the tumoural pathology *in vivo*.

Our results raised the question of whether $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging patterns in benign cartilage tumours, (which are known to form a cartilaginous PG-rich matrix), would be the same as for malignant tumours. According to many histological studies, the neoplastic cells of benign cartilage tumours such as chondroblastoma did not show, at any point of their evolution, real cartilage matrix formation [13, 23]. As

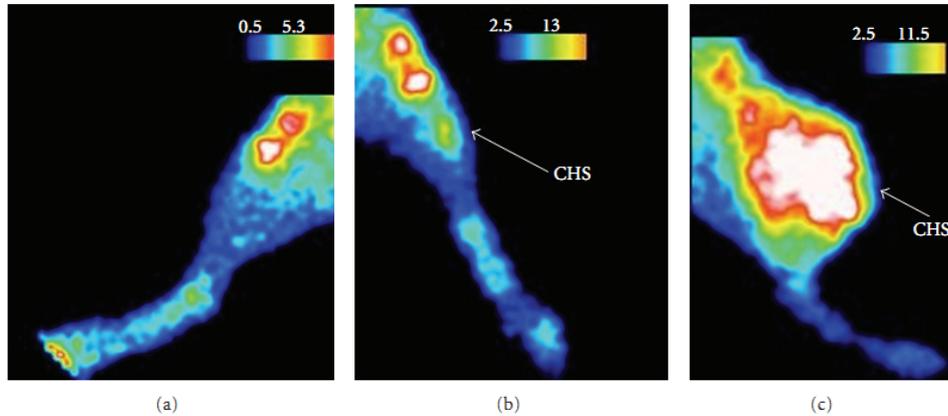


FIGURE 8: $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ longitudinal *in vivo* examination of a representative SRC-bearing rat; (a) *in vivo* scintigraphic image of the contralateral paw at day 4; (b) *in vivo* scintigraphic image of the tumour-bearing paw at day 4; (c) *in vivo* scintigraphic image of the tumour bearing paw of the same animal at day 35. A clear accumulation of radioactivity within tumoural tissue was observed as early as day 4 after implant (Image b, arrow); abbreviations: CHS = chondrosarcoma.

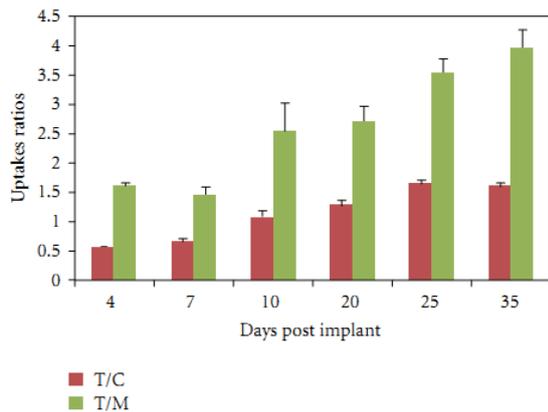


FIGURE 9: Quantitative analysis of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ accumulation in chondrosarcoma against time after implant. Results are expressed as Tumour/Muscle and Tumour/Contralateral uptake ratios (T/M and T/C, resp.). Mean values + standard deviation are presented at each time point.

a consequence, a differential accumulation of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ radiotracer could be expected. Since the biological nature of benign cartilage tumours is still debating, we will have to elucidate this aspect by performing a preclinical $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging study of rodent models of enchondroma, (such as mutant mice for hedgehog signalling pathways or Ext1/Ext2 exostosin encoding gene) in parallel to the biological characterization of PG of tissue [23–25].

From a clinical point of view, the distinction between benign and low-grade malignant pathology, is known to be extremely difficult both at radiologically and histologically, and remains a challenge [9, 26]. All current imaging modalities have shown their limitations. Radiographs, CT, MRI and contrast enhanced MRI provide morphological data for local staging and extra-osseous involvement, but

appeared limited in determining functional markers of postoperative recurrence, response or relapse to therapies [9, 27–29]. In such context, $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ radiotracer may serve as an adjunct to CT and MRI, by supplying quantitative data which would allow imaging and follow-up to be functionally rather than morphologically based. For functional imaging of cartilage neoplasms, radiotracers currently available provide indirect evaluations of the pathology, such as bone remodeling and inflammation features, but do not allow biological assessment of the tumour. Many tumour seeking agents such as ^{201}Tl , $^{99m}\text{Tc-MIBI}$, $^{99m}\text{Tc-Tetrofosmin}$, $^{99m}\text{Tc-DMSA(V)}$ and more recently $^{18}\text{F-FDG}$ have been found useful in an initial diagnosis and grading, but they have also demonstrated their limitations for imaging chondrosarcoma with low cellularity and low vascularity [30–33]. $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging would allow a regular *in vivo* follow up, in order to evidence any “upregulation” or “downregulation” synthesis of PG, as the reflect of potential malignant transformation, recurrence, response or relapse to therapies. We strongly believe in such potential application since $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging recently evidenced in the SRC model a “downregulation synthesis” of PG as a result of anticancer treatment (unpublished data).

Another potential application of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging in chondrosarcoma would be the early imaging of metastasis. As a consequence, the sensitivity of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging for the early evaluation of chondrosarcoma metastasis has to be determined in relevant preclinical animal models of chondrosarcoma with spontaneous metastasis [34, 35].

5. Conclusion

This preliminary work in the orthotopic SRC model underlined the suitability and high sensitivity of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ radiotracer for imaging chondrosarcoma at the PG level. $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging provided a suitable set of quantitative criteria for the *in vivo* characterization of

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

Sarcoma

7

chondrosarcoma behaviour in bone environment, which could be useful for achieving a greater understanding of the pathology.

In view of a potential clinical application, $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging appears of interest for (i) the establishment of the cartilaginous nature of “musculoskeletal” tumours (ii) the *in vivo* assessment to PG changes associated to the evolution of pathological process, local recurrence, response or relapse to therapies. Additional preclinical studies are needed to investigate the potential of $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ imaging in the tumoral pathology of cartilage.

Acknowledgments

The authors received grants from Institut National du Cancer, “projet libre intercancéropôle CLARA/Grand Ouest”, Ligue Contre le Cancer, Regional Innovation Fund FRI2/OSEO, Auvergne Region for “Contrat de Projets Etat Region”.

References

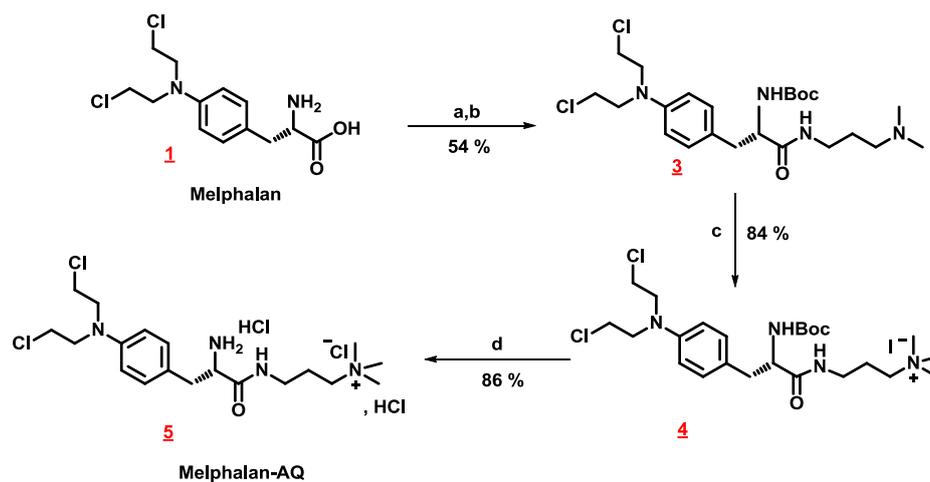
- [1] J. C. Madelmont, I. Giraud, C. Nicolas et al., “inventors. Cyclopharma Laboratoires, assignee. Novel quaternary ammonium derivatives, method for preparing same and pharmaceutical use,” International patent PCT WO 01/00621 A1. January 2001.
- [2] C. Nicolas, M. Borel, J. C. Maurizis et al., “Synthesis of N-quaternary ammonium [^3H] and [^{99m}Tc]Polyazamacrocycles, potential radiotracers for cartilage imaging,” *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, vol. 43, no. 6, pp. 585–594, 2000.
- [3] J. C. Maurizis, M. Rapp, C. Nicolas, M. Ollier, M. Verny, and J. C. Madelmont, “Disposition in rats of N-pyridinium-propyl-cyclam, N-triethylammoniumpropyl-cyclam, and N-[triethylammonium]-3-propyl-[15]ane-N5, potential cartilage imaging agents,” *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 28, no. 4, pp. 418–422, 2000.
- [4] M. Ollier, J. C. Maurizis, C. Nicolas et al., “Joint scintigraphy in rabbits with $^{99m}\text{Tc-N-[3-(triethylammonio)propyl]-15ane-N5}$, a new radiodiagnostic agent for articular cartilage imaging,” *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 42, no. 1, pp. 141–145, 2001.
- [5] E. Miot-Noirault, A. Vidal, P. Pastoureau et al., “Early detection and monitoring of cartilage alteration in the experimental meniscectomised guinea pig model of osteoarthritis by $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ scintigraphy,” *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 34, no. 8, pp. 1280–1290, 2007.
- [6] E. Miot-Noirault, A. Vidal, P. Auzeloux, J. C. Madelmont, J. Maublant, and N. Moins, “First in vivo SPECT imaging of mouse femorotibial cartilage using $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$,” *Molecular Imaging*, vol. 7, no. 6, pp. 263–271, 2008.
- [7] F. Lamoureux, M. Baud’huin, L. Duplomb, D. Heymann, and F. Rédini, “Proteoglycans: key partners in bone cell biology,” *BioEssays*, vol. 29, no. 8, pp. 758–771, 2007.
- [8] World Health Organization, “Cartilage tumours,” in *World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics, Tumours of Soft Tissue and Bone*, C. D. M. Fletcher, K. K. Unni, and F. Mertens, Eds., pp. 234–257, IARC Press, Lyon, France, 2002.
- [9] H. Gelderblom, P. C. W. Hogendoorn, S. D. Dijkstra et al., “The clinical approach towards chondrosarcoma,” *Oncologist*, vol. 13, no. 3, pp. 320–329, 2008.
- [10] W. A. Chow, “Update on chondrosarcomas,” *Current Opinion in Oncology*, vol. 19, no. 4, pp. 371–376, 2007.
- [11] H. L. Evans, A. G. Ayala, and M. M. Romsdahl, “Prognostic factors in chondrosarcoma of bone. A clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading,” *Cancer*, vol. 40, no. 2, pp. 818–831, 1977.
- [12] F. Schajowicz, L. H. Sobin, and World Health Organization, *International Histological Classification of Tumours, Histological Typing of Bone Tumours*, Springer, Berlin, Germany, 1993.
- [13] T. Aigner, “Towards a new understanding and classification of chondrogenic neoplasias of the skeleton—biochemistry and cell biology of chondrosarcoma and its variants,” *Virchows Archiv*, vol. 441, no. 3, pp. 219–230, 2002.
- [14] L. Ollivier, D. Vanel, and J. Leclère, “Imaging of chondrosarcomas,” *Cancer Imaging*, vol. 4, pp. 36–38, 2003.
- [15] F. Feldman, R. van Heertum, and C. Manos, “ ^{18}F FDG PET scanning of benign and malignant musculoskeletal lesions,” *Skeletal Radiology*, vol. 32, no. 4, pp. 201–208, 2003.
- [16] S. E. Anderson, L. S. Steinbach, S. Schlicht, G. Powell, M. Davies, and P. Choong, “Magnetic resonance imaging of bone tumors and joints,” *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, vol. 18, no. 6, pp. 457–465, 2007.
- [17] R. J. Hicks, G. C. Toner, and P. F. Choong, “Clinical applications of molecular imaging in sarcoma evaluation,” *Cancer Imaging*, vol. 5, no. 1, pp. 66–72, 2005.
- [18] E. Grimaud, C. Damiens, A. V. Rousselle, N. Passuti, D. Heymann, and F. Gouin, “Bone remodelling and tumour grade modifications induced by interactions between bone and Swarm rat chondrosarcoma,” *Histology and Histopathology*, vol. 17, no. 4, pp. 1103–1111, 2002.
- [19] F. Gouin, B. Ory, F. Rédini, and D. Heymann, “Zoledronic acid slows down rat primary chondrosarcoma development, recurrent tumor progression after intralesional curettage and increases overall survival,” *International Journal of Cancer*, vol. 119, no. 5, pp. 980–984, 2006.
- [20] R. W. Farndale, D. J. Buttle, and A. J. Barrett, “Improved quantitation and discrimination of sulphate glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 883, no. 2, pp. 173–177, 1986.
- [21] G. K. Hascall, “Ultrastructure of the chondrocytes and extracellular matrix of the Swarm rat chondrosarcoma,” *Anatomical Record*, vol. 198, no. 2, pp. 135–146, 1980.
- [22] D. Breitreutz, L. Diaz de Leon, and L. Paglia, “Histological and biochemical studies of a transplantable rat chondrosarcoma,” *Cancer Research*, vol. 39, no. 12, pp. 5093–5100, 1979.
- [23] T. Aigner, S. Loos, C. Inwards et al., “Chondroblastoma is an osteoid-forming, but not cartilage-forming neoplasm,” *Journal of Pathology*, vol. 189, no. 4, pp. 463–469, 1999.
- [24] S. Hopyan, P. Nadesan, C. Yu, J. Wunder, and B. A. Alman, “Dysregulation of hedgehog signalling predisposes to synovial chondromatosis,” *Journal of Pathology*, vol. 206, no. 2, pp. 143–150, 2005.
- [25] J. V. M. G. Bovée, “EXtra hit for mouse osteochondroma,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 5, pp. 1813–1814, 2010.
- [26] X. L. Wang, L. H. De Beuckeleer, A. M. A. De Schepper, and E. Van Marck, “Low-grade chondrosarcoma vs enchondroma: challenges in diagnosis and management,” *European Radiology*, vol. 11, no. 6, pp. 1054–1057, 2001.
- [27] J. V. M. G. Bovee and P. C. W. Hogendoorn, “Cartilage-forming tumours of bone and soft tissue and their differential diagnosis,” *Current Diagnostic Pathology*, vol. 7, no. 4, pp. 223–234, 2001.

Chapitre II – Intérêt du radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

- [28] J. V. M. G. Bovée, A. M. Cleton-Jansen, A. H. M. Taminiau, and P. C. W. Hogendoorn, "Emerging pathways in the development of chondrosarcoma of bone and implications for targeted treatment," *Lancet Oncology*, vol. 6, no. 8, pp. 599–607, 2005.
 - [29] J. V. M. G. Bovée, "Multiple osteochondromas," *Orphanet Journal of Rare Diseases*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, 2008.
 - [30] S. G. Pneumaticos, S. N. Chatziioannou, W. H. Moore, and M. Johnson, "The role of radionuclides in primary musculoskeletal tumors beyond the 'bone scan'," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 37, no. 3, pp. 217–226, 2001.
 - [31] G. Büyükdere, Ö. Sargin, and S. Özbarlas, "Tc-99m tetrofosmin imaging in chondrosarcoma," *Clinical Nuclear Medicine*, vol. 25, no. 1, pp. 64–65, 2000.
 - [32] P. F. M. Choong, T. Kunisada, J. Slavin, S. Schlicht, and R. Hicks, "The role of thallium-201 and pentavalent dimercaptosuccinic acid for staging cartilaginous tumours," *International Seminars in Surgical Oncology*, vol. 8, pp. 1–7, 2004.
 - [33] F. Y. I. Lee, J. Yu, S. S. Chang, R. Fawwaz, and M. V. Parisien, "Diagnostic value and limitations of fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography for cartilaginous tumors of bone," *Journal of Bone and Joint Surgery A*, vol. 86, no. 12, pp. 2677–2685, 2004.
 - [34] J. C. M. Clark, C. R. Dass, and P. F. M. Choong, "Development of chondrosarcoma animal models for assessment of adjuvant therapy," *ANZ Journal of Surgery*, vol. 79, no. 5, pp. 327–336, 2009.
 - [35] J. C. M. Clark, T. Akiyama, C. R. Dass, and P. F. M. Choong, "New clinically relevant, orthotopic mouse models of human chondrosarcoma with spontaneous metastasis," *Cancer Cell International*, vol. 20, pp. 1–10, 2010.
-

Chapitre III

***Application à la
vectorisation d'agents
cytotoxiques avec le
melphalan ammonium
quaternaire***



Réactifs et conditions : (a) $(Boc)_2O$, NEt_3 , $MeOH$, température ambiante ; (b) 3-(diméthylamino)propylamine 2, DCC , $HOBT$, CH_2Cl_2 , température ambiante ; (c) CH_3I , $EtOH$ anhydre, température ambiante ; (d) solution d' $HCl/EtOH$ anhydre 2N, température ambiante.

Schéma 9 : Synthèse du melphalan-AQ 5

La seconde partie des travaux réalisés au cours de cette thèse a consisté à appliquer la stratégie de vectorisation vers les protéoglycanes du cartilage, à la vectorisation d’agents cytotoxiques, pour proposer une nouvelle approche thérapeutique du chondrosarcome. Afin de valider la preuve de concept, un premier dérivé ammonium quaternaire du melphalan, le melphalan ammonium quaternaire (Melphalan-AQ), a été synthétisé et évalué (i) *in vitro*, en terme d’activité cytotoxique et d’activité sur le cycle cellulaire et (ii) *in vivo*, en terme d’efficacité antitumorale, sur le modèle de rat porteur de chondrosarcome Swarm (SRC) présenté dans le chapitre II.

I. Synthèses des dérivés du melphalan

A. Synthèse du melphalan-AQ 5

La synthèse du melphalan-AQ 5 est réalisée en trois étapes à partir du melphalan commercial 1 (Schéma 9).

La première étape consiste à coupler le melphalan 1 avec la 3-(diméthylamino)propylamine 2. Cette étape nécessite de protéger préalablement la fonction amine du melphalan par un groupement *tert*-butyloxycarbonyl. Le melphalan, sous sa forme non chlorhydrate, est traité par la triéthylamine puis par le dicarbonate de di-*tert*-butyle dans le méthanol. Après cinquante minutes d’agitation à température ambiante, le milieu est acidifié à pH = 1 avec une solution aqueuse d’acide chlorhydrique 1 N puis extrait avec de l’acétate d’éthyle. Le couplage avec la 3-diméthylamino-1-propylamine 2 est alors réalisé directement sur le produit brut en présence d’agents de couplage peptidiques usuels, dicyclocarbodiimide et hydroxybenzotriazole (DCC/HOBt), dans le dichlorométhane. Une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice permet d’isoler le dérivé amine tertiaire 3 avec un rendement de 54 %.

La seconde étape consiste à quaterniser le bras amine tertiaire en présence d’iodure de méthyle dans l’éthanol anhydre. Le composé 4 est obtenu avec un bon rendement de 84 % après précipitation dans l’éther éthylique anhydre.

Enfin, la dernière étape consiste à déprotéger la fonction amine en milieu acide dans l’éthanol chlorhydrique 2 N. Une partie des contre-ions iodures se retrouvent alors substitués par des contre-ions chlorures. Une colonne sur résine échangeuse d’ions est donc nécessaire pour substituer la totalité des iodures par des chlorures, l’objectif étant de conserver un seul

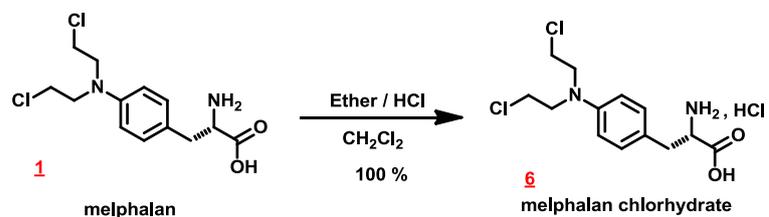


Schéma 10 : Synthèse du melphalan chlorhydrate 6

type d'ions pour la détermination du poids moléculaire en vue des études biologiques. L'échange a été confirmé par microanalyse pour laquelle le pourcentage d'iode a été donné inférieur à 100 ppm. Le melphalan-AQ est ainsi obtenu avec un rendement global de 39 %. Tous les composés de cette séquence réactionnelle ont été caractérisés par analyse infra-rouge, RMN ^1H , RMN ^{13}C , spectrométrie de masse et analyse centésimale.

Sur le spectre RMN ^1H du composé final **5**, la fonction ammonium quaternaire est caractérisée par un singulet intégrant pour neuf protons à 3,06 ppm. La forme chlorhydrate de l'amine primaire est visible par la présence d'un singulet élargi intégrant pour trois protons à 8,48 ppm, correspondant à la fonction NH_3^+ .

Cette forme chlorhydrate de l'amine est également confirmée par le spectre infra-rouge avec la présence d'une bande d'absorption entre 2500 et 3200 cm^{-1} correspondant aux vibrations de valence $\nu_{\text{NH}_3^+}$.

La caractérisation de la structure du dérivé ammonium quaternaire **5** a été, d'autre part, complétée par une analyse par spectrométrie de masse en mode électrospray. Cette analyse donne un pic moléculaire m/z 402/403/405 d'intensité relative 9/6/1 caractéristique de la présence des deux atomes de chlore.

L'analyse centésimale réalisée nous a permis d'une part, de vérifier l'échange complet des anions iodures et, d'autre part, de déterminer la formule brute du composé **5** qui est isolé sous forme hydratée : $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O} \cdot 1,5\text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{HCl}$:

Valeurs théoriques : %C : 47,90 ; %H : 7,20 ; %N : 11,80 ; %O : 3,40 ; %Cl : 29,80

Valeurs trouvées : %C : 42,56 ; %H : 7,41 ; %N : 9,70 ; %O : 7,98 ; %Cl : 32,97

Cette analyse nous permet de déterminer la masse molaire du dérivé ammonium quaternaire **5** du lot utilisé pour les études biologiques : 539,80 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

B. Synthèse du melphalan chlorhydrate **6**

Le melphalan commercial **1**, sous forme non chlorhydrate, est insoluble dans les solvants aqueux. Pour les besoins des études *in vitro* et *in vivo*, nous avons choisi de synthétiser le chlorhydrate correspondant **6**.

Son obtention s'effectue en milieu totalement anhydre. Une suspension du melphalan commercial **1** est réalisée dans du dichlorométhane anhydre. Après ajout d'éther éthylique chlorhydrique 2 N, le milieu est agité quelques minutes avant d'être évaporé. Le résidu est



ensuite repris par de l'éther éthylique anhydre puis le milieu est agité pendant une nuit, sous argon, afin d'être certain d'obtenir un composé non hydraté. Le lendemain, une simple filtration sous argon, permet d'obtenir le melphalan sous forme chlorhydrate **6**, avec un rendement quasi-quantitatif. Ce composé a été caractérisé par analyse infra-rouge, RMN ^1H , RMN ^{13}C , spectrométrie de masse et analyse centésimale.

La transformation du melphalan en son chlorhydrate est confirmée en analyse infra-rouge par la disparition des bandes à ≈ 1600 et $\approx 1400\text{ cm}^{-1}$ caractéristiques du groupement COO^- du melphalan au profit d'une bande d'absorption intense à 1740 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$ acide) et d'une bande large vers 2900 cm^{-1} correspondant aux vibrations de valence $\nu_{\text{NH}_3^+}$. Ce sel d'ammonium est également mis en évidence par deux bandes intenses à 1615 et 1520 cm^{-1} correspondant respectivement aux vibrations antisymétriques et symétrique du groupement NH_3^+ .

Les résultats de la microanalyse nous permettent de déterminer la formule brute et la masse molaire du composé **6** : $\text{C}_3\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 1,5\text{HCl}$ et $359,68\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Valeurs théoriques : %C : 45,70 ; %H : 5,60 ; %N : 8,20 ; %O : 9,40 ; %Cl : 31,10

Valeurs trouvées : %C : 42,95 ; %H : 5,66 ; %N : 7,46 ; %O : 9,25 ; %Cl : 34,38



II. Etudes in vitro du melphalan-AQ et du melphalan,HCl.

A. Modes opératoires

1. Détermination du pouvoir alkylant par le test à la NBP

90 µL d'une solution à 5 % (p/v) de 4-(4'-nitrobenzyl)pyridine (NBP) dans le n-propanol contenant 0,125 volumes de tampon phosphate (100 mM, pH 7,4) sont déposés dans chaque puits des microplaques 96 puits (Nunclon™ surface). Après incubation à 37 °C, 10 µL de n-propanol seul ou, d'une solution de melphalan-AQ **5** ou melphalan,HCl **6** sont ajoutés (ces solutions sont préparées dans le n-propanol de telle sorte que la concentration finale en **5** ou **6** dans chaque puits soit de 2 mM). Les microplaques sont alors agitées pendant une minute sur Tiramax avant d'être incubées à 37 °C pendant 15, 30, 60, 180 et 240 minutes. Une fois le temps d'incubation terminé, 150 µL d'une solution révélatrice contenant du 3-aminopropan-1-ol et de l'alcool *tert*-butylique (25/75, v/v) sont distribués dans chaque puits. La coloration bleue du complexe NBP-alkylant est obtenue après agitation. La densité optique est mesurée à 540 nm sur un spectrophotomètre "Labsystem Multiskan MS" avec lecteur de microplaques.

2. Culture cellulaire

L'évaluation de la cytotoxicité du melphalan-AQ **5** et du melphalan,HCl **6** a été réalisée sur différentes lignées : HEMC-SS, chondrosarcome humain ; Saos2, Ostéosarcome humain ; M4Beu, mélanome humain et sur une lignée de chondrocytes sains humains :

- La lignée HEMC-SS (chondrosarcome humain, ECACC, Salisbury, Royaume-Uni) est cultivée dans un milieu DMEM/F12 (v/v) (Dutcher, Brumath, France) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (Biowest, Nuillé, France), 4 mg/L de gentamicine (Dutcher) et 2 mM de glutamine (Fischer, Illkirch, France).
- La lignée Saos-2 (ostéosarcome humain, ATCC, Manassas, USA) est cultivée dans un milieu McCoy's 5A (Dutcher) supplémenté par 10 % de sérum de veau foetal (Biowest) et 4 mg/L gentamicine (Dutcher).
- Les chondrocytes (PromoCell, Heidelberg, Allemagne) sont cultivés dans le milieu "Chondrocyte Growth Medium" (PromoCell) + "SupplementMix" (PromoCell).



- La lignée M4Beu, obtenue par le Pr J.F. Doré (mélanome humain, Centre Léon Bérard, Lyon, France), est cultivée dans un milieu MEM + glutamax (Fischer) supplémenté par 4 mg/L de gentamicine (Dutcher), 10 % de sérum de veau fœtal (Biowest), 1 % d'une solution vitaminique (Fischer, 100 X), 1 % d'acides aminés non-essentiels (Fischer, 100 X) et 1 % de pyruvate de sodium (Dutcher, 100 mM).

Toutes les lignées sont cultivées dans une étuve à 37 °C en normoxie (21 % O₂, 5 % CO₂).

3. Evaluation de la cytotoxicité par le test à la résazurine

Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits (Nunclon™ Surface) à une densité de 15.10^3 cellules pour 150 µL de leur milieu de culture respectif. Les plaques sont conservées pendant 24 h à l'étuve à 37 °C pour laisser les cellules adhérer. Lors de la phase de traitement, 50 µL de solution du composé à étudier (composé ayant été solubilisé dans le diméthylsulfoxyde, DMSO) sont ajoutés de telle sorte que la concentration finale en DMSO soit de 0,5 % (v/v). Les cellules sont incubées pendant 72 h en présence ou non du composé. L'effet cytotoxique est alors évalué par le test à la résazurine d'après la procédure décrite par O'Brien *et al.* [186].

La fluorescence est mesurée avec un automate, le Fluoroskan Ascent FL™ (Labsystems) à une longueur d'onde d'excitation de 630 nm et d'émission de 590 nm. L'activité cytotoxique est définie comme la concentration nécessaire pour inhiber la croissance cellulaire de 50 % (CI₅₀).

4. Cytométrie en flux

Les cellules sontensemencées à raison de 1.10^5 cellules par boîte de Pétri de 20 cm² puis laissées 24 h à l'étuve pour adhérer au support. Lors de la phase de traitement, dans chaque boîte de pétri, 25 µL d'une solution du composé à étudier solubilisé dans le DMSO (à la concentration de 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM ou 20 µM), sont ajoutés de telle sorte que la concentration finale en DMSO soit de 0,5 % (v/v). Après incubation pendant un temps défini (15, 24, 48 ou 72 h), le tapis cellulaire est décollé par l'action de la trypsine 1 X. La suspension cellulaire, contenant le milieu de culture et les cellules adhérentes, est séparée en deux suspensions. La première suspension servira à l'analyse du cycle cellulaire (évaluation du pourcentage de cellules en phase G0G1, S, G2M ou SubG0G1), la seconde à déterminer le pourcentage de cellules en phase apoptotique par le test à l'anexine V. Le test à l'Annexine V permet de différencier les cellules apoptotiques des cellules mortes ou vivantes.



Suspension 1 : Détermination du pourcentage de cellules en phase G0G1, S, G2M et SubG0G1.

La suspension est centrifugée (400 g, 8 minutes, 4 °C), le culot cellulaire est repris dans 1 mL de tampon phosphate froid (DPBS 1 X, Invitrogen), puis, de nouveau centrifugé (10000 rpm, 5 minutes, 4 °C). Le surnageant est alors éliminé puis les culots sont plongés dans l'azote liquide avant d'être conservés à - 80 °C jusqu'à analyse.

Lors de l'analyse, le culot est repris par 300 µL de ribonucléase (1 mg/mL) auxquels sont ajoutés 300 µL d'iodure de propidium (0,1 mg/mL, Sigma Aldrich, France). La distribution du cycle cellulaire est analysée par un cytomètre en flux (Beckman Coulter Epics XL 4C) aux longueurs d'ondes de 488 nm (excitation) et 620 nm (lecture).

Suspension 2 : Détermination du pourcentage de cellules en phase apoptotique.

Le test à l'annexine V est réalisé en utilisant les réactifs du kit "Annexin V - FITC kit" (Beckman Coulter, Marseille, France). Après avoir compté les cellules, la suspension est centrifugée (500 g, 5 minutes, 4 °C). Le surnageant est éliminé puis le culot est repris par le tampon de réaction contenu dans le kit afin d'obtenir une concentration comprise entre 5.10^5 et 5.10^6 cellules par mL. Pendant toutes les manipulations, la suspension cellulaire doit être conservée sur de la glace pilée.

Lors de l'analyse, à 100 µL de suspension cellulaire sont ajoutés 1 µL de solution d'Annexine V - FITC, puis 5 µL d'iodure de propidium (ces réactifs sont contenus dans le kit). Après agitation douce, les tubes sont placés quinze minutes dans le noir avant d'ajouter 400 µL de tampon contenu dans le kit Annexin V - FITC. L'analyse au cytomètre en flux doit se faire dans les trente minutes.

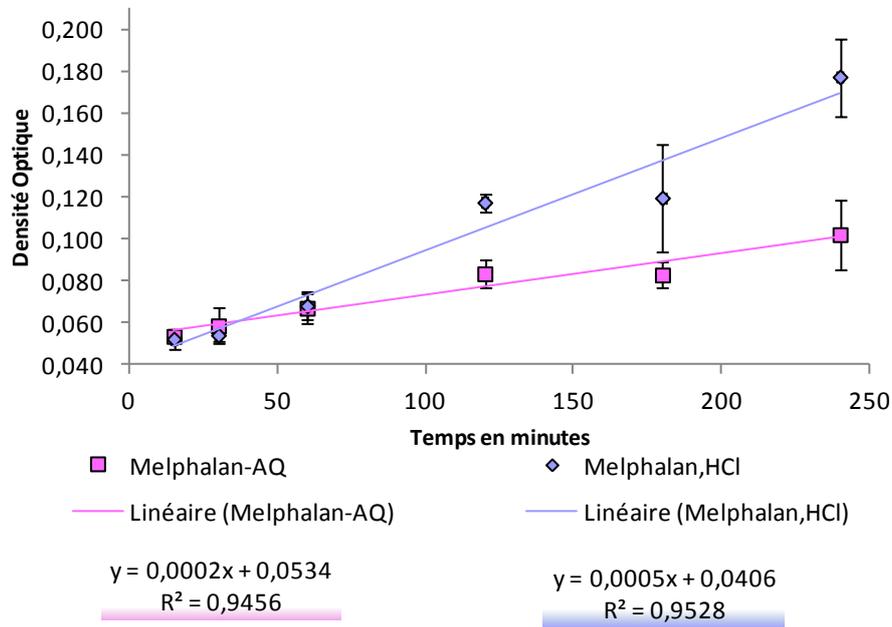


Figure 79 : Détermination du pouvoir alkylant - Test à la NBP

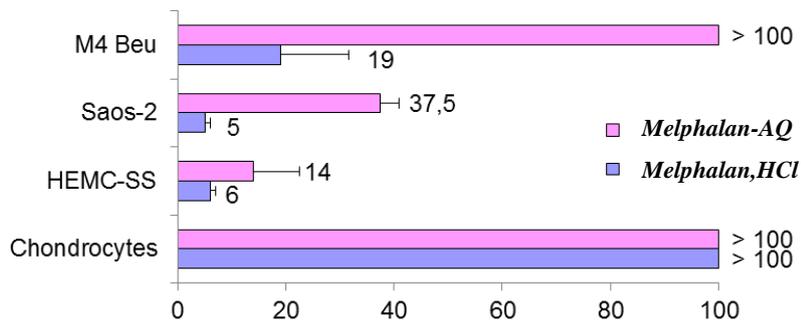


Figure 80 : Valeur des CI₅₀ en µM déterminées pour quatre lignées cellulaires après traitement au melphalan,HCl ou au melphalan-AQ

B. Résultats

1. Evaluation du pouvoir alkylant

Le test à la 4-(4'-nitrobenzyl)pyridine (NBP) constitue une technique simple basée sur un dosage colorimétrique du complexe NBP-agent alkylant qui correspond à un chromophore violet. La NBP agit comme un substrat pour l'attaque nucléophile de la partie alkylante de la molécule, à savoir, la fonction bis(2-chloroéthyl)amino, mimant ainsi l'alkylation de l'ADN. Ce test permet donc de déterminer le pouvoir alkylant d'un composé. La formation du complexe est plus ou moins rapide selon le pouvoir alkylant de la molécule testée.

Dans notre cas, le melphalan-AQ **5** forme un complexe avec la NBP et possède donc un pouvoir alkylant (*Figure 79*). Ce pouvoir alkylant est cependant moins rapide que celui du melphalan,HCl **6**. En effet, au temps 240 minutes, la densité optique du complexe NBP-melphalan,HCl atteint $0,18 \pm 0,02$ alors que la densité optique du complexe NBP-melphalan-AQ est de $0,10 \pm 0,02$.

Ces résultats prouvent que le greffage du bras ammonium quaternaire ne modifie pas de façon significative l'alkylation.

2. Détermination de la cytotoxicité par le test à la résazurine

Les études de cytotoxicité mettent en évidence une activité cytotoxique pour le melphalan-AQ **5** comme pour le melphalan,HCl **6** sur les lignées Saos-2 et HEMC-SS (*Figure 80*). La CI_{50} du melphalan-AQ **5** est respectivement de $37,5 \pm 3,53 \mu\text{M}$ et de $14,0 \pm 8,48 \mu\text{M}$ pour les lignées Saos-2 et HEMC-SS. Pour le melphalan,HCl **6**, les valeurs de CI_{50} sont respectivement de $5,0 \pm 1,01 \mu\text{M}$ et de $6 \pm 1,10 \mu\text{M}$ pour ces mêmes lignées. De plus, un différentiel intéressant est observé pour les deux molécules entre la lignée de chondrocytes sains et la lignée de chondrocytes tumoraux, pour laquelle tous deux sont inactifs. Concernant la lignée M4Beu, le melphalan-AQ **6** ne montre pas d'activité cytotoxique contrairement au melphalan,HCl dont la CI_{50} est de $19 \pm 12,73$.

3. Caractérisation de l'activité cytotoxique

Pour caractériser l'activité cytotoxique, nous nous sommes intéressés à l'effet "temps d'incubation" mais aussi, à l'effet "dose". Dans un premier temps, les cellules de chondrosarcome HEMC-SS sont traitées pendant des temps variables (15, 24, 48 ou 72 h) et à

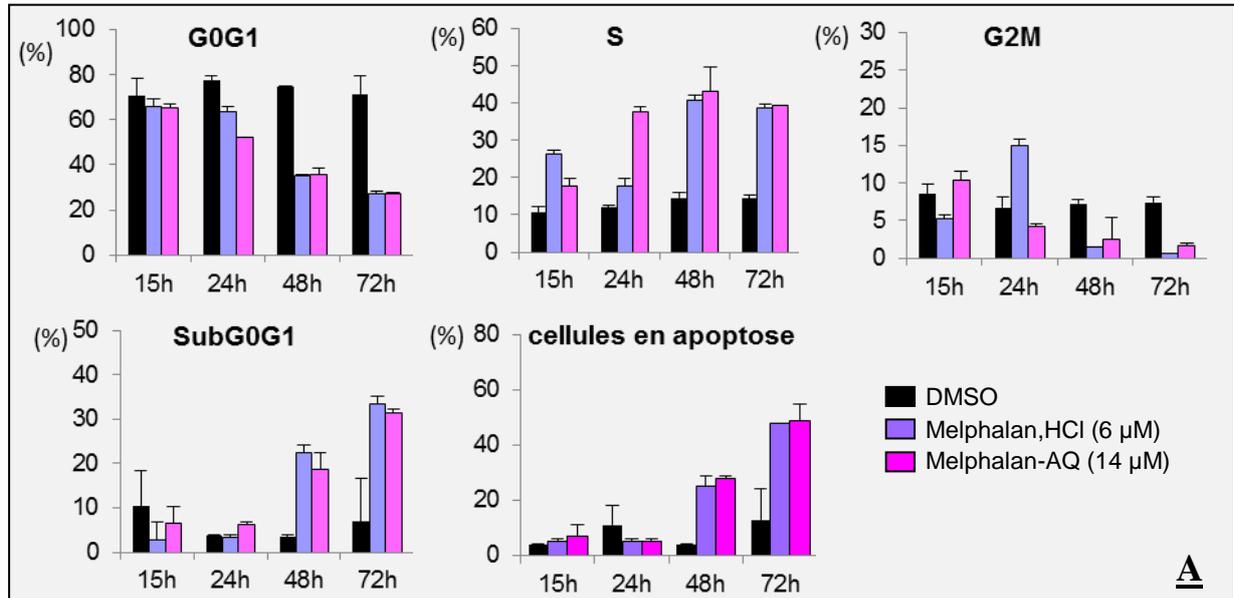


Figure 81 : Répartition cellulaire dans les différentes phases du cycle cellulaire après traitement au melphalan,HCl ou au melphalan-AQ à la dose correspondant à leur CI_{50} pendant 15 h, 24 h, 48 h et 72 h sur la lignée HEMC-SS

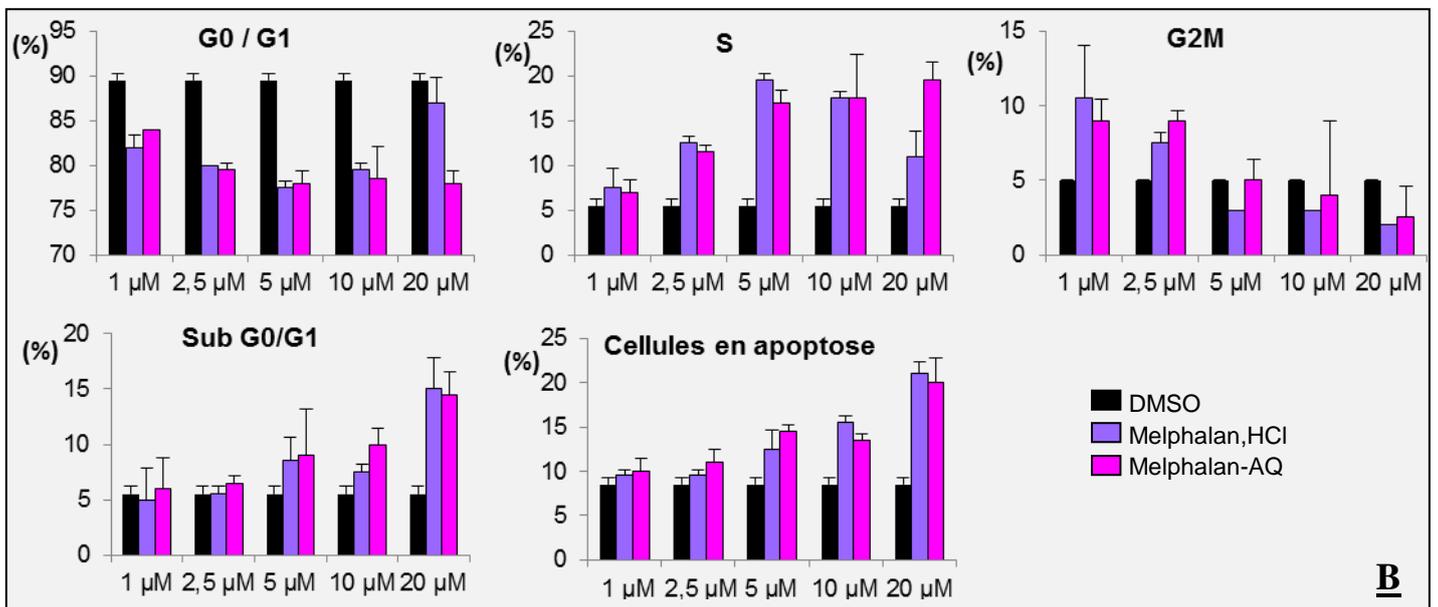


Figure 82 : Répartition cellulaire dans les différentes phases du cycle cellulaire après traitement au melphalan,HCl ou au melphalan-AQ à la dose de 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M ou 20 μ M pendant 24 h sur la lignée HEMC-SS

une dose correspondant à la valeur de leur CI_{50} respective (14 μM pour le melphalan-AQ **5** et 6 μM pour le melphalan,HCl **6**) (*Figure 81*). Dans un second temps, elles sont traitées pendant 24 h à la dose de 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM ou 20 μM (*Figure 82*).

Concernant l'influence du temps d'incubation (*Figure 81*) : un blocage en fin de phase S temps dépendant, ainsi qu'un début d'apoptose sont observés à partir de 48 h pour le melphalan,HCl **6** et le melphalan-AQ **5**. Concernant les cellules traitées au melphalan-AQ **5** pendant 72 h, la proportion en phase S et en SubG0G1 est augmentée respectivement de 2,7 et de 4,6 fois par rapport au contrôle. Pour les cellules traitées au melphalan,HCl, cette augmentation est respectivement de 2,7 et de 4,8 fois. Le subG0G1 correspond ici à des cellules en apoptose. En effet, la corrélation, entre le pourcentage des cellules en phase subG0G1 et celui des cellules en apoptose marquées à l'annexine, est bonne avec un coefficient de corrélation $r = 0,97$.

Concernant l'influence de la concentration (*Figure 82*), on observe un blocage en phase S et un début d'apoptose dès 5 μM pour les deux composés. Comparativement à la proportion de cellules en phase S en l'absence de traitement et à la dose de 20 μM , la proportion de cellules pour cette même phase est 3,5 fois plus importante après traitement au melphalan-AQ **5** et 2 fois plus importante après traitement au melphalan,HCl **6**.

L'ensemble de ces résultats démontrent que le greffage du bras ammonium quaternaire, au niveau de la fonction acide du melphalan, ne supprime pas son activité cytotoxique. En effet, le melphalan-AQ **5** conserve un pouvoir alkylant, ainsi qu'une cytotoxicité semblable à celle du melphalan,HCl **6** pour les lignées osseuses (Saos-2) et cartilagineuses (chondrocytes sains et tumoraux). De plus, les études de cytométrie de flux révèlent un blocage en fin de phase S temps et concentration dépendant ce qui est caractéristique de la famille des moutardes azotées dont fait partie le melphalan [187].

Chapitre III – Application à la vectorisation d'agents cytotoxiques avec le melphalan-AQ

Dose (mg/kg)	Dose (μ mol/kg)	Score Clinique	Nombre d'animaux	Nombre de morts	% de mort	
52	96	-	5	5	100 %	
35	65	0	6	5	83 %	
30	55	-	6	6	100 %	
26	48	0	5	3	60 %	
22	40	0	6	4	67 %	Perte de poids en %
17,5	32	0	5	0	0 %	6 %
10	18	0	5	0	0 %	5 %
4	7	0	5	0	0 %	3 %

Tableau 3 : Détermination de la DMT du melphalan-AQ 5 administré en i.v. sur souris OF1

III. Etudes in vivo

L'activité cytotoxique du melphalan-AQ **5**, typique des moutardes azotées, ayant été démontrée *in vitro*, nous avons souhaité, *in vivo*, évaluer son efficacité antitumorale comparativement à son équivalent non vectorisé, le melphalan,HCl **6**. Il nous a donc fallu, dans un premier temps, déterminer la toxicité de ce composé sur souris OF1.

A. Dose Maximale Tolérée (DMT) du melphalan-AQ **5** et du melphalan,HCl **6**

La Dose Maximale Tolérée (DMT) du melphalan est connue, elle est de 25 $\mu\text{mol/kg}$ [188], ce qui correspond à 9 mg/kg de melphalan,HCl **6**. Il nous a fallu déterminer la DMT du melphalan-AQ **5**.

L'expérience a été réalisée sur des souris OF1 mâles (n = 43) âgées de six semaines (Charles River, France). Chaque groupe de cinq ou six souris ont reçu une administration de melphalan-AQ **5** en i.v. comprise entre 4 et 52 mg/kg. Le melphalan-AQ **5** a été solubilisé dans une solution de chlorure de sodium (9 g.L⁻¹) avec 2 % d'éthanol. Le volume injecté correspondait à un volume de 200 μL pour un poids de 20 g. Suite à l'injection, chaque souris a été pesée régulièrement et son état général surveillé. La DMT est définie comme la plus haute dose administrée répondant à un certain nombre de critères :

- ▶ Aucune mort dans un groupe
- ▶ Perte de poids maximum admise : 10 %
- ▶ Score clinique le plus faible possible.

Le score clinique est évalué pour chaque souris en s'intéressant à un certain nombres de signes cliniques : diarrhée, poils hérissés, yeux clos, léthargie. Pour chaque signe clinique, on attribue une valeur de 1 si la souris présente le signe en question. Dans le cas contraire, on attribue une valeur de 0. En faisant la somme des valeurs, on obtient le score clinique pour chaque souris.

Aucune souris n'a révélé de signes cliniques. La DMT est donc déterminée essentiellement en considérant la perte de poids (*Tableau 3*). A la dose de 17,5 mg/kg, soit 32 $\mu\text{mol/kg}$, aucune mort n'est rapportée. De plus, la perte de poids maximum observée à cette même dose est de 6 % (< 10 %). **La DMT du melphalan-AQ administré en i.v. sur souris OF1 est donc de 32 $\mu\text{mol/kg}$, soit 17,5 mg/kg.**



B. Efficacité antitumorale et toxicité in vivo du melphalan-AQ 5 comparativement au melphalan,HCl 6

L'évaluation *in vivo* de l'efficacité du melphalan-AQ 5, comparativement au melphalan,HCl 6, a été réalisée sur le modèle de rat porteur de chondrosarcome Swarm décrit précédemment dans le chapitre II.

Deux protocoles ont été envisagés :

Dans un premier temps, les doses étudiées étaient équimolaires entre elles. Pour le melphalan-AQ 5, elle était de 16,2 $\mu\text{mol/kg}$ soit 8,7 mg/kg ce qui correspond à 50 % de sa DMT et, pour le melphalan,HCl 6, de 16,2 $\mu\text{mol/kg}$ soit 5,8 mg/kg, (65 % de sa DMT).

Dans un second temps, les doses étudiées correspondaient à 50 % de leur DMT respective. Pour le melphalan-AQ 5, elle était toujours de 16,2 $\mu\text{mol/kg}$ soit 8,7 mg/kg mais, pour le melphalan,HCl 6, elle était abaissée à 12,5 $\mu\text{mol/kg}$ soit 4,5 mg/kg.

Quelques soit les doses :

- ▶ Les effets indésirables ont été évalués par la pesée régulière de tous les animaux et par le prélèvement sanguin pour l'analyse de la formule hématologique (Unité d'Epidémiologie Animale, INRA, Saint Genès Champanelle, France).
- ▶ Le volume tumoral a été régulièrement mesuré au pied à coulisse.
- ▶ Des imageries scintigraphiques ont été réalisées avec le radiotracteur $^{99\text{m}}\text{Tc-NTP 15-5}$.
- ▶ Les animaux ont été sacrifiés, soit une semaine après la dernière dose, soit à un stade avancé. Dans les deux cas, les tumeurs ont été pesées et le dosage biochimique des protéoglycanes a été réalisé.
- ▶ Des fragments de tumeurs ont été envoyés en analyse anatomopathologique (Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France).

1. Modes opératoires

a. Analyses hématologiques

Des prélèvements sanguins ont été réalisés pour chaque rat. Les rats ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane (CSP, Cournon d'Auvergne, France) dans l'air (1,5 %, 1 L/min). 200 μL de sang ont été prélevés dans la veine de la queue avec une seringue surmontée d'un cathéter (BD vacutainer, Plymouth, UK) préalablement hépariné (heparine choay, Sanofi-aventis, Paris, France).



Le sang a été récupéré dans des tubes coatés en EDTA (Venosafe, Terumo Leuven, Belgique) puis les tubes ont été agités très lentement pendant deux minutes. Les échantillons ont, enfin, été analysés avec un analyseur d'hématologie (scil Vet abc, Scil, France).

b. Evaluation de l'effet antitumoral

L'effet antitumoral a été évalué par l'imagerie scintigraphique réalisée avec le radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ et par la mesure du volume tumoral au pied à coulisse.

Mesure du volume tumoral au pied à coulisse

↪ Le volume tumoral (**VT**), à un stade donné et pour chaque tumeur, a été estimé par la mesure au pied à coulisse des deux dimensions de la tumeur, selon la formule :

$$VT (mm^3) = (L \times l^2)/2$$

Avec "**L**" : longueur en mm et "**l**" : largeur en mm

Les mesures ont été réalisées systématiquement par le même opérateur et dans les mêmes conditions afin de limiter au maximum la variabilité.

↪ Le paramètre **T/C** a été estimé à un stade donné [189] :

$$T/C = (VT \text{ moyen du groupe traité à } J_x / VT \text{ du groupe témoins à } J_x) \times 100$$

↪ L'inhibition tumorale (**TGI**) a pu être exprimée en pourcentage selon la formule :

$$TGI = 100 - T/C$$

↪ Le temps de doublement (**TD**) a été déterminé. Il correspond au temps que met une tumeur pour doubler de volume et s'exprime en unité de temps. Ce temps de doublement est déterminé individuellement pour chaque animal puis moyenné. Sa détermination est possible lorsque le volume tumoral suit une fonction exponentielle de formule $V_T = V_0 \cdot e^{at}$ (V_0 : Volume tumoral au stade J_0), la formule est alors :

$$TD = Ln2 / a$$

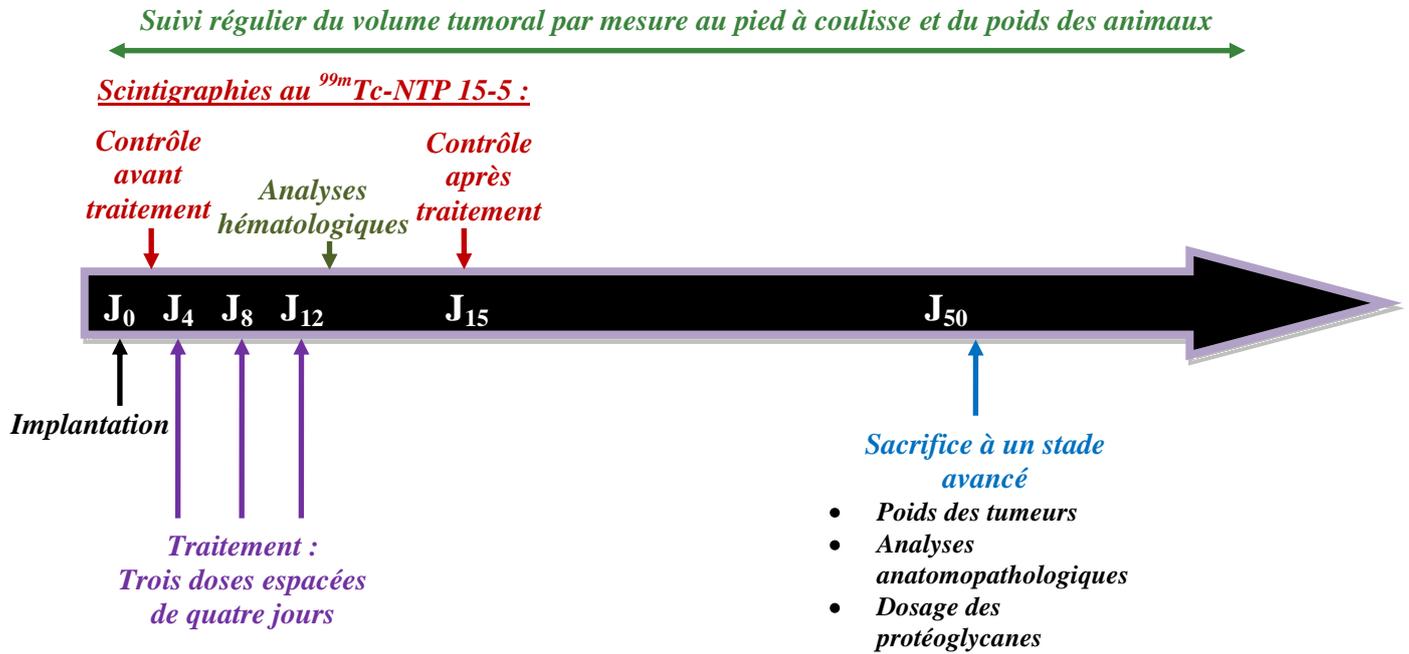


Figure 83 : Synopsis de l'étude in vivo

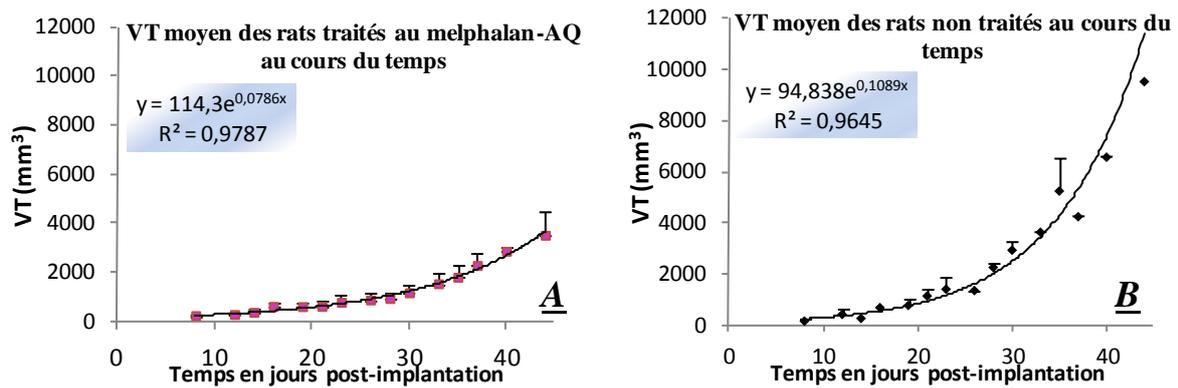


Figure 84 : Evolution du volume tumoral moyen pour les rats traités au melphalan-AQ (A) et les rats non traités (B)

L'évolution suit une fonction exponentielle et permet de déterminer un temps de doublement

Imagerie scintigraphique

Comme démontré dans *le chapitre II*, le radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ peut être utilisé pour évaluer la réponse à un traitement. Durant la phase de traitement, aucun contrôle par imagerie n'a été effectué, ce, pour éviter une éventuelle compétition entre le radiotracer et le melphalan-AQ **5**, deux molécules vectorisées par un ammonium quaternaire. Pour chaque imagerie scintigraphique, le rapport T/M "*Activité surfacique de la tumeur / Activité surfacique du muscle*" a été déterminé, puis, moyenné pour chaque groupe.

c. Dosage des protéoglycanes

En vue du dosage des protéoglycanes, les échantillons de tissu ont été rapidement congelés dans l'azote liquide puis conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à analyse. Le dosage des protéoglycanes a été réalisé par un test biochimique. Chaque échantillon de tumeur a été préalablement pesé puis réduit en poudre avec un broyeur de tumeur (GentleMACS Dissociator, Miltenyi Biotec) dans $300\text{ }\mu\text{L}$ d'un tampon de digestion contenant $0,6\text{ mg/mL}$ de papaïne et $0,25\text{ mg/mL}$ de dithiothreitol (DTT) dans un tampon phosphate ($20\text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$, $20\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 1 mM EDTA , pH 6,8).

Les suspensions ont ensuite été incubées 24 h à $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. La teneur en glycosaminoglycanes (GAG) sulfatés a été déterminée en utilisant le kit "*Sulfated Glycosaminoglycan Assay*" (Biocolor Ltd, Belfast, Ireland).

2. Comparaison des deux traitements à dose équimolaire

L'étude consiste à injecter en i.v. trois doses de melphalan-AQ **5** ($16,2\text{ }\mu\text{mol/kg}$ soit $8,7\text{ mg/kg}$), de melphalan,HCl **6** ($16,2\text{ }\mu\text{mol/kg}$ soit $5,8\text{ mg/kg}$) ou de sérum physiologique. Ces doses sont espacées de quatre jours à partir du stade J_4 post implantation (*Figure 83*).

a. Evaluation de l'effet antitumoral

Evaluation par mesure du volume tumoral au pied à coulisse

La croissance du volume tumoral moyen des rats traités au melphalan-AQ **5** et celle des rats non traités suivent une fonction exponentielle avec de très bons coefficients de corrél-

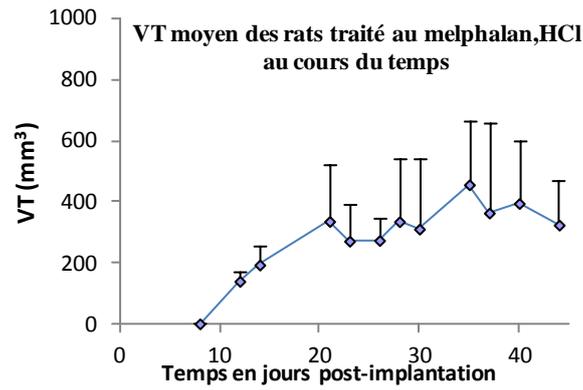


Figure 85 : Evolution du volume tumoral moyen pour les rats traités au melphalan,HCl
L'évolution ne suit pas une fonction exponentielle et ne permet pas de déterminer de temps de doublement

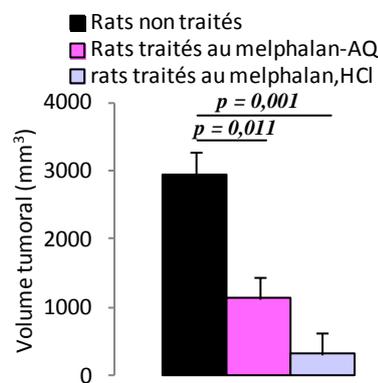


Figure 86 : Volume tumoral moyen au stade J₃₀ pour les trois groupes

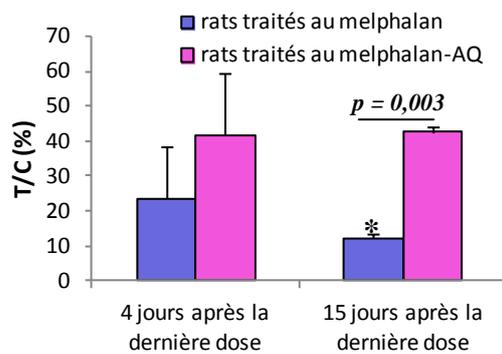


Figure 87 : Valeurs du T/C en pourcentage quatre jours et quinze jours après administration de la dernière dose.

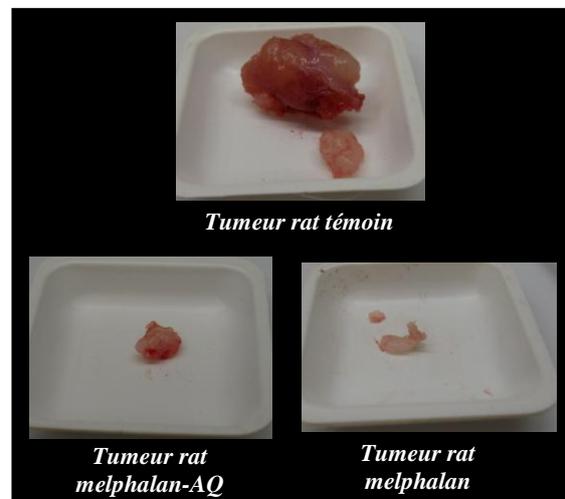


Figure 88 : Photographies des tumeurs prélevées en fin d'étude

lation respectivement de 0,9893 et de 0,9821 (*Figure 84, A et B*), ce qui correspond à des temps de doublement respectifs de 8,8 et de 6,4 jours. Le melphalan-AQ 5 entraîne donc une inhibition de la croissance tumorale avec un allongement du temps de doublement de 40 %.

Concernant les rats traités au melphalan, un effet antitumoral est également observé. Cependant, la croissance du volume tumoral moyen ne suit pas une fonction exponentielle et ne permet pas de déterminer de temps de doublement (*Figure 85*). Nous pouvons néanmoins comparer les volumes tumoraux entre les trois groupes d'animaux.

Au stade J₃₀ (*Figure 86*), le volume tumoral moyen des rats traités au melphalan-AQ 5 ($2,95.10^3 \pm 0,32.10^3 \text{ mm}^3$) est 2,6 fois plus petit que les rats non traités. Le volume des rats traités au melphalan,HCl 6 ($0,31.10^3 \pm 0,30.10^3 \text{ mm}^3$) est, quant à lui, 9,5 fois plus petit que les rats non traités. Cette diminution du volume tumoral est significative chez les rats traités comparativement aux rats non traités, et ce, quelque soit le traitement ($p = 0,011$ pour le melphalan-AQ 5 et $p = 0,001$ pour le melphalan, HCl 6).

De plus, des valeurs de T/C (*Figure 87*) et de TGI peuvent être déterminées. Dès quatre jours après la dernière injection, la valeur du paramètre T/C est de $23,7 \pm 14,8 \%$ pour les rats traités au melphalan,HCl 6 alors que le T/C pour les rats traités au melphalan-AQ 5 est de $41,6 \pm 18,1 \%$. Cette différence n'est cependant pas significative. 15 jours après administration de la dernière dose, la différence devient significative ($p = 0,003$) avec des T/C respectifs de $12,3 \pm 1,3 \%$ pour les rats traités au melphalan,HCl 6 et de $42,6 \pm 1,6 \%$ pour les rats traités au melphalan-AQ 5, ce qui impose un TGI respectif de 87,7 et de 57,4 % (*Figure 87*). Même si une efficacité supérieure est obtenue pour le traitement au melphalan,HCl 6, l'efficacité antitumorale du melphalan-AQ 5, avec un rapport T/C de 42,6 %, peut être considérée comme intéressante selon les critères du National Cancer Institut [182].

A la fin de l'étude, les tumeurs sont prélevées. Leurs tailles chez les rats traités sont nettement plus petites que celles des tumeurs pour les rats non traités (*Figure 88*), ce qui illustre bien l'effet antitumoral.

Scintigraphie avec le radiotracteur ^{99m}Tc-NTP 15-5

L'analyse quantitative de l'imagerie au stade J₂ (avant traitement) et J₁₅ (après traitement) met en évidence une diminution significative de la fixation chez les rats traités ($p < 0,05$) (*Figure 89*) dès trois jours après la dernière dose. En effet, au stade J₁₅, le rapport T/M est de $1,20 \pm 0,09$ pour les rats traités au melphalan-AQ 5 et de $1,28 \pm 0,06$ pour les rats

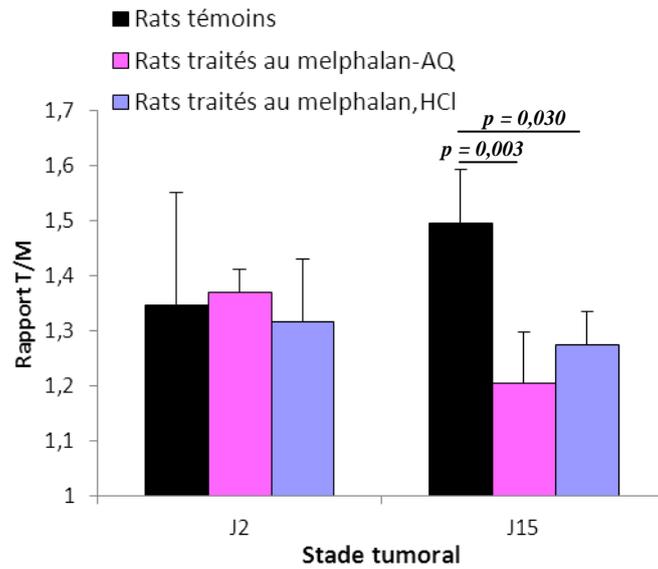


Figure 89 : Rapport de fixation T/M du ^{99m}Tc-NTP 15-5 chez les rats traités au melphalan-AQ ou au melphalan,HCl, et chez les rats non traités, avant (stade J₂) et après (stade J₁₅) traitement

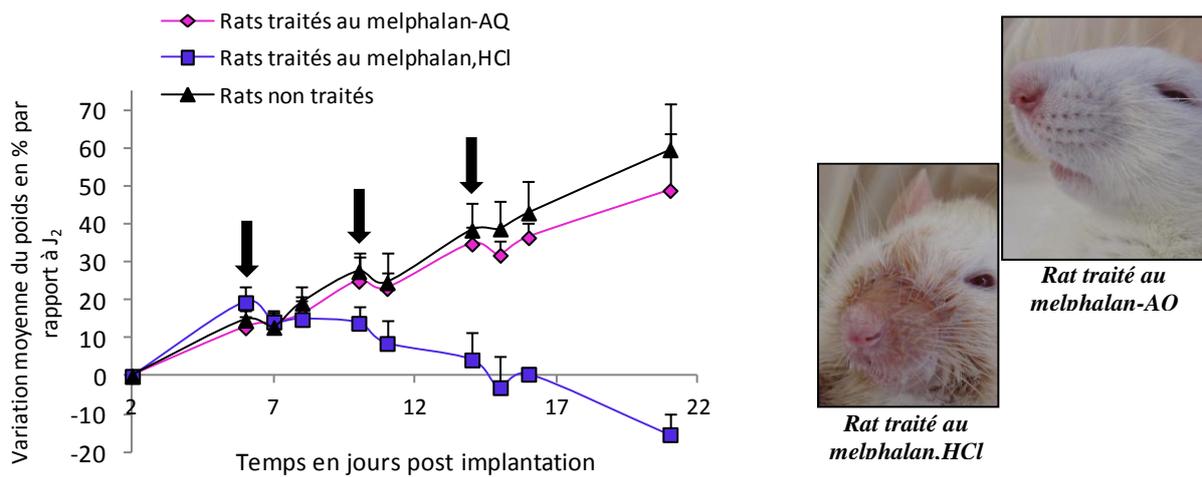


Figure 90 : Variation moyenne du poids des rats traités au melphalan,HCl ou au melphalan-AQ à dose équimolaire comparativement à l'évolution moyenne du poids chez les rats non traités

traités au melphalan,HCl 6, contre $1,50 \pm 0,10$ pour les rats contrôles.

b. Les effets indésirables

Les rats traités au melphalan-AQ 5 suivent une courbe de poids semblable à celle des rats contrôles, avec, pour ces deux groupes, une très légère perte de poids (< 1 %) observée le lendemain de chaque injection (*Figure 90*). Aucun autre signe clinique n'est recensé: pas de léthargie, pas de diarrhée... Tous les rats semblent très bien tolérer le traitement.

En ce qui concerne les rats traités au melphalan,HCl 6, ces derniers subissent une chute de poids très importante, et ce, dès le lendemain de la première injection et amplifiée à chaque dose administrée jusqu'à atteindre une perte de poids de 15 % au stade J₂₁. Pour ces derniers, de la diarrhée, des saignements, de l'irritation et des phénomènes de pelades sont observés.

Le melphalan est un agent alkylant très cytotoxique, non sélectif et responsable d'un certain nombre d'effets indésirables dont des désordres hématologiques qui peuvent expliquer les saignements importants observés. Des analyses hématologiques sont donc réalisées dès le lendemain de la dernière dose (J₁₃).

Ces analyses mettent en évidence une chute du taux de globules blancs plus importante pour les rats traités au melphalan,HCl 6 que pour les rats traités au melphalan-AQ 5 ($p = 0,097$) (*Figure 91*). En effet, le taux de globules blancs pour les rats traités au melphalan,HCl 6 est presque trois fois moins important que celui des rats traités au melphalan-AQ 5. Ces effets sont fréquemment observés chez des patients souffrant de myélome multiple et traités au melphalan [190,191].

L'ensemble de ces résultats démontrent qu'à dose équimolaire, le traitement au melphalan non vectorisé est beaucoup moins bien toléré que le traitement au melphalan vectorisé.

c. Les modifications du tissu tumoral engendrées par le traitement

Après prélèvement, en vue des analyses anatomopathologiques, les échantillons de tumeurs, sont conservés dans l'AFFA jusqu'à analyse (Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France).

Comparativement aux rats témoins, une diminution significative ($p \ll 0,01$) du nombre de mitoses est observée pour les rats traités au melphalan,HCl 6 ou au melphalan-AQ 5

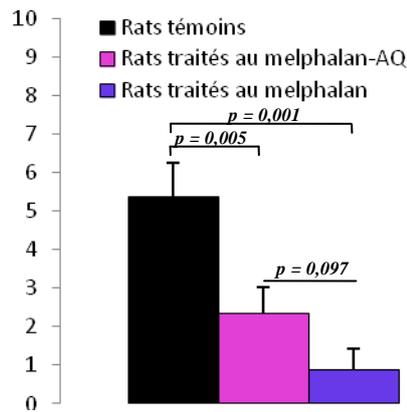


Figure 91 : Taux de globules blancs (10³/μL) dans le sang des rats après traitement, au stade J₁₃

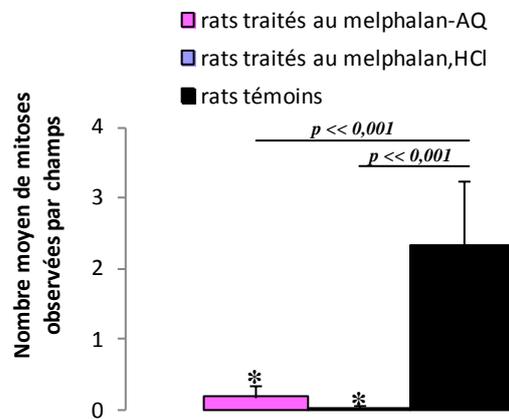


Figure 92 : Diminution du nombre de mitoses chez les rats traités

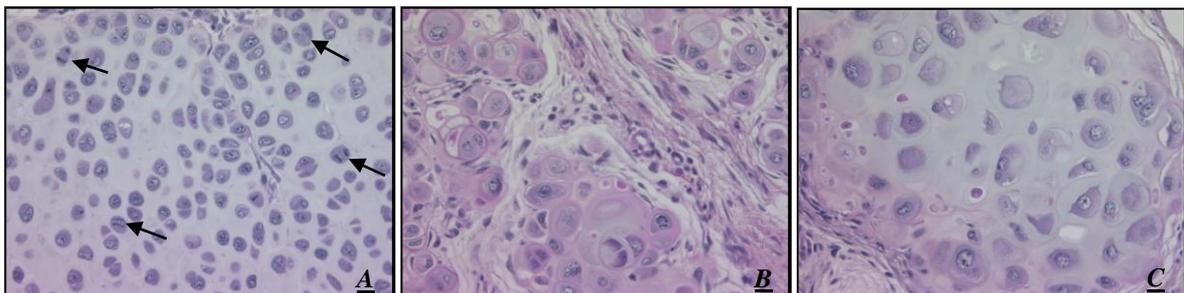


Figure 93 : Coupes de tumeurs, coloration HES, grossissement x 20

A : témoin ; B : melphalan-AQ ; C : melphalan, HCl

On observe de nombreuses mitoses (←) chez les témoins

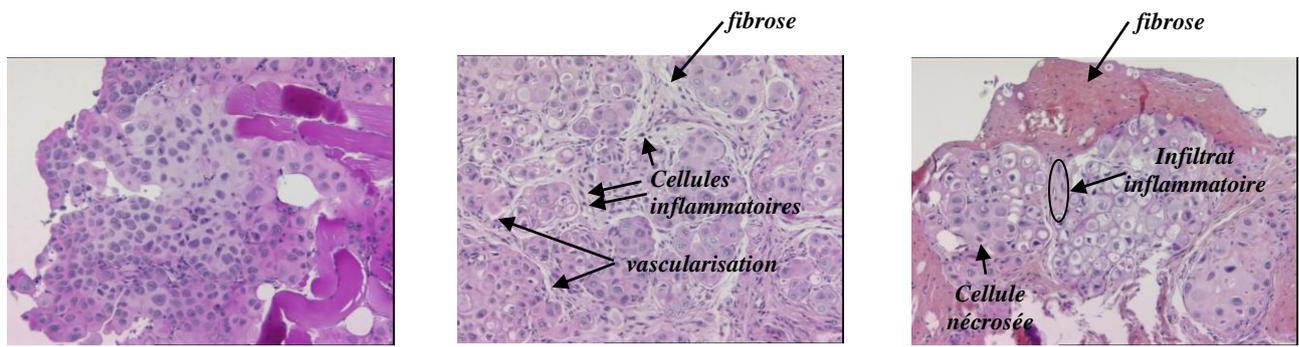


Figure 94 : Coupes de tumeur, coloration HES, grossissement x 10
A : témoin ; B : melphalan-AQ ; C : melphalan,HCl

Intensité de la coloration au bleu alcian	Traitement		
	Melphalan-AQ	Melphalan,HCl	NaCl
importante	43 %	40 %	75 %
modérée	43 %	60 %	25 %
faible	14 %	0 %	0 %

Figure 95 : Intensité de la coloration au bleu alcian dans les tumeurs

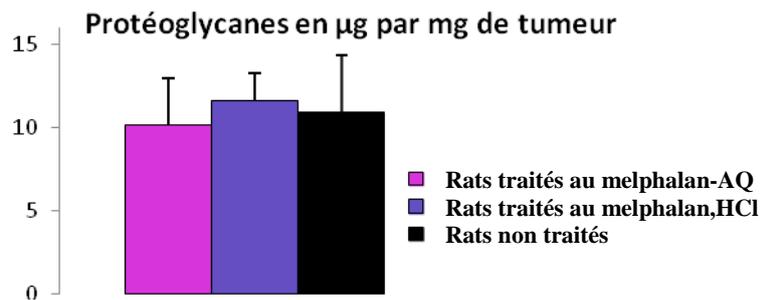


Figure 96 : Dosage biochimique des protéoglycane dans les tumeurs



(*Figure 92 et Figure 93*). Le nombre moyen de mitoses observées par champs est respectivement de $0,17 \pm 0,16$ et de $0,02 \pm 0,04$ pour les rats traités au melphalan-AQ 5 et ceux traités au melphalan,HCl 6. La différence entre les deux traitements n'est cependant pas significative. Cette observation est le premier signe d'un ralentissement de la croissance tumorale pour les deux traitements.

A cela, s'ajoutent des signes de régression tumorale (*Figure 94*) observés chez 57 % des rats traités au melphalan-AQ 5 et 40 % des rats traités au melphalan,HCl 6, tels que des cellules nécrosées. Un phénomène inflammatoire, marqué par la présence de nombreux lymphocytes et de zones de fibrose, semble se mettre en place chez les rats traités que ce soit au melphalan,HCl 6 ou au melphalan-AQ 5. Cet infiltrat est associé à une augmentation de la vascularisation qui offre aux lymphocytes (cellules inflammatoires) un accès au tissu pour éliminer les cellules nécrosées. L'inflammation est donc, ici, un signe indirect de l'efficacité du traitement.

Concernant la coloration au bleu alcian, les tumeurs non traitées, dans la majorité des cas (75 %), fixent fortement le réactif. Pour ce qui est des tumeurs traitées, l'intensité est plutôt modérée à importante (*Figure 95*). Le dosage des protéoglycanes appuie cette observation (*Figure 96*) puisque aucune différence significative n'est observée quelsoit le groupe.

Ces résultats sont surprenants. En effet, nous nous attendions à mettre en évidence une corrélation entre une efficacité antitumorale et une diminution de la densité en protéoglycanes, que ce soit par coloration au bleu alcian ou par le dosage biochimique, ce qui n'est pas le cas ici. Les analyses démontrent que certaines tumeurs de rats traités au melphalan-AQ 5 ou au melphalan,HCl 6 peuvent présenter à la fois des signes importants de régression tumorale et fixer fortement le bleu alcian. ***Nous ne pouvons donc pas forcément lier l'intensité en protéoglycanes d'un tissu à un effet antitumoral.***

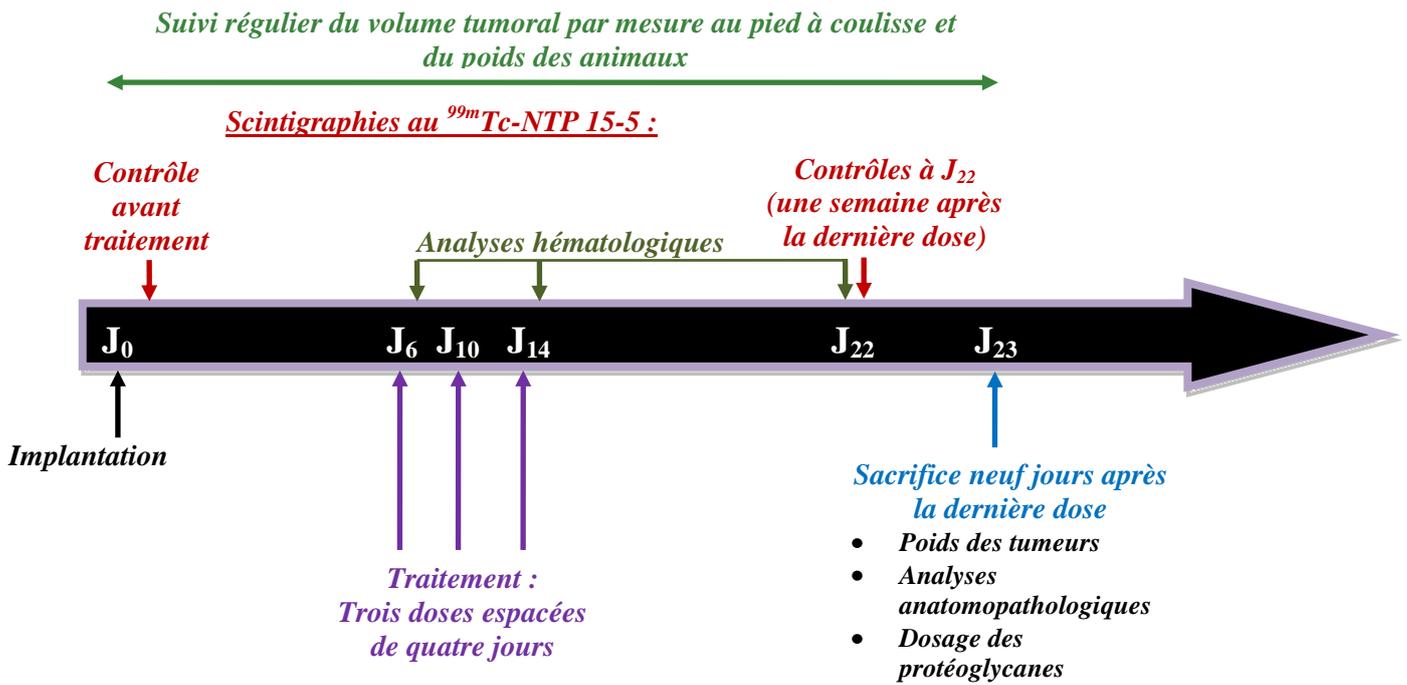


Figure 97 : Synopsis de l'étude in vivo

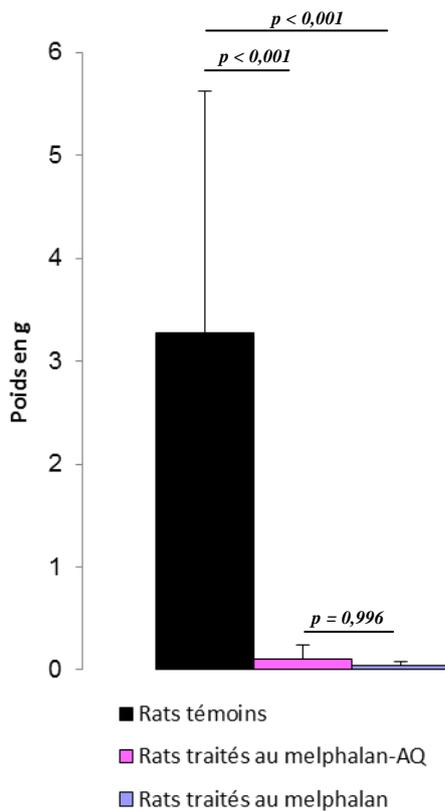


Figure 98 : Poids des tumeurs prélevées à J₂₂

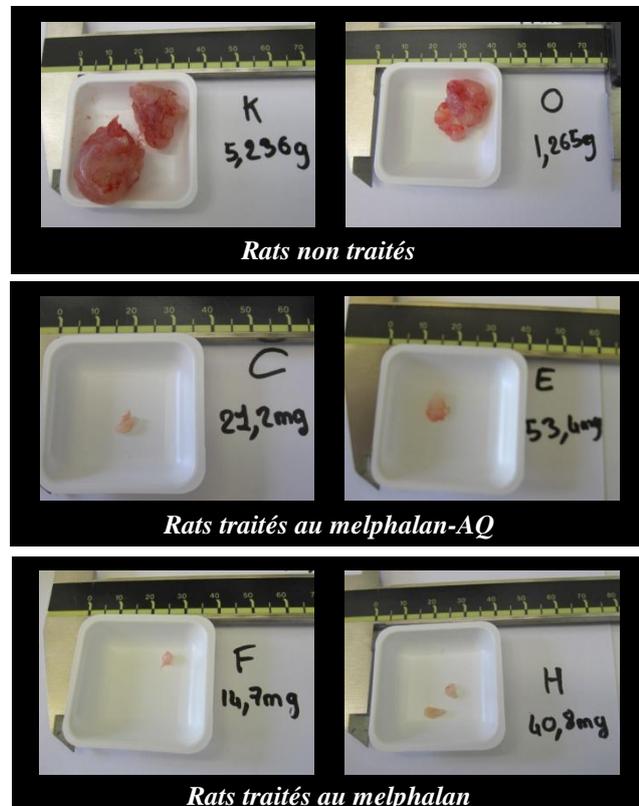


Figure 99 : Photographies des tumeurs prélevées à J₂₂

3. Comparaison des deux traitements à la dose correspondant à 50 % de leur DMT respectives

Une nouvelle étude *in vivo* a été réalisée à dose équivalente en terme de toxicité, soit 50 % de la DMT pour le melphalan-AQ **5** et 50 % de la DMT pour le melphalan,HCl **6** (*Figure 97*):

- ▶ Trois doses de melphalan-AQ **5**, de melphalan,HCl **6** ou de sérum physiologique, espacées de quatre jours, ont été administrées en i.v. à des rats porteurs de chondrosarcome Swarm. Le melphalan-AQ **5** a été administré à raison de 16 $\mu\text{mol/kg}$ (50 % de sa DMT sur souris OF1), le melphalan,HCl **6**, a été, quant à lui, administré à raison de 12,5 $\mu\text{mol/kg}$ (50 % de sa DMT sur souris OF1).
- ▶ Le volume tumoral a été évalué régulièrement par la mesure de la tumeur au pied à coulisse.
- ▶ Les analyses scintigraphiques ont été effectuées avant traitement et une semaine après la dernière dose.
- ▶ Des prélèvements et analyses de la formule sanguines ont été réalisés le lendemain de la première dose (J₇), le lendemain de la dernière dose (J₁₅), ainsi qu'une semaine après la dernière dose (J₂₂)
- ▶ Après sacrifices et prélèvements des tumeurs, au stade J₂₃, le dosage biochimique des protéoglycanes et l'analyse anatomopathologique ont été réalisés.

a. L'efficacité antitumorale

Pour cette étude, l'efficacité antitumorale a été évaluée par la pesée des tumeurs au stade J₂₂, soit une semaine après injection de la dernière dose. En effet à ce stade, alors que toutes les tumeurs des rats contrôles sont mesurables au pied à coulisse, seulement 40 % des tumeurs des rats traités au melphalan,HCl **6** et 40 % des tumeurs des rats traités au melphalan-AQ **5** sont palpables. L'effet antitumoral est bien illustré par le poids et la taille des tumeurs, *Figure 98* et *Figure 99*. De plus, alors que la différence des rats traités versus contrôles est significative ($p < 0,001$ quelque soit le traitement), la différence entre les deux traitements

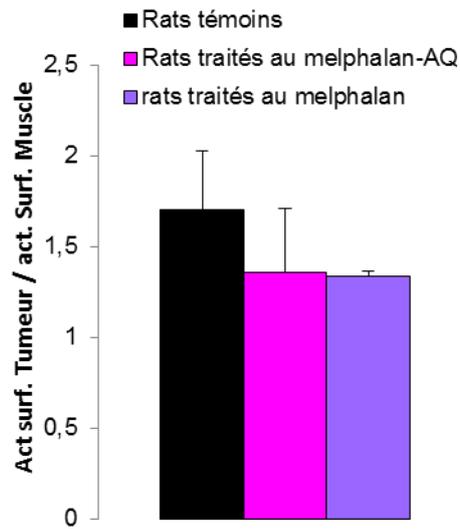


Figure 100 : Activité surfacique de la tumeur sur activité surfacique du muscle pour les rats diagnostiqués positifs au $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$, stade J₂₂

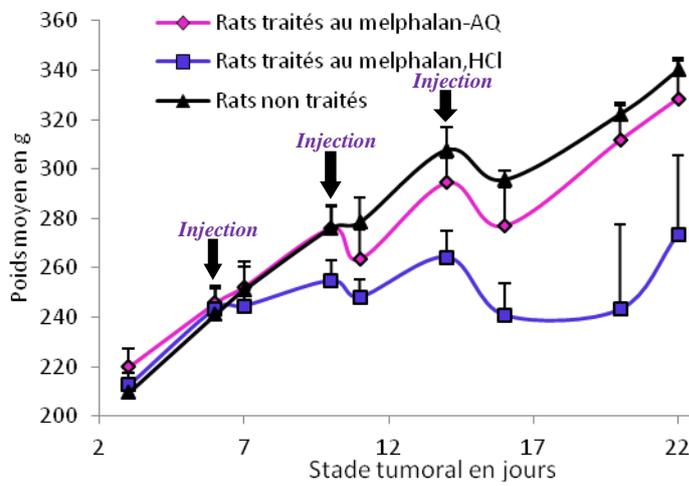


Figure 101 : Evolution du poids moyen pour les trois groupes

est, quant à elle, non significative ($p=0,996$).

Des scintigraphies au $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ sont également réalisées au stade J_{22} , soit juste avant le sacrifice des animaux. Alors que la totalité des rats contrôles sont diagnostiqués positifs au $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$, seulement 40 % des rats traités au melphalan-AQ **5** et 50 % des rats traités au melphalan,HCl **6** le sont. Cette observation s'explique par la taille des tumeurs qui, pour les plus petites, peuvent mesurer de 2 à 3 mm³ et sont donc en limite de résolution (1,8 mm) de la gamma-caméra. Pour les rats diagnostiqués positifs, une diminution du rapport activité surfacique de la tumeur sur activité surfacique du muscle chez les rats traités au melphalan,HCl **6** et chez les rats traités au melphalan-AQ **5** comparativement aux rats témoins a été mise en évidence, cependant cette diminution est non significative (*Figure 100*).

b. Les effets indésirables

Pour tous les rats, une légère perte de poids est toujours observée le lendemain de chaque injection (*Figure 101*).

Une perte de poids plus importante est toujours observée pour les rats traités au melphalan,HCl **6**. Cependant, la diminution de dose administrée rend cette perte de poids réversible, à partir de six jours après la dernière injection (J_{20}). Il faut toutefois noter que, même à cette dose, des saignements et des pelades sont observés.

Les rats traités au melphalan-AQ **5**, tolèrent bien le traitement. En effet, comme lors de l'étude précédente, l'évolution du poids est semblable à celle des rats contrôles et aucun saignement ni diarrée ne sont observés.

Des analyses hématologiques sont réalisées à J_7 (juste avant la 1^{ère} injection), à J_{15} (juste après la 3^{ème} injection) et à J_{22} (une semaine après la dernière injection) (*Figure 102*). La diminution des globules blancs est significativement plus importante ($p = 0,016$) chez les rats traités au melphalan,HCl **6** au stade J_{15} , soit, dès la fin du protocole de traitement. On observe également une diminution significative ($p = 0,009$) du taux de lymphocytes. Une semaine après la dernière injection, on observe une remontée du taux de globules blancs et de la proportion en lymphocytes qui sont de nouveau quantifiables chez les traités au melphalan,HCl **6**. Malgré tout, la différence melphalan,HCl **6** et melphalan-AQ **5** reste toujours significative.

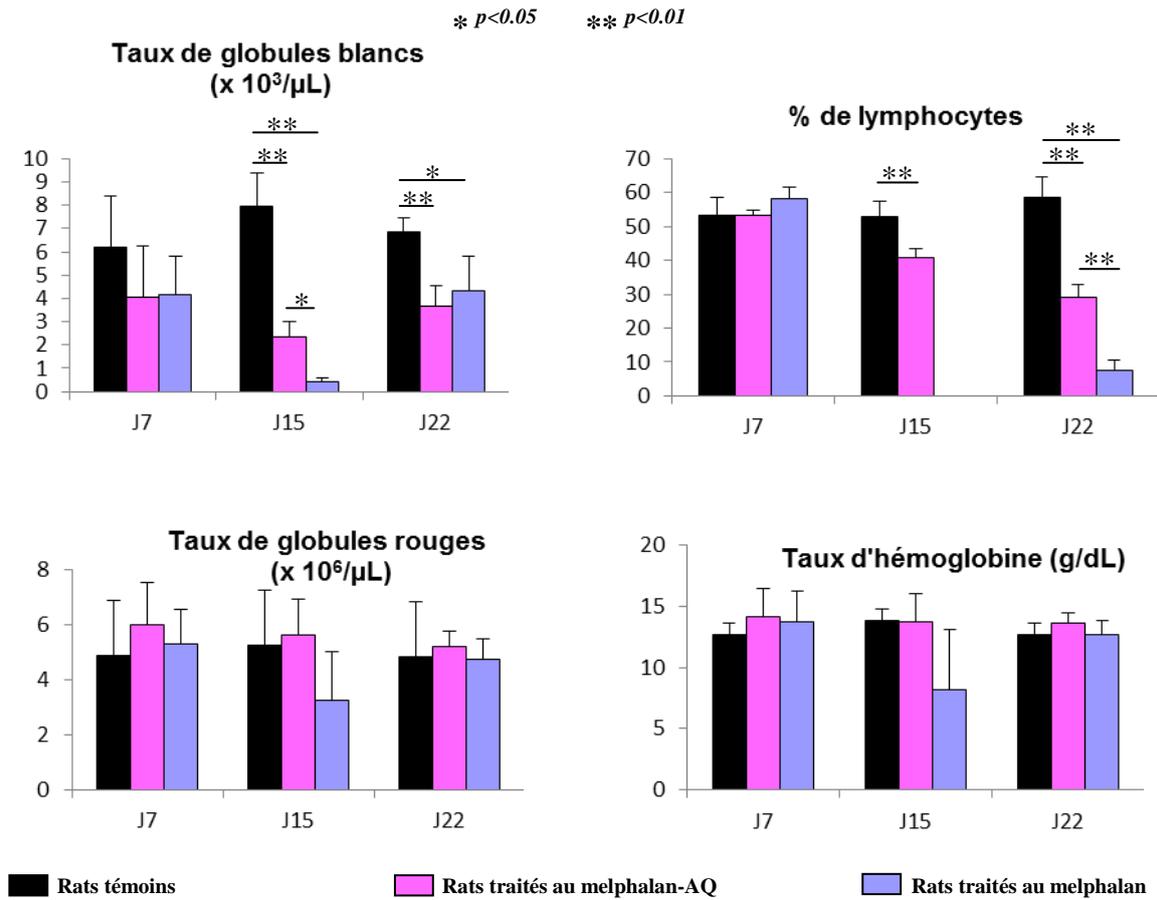


Figure 102 : Analyses hématologiques des rats traités au melphalan, HCl ou au melphalan-AQ comparativement aux rats non traités

J₇ : juste avant la première injection, J₁₅ : juste après la dernière injection et J₂₂ : une semaine après la dernière injection

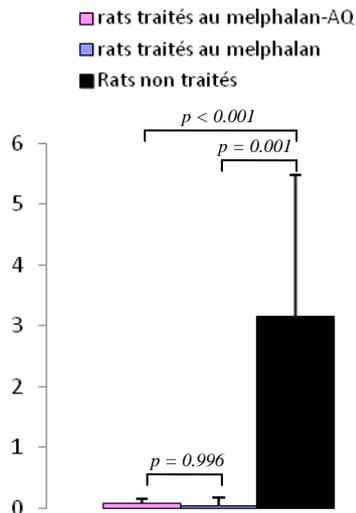


Figure 103 : Nombre moyen de mitoses observées par champs

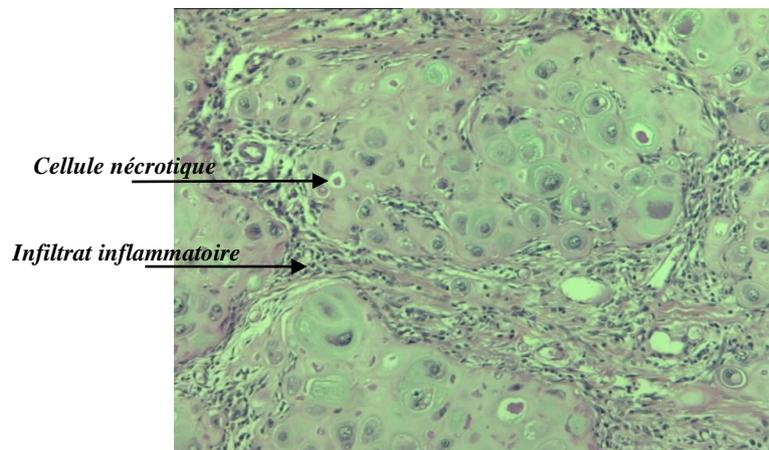


Figure 104 : Tumeur d'un rat traité au melphalan, HCl - Coloration HES, grossissement $\times 10$

Ces analyses mettent également en évidence un taux de globules rouges plus faible chez les rats traités au melphalan,HCl juste après la fin du protocole de traitement (J₁₅) mais cette différence n'est pas significative. Cette diminution du taux de globules rouges peut être associée à une anémie.

Tous ces paramètres évoquent un syndrome myélodysplasique. Les syndromes myélodysplasiques peuvent apparaître après un traitement chimiothérapeutique, plus particulièrement après administration d'un agent alkylant, tel que le melphalan. Ce syndrome est marqué par :

- une diminution des globules blancs qui provoque un affaiblissement du système immunitaire,
- des saignements qui correspondent à des manifestations hémorragiques dues à une insuffisance plaquettaire,
- des anémies dues à une diminution des globules rouges entraînant de la fatigue [192,191].

Une semaine après l'arrêt du traitement (stade J₂₂), le taux de globules rouges et d'hémoglobine sont revenus à la normale. Cependant, même s'ils sont remontés, le taux de globules blancs et le pourcentage de lymphocytes sont toujours significativement diminués chez les traités.

c. Les modifications du tissu tumoral engendrées par le traitement

Les résultats de l'étude anatomopathologique sur les tumeurs prélevées à un stade tardif mettent en évidence les mêmes observations que lors de l'étude précédente à dose équimolaire du melphalan-AQ 5 et du melphalan,HCl 6 :

↳ ***Une diminution du nombre moyen de mitoses par champs chez les rats traités (Figure 103).***

Le nombre moyen de mitoses observées par champs chez les rats non traités est de $3,15 \pm 2,32$ alors qu'il est de $0,03 \pm 0,14$ pour les rats traités au melphalan,HCl 6 et de $0,08 \pm 0,08$ pour les rats traités au melphalan-AQ 5.

↳ ***Des signes importants de régression tumorale (Figure 104).***

Des signes de régression tumorale sont observés chez les rats traités : pour 60 % des rats traités au melphalan-AQ 5 et pour 67 % des rats traités au melphalan,HCl 6. Ces signes comprennent la présence des cellules nécrotiques, de fibrose, la présence de nombreuses cellules inflammatoires ainsi qu'une augmentation de la densité de vascu-

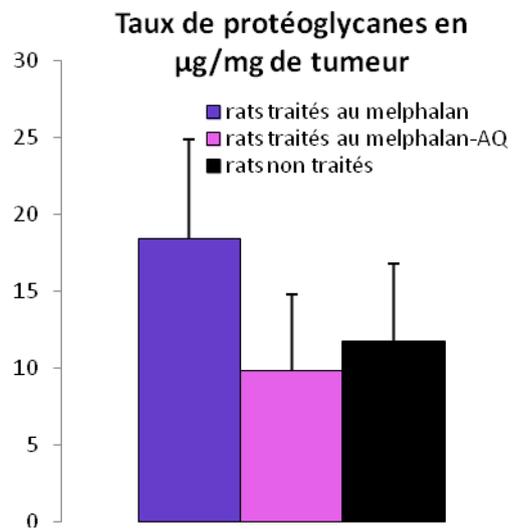


Figure 105 : Dosage biochimique des protéoglycanes dans les tumeurs

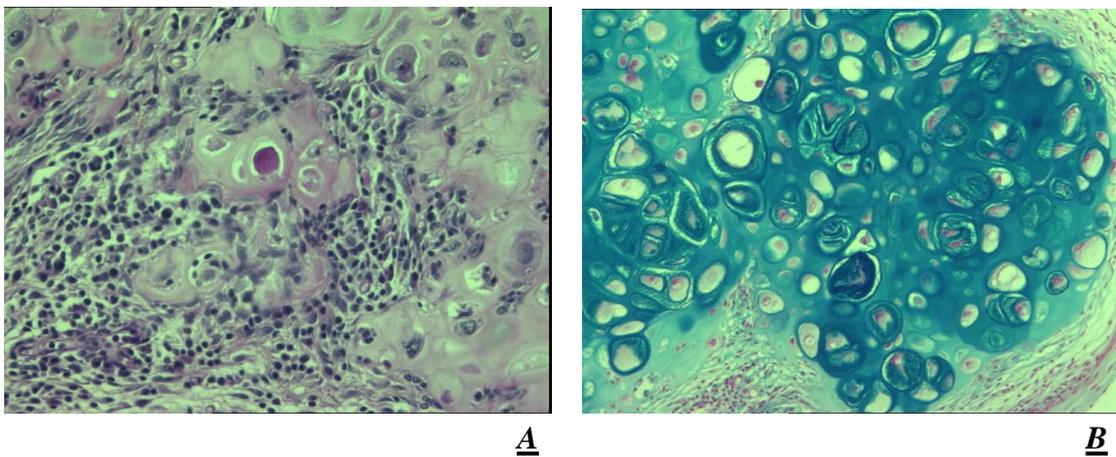


Figure 106 : Analyse anatomopathologique d'une tumeur de rat traité au melphalan-AQ
A : Coloration HES, grossissement x 20, B : Coloration bleu alcian, grossissement x 10

larisation.

↪ **Une corrélation entre l'intensité de la coloration au bleu alcian et l'effet antitumoral difficile à mettre en évidence (Figure 105 et Figure 106)**

Le dosage biochimique (Figure 105) met en évidence une diminution non significative de la densité des protéoglycanes dans les tumeurs des rats traités au melphalan-AQ 5 et des rats traités au melphalan,HCl 6, comparativement aux rats contrôles.

Du point de vue anatomopathologique, il ne semble pas y avoir de corrélation avec l'effet antitumoral. En effet, certaines tumeurs de rats traités peuvent présenter des signes de régression tumorale importants et fixer fortement le bleu alcian. Cette observation est bien visible Figure 106 avec la tumeur d'un rat traité au melphalan-AQ 5. La tumeur est très petite et ne pèse que 21 mg. Les analyses histologiques révèlent d'importants signes de régression tumorale, dont un infiltrat inflammatoire et une densité de vascularisation importants, le nombre de mitoses par champs est très faible (0,1). Malgré un effet antitumoral relativement bien mis en évidence, le marquage au bleu alcian observé est important et hétérogène.

IV. Conclusion

Nous avons démontré *in vitro* que **le greffage du bras ammonium quaternaire par formation d'une liaison amide sur la fonction acide ne supprimait pas l'activité**. En effet, le melphalan-AQ 5 conserve un pouvoir alkylant et une activité sur le cycle cellulaire typique des moutardes azotées, à savoir, un blocage en phase S associé à un processus apoptotique, comparables au melphalan,HCl 6.

Concernant, l'efficacité antitumorale *in vivo*, nous avons démontré qu'il n'y **avait pas de perte d'efficacité, pour le melphalan-AQ 5**. En effet, il n'existe pas de différence significative entre les deux traitements, que ce soit par mesure du volume tumoral, par analyses scintigraphiques au ^{99m}Tc -NTP 15-5, ou encore par analyses anatomopathologiques. Par ailleurs, l'imagerie au ^{99m}Tc -NTP 15-5 réalisée sur les animaux soumis aux traitements renforce les résultats montrant l'intérêt de ce radiotraceur pour le suivi *in vivo* de la réponse du chondrosarcome à la thérapie.

De plus, nous avons, démontré **une diminution considérable des effets indésirables pour les rats traités par le melphalan-AQ 5** comparativement aux rats traités par le melpha-



lan,HCl **6**. Ces derniers subissent une perte de poids dose-dépendante importante ainsi qu’une altération de la formule sanguine typique des moutardes azotées et réversible après arrêt du traitement.

Nous pouvons finalement conclure que le vecteur ammonium quaternaire, non seulement, permet d’amener spécifiquement un cytotoxique au niveau d’un chondrosarcome implanté en orthotopique, mais aussi et surtout, améliore considérablement l’index thérapeutique (rapport efficacité/tolérance), paramètre primordial en oncologie.

Ces résultats démontrent bien l’intérêt de la stratégie de vectorisation par la fonction ammonium quaternaire pour améliorer la prise en charge du chondrosarcome. Nous avons souhaité appliquer cette stratégie à une autre famille d’agent alkylant : les phosphoramides.



V. Publication

Invest New Drugs

DOI 10.1007/s10637-011-9663-z

REVIEW

Quaternary ammonium-melphalan conjugate for anticancer therapy of chondrosarcoma: in vitro and in vivo preclinical studies

Caroline Peyrode · Valérie Weber · Emmanuelle David · Aurélien Vidal · Philippe Auzeloux · Yves Communal · Marie Mélanie Dauplat · Sophie Besse · François Gouin · Dominique Heymann · Jean Michel Chezal · François Rédini · Elisabeth Miot-Noirault

Received: 22 December 2010 / Accepted: 21 March 2011

© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Summary Cartilage tumours present ongoing therapeutic challenges due to their chondrogenic extracellular matrix that potentially hampers drug delivery, their low percentage of dividing cells, and their poor vascularity. In this context, and based on the affinity of the quaternary ammonium moiety for proteoglycans (PG), we developed a strategy that uses the quaternary ammonium function to selectively deliver DNA alkylating agents to the cartilage tumour tissue. We engineered the quaternary ammonium derivative of melphalan (Mel-AQ) and assessed its antitumoural activity in vitro and in vivo. In vitro, micromolar concentrations of Mel-AQ inhibited the proliferation of human HEMC-SS chondrosarcoma and Saos-2 osteosarcoma cell lines. Moreover, 24-h incubation with 20 μ M Mel-AQ induced a 2.5-fold increase in S population and a 1.5-fold increase in subG0G1 population compared to controls. In vivo, Mel-AQ demonstrated antitumour activity in the orthotopic model of primary Swarm rat chondrosarcoma. When given to chondrosarcoma-bearing rats (three doses of 16 μ mol/kg at days 8, 12 and 16 post-implant), Mel-AQ

demonstrated an optimal antitumour effect at day 43, when tumour cell growth inhibition peaked at 69%. Interestingly, the treatment protocol was proved well tolerated, since the animals showed no weight loss over the course of the study. This antitumoural effect was assessed in vivo by scintigraphic imaging using ^{99m}Tc -NTP 15–5 developed in our lab as a PG-targeting radiotracer, and tumour tissue was analyzed at study-end by biochemical PG assay with Alcian blue staining. Mel-AQ treatment led to a significant decrease in the PG content of tumoural tissue. These experimental results highlighted the promising antitumour potential of Mel-AQ as a PG-targeting strategy for therapeutic management of chondrosarcoma.

Keywords Antitumour activity · Swarm Rat chondrosarcoma · Orthotopic model · Proteoglycans · ^{99m}Tc -NTP 15–5 radiotracer · Quaternary ammonium · Melphalan

Introduction

Chondrosarcoma is characterized by the formation of cartilage-like extracellular matrix and accounts for 25% of all bone cancers. Since the tumour is made chemo- and radio-resistant by the poorly vascularized and chondrogenic nature of the tissue, the only therapeutic control of chondrosarcoma currently available is radical surgery [1–3]. Among the numerous strategies aimed at increasing in-target drug accumulation, “vectors” with high specific affinities for one or more targets offer one of the most promising therapeutic opportunities [4]. Our team has built up recognized expertise in vectorization strategies through work identifying chemical carriers able to selectively

C. Peyrode (✉) · V. Weber · A. Vidal · P. Auzeloux · S. Besse · J. M. Chezal · E. Miot-Noirault
UMR 990 INSERM/ UdA, Université d'Auvergne,
Rue Montalembert, BP184, 63005 Clermont Ferrand Cedex,
France
e-mail: caroline.peyrode@inserm.fr

E. David · F. Gouin · D. Heymann · F. Rédini
UMR S957 Inserm, Nantes Atlantique Université,
44035 Nantes, France

Y. Communal · M. M. Dauplat
CLCC Jean Perrin,
63001 Clermont-Ferrand, France

Published online: 16 April 2011

deliver radionuclides and drugs to tissues for targeted imaging and therapy [5, 6]. Our chondrosarcoma management-oriented strategy is to exploit the chondrogenic nature of the tumour in order to selectively deliver drugs or radioisotopes to tumoural tissue.

We focused on the proteoglycan matrix of chondrosarcoma, which is mainly composed of aggrecan-type proteoglycans (PG) [1, 7]. Aggrecan is a complex macromolecule that consists of a central core protein to which numerous chondroitin sulphate and keratan sulphate glycosaminoglycan chains are covalently bound. Due to the high sulphate and carboxylate group content of their glycosaminoglycan moieties, the PG of the extracellular matrix (ECM) have strong negative charges that may interact with the positively-charged quaternary ammonium function [8–10].

We have developed cartilage-targeting compounds for therapeutic or imaging purposes by linking a quaternary ammonium function to anti-inflammatory drugs, chondroprotective agents, cytotoxic agents and ^{99m}Tc chelate. Each of these approaches led to high in-joint compound concentrations after in vivo administration [6, 11–13].

Here, we focused on the quaternary ammonium derivative of melphalan (Mel-AQ), which previously been demonstrated to exhibit high accumulation in cartilage in vivo [6].

This study established both in vitro and in vivo that the anticancer activity profile of Mel-AQ enables selective treatment of chondrosarcoma. In this paper, Mel-AQ was assessed on the basis of (a) in vitro growth-inhibitory activity and cell cycle arrest in chondrosarcoma cell lines and (b) in vivo antitumour potency in an orthotopic model of primary grade-II chondrosarcoma. These preclinical results underlined the potential of a melphalan-based PG-targeting strategy as a promising approach for efficacious therapeutic management of chondrosarcoma.

Materials and methods

Chemistry

The quaternary ammonium-melphalan conjugate was prepared as previously described [14], following the four-step scheme illustrated in Scheme 1. First, melphalan was treated by di-*tert*-butyl dicarbonate with Et_3N in methanol to protect the amine function. Subsequently, reaction with 3-(dimethylamino)-propylamine, dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) in dichloromethane (CH_2Cl_2) afforded the amide **2** in moderate yield. Treatment with methyl iodide in ethanol gave the quaternary ammonium **3**. Finally, the t-Boc-protecting group was removed by 2 N ethanolic hydrochloride solution, giving the target QA derivative **4** from **1** in an overall yield of 39%.

Drug preparation

For in vitro studies, Mel-AQ was dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma Aldrich, France).

For in vivo studies, Mel-AQ was dissolved in normal saline (Versol Sodium Chloride 0.9% 500 mL) with 2% of ethanol.

Cell cultures

HEMC-SS human chondrosarcoma and Saos-2 human osteosarcoma cell lines were ordered from the European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK) and the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA), respectively. Chondrocytes were ordered from PromoCell (Heidelberg, Germany). The transplantable M4Beu human melanoma cells were obtained from Pr. J. F. Dore (Centre Léon Berard, Lyon, France).

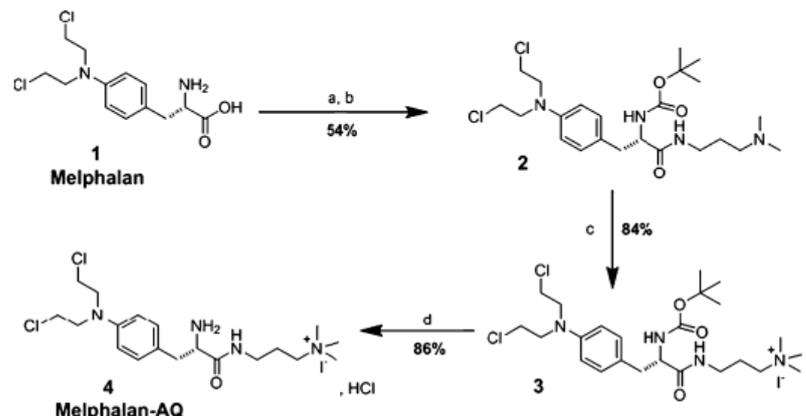
Cell lines were maintained as a monolayer culture in culture media, as follows:

- HEMC-SS cells with DMEM/F12 (v/v) (Dutcher, Brumath, France) supplemented with 10% foetal calf serum (Biowest, Nuaille, France), 4 mg/L gentamicin (Dutcher) and glutamine 2 mM (Fischer, Illkirch, France).
- Saos-2 cells with McCoy's 5A Medium (Dutcher) supplemented with 10% foetal calf serum (Biowest) and 4 mg/L gentamicin (Dutcher).
- Chondrocytes with Chondrocyte Growth Medium (PromoCell) supplemented with the SupplementMix (PromoCell).
- M4Beu cells with MEM+ glutamax (Fischer) supplemented with 4 mg/L gentamicin (Dutcher), 10% foetal calf serum (Biowest), 1% vitamin solution (Fischer, 100×), 1% non-essential amino acids (Fischer, 100×) and 1% sodium pyruvate (Dutcher, 100 mM).

In vitro evaluation of growth-inhibitory activity and cell cycle distribution

Cells were plated in 96-well microplates (Nunc™ Surface 167008) at a density of 15×10^3 cells in 150 μL of corresponding medium, and were allowed to adhere for 24 h before treatment. Fifty microliters of increasing concentrations of Mel-AQ in DMSO (Sigma-Aldrich, France) were then added, maintaining final DMSO concentration at 0.5% (v/v). The cells were incubated for 72 h with or without the drug. The cytotoxic effect of the drug was assessed by the resazurin reduction test as described in [15]. Fluorescence was measured on an automated 96-well Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems) at an excitation wavelength of 530 nm and an emission wave-

Scheme 1 Synthesis of melphalan-AQ



Reagents and conditions: (a) di-*tert*-butyl dicarbonate, Et₃N, MeOH, room temperature; (b) 3-(dimethylamino)propylamine, DCC, HOBT, CH₂Cl₂, room temperature; (c) methyl iodide, dry EtOH, room temperature; (d) 2N EtOH/HCl anhydrous solution, room temperature.

length of 590 nm. Cytotoxic activity was expressed as the drug concentration that inhibited cell growth by 50% (IC₅₀).

For the HEMC-SS human chondrosarcoma line, effects on cell cycle distribution were evaluated cytometrically. 10 × 10⁴ HEMC-SS cells were plated in 25 cm² flasks 72 h before adding DMSO or Mel-AQ at increasing concentrations for 24 h of incubation, or at IC₅₀ concentration for different incubation times (from 5 h to 96 h). After incubation, the cells were harvested by scraping. The cell suspension containing both floating and adherent cells was centrifuged twice (400 g, 8 min at +4°C) in phosphate buffer solution (PBS) (DPBS 1 × Invitrogen). The dry pellets were then frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. After thawing, the cell pellets were resuspended in 500 μL of ribonuclease I (1 mg/mL) added with 500 μL of propidium iodide (1 mg/mL) (Sigma Aldrich, France). The cell cycle distribution was analyzed using a flow cytometer (Coulter Epics XL, Coulter, Hialeah, FL, USA) at 488 and 620 nm wavelengths.

Orthotopic model of Swarm Rat Chondrosarcoma (SRC)

The SRC line was a generous gift from Dr. Patrick A. Guerne (Geneva, Switzerland). It was delivered as tissue fragments which were frozen until use. The male Sprague–Dawley rats (Charles River, L'Arbresles, France) used for this study were handled and cared for in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* [16] and Council Directive 86/609/EEC. Protocols were led under the authorization of the French Directorate of Veterinary Services and were conducted under the supervision of authorized investigators in accordance with the guidelines for the use of laboratory animals in cancer research [17].

For tumour implantation, the rats were anaesthetized by inhalation of isoflurane (CSP, Cournon d'Auvergne,

France) in air (1.5%, 1 L/min) plus an intramuscular injection of 100 mg ketamine (Imalgène; Rhone Merieux, France) per kilogram of body weight.

Tumour fragments were collected from well-developed tumours on the paratibial area of donor Sprague–Dawley rats. These fragments were immediately stored in ice-cold α-minimum essential medium and manually calibrated to 10 mm³. Allograft transplantation of a 10-mm³ SRC fragment was performed on the right paw, the other paw being used as the controlateral control [18]. Using a lateral approach, the cortical surface of the diaphysis was scarified laterally over 10 mm, a 10-mm³ SRC fragment was placed adjacent to the scarified surface, and the muscular and cutaneous wounds were sutured.

In vivo antitumour activity of Mel-AQ

Chondrosarcoma-bearing rats were randomized into two groups: a control group (*n*=6) and a Mel-AQ-treated group (*n*=6). Mel-AQ-treated animals received three Mel-AQ doses (16 μmol/kg per dose) at 4-day intervals (q4d × 3 schedule) injected by i.v. route, beginning on day 8 post-implant. Control animals received the excipient by i.v. route according to the same schedule. Animal weight and tumour size (two perpendicular diameter measurements) were recorded twice a week.

- The Tumour Volume (TV) of each tumour was estimated in two dimensions using the formula:

$$TV(\text{mm}^3) = (L \times W^2)/2$$

where L is length in mm, and W is width in mm.

TV values were averaged within each group at each time-point.

The T/C parameter was calculated over the period of study as the ratio of the mean TV of Mel-AQ-treated rats versus controls [19]:

$$T/C = \frac{\text{TV of treated group on Day X}}{\text{TV of control group on Day X}} \times 100$$

Tumour growth inhibition percentage (TGI) could therefore be expressed as:

$$TGI = 100 - T/C$$

- Weight variation was calculated according the formula:

$$\left(\frac{\text{Weight at Day } x - \text{Weight at Day } 8}{\text{Weight at Day } 8} \right) \times 100$$

Weight variations were averaged within each group at each time-point.

In vivo ^{99m}Tc-NTP 15–5 scintigraphic imaging of chondrosarcoma-bearing rats

Scintigraphic in vivo imaging was performed using a small-animal γ camera (CsI (Na) crystal) equipped with a 1.3/0.2/35 parallel-hole collimator (hole diameter/septum thickness/height in mm) (Gammamager[®], Biospace, France). The energy resolution and intrinsic planar resolution of the system are given as 11% at 140 keV and <2 mm full width at half maximum (FWHM), respectively. All acquisitions were performed with a 15% window centred on the 140-keV photopeak of ^{99m}Tc.

Each animal was submitted to three serial examinations with the ^{99m}Tc-NTP 15–5 radiotracer at Day 7, Day 17 and Day 30 of the protocol. The ^{99m}Tc-N-[triethylammonium]-3-propyl-15ane-N5 (^{99m}Tc-NTP 15–5) radiotracer was prepared and radiolabelled as previously published (specific radioactivity of 25 MBq/ μ mol), and administered by i.v. route to anaesthetized animals (40 MBq/animal) [20]. The animals were anaesthetized intraperitoneally with a mixture of ketamine (50 mg/kg) (Imalgène 500, Merial, France) and xylazine (10 mg/kg) (Rompun 2%, Bayer, France).

Acquisition was performed 15 to 30 min after i.v. tracer administration, with a 10-min planar acquisition for each posterior paw positioned over the camera collimator. Scintigrams were considered positive when tracer uptake areas corresponded to sites of implant. All the scans were evaluated by the same experienced investigator, using fixed-size regions of interest (ROIs) delineated over tumour and muscle patterns. Total activity counts in cpm (counts per minute) per pixel were obtained for each ROI. At each time-point and for

each animal, tumour-to-muscle ratio was calculated as follows:

$$T/M = \frac{\text{count in tumour}}{\text{count in muscle}}$$

Data were averaged within each group, and expressed as means \pm standard deviation.

Quantification of glycosaminoglycans (GAG)

A biochemical assay for GAG was performed on tumours that had been excised at the end of study then rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Each tumour sample was weighed and ground to powder, then solubilized in 300 μL of a digestion buffer containing 0.6 mg/mL papain—0.25 mg/mL dithiothreitol (DTT) in phosphate buffer (20 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA, pH 6.8) and incubated 24 h at 60°C . Sulphated GAG content was determined using a Blyscan Proteoglycan and Glycosaminoglycan assay kit (Biocolor Ltd, Belfast, Ireland).

Histology

Excised tumours of both control and Mel-AQ-treated groups were assayed for the presence of PG after Alcian blue staining.

Results

Mel-AQ inhibited tumour cell growth in bone cancer cell lines in vitro (Fig. 1)

Mel-AQ was found cytotoxic against HEMC-SS and Saos-2 cell lines at micromolar level, with IC_{50} values of 14.0 ± 8.5 and $37.5 \pm 3.5 \mu\text{M}$, respectively. Mel-AQ did not show any cytotoxic activity in human chondrocytes ($\text{IC}_{50} \gg 150 \mu\text{M}$) or M4Beu human melanoma ($\text{IC}_{50} > 150 \mu\text{M}$).

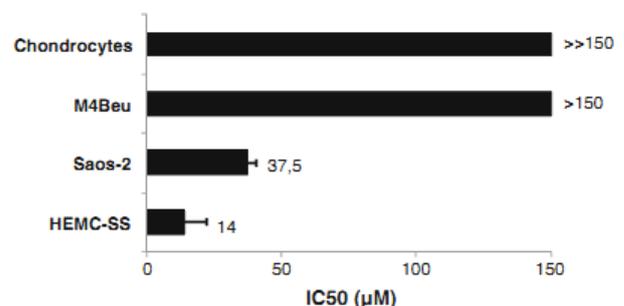


Fig. 1 Cell growth inhibition by Mel-AQ in vitro, in chondrocytes, M4Beu human melanoma, Saos-2 human osteosarcoma and HEMC-SS human chondrosarcoma cell lines. Cells were treated for 72 h, and cytotoxic effect was evaluated by resazurin reduction test. IC_{50} : drug concentration inhibiting 50% of cell proliferation (mean \pm SD)

Mel-AQ induced cell cycle arrest in HEMC-SS chondrosarcoma cells in vitro (Figs. 2 and 3)

As illustrated in Fig. 2, Mel-AQ treatment for a 24-h incubation time led to an increase in cells accumulated in the S and subG0G1 phases and a decrease in cells accumulated in the G0/G1 phase. Compared to controls, at 20 µM dose, Mel-AQ induced a 2.5-fold increase in S population, a 1.5-fold increase in subG0G1 population (indicating apoptosis), and a 1.5-fold decrease in G0/G1 population.

The kinetics of cell cycle arrest were studied at a drug concentration of 14 µM (IC₅₀ value) (Fig. 3). Significant differences were observed between treated cells and controls for the S, subG0G1 and G2M populations, i.e. at 48 h, a 2.5-fold increase, a 3.8-fold increase and a 2.2-fold decrease in the S, SubG0G1 and G0/G1 populations, respectively, and at 96 h, a 1.9-fold, a 16.3-fold increase and a 3.9-fold decrease in the G2M, SubG0G1 and G0/G1 populations, respectively.

Mel-AQ demonstrated antitumour activity in vivo in the orthotopic model of SRC (Fig. 4)

Mel-AQ was given at 16 µmol/kg according to a q4d × 3 schedule beginning on day 8 post-tumour implant. CTV values were significantly lower in the Mel-AQ-treated group than in controls from day 21 (384±145 vs 1,023±227; *p*=0.02) (Fig. 4a). Antitumour effect was optimal at day 43, with a T/C value of 31% corresponding to a 69% inhibition of tumoural growth. As shown in Fig. 4b, no weight loss was associated with the treatment.

In vivo ^{99m}Tc-NTP 15–5 imaging of tumours evidenced changes in radiotracer uptake in Mel-AQ-treated animals vs controls (Fig. 5)

At day 7 (before treatment), all animals showed a high and selective in-tumour accumulation of ^{99m}Tc-NTP 15–5,

enabling highly contrasted chondrosarcoma imaging in vivo, with T/M values of 1.53±0.23 for the Mel-AQ-treated group and 1.33±0.23 for the control group.

^{99m}Tc-NTP 15–5 imaging was strongly affected by Mel-AQ treatment: when animals were examined at day 17, i.e. 24 h after the last dose of Mel-AQ or excipient, T/M value was significantly lower (*p*<0.02) than in controls (1.47±0.16 vs 2.13±0.21). This lower radiotracer accumulation in the Mel-AQ-treated group vs controls was still observed at day 30, i.e. 14 days after the last dose, as shown in Fig. 5b and c (T/M values at day 30: 1.73±0.36 for Mel-AQ rats vs 2.34±0.54 for controls).

PG in tumour tissue was lower in Mel-AQ-treated chondrosarcoma vs controls. (Fig. 6)

Biochemical assay highlighted a lower tumour tissue PG content in the Mel-AQ-treated group compared to controls, i.e. 6.1±1.1 vs 7.5±2.4 µg/mg of tumour, respectively (Fig. 6a). This difference in PG content in Mel-AQ-treated tumours vs controls was confirmed by Alcian blue staining, as illustrated in Fig. 6b and c.

Discussion

Improving tumour selectivity is a priority in the development of new anticancer agents designed to deliver an effective high concentration of cytotoxic agent to target tumour tissue while protecting non-target tissue from toxic side effects. In these approaches, established antineoplastic drugs can be chemically modified to improve their selectivity [4, 21]. This was the strategy employed here: by linking a quaternary ammonium function (exhibiting a high affinity for proteoglycans) to a conventional DNA alkylating agent, we expected to enhance both the delivery

Fig. 2 Cell cycle distribution in HEMC-SS human chondrosarcoma cells treated with Mel-AQ for 24 h in two different experiments (mean±SD). Cells were treated at different concentrations while controls were treated with DMSO

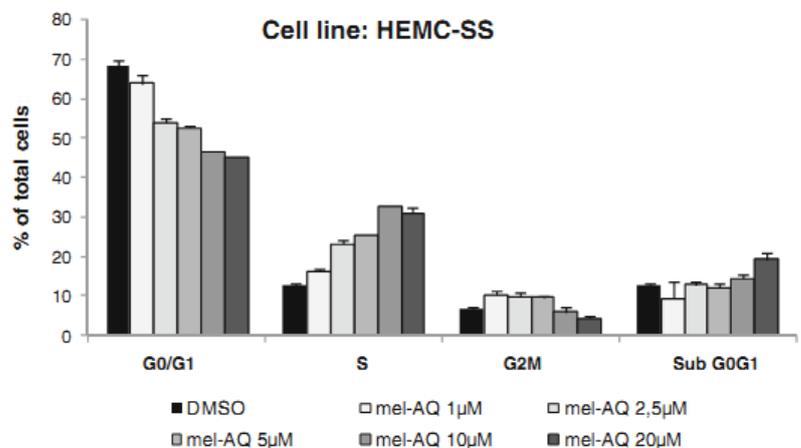
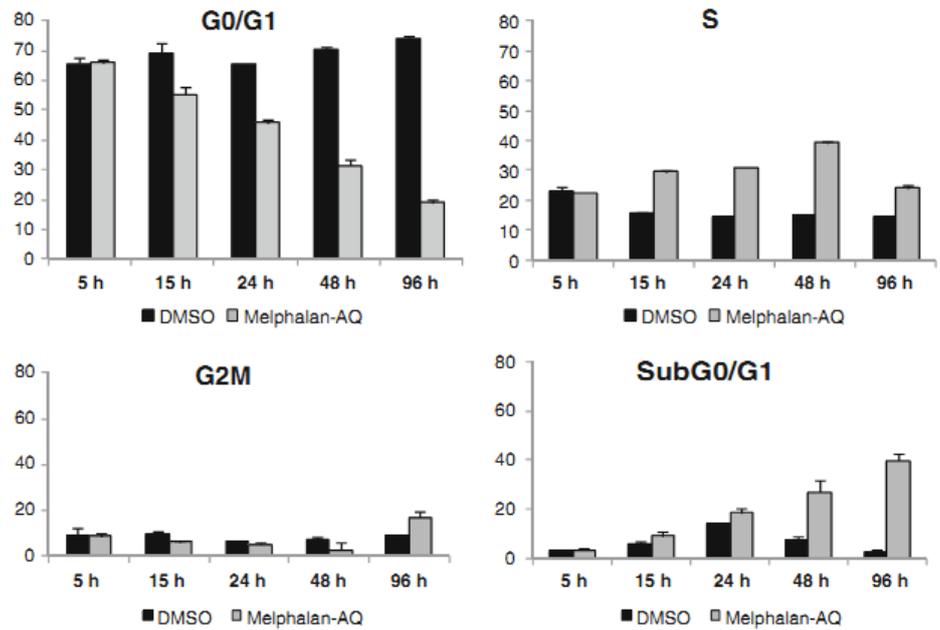


Fig. 3 Cell cycle distribution in HEMC-SS human chondrosarcoma cell line treated with Mel-AQ in two different experiments (mean±SD). Cells were treated with 14 μM Mel-AQ or DMSO for 5 h, 15 h, 24 h, 48 h or 96 h



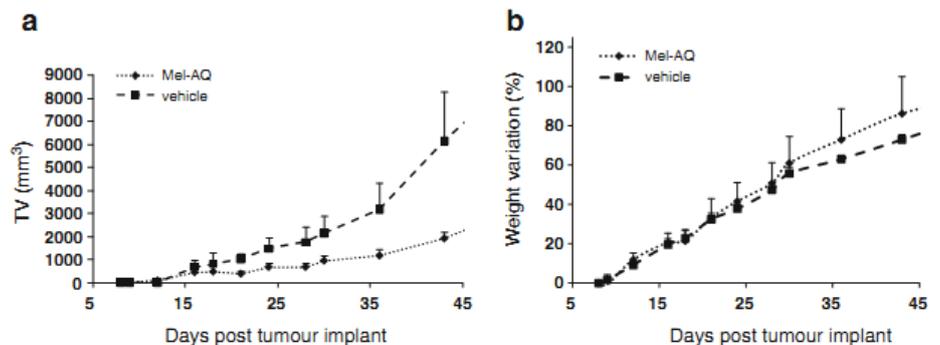
and the specificity of cytotoxic agents in chondrosarcoma tissue.

The high sulphate and carboxylate group contents of the GAG moieties lends chondrosarcoma ECM PG strong negative charges that may interact with the positively-charged quaternary ammonium moiety of Mel-AQ. Mel-AQ was shown to target cartilaginous tissues in healthy rats as unchanged compound or metabolite while keeping the pharmacologically-active mustard group [4]. Based on these previous promising results, we decided to evaluate the antitumour potential of Mel-AQ.

In a first step, the *in vitro* cytotoxic profile of Mel-AQ was characterized. Interestingly, Mel-AQ demonstrated a cytotoxic activity in bone tumour Lines like HEMC-SS and Saos-2 cell lines, whereas no effect was observed with M4Beu melanoma cells or chondrocytes. For HEMC-SS and Saos-2 lines, IC₅₀ values ranged from 10 to 40 μM.

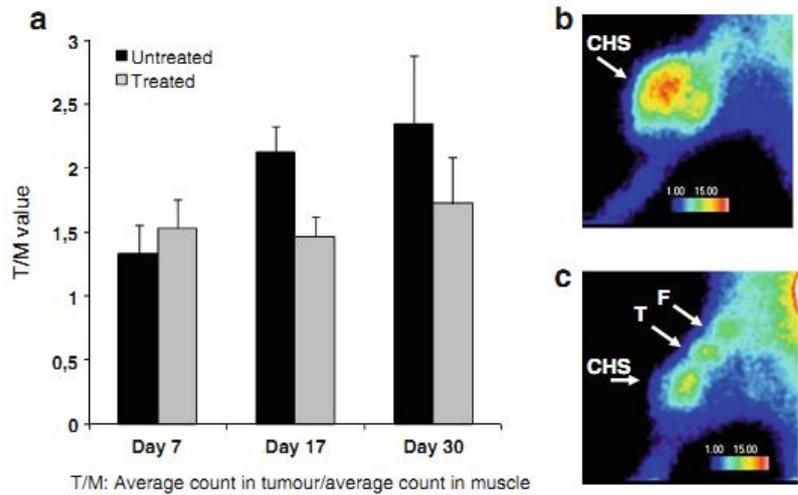
Interestingly, the human HEMC-SS chondrosarcoma line exhibited the highest sensitivity to Mel-AQ, with an IC₅₀ of 14.0±8.5 μM. When HEMC-SS chondrosarcoma cells were incubated *in vitro* with Mel-AQ at various concentrations, we observed drug exposure-time-dependent cycle arrest in both S and G2M phases, leading to a significant increase in cell accumulation in SubG0G1 population. Mel-AQ was then assessed for antitumour challenge *in vivo* using the syngeneic Swarm rat chondrosarcoma (SRC) model. Syngeneic *in vivo* tumour models are widely used for *in vivo* initial drug discovery research, since the animals have the same genetic background as the tumour cell line, thus precluding of risk of graft rejection [22]. We chose the SRC model as it has been extensively characterized with large aggregating proteoglycans that have been described as a major component of the chondrosarcoma ECM of SRC [23, 24]. Since experiments with the SRC model have

Fig. 4 *In vivo* assessment of antitumour activity (a) and tolerance (b) of Mel-AQ in SRC models. Treatments were given by *i.v.* route according to a “q4d x 3” schedule beginning on day 8 post-implant. Values are presented as means±SD



Invest New Drugs

Fig. 5 ^{99m}Tc -NTP 15–5 scintigraphy. **a** Quantitative analysis of ^{99m}Tc -NTP 15–5 accumulation in tumours versus muscle at day 7 post-implant (before treatment) and at day 17 and day 30 post-implant (after treatment). **b** Scintigraphic images obtained at day 30 post-implant on a representative control. **c** Scintigraphic images obtained at day 30 post-implant on a representative Mel-AQ-treated rat. Abbreviations: *F* femoral condyle, *T* tibial plateau, *CHS* chondrosarcoma

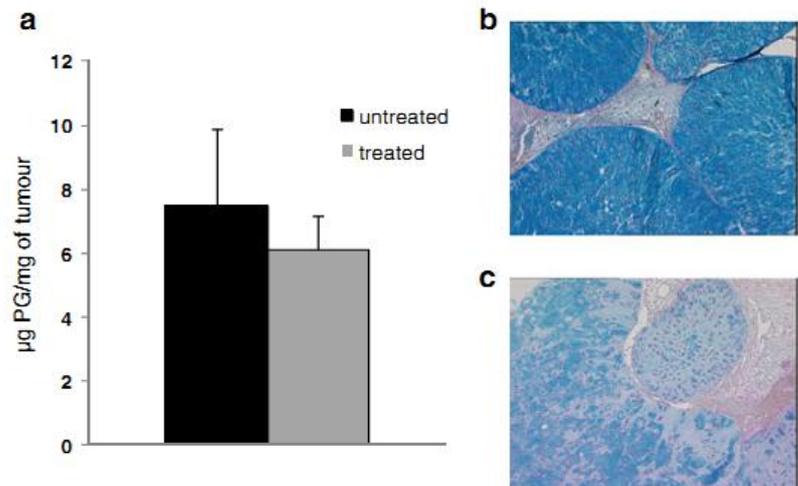


demonstrated that transplantation site can affect tumour grade and malignancy, we used an experimental approach based on primary orthotopic paratibial location [18, 25, 26]. Paratibial tumour implant has been demonstrated to induce well-differentiated malignant chondrosarcoma that features a characteristic lobulated tumour separated by thin vasculo-connective septa. The histological and clinical behaviour of SRC mimics human grade-II disease, with local tumour growth invading and ultimately destroying host bone in late-stage pathology [18]. Based on our experimental results in SRC-bearing rats, Mel-AQ demonstrated a promising antitumour activity compared to controls: the treatment regimen used (three doses of 16 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ at days 8, 12 and 16 post-implant) showed a TGI ranging from 42% to 69% from day 18.

Interestingly, the treatment protocol proved well tolerated, since the animals showed no weight loss over the course of the study. Antitumour effect was also assessed *in vivo* by ^{99m}Tc -NTP 15–5 scintigraphic imaging, which was previously demonstrated in the SRC orthotopic model to provide suitable criteria for monitoring cartilage tumour [20].

Since ^{99m}Tc -NTP 15–5 radiotracer and Mel-AQ contain the same quaternary ammonium function in their structure and are therefore both expected to target PG, they were not administered simultaneously to the animals in order to avoid any competition. ^{99m}Tc -NTP 15–5 scintigraphic imaging was performed at day 7 (before treatment), day 17 (1 day after the last Mel-AQ dose) and day 30 (14 days after the last Mel-AQ injection). As expected, ^{99m}Tc -NTP 15–5 radiotracer accumulation in tumour tissue enabled

Fig. 6 PG content of chondrosarcoma tissue from Mel-AQ-treated rats and controls at the end of the study. **a**: PG content in tumoural tissue by biochemical assay. Values are presented as means \pm SD. **b** Alcian blue staining of chondrosarcoma tissue from an untreated rat. **c** Alcian blue staining of chondrosarcoma tissue from a Mel-AQ-treated rat



highly contrasted scintigraphic imaging of SRC *in vivo*. Quantitative analysis of scintigraphic scans evidenced a significant decrease in tracer uptake in treated animals compared to controls at day 17 ($p < 0.02$). This decrease was still maintained at day 30. We posit that changes in ^{99m}Tc -NTP 15–5 uptake reflect a decrease in the PG content of tumour tissue as a result of a cytotoxic effect of Mel-AQ. The decrease in PG content of Mel-AQ-treated tumours was confirmed by biochemical assay of tumour tissue and Alcian blue staining of histological SRC slices. These results suggest that Mel-AQ treatment could trigger the “downregulation synthesis” of PG in chondrosarcoma tissue *in vivo*, as already described for other chemotherapy approaches [27].

Conclusion

Cartilage tumours continue to present orthopaedic oncologists with therapeutic challenges. Malignant cartilaginous tumours are generally unresponsive to chemotherapy, with the result that the 5-year survival rate of high-grade chondrosarcoma is only 29% [5]. Based on its high binding capacity to proteoglycans, quaternary ammonium conjugated with melphalan alkylating agent was synthesized, and its potential antitumour activity in chondrosarcoma was tested and characterized *in vitro* and *in vivo*. The differential *in vitro* antitumour activity (tumour chondrocytes versus normal chondrocytes) of Mel-AQ, its ability to inhibit tumour cell growth *in vivo*, and its good tolerance in animals make Mel-AQ a promising candidate for further work to develop an urgently needed efficacious treatment of chondrosarcoma.

Financial support Institut National du Cancer (NoRO7022NN), Ligue Contre le Cancer Auvergne Région, Innovation Regional Fund (FRI2, OSEO), State-Region Planning Contract (CPER)

References

- Gelderblom H, Hogendoorn PC, Dijkstra SD, van Rijswijk CS, Krol AD, Taminiau AH, Bovee JV (2008) The clinical approach towards chondrosarcoma. *Oncologist* 13:320–329
- Riedel RFLN, Dodd L, Kirsch D, Martinez S, Brigman BE (2009) The clinical management of chondrosarcoma. *Curr Treat Options Oncol* 10:94–106
- Bovee JV, Hogendoorn PC, Wunder JS, Alman BA (2010) Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 10:481–488
- Juillerat-Jeanneret L, Schmitt F (2007) Chemical modification of therapeutic drugs or drug vector systems to achieve targeted therapy: looking for the grail. *Med Res Rev* 27:574–590
- Chezal JM, Papon J, Labarre P, Lartigue C, Galmier MJ, Decombat C, Chavignon O, Maublant J, Teulade JC, Madelmont JC, Moins N (2008) Evaluation of radiolabeled (hetero)aromatic analogues of N-(2-diethylaminoethyl)-4-iodobenzamide for imaging and targeted radionuclide therapy of melanoma. *J Med Chem* 51:3133–3144
- Rapp M, Giraud I, Maurizis JC, Galmier MJ, Madelmont JC (2003) Synthesis and *in vivo* biodisposition of [^{14}C]-quaternary ammonium-melphalan conjugate, a potential cartilage-targeted alkylating drug. *Bioconjug Chem* 14:500–506
- Aigner T (2002) Towards a new understanding and classification of chondrogenic neoplasias of the skeleton: biochemistry and cell biology of chondrosarcoma and its variants. *Virchows Arch* 441:219–230
- Olsen GD, Chan EM, Riker WK (1975) Binding of d-tubocurarine di (methyl- ^{14}C) ether iodide and other amines to cartilage, chondroitin sulfate and human plasma proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 195:242–250
- Maurizis JC, Ollier M, Nicolas C, Madelmont JC, Garrigue H, Veyre A (1992) *In vitro* binding of oxime acetylcholinesterase reactivators to proteoglycans synthesized by cultured chondrocytes and fibroblasts. *Biochem Pharmacol* 44:1927–1933
- Larsson B, Nilsson M, Tjälve H (1981) The binding of inorganic and organic cations and H $^+$ to cartilage *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 30:2963–2970
- Giraud I, Rapp M, Maurizis JC, Madelmont JC (2000) Application to a cartilage targeting strategy: synthesis and *in vivo* biodistribution of (^{14}C)-labeled quaternary ammonium-glucosamine conjugates. *Bioconjug Chem* 11:212–218
- Vidal A, Chezal JM, Mounetou E (2010) New quaternary ammonium oxime derivatives: synthesis and *in vitro* antiosteoarthritis evaluation. *Eur J Med Chem* 45:405–410
- Nicolas C, Borel M, Maurizis JC, Gallais N, Rapp M, Ollier M, Very M, Madelmont JC (2000) Synthesis of N-quaternary ammonium [^3H] and [^{99m}Tc]polyazamacrocycles, potential radiotracers for cartilage imaging. *J Labelled Comp Radiopharm* 43:585–594
- Giraud I, Rapp M, Maurizis JC, Madelmont JC (2002) Synthesis and *in vitro* evaluation of quaternary ammonium derivatives of chlorambucil and melphalan, anticancer drugs designed for the chemotherapy of chondrosarcoma. *J Med Chem* 45:2116–2119
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267:5421–5426
- Guide for the care and use of laboratory animals (1996) National Academy Press, Washington
- Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, Double JA, Everitt J, Farmingham DA, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 102:1555–1577
- Grimaud E, Damiens C, Rousselle AV, Passuti N, Heymann D, Gouin F (2002) Bone remodelling and tumour grade modifications induced by interactions between bone and swarm rat chondrosarcoma. *Histol Histopathol* 17:1103–1111
- Polin L, White K, Kushner J, Paluch J, Simpson C, Pugh S, Edelstein MK, Hazeldine S, Fontana J, LoRusso P, Horwitz JP, Corbett TH (2002) Preclinical efficacy evaluations of XK-469: dose schedule, route and cross-resistance behavior in tumor bearing mice. *Invest New Drugs* 20:13–22
- Miot-Noirault E, Gouin F, Vidal A, Rapp M, Maublant J, Askienazy S, Chezal JM, Heymann D, Redini F, Moins N (2009) First preclinical imaging of primary cartilage neoplasm and its local recurrence using ^{99m}Tc -NTP 15–5 radiotracer. *J Nucl Med* 50:1541–1547
- Bielawski K, Bielawska A (2008) Small-molecule based delivery systems for alkylating antineoplastic compounds. *ChemMedChem* 3:536–542

Invest New Drugs

22. De Jong M, Maina T (2010) Of mice and humans: are they the same? Implications in cancer translational research. *J Nucl Med* 51:501–504
23. Hascall GK (1980) Ultrastructure of the chondrocytes and extracellular matrix of the swarm rat chondrosarcoma. *Anat Rec* 198:135–146
24. Breitzkreutz D, Diaz de Leon L, Paglia L, Gay S, Swarm RL, Stern R (1979) Histological and biochemical studies of a transplantable rat chondrosarcoma. *Cancer Res* 39:5093–5100
25. Hamm CA, Stevens JW, Xie H, Vanin EF, Morcuende JA, Abdulkawy H, Seftor EA, Sredni ST, Bischof JM, Wang D, Malchenko S, Bonaldo Mde F, Casavant TL, Hendrix MJ, Soares MB (2010) Microenvironment alters epigenetic and gene expression profiles in Swarm rat chondrosarcoma tumors. *BMC Cancer* 10:471
26. Kenan S, Steiner GC (1991) Experimental transplantation of the Swarm rat chondrosarcoma into bone: radiological and pathological studies. *J Orthop Res* 9:445–451
27. Sakimura R, Tanaka K, Yamamoto S, Matsunobu T, Li X, Hanada M, Okada T, Nakamura T, Li Y, Iwamoto Y (2007) The effects of histone deacetylase inhibitors on the induction of differentiation in chondrosarcoma cells. *Clin Cancer Res* 13:275–282

*Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées
des phosphoramides*



Chapitre IV

***Amélioration de la
spécificité – Synthèse et
évaluation de prodrogues
dérivées des
phosphoramides***

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

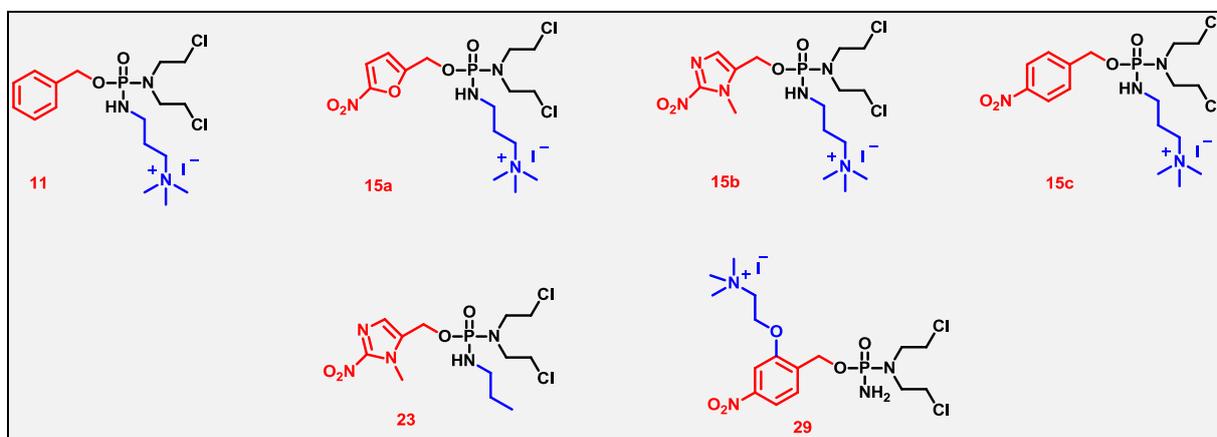


Figure 107 : Structure des prodrogues synthétisées, activables en hypoxie et dérivées du cyclophosphamide

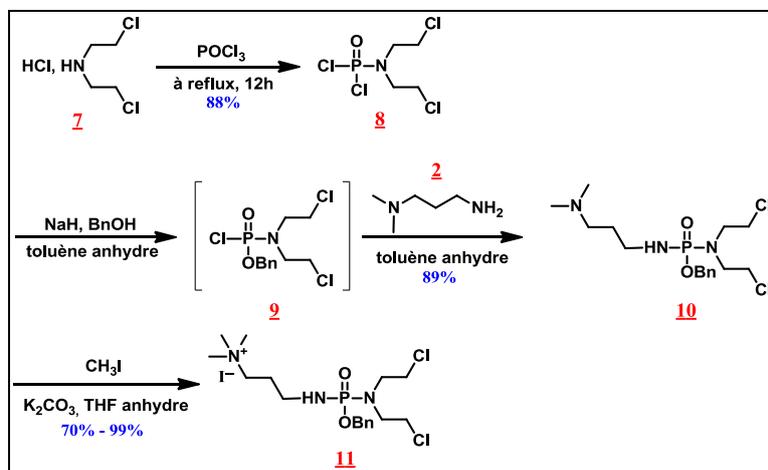


Schéma 11 : Synthèse de l'équivalent non clivable, le composé 11

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

Les résultats obtenus avec le melphalan-AQ **5** (maintien de l'activité cytotoxique, inhibition de la croissance tumorale et diminution des effets indésirables) prouvent l'intérêt de vectoriser un agent cytotoxique par une fonction ammonium quaternaire. Nous avons souhaité appliquer cette stratégie de vectorisation à d'autres agents cytotoxiques.

Comme développé plus haut, le chondrosarcome est caractérisé par un environnement hypoxique. La troisième partie de cette thèse est l'exploitation de cette particularité du chondrosarcome, pour améliorer la spécificité des molécules et ainsi, proposer une nouvelle approche thérapeutique encore plus sélective de cette pathologie. Ce chapitre décrit la synthèse et les études biologiques de prodrogues dérivées du cyclophosphamide activables en hypoxie (*Figure 107*) :

- ↪ Les composés **15a**, **15b** et **15c** portent le vecteur sur la moutarde azotée, à savoir la partie dotée de l'activité cytotoxique, et se différencient par la nature de leur entité clivable : nitrofurane, nitroimidazole ou nitrophényle.
- ↪ Le composé **11** correspond à un équivalent non clivable des composés **15a-c**.
- ↪ Le composé **23** correspond à un équivalent non vectorisé du composé **15b**.
- ↪ Enfin, le composé **29** se différencie des autres molécules par la position du vecteur ammonium quaternaire qui est, ici, porté par l'entité clivable.

I. Synthèses des dérivés phosphoramides

A. Synthèse de dérivés portant le vecteur sur l'entité active

1. Synthèse d'un dérivé non activable en hypoxie : dérivé benzyle **11**

Plusieurs voies de synthèse sont envisageables en fonction de l'ordre choisi pour l'introduction des différents substituants sur l'atome de phosphore. D'après les données de la littérature [193,194], nous avons choisi une stratégie (*Schéma 11*) qui peut également être utilisée pour les synthèses des prodrogues **15a-c**. Celle-ci débute par la formation du dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8**, se poursuit par la substitution successive des deux atomes de chlore par le groupement *O*-benzyle, puis par la 3-diméthylamino-1-propylamine **2**, et se termine enfin par la quaternisation de l'amine tertiaire.

La synthèse du dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** est réalisée par réaction de l'oxychlorure de phosphore sur le chlorhydrate de la bis(2-

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

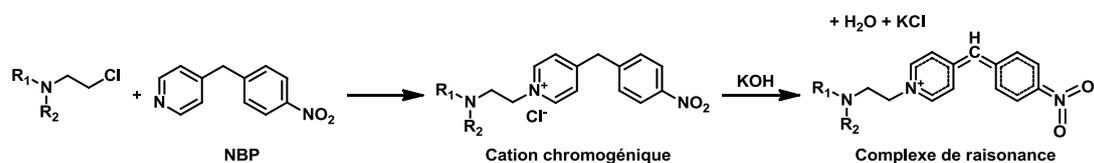


Schéma 12 : Principe de l'indicateur coloré spécifique des agents alkylants à base de 4-(4'-nitrobenzyl) pyridine ou NBP.
 La plaque de chromatographie est plongée dans une solution de NBP à 2,5 % dans l'acétone, chauffée, puis plongée dans une solution méthanolique de potasse à 10 %. Les composés possédant la fonction chloroéthylamine apparaissent en bleu-violet profond en raison de la formation d'un complexe de résonance.

Spectre du milieu réactionnel lors de la formation du composé (9) :



Spectre du milieu réactionnel lors de la formation du composé (9), après avoir ajouté quelques cristaux du composé (8) :

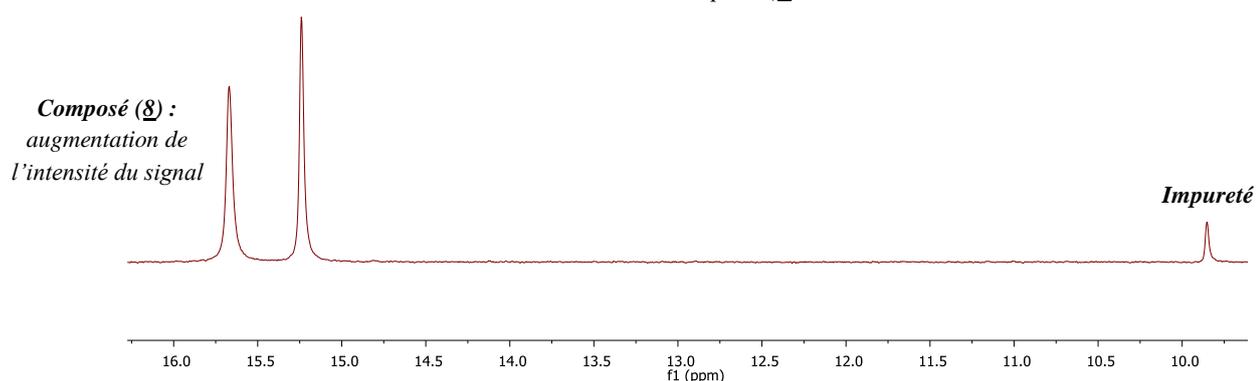


Figure 108 : Suivi par RMN ^{31}P du milieu réactionnel lors de la formation de l'intermédiaire 9
 Ref : H_3PO_4 à 1 % dans D_2O

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

chloroéthyl)amine **7**. Cette réaction s'effectue sous reflux pendant une dizaine d'heures. Une distillation sous pression atmosphérique pour éliminer l'excès d'oxychlorure de phosphore, suivie d'une distillation sous pression réduite (bp 110-114°C ; 0,1 mmHg) [195] ou d'une colonne sur gel de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3, v/v) permet d'isoler le composé **8** sous la forme d'un solide blanc à température ambiante avec un rendement pouvant atteindre 88 %.

En solution dans du toluène anhydre, le composé **8** réagit avec du benzylate de sodium, obtenu par action d'hydruure de sodium sur l'alcool benzylique à froid. Après quatre heures d'agitation, un suivi par chromatographie sur plaque de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 7/3, v/v) montre la quasi-disparition du dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** ainsi que la formation d'un composé révélant à l'ultra-violet à 254 nm et avec un indicateur coloré spécifique des agents alkylants à base de 4-(4'-nitrobenzyl) pyridine (NBP) pouvant correspondre au composé **9** attendu. Le principe de la réaction de cet indicateur coloré est explicité **Schéma 12**. La formation du chlorure de l'acide benzyl *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique **9** est également suivie par RMN du phosphore (**Figure 108**). On observe l'apparition d'un composé dont le signal est moins déblindé que le signal correspondant au produit de départ **8** ($\Delta = -0,43$ ppm). Bien qu'étant utilisé à raison de 1 équivalent par rapport à l'alcool benzylique, on constate que le composé **8** est toujours présent dans le milieu réactionnel dans un ratio **8/9**, 25 % / 75 %.

D'après la littérature, le composé **9** est instable [194], la formation de chlorure de benzyle ayant été observée ; nous choisissons donc de poursuivre la réaction *in situ* par addition de la 3-diméthylamino-1-propylamine **2** malgré la présence de dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** n'ayant pas réagi. Après deux heures d'agitation, un suivi par chromatographie sur plaque de silice (silice, éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 7/3, v/v) montre la disparition de l'intermédiaire formé **9**. Le mélange réactionnel est alors évaporé sous vide avec un bain-marie ne dépassant pas 35 °C pour éviter la dégradation des divers composés. Une purification par chromatographie sur colonne de gel silice éluée par un mélange équimoléculaire acétate d'éthyle/éthanol contenant 5 % d'ammoniaque est alors réalisée. Cette réaction a été effectuée trois fois et le composé **10** a été isolé, soit sous sa forme base, soit sous la forme du chlorhydrate correspondant, ceci ayant été déterminé par RMN du proton et en observant les valeurs des déplacements chimiques des signaux relatifs

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

Dans CDCl ₃	N(CH ₃) ₂	CH ₂ N(CH ₃) ₂	CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂
10 (non chlorydrate)	2,55	3,00-3,09	1,86
10 (chlorydrate)	2,72	3,00-3,12	1,96

Tableau 4 : Déplacements chimiques des signaux relatifs aux méthyles et méthylènes en α et β de l'amine du composé **10** selon sa forme chlorydrate ou sa forme base

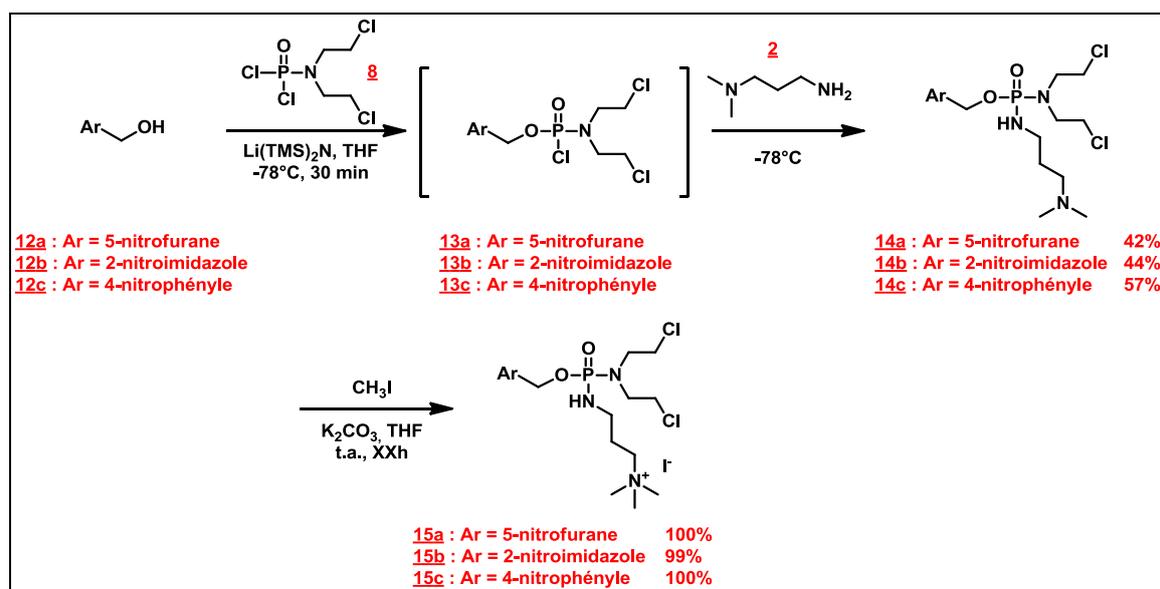


Schéma 13 : Synthèse des prodrogues **15a**, **15b** et **15c**

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

aux méthyles et méthylène en α et β de l'amine (**Tableau 4**), qui voient leur signaux se déplacer vers les champs faibles pour la forme chlorhydrate.

La dernière étape consiste à quaterniser la fonction amine tertiaire, et ce par action d'iodure de méthyle. Les premiers essais sont réalisés dans un milieu éthanolique anhydre avec un excès d'iodure de méthyle. Dans ces conditions, l'alkylation n'est pas observée, le spectre de RMN ^1H du composé isolé ne varie que par le déplacement des protons vicinaux de l'atome d'azote de la fonction amine tertiaire, ce qui semble indiquer une protonation vraisemblablement liée à la formation de HI dans le milieu. Afin d'éviter la formation de l'iodohydrate, les conditions sont modifiées par l'utilisation de THF anhydre en remplacement de l'éthanol et par ajout d'une base, le carbonate de sodium, à raison de six équivalents, selon un mode opératoire décrit dans la littérature [196]. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant environ deux heures. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince (silice, éluant : éthanol contenant 10 % d'ammoniaque). On observe alors la formation d'un produit plus polaire et la disparition totale du produit de départ **10**. Après filtration du milieu réactionnel et lavage du précipité avec du méthanol, le filtrat est évaporé pour conduire au dérivé ammonium quaternaire **11**. Celui-ci est obtenu avec des rendements allant de 70 à 99 % sous la forme d'une poudre blanche très hygroscopique qui est conservée sous argon à -80°C . Malgré ces conditions de conservation, le composé **11** se transforme en huile visqueuse.

La quaternisation de la fonction amine est confirmée en RMN du proton, par le déplacement du signal correspondant aux protons des méthyles portés par l'azote qui se voient déblindés d'environ 0,37 ppm et intègre désormais pour 9 protons ; mais également en RMN du carbone car le déplacement du signal, correspondant aux groupements méthyles, est déblindé d'environ 11 ppm puisqu'il passe de 42,5 ppm pour l'amine tertiaire à 53,8 ppm pour l'ammonium quaternaire.

2. Synthèse des prodrogues vectorisées et activables en hypoxie 15a-c

Nous nous sommes intéressés à des entités clivables en hypoxie de structure nitro-(hétéro)aromatique. La nature de l'hétérocycle influence la vitesse de libération du principe actif, aussi trois cycles ont été étudiés dans un premier temps : les cycles phényle, furane et imidazole.

Les synthèses des trois structures suivantes, **15a-c**, ont été entreprises selon la séquence réactionnelle décrite **Schéma 13**, à partir de l'alcool correspondant **12**. Si les

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues
dérivées des phosphoramides

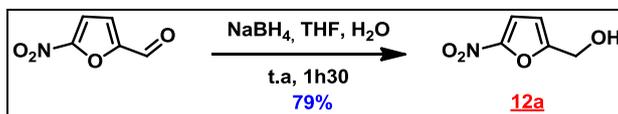


Schéma 14 : Synthèse du 2-hydroxyméthyl-5-nitrofurane **12a**

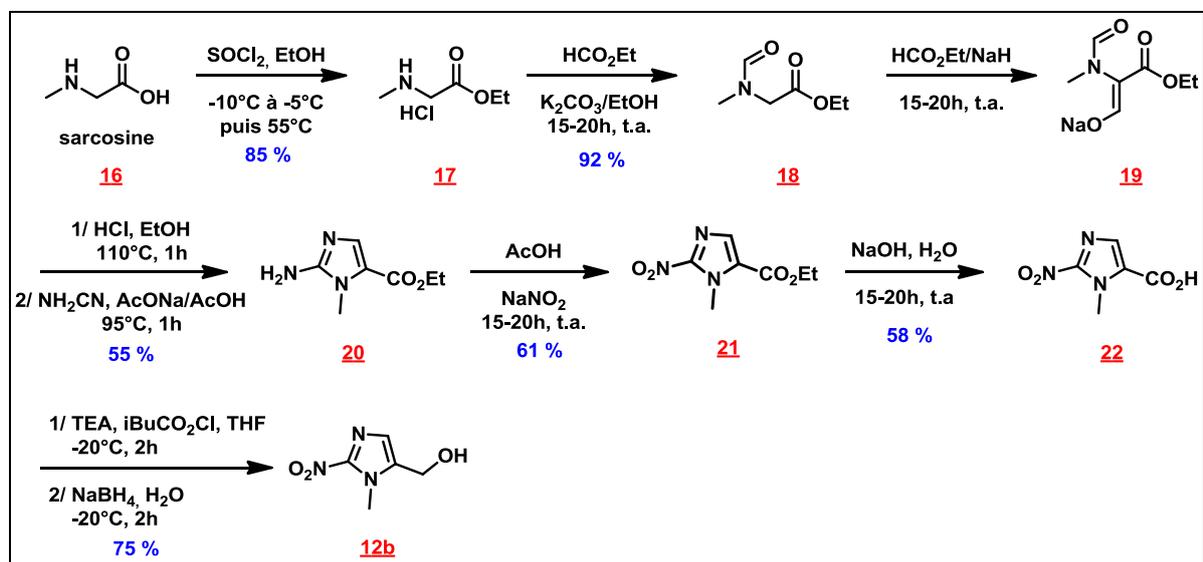


Schéma 15 : Synthèse du 5-hydroxyméthyl-1-N-méthyl-2-nitro-1H-imidazole **12b**

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

dernières étapes sont identiques, le nombre global d'étapes nécessaires à l'obtention de ces dérivés **15a-c** dépend de l'accessibilité de l'alcool de départ. En effet, les alcools de départ sont soit commerciaux (dans le cas de l'alcool *p*-nitrobenzylique **12c**), soit préparés au préalable, à partir de l'aldéhyde correspondant dans le cas du 2-hydroxyméthyl-5-nitrofurane **12a** ou, d'après une séquence multiétape dans le cas du 5-hydroxyméthyl-1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazole **12b**.

a. Préparation des alcools **12a** et **12b** utilisés comme synthon de départ

Synthèse du 2-hydroxyméthyl-5-nitrofurane **12a**

Le 5-nitro-2-furaldéhyde commercial est réduit par le borohydrure de sodium dans un mélange THF/eau pour conduire à l'alcool **12a** (*Schéma 14*) [177]. Le temps de réaction est assez court (1h30) et la purification, qui ne consiste qu'en une simple extraction à l'acétate d'éthyle, permet d'obtenir l'alcool **12a** analytiquement pur par RMN ¹H et ce avec un rendement satisfaisant de 79 %.

Synthèse du 5-hydroxyméthyl-1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazole **12b**

La séquence réactionnelle envisagée comporte sept étapes au départ de la sarcosine **16**, et fait intervenir la synthèse de Marckwald [197] pour obtenir le cycle imidazole (*Schéma 15*).

Une première étape d'estérification par action de chlorure de thionyle en milieu éthanolique a conduit à l'ester éthylique **17** avec un rendement de 85 %.

La *N*-formylation est réalisée par addition du formiate d'éthyle en présence de carbonate de potassium. Après une nuit d'agitation à température ambiante, le composé **18** est obtenu avec un rendement de 92 %. Une étude de RMN montre la présence de deux rotamères pour le composé **18**. L'existence de deux rotamères, liée à la présence de la fonction amide, provoque le dédoublement (dans un rapport 67 % / 33 %) de tous les signaux visibles en RMN proton et carbone.

La *C*-formylation est ensuite réalisée par ajout lent d'hydrure de sodium dans une solution du composé **18** dans le formiate d'éthyle, refroidie dans un bain de glace. Après une nuit d'agitation à température ambiante et lavage du résidu obtenu à l'hexane, celui-ci est chauffé à 110 °C pendant une heure dans l'éthanol en présence d'acide chlorhydrique concentré afin de réaliser une *N*-déformylation.

La formation du cycle imidazole est réalisée à chaud par ajout de cyanamide dans un

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues
dérivées des phosphoramides

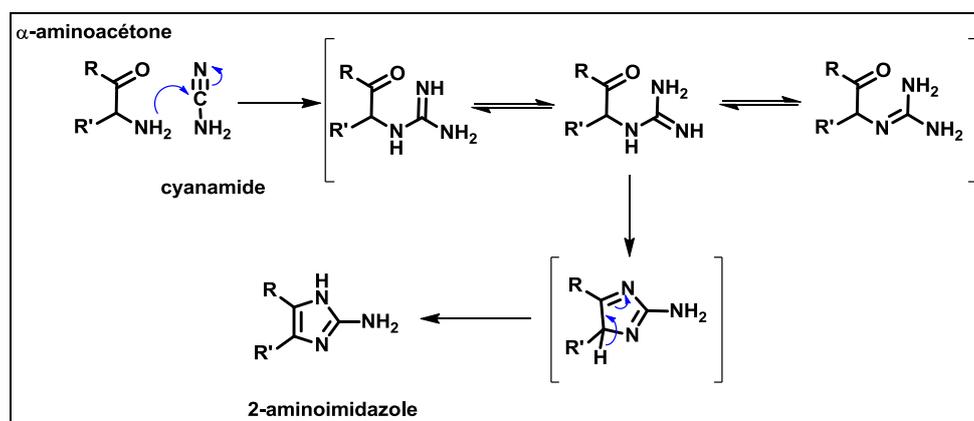


Schéma 16 : Mécanisme de la synthèse de Marckwald [197]

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

milieu aqueux, d'après la réaction de Marckwald, classiquement utilisée pour la formation d'imidazoles. Cette réaction s'effectue par action d'une α -aminoacétone sur le cyanamide, le produit obtenu est un 2-aminoimidazole (*Schéma 16*). Le groupement amine de l' α -aminoacétone s'additionne sur le groupement nitrile du cyanamide ce qui forme un dérivé de guanidine. Une condensation intramoléculaire entre une fonction amine et la fonction cétone conduit à la cyclisation en 2-aminoimidazole, après une prototropie dans le composé intermédiaire.

Après passage en milieu basique du milieu réactionnel et extraction, une purification sur colonne de gel de silice, éluée par un mélange acétate d'éthyle/éthanol 95/5 (v/v), permet d'isoler le composé **20** avec un rendement de 55 %.

Après nitration du composé **20** par addition de nitrite de sodium en milieu acide acétique dilué, purification sur colonne de gel de silice du composé **21** puis hydrolyse de l'ester par de la soude, l'acide **22** est obtenu analytiquement pur sous forme d'une poudre blanche.

Les conditions de réduction envisagées ensuite consistaient à activer l'acide **22** avec du *N,N*-carbonyldiimidazole puis à le réduire par du borohydrure de sodium en milieu aqueux, d'après une procédure décrite dans la littérature [195]. Ces conditions de réduction se sont révélées être inefficaces dans notre cas. D'après des recherches bibliographiques, nous avons envisagé d'autres conditions : activation de l'acide par l'isobutylchloroformiate puis réduction par du borohydrure de sodium en milieu aqueux. L'activation de l'acide est ici nécessaire car le borohydrure de sodium ne permet généralement pas la réduction de l'acide en alcool et l'utilisation de réducteurs plus forts, tel que LiAlH_4 , aurait vraisemblablement également conduit à la réduction de la fonction nitro. Dans ces conditions, et après une chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée par de l'acétate d'éthyle, le produit **12b** est obtenu avec un rendement de 75 %.

*b. Couplage des alcools **12** avec le dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8***

Comme énoncé précédemment, les trois dernières étapes sont identiques quelque soit le nitro-(hétéro)aromatique utilisé (*Schéma 13*). Ces étapes sont réalisées en milieu anhydre et l'évolution des deux premières est suivie par RMN du phosphore 31.

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

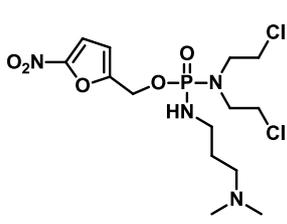
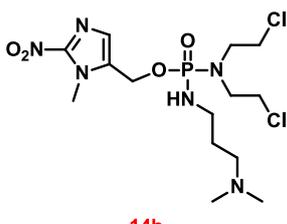
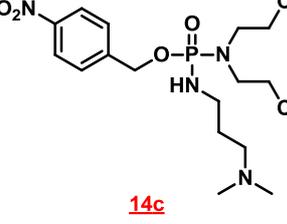
 <p>14a</p>	prélèvements	T ₀	T ₀ + 10'	Ajout de l'amine T ₀ + 30'	T ₀ + 50'	T ₀ + 2h30
	Impureté	9,89	9,89		9,93	9,93
	Impureté	11,25	11,24		/	/
	13a	15,54	15,54		/	/
	8	15,67	15,67		/	/
	14a	/	/		17,40	17,29
 <p>14b</p>	prélèvements	T ₀	T ₀ + 30'	Ajout de l'amine T ₀ + 38'	T ₀ + 45'	/
	Impureté	10,40	10,40		/	/
	13b	15,36	15,36		/	/
	8	15,69	15,69		/	/
	14b	/	/		17,26	/
	Impureté	/	/		19,09	/
 <p>14c</p>	prélèvements	T ₀	T ₀ + 25'	Ajout de l'amine T ₀ + 30'	T ₀ + 1h10	T ₀ + 1h50
	Impureté	10,01	10,02		10,08	10,09
	13c	15,58	15,58		/	/
	8	15,67	15,67		/	/
	14c	/	/		17,27	17,26
	Impureté	/	/		19,23	19,21

Figure 109 : Suivi réactionnel par RMN ³¹P des trois réactions, ref H₃PO₄ à 1 % dans D₂O

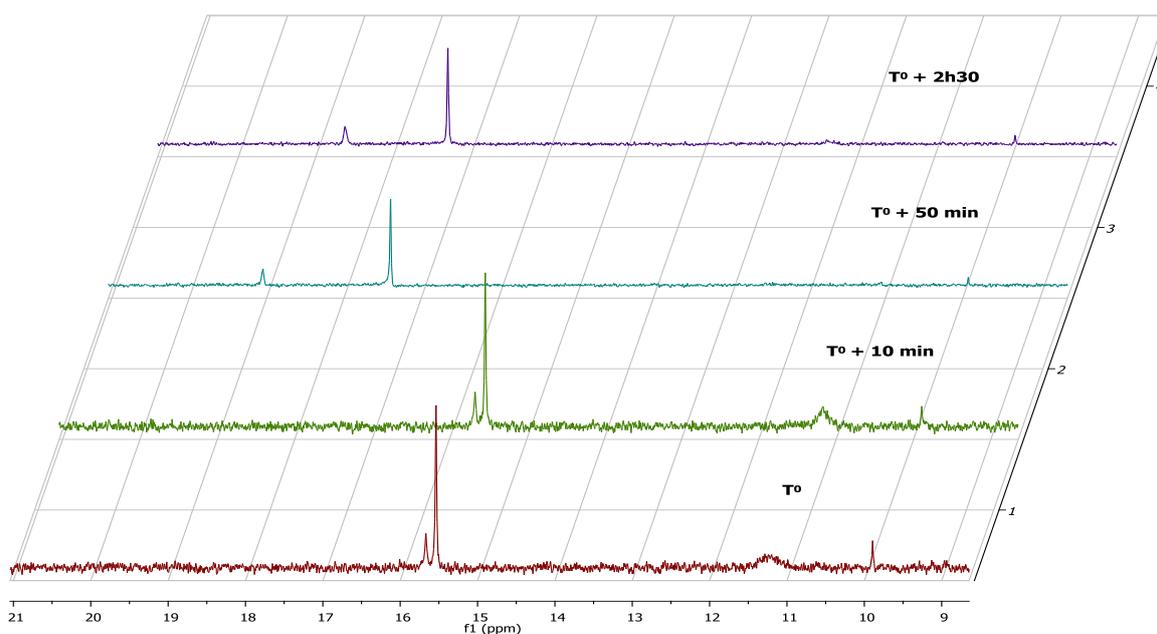


Figure 110 : Suivi par RMN ³¹P de la formation de **14a**, ref H₃PO₄ à 1 % dans D₂O

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

Une solution molaire de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF est additionnée lentement, à - 78 °C et sous argon, à une solution dans le THF anhydre de l'alcool de départ **12**.

Après une dizaine de minutes, l'ajout du dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** est réalisé rapidement et définit notre T₀ pour le suivi par RMN ³¹P.

L'évolution vers la formation des intermédiaires **13** puis celle des composés **14** sont suivies par RMN ³¹P (*Figure 109 et Figure 110*). Les déplacements chimiques des produits et réactifs ne varient que très légèrement d'un dérivé à l'autre et sont donnés comparativement à la référence (H₃PO₄ à 1% dans D₂O placé dans un tube coaxial). Le signal du dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** apparaît à environ 15,68 ppm dans le milieu réactionnel et les dérivés phosphorés intermédiaires **13** entre 15,30 et 15,60 ppm. Lors de la première étape, on remarque également dans toutes les réactions, l'apparition d'un signal vers 10 ppm correspondant à une impureté, présente en proportion variable selon le composé et l'expérience.

Le réactif **8** est ajouté en très léger excès (1,1 équivalent), et sa cinétique de disparition est très rapide pour tous les produits **12**. En effet, la RMN ³¹P montre que la formation des intermédiaires **13** est quasi-instantanée : leurs signaux à 15,54 ; 15,36 et 15,58 sont déjà présents à T₀ avec une forte intensité et le signal du réactif **8** à 15,67 a une intensité très faible voir nulle (ratio **13a/8** = 1/0,3 ; ratio **13c/8** = 1/0,2). On ne remarquera aucune réelle évolution lors des prélèvements suivants. La formation de l'intermédiaire **13b** (15,36 ppm) est apparue plus lente lors d'une des réactions : à T₀, le signal du réactif **8** est très important par rapport à **13b** (ratio **13b/8** = 0,2/1) puis les signaux évoluent en sens contraire pour arriver respectivement à un ratio **13b/8** = 1/1 à 30 min et à un ratio **13b/8** = 1/0 à 55 min lors de deux expériences distinctes.

Pour les trois réactions, deux équivalents de 3-diméthylamino-1-propylamine **2** sont additionnés au bout de 30 à 40 minutes en général ; ce temps nous paraissait le plus judicieux en raison de la quasi-disparition du produit de départ **8** et afin d'éviter une augmentation de la proportion de l'impureté à environ 10 ppm. Cette seconde étape est là aussi très rapide. En effet, au bout de 10 à 40 minutes, l'intermédiaire a totalement disparu, ainsi que l'excès de produit de départ **8**, pour laisser apparaître deux produits de réaction, avec un signal à 17,26-17,40 ppm et un autre vers 19 ppm. Les prélèvements suivants ne laissent apparaître aucune

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues
dérivées des phosphoramides

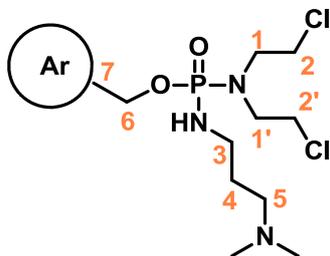


Figure 111 : Structure générale des composés 14



Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

évolution du milieu. En fin de réaction, le milieu est extrait avec de l'acétate d'éthyle puis les produits **14** sont purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice avec des rendements de l'ordre de 40 à 60 %.

Les caractéristiques spectrales des composés **14a-c** sont en accord avec la structure proposée (*Figure 111*):

↪ **Spectroscopie Infra-Rouge** : Le spectre IR confirme la présence de la fonction nitro par l'existence de bandes d'absorption proches de 1500 et 1350 cm^{-1} , correspondant respectivement aux vibrations de valence antisymétrique et symétrique.

↪ **Résonance Magnétique Nucléaire du ^1H** : Le couplage des alcools avec le composé **8** est vérifié par la présence d'un signal vers 5 ppm, correspondant aux protons du méthylène de l'alcool (H-6) qui affichent ici une constante de couplage 3J de l'ordre de 8 Hz avec le phosphore.

Sur les spectres RMN ^1H obtenus dans le méthanol deutéré, nous pouvons observer les signaux caractéristiques de la chaîne propylamine greffée, à savoir un quintuplet (ou multiplet) vers 1,7 ppm ($J = 7,3$ Hz) intégrant pour deux protons, un multiplet vers 2,4 ppm intégrant pour deux protons et un triplet dédoublé (la constante $J_{\text{H}_3,\text{NH}}$ n'apparaissant pas) vers 2,9 ppm intégrant pour deux protons, correspondant aux trois groupements méthylènes respectivement en β , α et γ de l'amine tertiaire (H-4, H-5 et H-3). Une constante de couplage $^3J_{\text{H,P}}$ de l'ordre de 11 ppm est observée pour les protons du méthylène de la chaîne propyle en β du phosphore (H-3). Lorsque l'acquisition est réalisée dans le diméthylsulfoxyde deutéré, ce même signal à 2,9 ppm relatif aux protons H-3 apparaît sous la forme d'un quadruplet dédoublé ($^3J_{\text{H,H}} = 6,7$ Hz et $^3J_{\text{H,P}} = 11,0$ Hz pour le composé **14a**), la constante 3J avec le proton du NH étant visible. Le signal caractéristique du proton du groupe NHP(O) pour le composé **14a** apparaît d'ailleurs sous la forme d'un triplet dédoublé vers 5 ppm avec une constante de couplage $^2J_{\text{H,P}}$ de 11,7 ppm et $^3J_{\text{H,H}}$ de 6,7 Hz (ce signal n'est pas visible lorsque l'acquisition est faite dans le méthanol deutéré).

↪ **Résonance Magnétique Nucléaire du ^{13}C** : La fonction *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique est confirmée par l'étude du spectre RMN ^{13}C J-Mod, révélant deux doublets à ≈ 49 ppm et ≈ 43 ppm, affichant respective-

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues
dérivées des phosphoramides

	Déplacement chimique en ppm des protons -CH ₃		Déplacement chimique en ppm des protons -CH ₂	
	<u>14a</u> DMSO- <i>d</i> ₆	<u>14c</u> CD ₃ OD	<u>14a</u> DMSO- <i>d</i> ₆	<u>14c</u> CD ₃ OD
Forme chlorydrate	2,70	2,55	3,05	2,78
Forme base	2,12	2,26	2,24	2,40
Déplacement observé	+ 0,58	+ 0,29	+ 0,69	+ 0,38

Tableau 5 : Identification de la forme basique ou chlorydrate des composés **14a** et **14c** par RMN ¹H selon les déplacements chimiques en ppm des protons vicinaux de la fonction amine

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

ment des constantes phosphore-carbone ${}^2J = 4,3-5,0$ Hz et ${}^3J = 1,4$ Hz. De plus, le couplage de l'(hétéro)aromatique est validé par l'apparition d'un doublet pour le carbone aromatique quaternaire C-7, avec une constante ${}^3J_{C7-P} = 7-8$ Hz et du doublet relatif au carbone C-6, avec une constante ${}^2J_{C6-P} = 3,8-4,4$ Hz.

Cette détermination structurale s'est également appuyée sur des expériences de RMN 2D de type COSY et HSQC.

- ↳ **Résonance Magnétique Nucléaire du ${}^{31}P$** : Le signal du phosphore apparaît à 18,20-18,33 ppm dans le méthanol deutéré, comparativement à la référence, H_3PO_4 à 1 % dans D_2O placé dans un tube coaxial.
- ↳ **Spectrométrie de masse** : Les spectres de masse montrent la présence d'un amas isotopique dû à l'élément chlore (Cl^{35} , Cl^{37}) avec une distribution M, M+2, M+4 avec une abondance de 9/6/1 caractéristiques de la présence de deux atomes de chlore dans la molécule

d. Quaternisation

La dernière étape de la réaction est la quaternisation de la fonction amine du bras vecteur de la molécule. Cinq équivalents d'iodure de méthyle sont utilisés et contrairement aux étapes précédentes, elle s'effectue à température ambiante dans du THF anhydre. Dans certains cas, les amines **14** sont isolées sous la forme de leur chlorhydrate, c'est le cas des composés **14a** et **14c**. La RMN 1H permet de caractériser la forme chlorhydrate ou base de l'amine selon les déplacements chimiques des protons vicinaux de l'azote. Pour les composés **14a** et **14c**, des déplacements chimiques vers les champs faibles sont observés pour la forme chlorhydrate (*Tableau 5*).

Lors de cette étape de quaternisation réalisée en utilisant le chlorhydrate, du carbonate de potassium sera utilisé, ceci, en nous basant sur les observations faites lors de la quaternisation du dérivé benzyle **11**. Concernant le dérivé nitroimidazole **14b**, la forme chlorhydrate n'est pas observée. Il est préférable de travailler avec l'amine et non son chlorhydrate. En effet, en utilisant la forme chlorhydrate, une étape de filtration pour éliminer les sels est nécessaire alors que dans le cas contraire, une simple évaporation du milieu réactionnel est suffisante. Le milieu réactionnel est alors évaporé à l'évaporateur rotatif sous vide poussé (pompe à palette) et sans chauffer le ballon, ce, afin d'éviter la dégradation des composés sous l'effet de la chaleur.

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

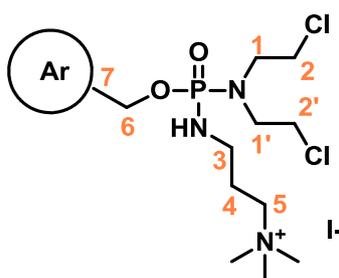


Figure 112 : Structure générale des composés 15

Amine tertiaire <u>14</u>	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$: 55 ppm	$\text{CH}_2\text{N}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$: 43 ppm
Ammonium quaternaire <u>15</u>	$\underline{\text{C}}\text{H}_2^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$: 66 ppm	$\text{CH}_2^+\text{N}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$: 54 ppm

Tableau 6 : Déplacements chimiques des carbones portés en α de la fonction amine lors de la quaternisation

	$[\text{M}]^+$	$[\text{M}+2]^+$	$[\text{M}+4]^+$	$[\text{M}-\text{N}(\text{CH}_3)_3]^+$
Composé <u>15a</u>	445,22	447,17	449,14	386,07
Composé <u>15b</u>	459,20	461,15	463,09	-
Composé <u>15c</u>	455,26	457,16	459,12	396,13

Tableau 7 : Caractérisation par spectrométrie de masse des composés 15a-c

Temps en minutes	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	80	20
3	75	25
5	60	40
10	50	50
11	80	20
20	80	20

Tableau 8 : Composition de la phase mobile au cours du temps

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

Notons que ces molécules ne doivent pas être reprises par le méthanol : une dégradation rapide du composé **15b** a été observée. Difficilement solubles dans le THF, solvant de la réaction, lorsque la filtration du carbonate de potassium est réalisée, nous utilisons de l'acétonitrile pour récupérer tout le composé **15** dans les eaux-mères.

La caractérisation des dérivés **15a-c** est réalisée par analyse infra-rouge, RMN ^1H , ^{31}P et ^{13}C et appuyée par des expériences 2D de type COSY et HSQC, ainsi que par spectrométrie de masse, et est en accord avec la structure (*Figure 112*).

- ↪ **Résonance Magnétique Nucléaire du ^1H** : La quaternisation de la fonction amine tertiaire est confirmée par le déplacement des signaux des protons en α de l'azote qui se voient déblindés d'environ 1 ppm. Pour exemple avec le composé **15a** : Pour la forme amine tertiaire **14a**, le signal des protons H-5 apparaissait à 2,43 ppm et le singulet intégrant pour les six protons des méthyles à 2,28 ppm. Après quaternisation, sur le spectre du dérivé **15a**, les protons H-5 apparaissent sous forme d'un multiplet à 3,35-3,53 ppm et le singulet intégrant pour neuf protons à 3,18 ppm. Comme précédemment, une constante de couplage 3J proton-phosphore de ≈ 12 ppm est observée pour les protons du méthylène en β du phosphore (H-3).
- ↪ **Résonance Magnétique Nucléaire du ^{13}C** : La quaternisation est confirmée par l'étude du spectre RMN ^{13}C J-Mod. Les signaux correspondant aux méthyles portés par l'ammonium quaternaire ainsi que ceux correspondant au méthylène en α sont déblindés de 10 ppm en moyenne (*Tableau 6*).
- ↪ **Résonance Magnétique Nucléaire du ^{31}P** : Le signal du phosphore apparaît à 17,95-18,09 ppm dans le méthanol deutéré, comparativement à la référence, H_3PO_4 à 1% dans D_2O placé dans un tube coaxial.
- ↪ **Spectrométrie de Masse** : Comme pour les composés **14a-c**, nous observons sur les spectres de masse, une distribution M, M+2, M+4 caractéristique de la présence de deux atomes de chlore (*Tableau 7*). Pour les composés **15a** et **15c**, l'étude de la fragmentation par SM^2 montre la présence d'un ion respectivement à m/z 386,07 et m/z 396,13 correspondant à une perte de 59 u.m.a soit la perte d'un radical triméthylamino $\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_3$.

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

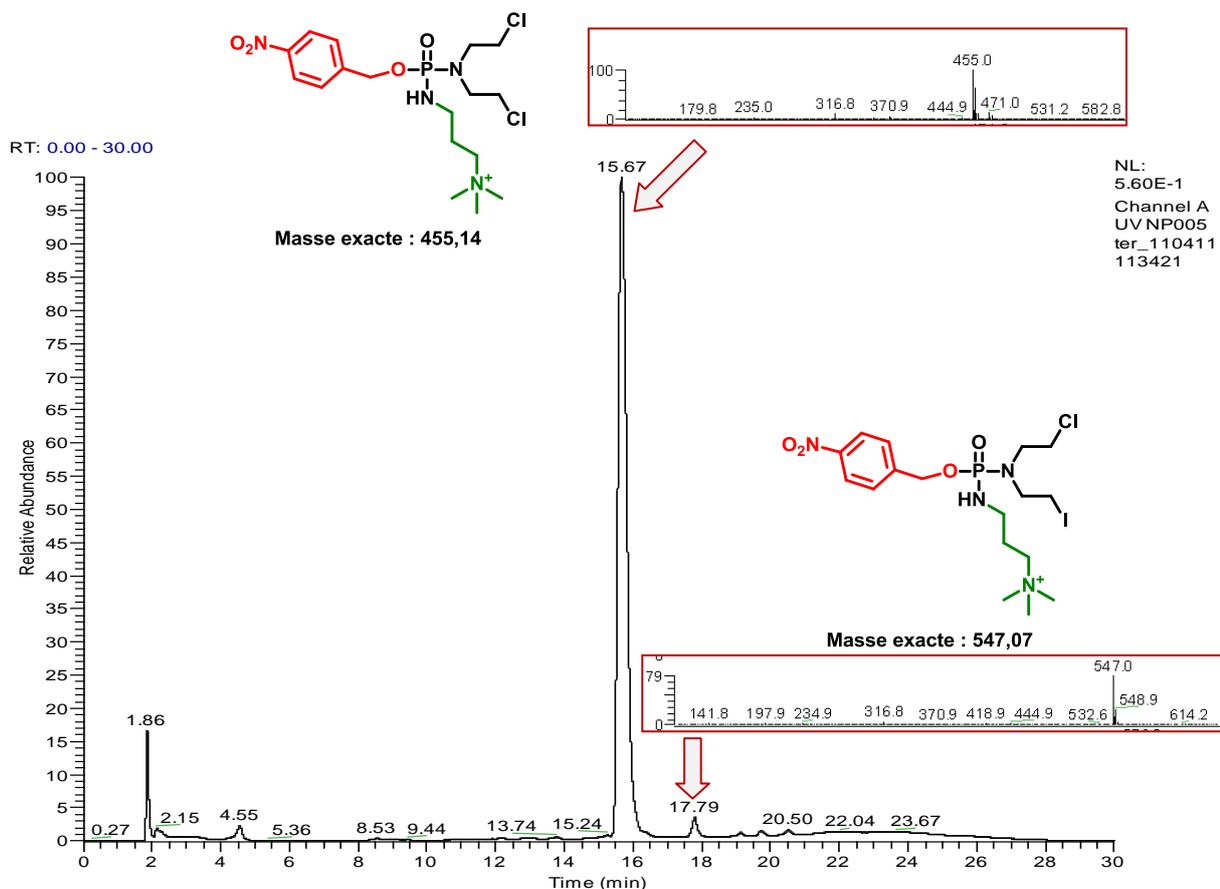


Figure 113 : Chromatogrammes CPL-UV pour du dérivé **15c**

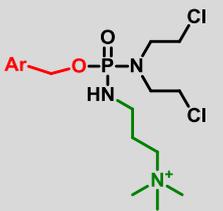
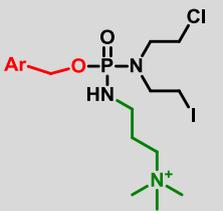
Composés :	 Molécule dichlorée		 Molécule substituée	
	Masse exacte théorique	$m/z M^+$	Masse exacte théorique	$m/z M^+$
15a	445,12	445,21	537,05	536,98
15b	459,14	459,20	551,08	551,10
15c	455,14	455,24	547,07	547,13

Tableau 9 : Analyse par spectrométrie de masse des composés **15a-c**

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

La pureté des composés est également vérifiée par chromatographie en phase liquide (CPL) (**Figure 113**). La colonne utilisée est une colonne de type C18 ; la détection est une détection ultra-violet à 254 nm ou par spectrométrie de masse. La phase mobile utilisée comprend un solvant **A** : H₂O, 15 mM TFA et un solvant **B** : ACN, 15 mM TFA en mode gradient (**Tableau 8**).

L'analyse CPL et l'analyse par spectrométrie de masse mettent en évidence la présence d'une impureté. Cette impureté, retrouvée pour chacun des composés **15a-c** mais dans une proportion très négligeable, correspond au dérivé pour lequel l'un des chlores est substitué par un atome d'iode puisque nous retrouvons un écart de 91,9 u.m.a. entre les valeurs de masse (**Tableau 9**). Par exemple, le chromatogramme en phase liquide obtenu pour le composé **15c** (**Figure 113**) montre un pic à un temps de rétention de 15,67 minutes avec un spectre de masse présentant des pics d'ions moléculaires à m/z 455/457/459 avec une abondance de 9/6/1 qui témoignent de la présence de deux atomes de chlore et qui correspond au produit **15c**, ainsi qu'un pic à un temps de rétention de 17,79 minutes, relatif à des pics d'ions moléculaires à m/z 547/549 avec des intensités relatives de 100 % / 33 % et qui correspond à l'analogue monochloré et monoiodé.

3. Synthèse du composé 23, l'équivalent non vectorisé du composé 15b

Compte tenu des résultats obtenus lors de l'étude *in vitro*, qui seront développés plus loin et qui démontrent que le composé **15b** possède un meilleur différentiel de cytotoxicité en hypoxie versus normoxie, nous avons sélectionné ce composé pour l'étude *in vivo* sur un modèle de xénogreffe de chondrosarcome humain sur souris SCID.

Nous avons alors souhaité évaluer son efficacité antitumorale comparativement à son équivalent non clivable, le composé **11**, et à un équivalent non vectorisé, le composé **23**, qu'il nous a fallu synthétiser. Pour cette prodrogue, nous avons choisi de supprimer la fonction ammonium quaternaire et de conserver une chaîne carbonée de nature propylique de façon à minimiser les différences avec la molécule de référence **15b**.

La synthèse de cette prodrogue s'effectue "one pot" (**Schéma 17**) à partir de l'alcool **12b** dont la synthèse a été développée précédemment. Comme pour les dérivés **11** et **15a-c**, un suivi de la réaction est réalisé par RMN ³¹P en prélevant à un instant T quelques gouttes de milieu réactionnel qui sont ensuite diluées dans du THF.

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

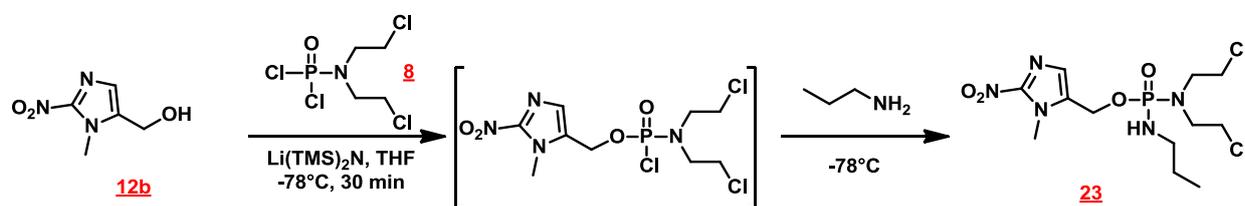


Schéma 17 : Synthèse de la prodrogue non vectorisée 23

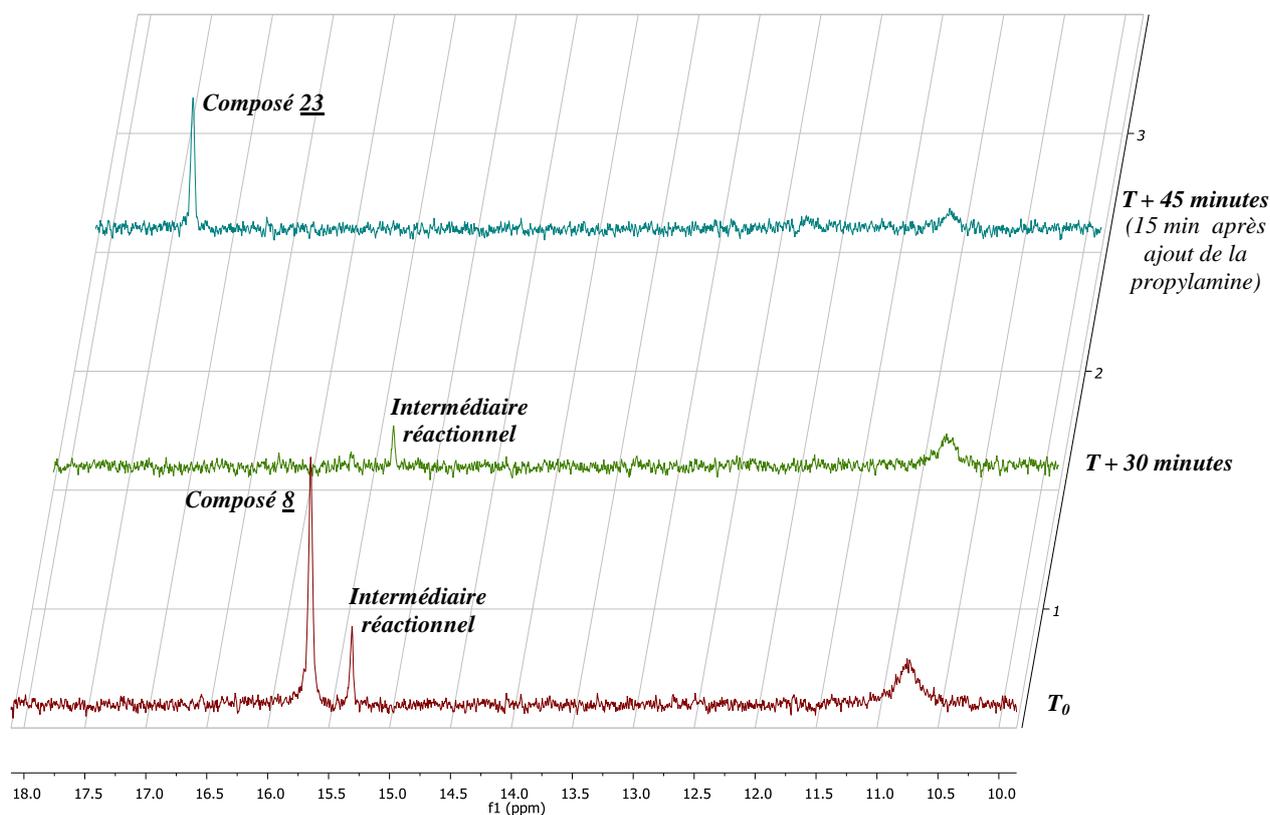


Figure 114 : Suivi par RMN ³¹P de la formation du composé 23, ref : H₃PO₄ à 1 % dans D₂O

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

Une solution molaire de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans le THF est ajoutée goutte à goutte, à - 78 °C et sous argon, à une solution de l'alcool **12b** dans le THF anhydre. Après environ cinq minutes, le dichlorure de l'acide *N,N*-bis-(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** est ajouté rapidement (T_0 pour le suivi RMN). Le spectre T_0 , en RMN ^{31}P , fait apparaître trois pics, l'un à 15,65 ppm relatif au produit de départ **8**, un autre à 15,31 ppm correspondant vraisemblablement à l'intermédiaire réactionnel et le dernier, à 10,75 ppm correspondant à une impureté. En raison de la forte proportion du composé **8** restant (80/20), nous continuons l'agitation pendant trente minutes puis un second spectre est enregistré. Le produit de départ **8** a cette fois-ci, quasiment disparu, la propylamine est alors additionnée au milieu réactionnel. Après quinze minutes d'agitation, le contrôle par RMN ^{31}P montre la disparition du pic à 15,31, relatif à l'intermédiaire de réaction et l'apparition d'un signal à 17,30 ppm correspondant au produit de réaction. Une extraction est alors réalisée, suivie d'une chromatographie sur colonne de silice pour conduire au produit **23** avec un rendement de 27 %.

B. Synthèse d'un dérivé portant le vecteur ammonium quaternaire sur l'entité clivable

Nous avons également envisagé la synthèse de prodrogues dérivées du cyclophosphamide pour lesquelles le vecteur ammonium quaternaire est porté par l'entité clivable. Sur ce modèle, un premier composé, de type nitrobenzène, a été obtenu suivant la séquence réactionnelle du *Schéma 18*.

Le protocole développé précédemment, qui correspond au couplage de l'alcool **12a-c** avec le composé **8** suivi d'une quaternisation permettant d'obtenir les prodrogues **15a-c**, est repris ici et nécessite donc au préalable la synthèse du [2-{2-(diméthylamino)éthoxy}-4-nitrophényl]méthanol **26**.

1. Synthèse de l'alcool **26**, le [2-{2-(diméthylamino)éthoxy}-4-nitrophényl]méthanol

La première étape consiste à protéger la fonction acide de l'acide 2-hydroxy-4-nitrobenzoïque commercial par estérification. Cette réaction s'effectue par action du chlorure de thionyle dans le méthanol et nécessite un chauffage à 60 °C. Après extraction et évaporation, le composé **24** est obtenu avec un excellent rendement de 97 % et utilisé sans

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues
dérivées des phosphoramides

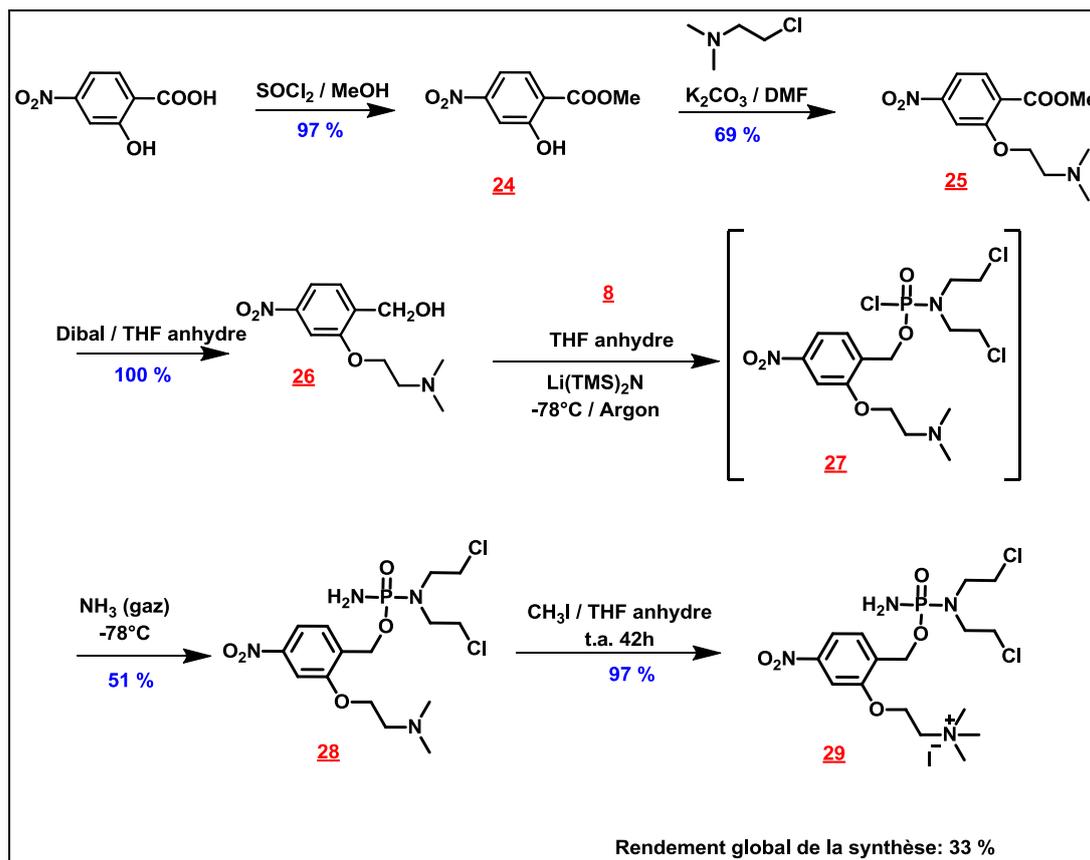


Schéma 18 : Synthèse de l'iodure de 2-{2-([N,N-bis-(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl)oxyméthyl}-5-nitrophénoxy)-N,N,N-triméthyléthananonium 29

autre purification pour l'étape suivante.

L'étape suivante consiste à alkyler la fonction alcool du composé **24** par action de la 2-chloro-*N,N*-diméthyléthylamine dans le diméthylformamide en présence de carbonate de potassium d'après une procédure décrite par Hay *et al.* [198]. Après une nuit à 100 °C et une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée par un mélange acétate d'éthyle/éthanol (9/1, v/v), le composé **25** est obtenu avec un rendement de 69 %. L'alkylation de l'alcool est confirmée en analyse infra-rouge, par la disparition de la bande d'absorption ν_{OH} à 3117 cm^{-1} , et, en RMN 1H par la disparition du signal à 11 ppm pour le composé **24** (correspondant au proton de l'alcool), ainsi que par l'apparition des signaux caractéristiques de la chaîne *N,N*-diméthyléthylamine, à savoir, deux triplets à 4,21 et 2,82 ppm affichant des constantes de couplage de 5,6 Hz et correspondant respectivement aux protons des méthyles en α de l'oxygène et de l'azote, ainsi qu'un singulet à 2,36 ppm relatif aux protons de la fonction *N,N*-diméthylamino.

La réduction de la fonction ester du composé **25** est réalisée dans le THF anhydre par action de l'hydrure de diisobutylaluminium à froid. Après une heure d'agitation à 0 °C, la réaction est stoppée par addition d'une solution aqueuse de tartrate de magnésium puis extraite par de l'acétate d'éthyle. Après évaporation, le [2-{2-(diméthylamino)éthoxy}-4-nitrophényl]méthanol **26** est obtenu avec un rendement quantitatif sous forme d'une poudre analytiquement pure par RMN 1H .

La réduction de l'ester en alcool est confirmée par RMN 1H par l'apparition d'un singulet à 4,67 ppm relatif au méthylène en α de l'alcool et par RMN ^{13}C avec la disparition du signal carbonyle de l'ester (165,77 ppm) et l'apparition du signal du méthylène de l'alcool primaire (61,29 ppm).

2. Formation du dérivé phosphoramide **28**

Le même protocole que celui utilisé pour l'obtention des composés **15a-c** est utilisé ici.

Une solution molaire de bis(triméthylsilyl)amidure de lithium dans du THF est ajoutée goutte à goutte, à -78 °C et sous argon, à une solution de l'alcool **26** dans du tétrahydrofurane anhydre. Après environ cinq minutes, le dichlorure de l'acide *N,N*-bis-(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** est ajouté rapidement. Cet ajout est le point de référence temporel et sera désigné comme T_0 pour le suivi par RMN ^{31}P .

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues
dérivées des phosphoramides

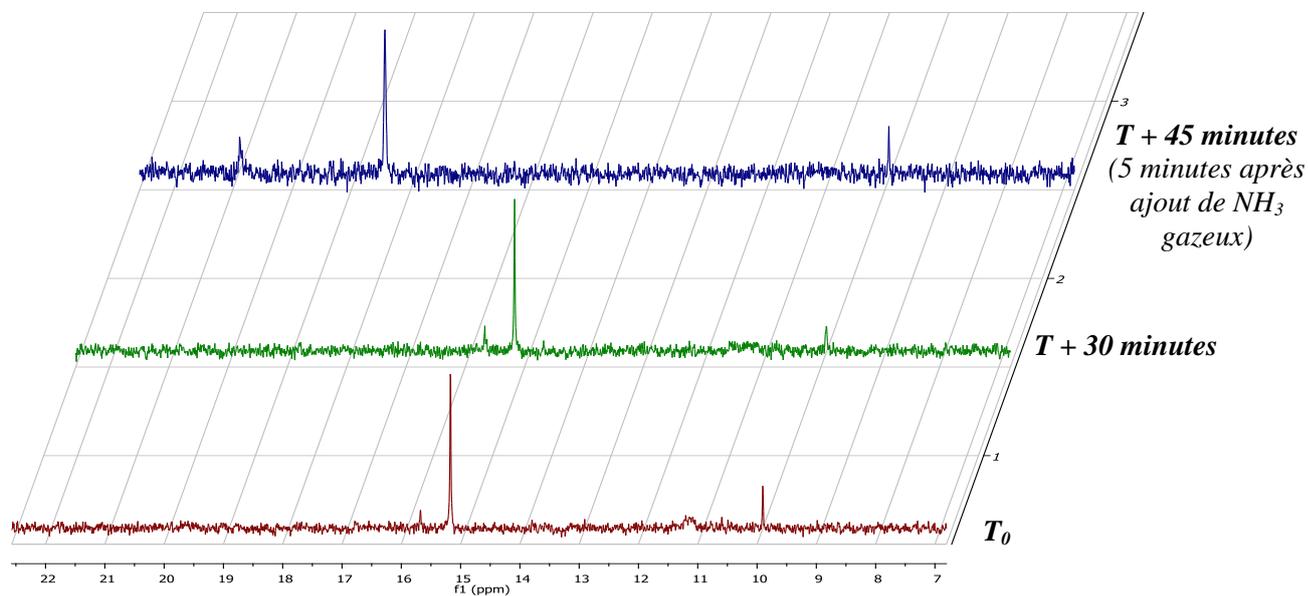


Figure 115 : Suivi par RMN ^{31}P de la formation du composé 28

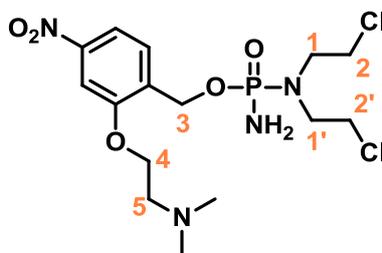


Figure 116 : Structure du composé 28

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

Le suivi par RMN ^{31}P de cette réaction (**Figure 115**) met en évidence trois pics : un à 15,72 ppm qui correspond au produit de départ **8**, un à 15,17 ppm correspondant à la formation d'un nouveau produit **27** et un dernier à 9,9 ppm qui correspond à une impureté régulièrement rencontrée en reproduisant ce protocole. En se fiant aux intégrations du spectre, on peut estimer que la réaction a été très rapide. En effet, dès le premier spectre, le produit **8** a pratiquement disparu (ratio $\frac{27}{8} = 1/10$).

Le spectre réalisé après trente minutes de réaction ($T_0 + 30$ min), ne montre pas d'évolution significative. Nous décidons alors de faire barboter de l'ammoniac gazeux dans notre milieu pendant cinq minutes avant de réaliser un nouveau contrôle par RMN ^{31}P ($T_0 + 45$ min). Les signaux à 15,67 et 15,17 ppm ont totalement disparu. Deux nouveaux signaux apparaissent à 18,43 et 20,88 ppm. La substitution du chlore par l'ammoniac semble s'être opérée de façon quantitative. Quinze minutes après l'ajout d'ammoniac gazeux, de l'eau est additionnée au milieu, puis le mélange réactionnel est extrait avec du dichlorométhane avant d'être purifié par chromatographie sur colonne d'alumine, éluée avec de l'acétate d'éthyle et de l'éthanol, avec un gradient d'éthanol de 1 à 10 %. Les premiers essais de purification par chromatographie sur colonne de gel de silice n'ont pas permis de séparer le produit **28** et l'alcool de départ **26**.

Le rendement de ces deux étapes réalisées "one pot" est de 51 % et le produit **28** a été caractérisé par infra-rouge, RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P (**Figure 116**).

- ↳ **Infra-rouge** : Deux bandes d'absorption à 3232 et 3108 cm^{-1} sont attribuables aux vibrations antisymétriques et symétriques de la fonction NH_2 de la moutarde phosphoramide.
- ↳ **Résonance Magnétique Nucléaire du ^1H** : Le couplage de l'alcool avec le composé **8** est vérifié par la présence de deux doublets dédoublés ayant des déplacements chimiques de 5,10 et 5,16 ppm et correspondant aux deux protons diastéréotopiques du méthylène H-3. Ces protons affichent une constante de couplage en 3J de 6,4 et 7,2 Hz avec le phosphore ainsi qu'une constante géminée de 13,9 Hz.
- ↳ **Résonance Magnétique Nucléaire du ^{13}C** : Le couplage de l'(hétéro)aromatique est validé par le doublet du carbone du méthylène C-3 qui couple avec le phosphore selon une constante $^2J = 4,3$ Hz et le doublet du carbone aromatique $\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{-C}$ couplant également avec le phosphore selon une constante $^3J = 8,4$ Hz.

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues
dérivées des phosphoramides

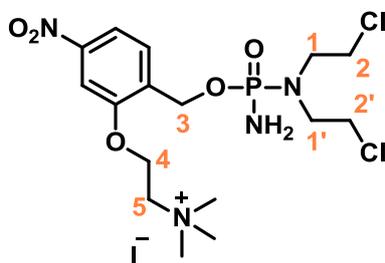


Figure 117 : Structure du composé 29

↪ **Résonance Magnétique Nucléaire du ^{31}P** : Le signal du phosphore apparaît à 19,63 ppm dans le méthanol deutéré, comparativement à la référence : H_3PO_4 à 1 % dans D_2O placé dans un tube coaxial.

2. Quaternisation du composé **28**

L'étape finale de cette synthèse consiste à métyler l'amine tertiaire du bras vecteur pour donner l'ammonium quaternaire. Pour ce faire, de l'iodure de méthyle est ajouté à une solution de **28** dans du THF anhydre. Le mélange est agité, sous argon et à température ambiante. L'avancement de la réaction est contrôlé par chromatographie sur plaque de silice (révélée aux UV et à la NBP), ainsi que par RMN ^{31}P . Après 42 h de réaction, nous observons la disparition du produit de départ **28**, le milieu réactionnel est simplement évaporé à température ambiante à l'aide d'une pompe à palette, afin d'obtenir le produit **29** avec un rendement de 97 %.

Ce produit a été caractérisé par infra-rouge, RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P (**Figure 118**) :

↪ **Résonance magnétique nucléaire du ^1H** : L'alkylation de l'amine tertiaire est confirmée par le déplacement du signal des méthyles qui se voient déblindés comparativement aux méthyles du composé **28** (**28** : $\text{N}(\text{CH}_3)_2$: 2,38 ppm et **29** : $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$: 3,34 ppm).

↪ **Résonance magnétique du ^{13}C** : La quaternisation est confirmée par le déplacement des protons vicinaux de l'azote vers les champs faibles avec le carbone C-5 qui apparaît à un déplacement chimique de 66,48 ppm contre 58,81 ppm pour le dérivé **28** non quaternisé, ainsi que par les méthyles de la fonction ammonium quaternaire qui apparaissent à 54,77 ppm pour le composé **29** sous forme quaternisée, alors qu'ils apparaissaient à 45,94 ppm pour l'amine tertiaire.

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

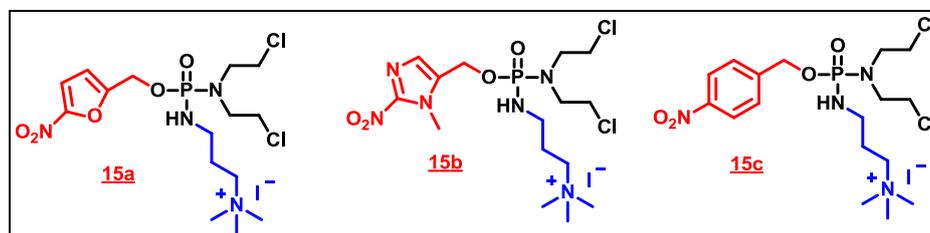


Figure 118 : Structure des prodrogues étudiées

II. Etude cinétique du clivage des prodrogues par RMN

³¹P

Les trois prodrogues dérivées du cyclophosphamide, vectorisées sur l'entité active (*Figure 118*) et se différenciant uniquement par la nature de leur entité clivable : nitrofurane **15a**, nitroimidazole **15b** et nitrophényle **15c**, ont été étudiées en termes de stabilité et de clivage induit par un agent chimique, l'hydrosulfite de sodium (Na₂S₂O₄).

A. Mode Opérateur

Pour chaque étude cinétique, une succession d'acquisitions à intervalles de temps déterminés a été programmée sur 24 heures à 37 °C ou à 20 °C. Pour l'interprétation individuelle de chaque spectre, le logiciel TOPSPIN a été utilisé et les déplacements chimiques de chaque pic ont été exprimés en ppm à partir d'une référence placée dans un tube coaxial, la triphénylphosphine à 5 % dans le DMSO-*d*₆ ($\delta = -6,4$ ppm par rapport à H₃PO₄ à 1 % dans D₂O). L'aire de chaque pic a été déterminée après avoir attribué une aire de 100 au pic de référence. Les données de cinétique concernant la prodrogue et l'anion libéré ont été déterminées avec le logiciel Table Curve 2D.

1. Etude de stabilité

Pour les études de stabilité, chaque prodrogue a été solubilisée soit dans du sérum physiologique pur, soit dans un mélange tampon cacodylate (Na(CH₃)₂As₃H₂O ; 0,1 M, pH = 7,4) / acétonitrile à raison de 15 mg pour 500 μ L de tampon cacodylate et 80 μ L d'acétonitrile. Le tampon cacodylate a été préparé à partir d'une solution mère (0,2 M, pH = 7,4) conservée à + 4 °C.

2. Suivi du clivage des composés par RMN ³¹P

Pour ces études, 30 mg de prodrogue ont été dissous dans 160 μ L d'acétonitrile. A 80 μ L de cette solution de départ ont été ajoutés 500 μ L de tampon cacodylate (0,1 M ; pH = 7,4), l'analyse RMN ³¹P correspond au T₀. Dans un deuxième temps, à 80 μ L de la même solution de départ, ont été ajoutés trois ou neuf équivalents d'hydrosulfite de sodium (Na₂S₂O₄) solubilisés dans 500 μ L de tampon cacodylate (0,1 M ; pH 7,4). La cinétique a alors été immédiatement démarrée.

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

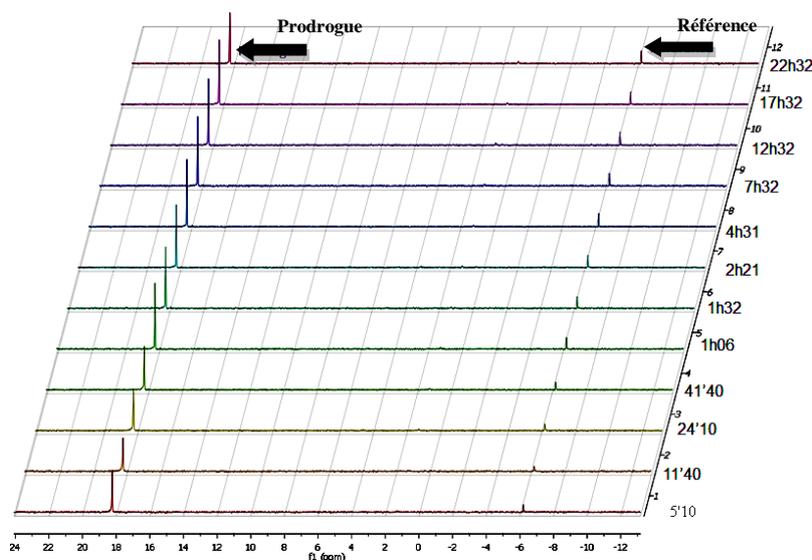


Figure 119 : Suivi par RMN ^{31}P de la stabilité du composé **15c** dans un tampon cacodylate à 37 °C en l'absence de réducteur – Référence : PPh_3 (5 % dans le DMSO)

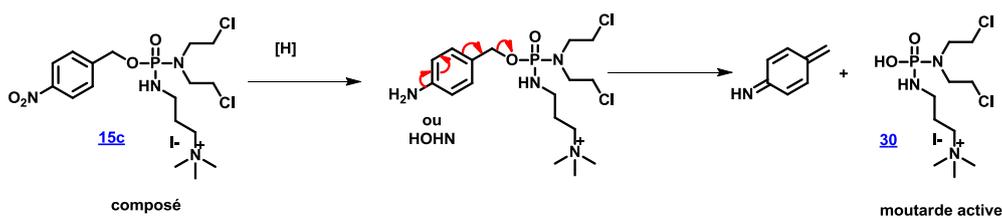


Figure 120 : Clivage du composé **15c** et libération de l'entité active en présence de trois équivalents de réducteurs

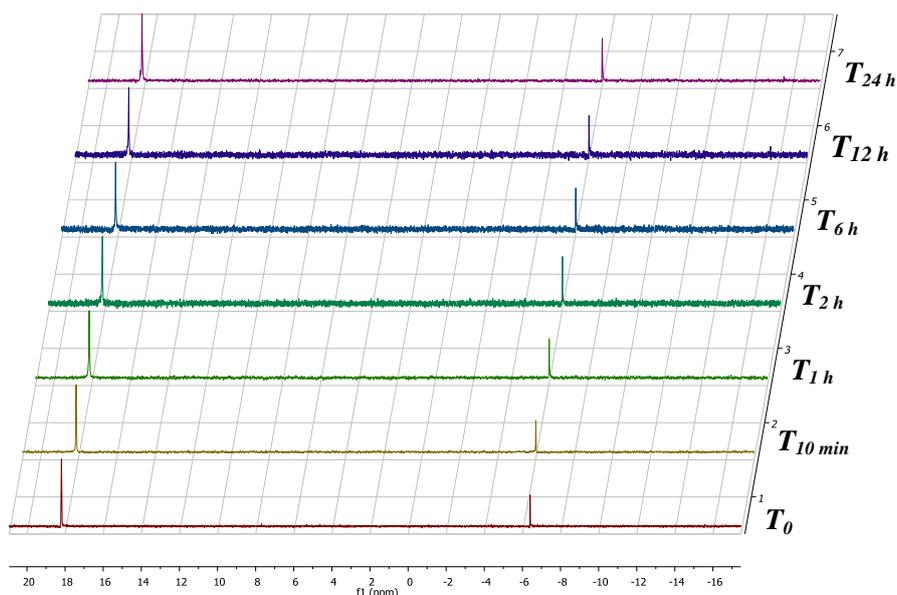


Figure 121 : Suivi par RMN ^{31}P de la stabilité du composé **11** dans un tampon cacodylate à 37 °C en présence de trois équivalents de réducteur – Référence : PPh_3 (5 % dans le DMSO)

B. Etude de stabilité des prodrogues

1. A 37 °C, dans le tampon cacodylate

Les études de clivage des composés étant réalisées dans un tampon cacodylate, à 37 °C et en présence d'agent réducteur, il était important de vérifier au préalable la stabilité de ces composés dans des conditions identiques mais en l'absence d'agent réducteur.

Les suivis par RMN ^{31}P démontrent qu'à la température de 37 °C, dans du tampon cacodylate et en absence d'agent réducteur, aucun des trois composés étudiés ne se dégradent sur 24 h. En effet, au cours du temps, comme exemplifié avec le composé **15c** (Figure 119), aucun signal supplémentaire n'apparaît.

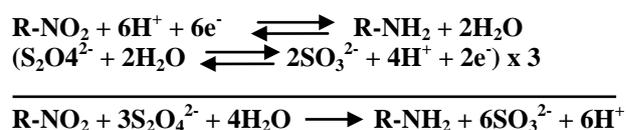
2. A 20 °C, dans le sérum physiologique

D'autres conditions ont été testées : température de 20 °C et composés dilués dans du sérum physiologique pur. L'objectif était, ici, de vérifier la stabilité des composés en préparation injectable en vue des études *in vivo*.

Dans ces conditions, aucun autre signal n'apparaît au cours du temps. Les prodrogues sont donc considérées comme stables à température ambiante dans le sérum physiologique.

C. Etude du clivage et de la libération de l'entité active

Pour l'étude du clivage par RMN ^{31}P des prodrogues **15a-c**, nous avons choisi d'utiliser trois équivalents de réducteur, l'hydrosulfite de sodium. En effet, la réduction du groupement nitro en amine nécessite six électrons, selon l'équation d'oxydoréduction :



En considérant, l'équation d'oxydoréduction de l'hydrosulfite de sodium (NaS_2O_4), trois équivalents de ce réducteur sont nécessaires pour la réduction complète de la fonction nitro et devraient permettre le clivage de la prodrogue ainsi que la libération de l'entité active selon le mécanisme Figure 120 [114,199,200].

Nous avons, dans un premier temps, voulu vérifier la stabilité du composé benzyle **11**, composé défini comme étant non clivable, dans un milieu réducteur. Un suivi par RMN ^{31}P de ce composé a donc été réalisé après avoir ajouté trois équivalents d'hydrosulfite de sodium

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

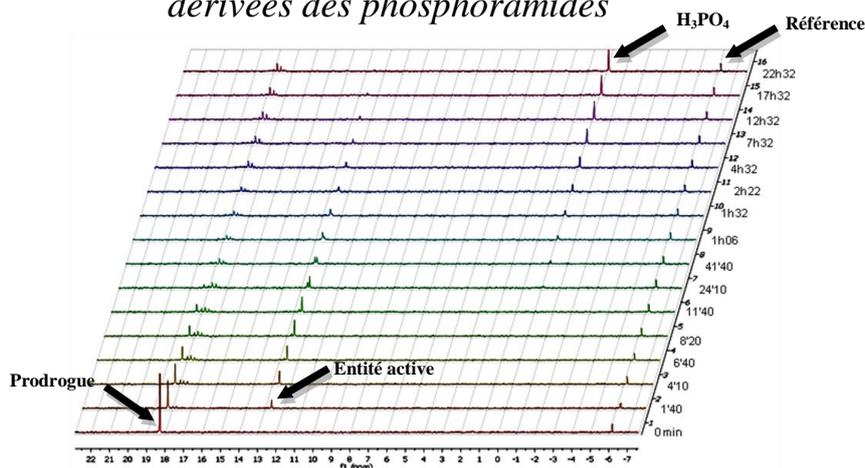


Figure 122 : Suivi par RMN ^{31}P du clivage du composé 15c sur 24 h, à 37°C , en présence de trois équivalents de réducteur - Référence : PPh_3 (5 % dans le DMSO)



Figure 123 : Cinétique de la disparition de la prodrogue 15a au cours du temps - Analyse : Table Curve 2D

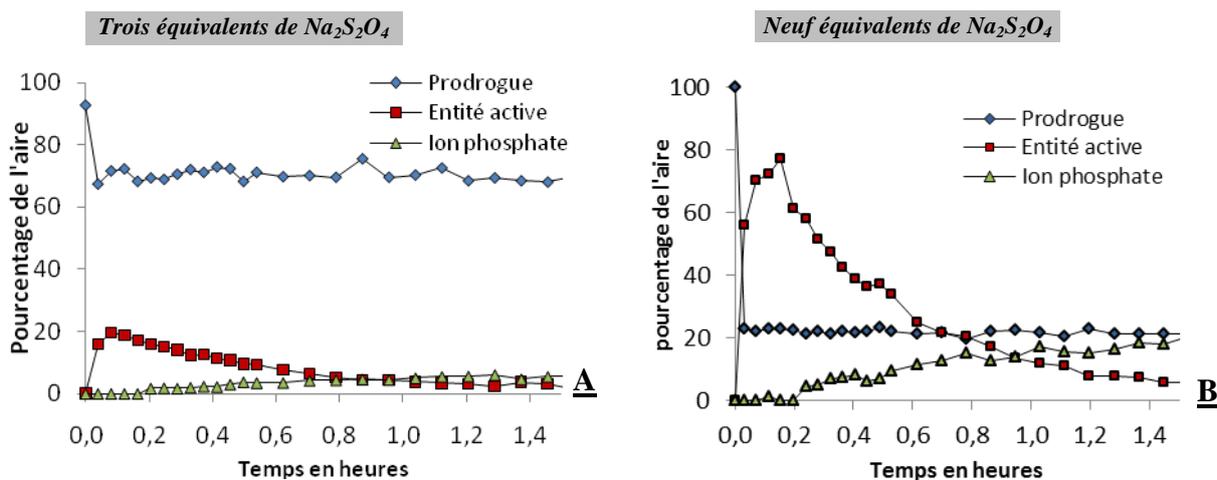


Figure 124 : Suivi de la disparition de la prodrogue (15c) et de l'apparition de l'entité active et de l'ion phosphate au cours du temps après ajout de trois équivalents de réducteur (A) ou de neuf équivalents de réducteur (B)

(Figure 121). Dans ces conditions, aucun signal supplémentaire n'apparaît au cours du temps. Le composé **11** est donc stable dans un environnement réducteur à 37 °C. Il ne devrait donc pas, ou peu, avoir d'activité lors des études biologiques, car il ne libère pas la moutarde active. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux prodrogues clivables **15a-c**. Lorsque trois équivalents d'agent réducteur sont ajoutés au milieu, le suivi RMN ³¹P met en évidence la disparition rapide du signal correspondant à la prodrogue de départ et l'apparition de nombreux autres signaux supplémentaires caractérisés par des déplacements chimiques différents (Figure 122).

1. Disparition de la prodrogue

En présence de trois équivalents d'agent réducteur, le clivage de la prodrogue est très rapide et total pour les dérivés nitrofurane **15a** et nitroimidazole **15b** avec des temps de demi-vie respectifs de 169 et 167 secondes, comme exemplifié avec le composé **15a** (Figure 123).

Concernant le dérivé nitrobenzyle **15c**, son clivage semble être plus difficile puisque trois équivalents d'hydrosulfite de sodium ne permettent de cliver que 15 % du produit de départ. Même en augmentant la quantité de réducteur à neuf équivalents, le clivage n'est toujours pas total, il n'est réalisé qu'à 80 % (Figure 124).

2. Cinétique de l'entité active

a. L'hypothèse

Parallèlement à la disparition du signal correspondant à la prodrogue, apparaît puis disparaît un signal qui semble être commun aux trois composés, situé aux environs de 12 ppm. D'après les données de la littérature [113,114,177] concernant des prodrogues de structure proche mais non vectorisées par une fonction ammonium quaternaire, ce signal pourrait correspondre à la moutarde active libérée. En effet, un certain nombre d'auteurs ont déjà étudié la cinétique du clivage de prodrogues dérivées du cyclophosphamide et de l'ifosfamide par RMN ³¹P et tous, ont observé l'apparition d'un signal sortant aux environs de 12 ppm (par rapport à H₃PO₄), et ce, très rapidement après ajout du réducteur.

b. Validation de l'hypothèse

Afin de confirmer notre hypothèse, nous nous appuyons sur une analyse par chromatographie en phase liquide avec une détection par spectrométrie de masse (CPL-SM).

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

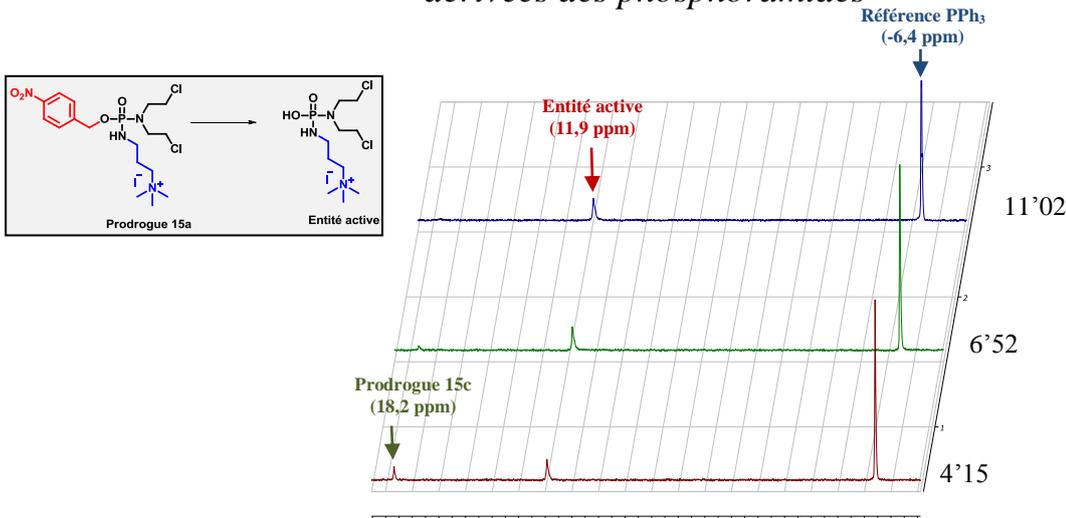


Figure 125 : Evolution du composé **15a**, suivie en RMN ^{31}P , en présence de onze équivalents de réducteur dans un tampon cacodylate à 37 °C - Référence : PPh_3 (5 % dans le DMSO)

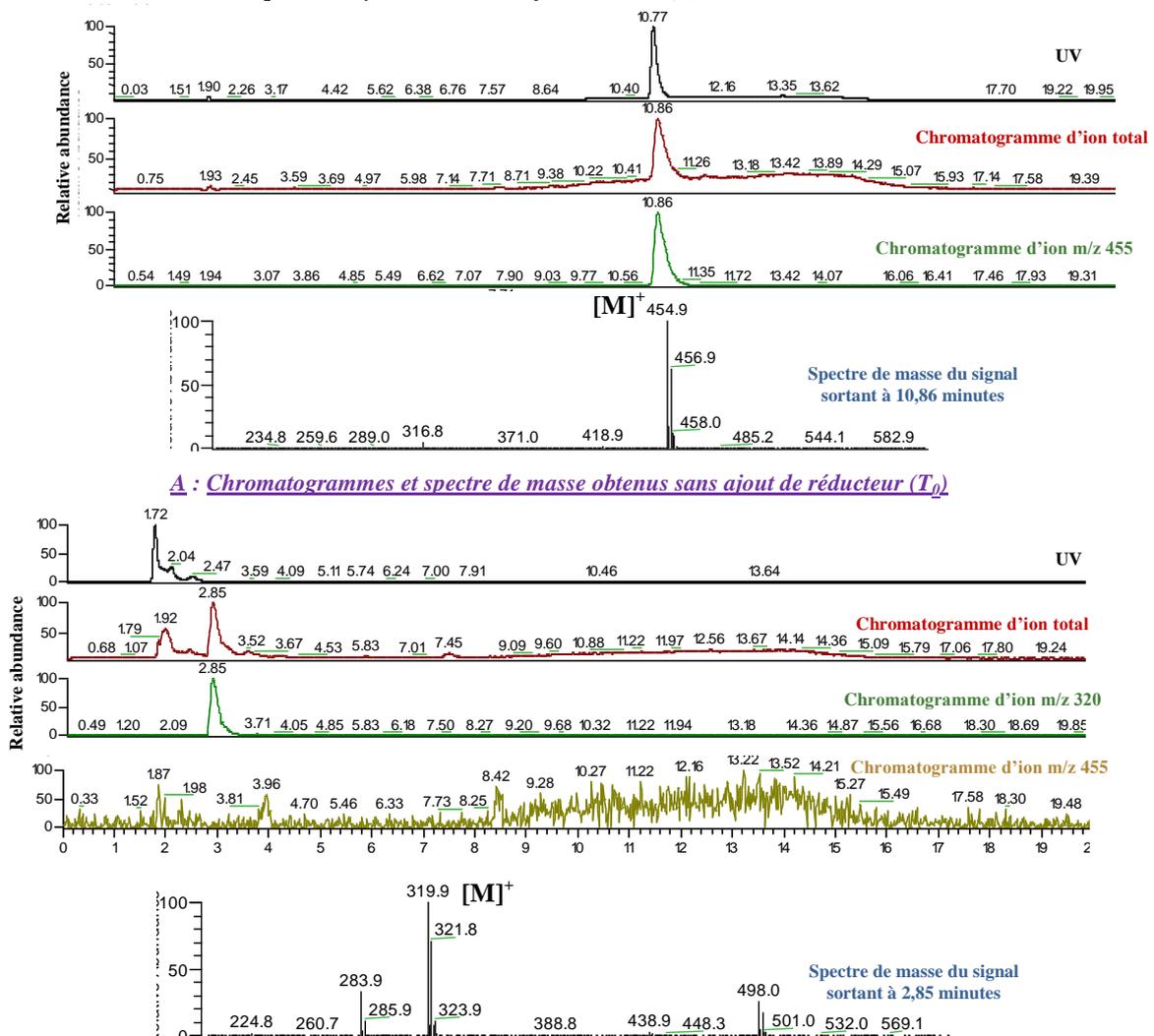


Figure 126 : Chromatogrammes et spectres de masse obtenus avec le composé **15c** dans un tampon cacodylate avant (A) et après clivage (B)

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

Avant de réaliser cette analyse, des conditions de réduction doivent être déterminées pour faire en sorte de n'avoir, dans l'échantillon à analyser, que l'espèce à identifier (le signal apparaissant en RMN ^{31}P à environ 12 ppm) et, éventuellement une quantité résiduelle de la prodroge de départ. Ces conditions sont mises au point par une étude RMN ^{31}P .

Lorsque le composé **15c**, en solution dans du tampon cacodylate, est mis en présence de onze équivalents de réducteur puis placé onze minutes à 37 °C, le spectre RMN ^{31}P ne présente qu'un unique signal à 12 ppm (*Figure 125*). Ce sont donc ces conditions qui seront utilisées pour l'étude par CPL-SM.

Une première analyse en l'absence d'agent réducteur est réalisée (*Figure 126, A*). Le balayage d'ion total de m/z 200 à m/z 600 ne met en évidence qu'un unique signal présentant un temps de rétention de 10,8 minutes. Ce signal correspond à une molécule absorbant en ultra-violet à 254 nm et donne un spectre de masse avec l'amas isotopique caractéristique de la présence de deux atomes de chlore (M^+ : m/z 455/457/459), ce qui confirme la présence de la prodroge **15c** dans l'échantillon sans réducteur.

Dans un second temps, onze équivalents de réducteur sont ajoutés au milieu qui est placé à 37 °C pendant onze minutes (*Figure 126, B*). Après incubation, l'échantillon est immédiatement analysé par CPL-MS. L'analyse par chromatographie en phase liquide avec détection en ultra-violet ne fait pas apparaître de signal à 10,8 minutes comme précédemment, ce qui semble indiquer la disparition de la prodroge **15c**. Cette disparition est confirmée par le chromatogramme d'ion total et le chromatogramme d'ion m/z 455. Le balayage d'ion total m/z 200 à m/z 600 révèle, cette fois-ci, un pic présentant un temps de rétention de 2,85 minutes qui correspond à une molécule qui n'absorbe pas en ultra-violet et qui donne un spectre de masse avec toujours un amas isotopique caractéristique de la présence de deux atomes de chlore (M^+ : aires m/z 320/322/324) en accord avec la structure de du composé **30**.

En confrontant les résultats de cette analyse CPL-MS et de l'analyse précédente de RMN ^{31}P , nous pouvons conclure qu'en présence de réducteur, la prodroge **15c** est clivée totalement avec libération l'entité active attendue **30** qui donne, en RMN ^{31}P , un signal à environ 12 ppm.

Cette observation est valable pour l'ensemble des composés **15a-c**

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

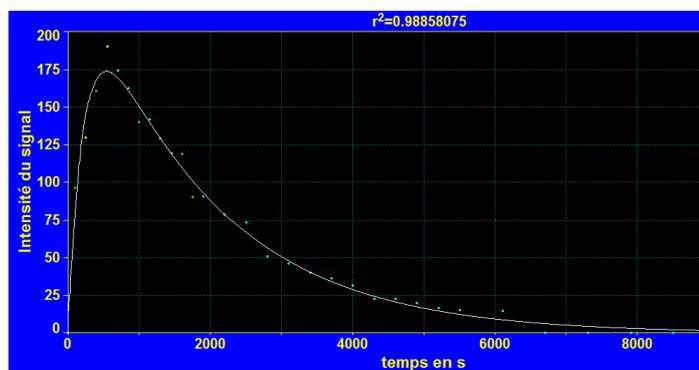


Figure 127 : Cinétique de formation et de dégradation de l'entité active

c. Cinétique de l'entité active libérée

Les cinétiques des entités actives obtenues, interprétées avec le logiciel table curve 2D, sont d'ordre 1/1 avec des constantes de vitesse de formation de l'ordre de 10^{-3} secondes et de dégradation de l'ordre de 10^{-4} secondes (*Figure 127*).

III. Evaluation in vitro – Etude de cytotoxicité en hypoxie et normoxie

A. Modes opératoires

La cytotoxicité des prodrogues **15a-c** a été évaluée sur les différentes lignées cellulaires de chondrosarcome humain (HEMC-SS), d'ostéosarcome humain (Saos-2), d'adénocarcinome prostatique humain (PC3) et de mélanome murin (B16F0) en normoxie et en hypoxie. Les cellules sontensemencées dans des plaques de 96 puits (Nunclon™ Surface) à une concentration de 15 000 cellules par puits dans 150 µL de milieu de culture. Pendant 24 heures, les plaques sont incubées en normoxie à 37 °C sous 5 % de CO₂. 24 heures après l'ensemencement, 50 µL de concentrations croissantes de prodrogues diluées dans le DMSO, de telle sorte que le pourcentage final en DMSO soit de 0,5 %, sont ajoutés dans chaque puits. Cette étape est réalisée soit sous hotte pour les plaques testées en normoxie, soit, dans une boîte à gants (1 % O₂ / 5 % CO₂ / Argon) avec du diméthylsulfoxyde et des milieux dégazés pour les plaques testées en hypoxie.

Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 h à 37 °C avec ou sans les prodrogues soit dans une enceinte hypoxique (ADELBIO, Clermont-Ferrand) en condition d'anoxie stricte (azote / 5 % CO₂), soit en condition de normoxie (21 % O₂ / 5 % CO₂). Après une incubation de 24 h, le milieu contenant les drogues est éliminé et le tapis cellulaire lavé au PBS. Toutes les cellules sont ensuite réincubées dans du milieu neuf à 37 °C, en normoxie pendant 48 h. L'effet cytotoxique des prodrogues est évalué par le test de réduction à la résazurine. La fluorescence est mesurée avec un lecteur de plaque 96 puits Fluoskan Ascent FL Plate™ (Labsystems) à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et à une longueur d'onde d'émission de 590 nm. Le pourcentage de viabilité cellulaire est estimé pour chaque concentration et chaque lignée cellulaire. Des valeurs de CI₅₀ peuvent être estimées.

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

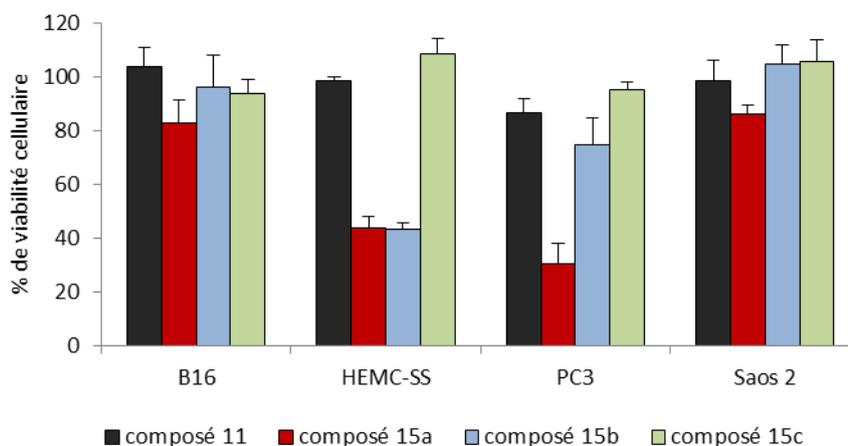


Figure 128 : Pourcentage de viabilité cellulaire en hypoxie à la dose de 10 µM pour les quatre dérivés, sur les lignées B16F0, HEMC-SS, PC3 et Saos-2

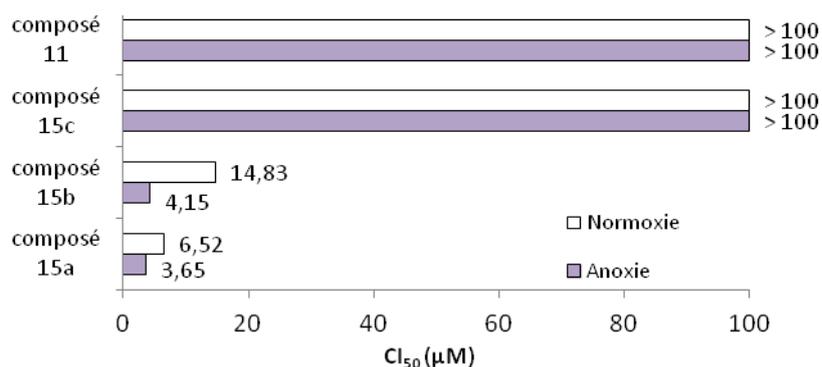


Figure 129 : Résultat de l'étude de cytotoxicité sur la lignée HEMC-SS en hypoxie et en normoxie des quatre dérivés

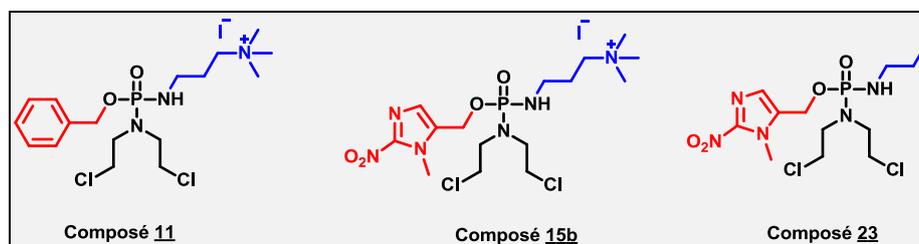


Figure 130 : Structure des trois dérivés phosphoramides testés in vivo.

B. Résultats

Suivant le protocole décrit ci-dessus, une première évaluation de la cytotoxicité en anaérobie stricte et en normoxie a été réalisée sur les lignées cellulaires B16F0, Saos-2, HEMC-SS et PC3 (*Figure 128*).

Les résultats obtenus démontrent une absence d'activité pour le composé **11** (dérivé benzyle et non clivable) et pour le composé **15c** (dérivé nitrobenzyle) pour les quatre lignées. Ces résultats étaient attendus. En effet, le dérivé benzyle **11** est non clivable, l'oxygène restant substitué et ne libérant pas la moutarde correspondante, il n'est donc pas actif. Pour ce qui est du composé **15c**, l'absence de cytotoxicité est cohérente avec les suivis réalisés par RMN ³¹P qui ont souligné une difficulté de clivage pour ce composé. En effet, il fallait jusqu'à onze équivalents de réducteur pour conduire au clivage complet de la molécule alors que trois équivalents étaient suffisants pour assurer le clivage des composés **15a** ou **15b**.

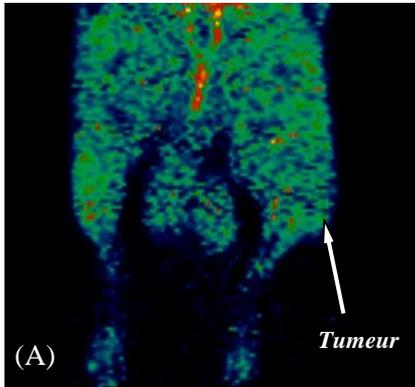
Concernant l'activité cytotoxique des composés **15a** et **15b**, elle semble être plus intéressante sur les lignées HEMC-SS (chondrosarcome humain) et PC3 (adénocarcinome prostatique) avec des pourcentages de viabilité cellulaire respectifs, à la dose de 10 µM et en hypoxie, de 43,7 ± 4,47 % et 30,3 ± 7,65 % pour le composé **15a** et de 43,4 ± 2,47 % et 74,6 ± 10,2 % pour le composé **15b**. Sur les lignées B16F0 et Saos-2, aucun des composés testés n'a montré d'activité cytotoxique.

Pour la lignée HEMC-SS (*Figure 129*), des valeurs de CI_{50} ont été déterminées en hypoxie et en normoxie : le différentiel semble plus intéressant pour le composé **15b** avec un rapport $CI_{50} \text{ normoxie} / CI_{50} \text{ en hypoxie}$ de 3,6 alors qu'il n'est que de 1,8 pour le composé **15a**. Cette observation est en accord avec la littérature. En effet, Duan *et al.* [179], ayant étudié l'activité de prodrogues dérivées des phosphoramides dans ces mêmes conditions (hypoxie et normoxie), ont également mis en évidence un différentiel hypoxie/normoxie plus intéressant pour une entité clivable de type nitroimidazole qu'une entité clivable de type nitrofurane.

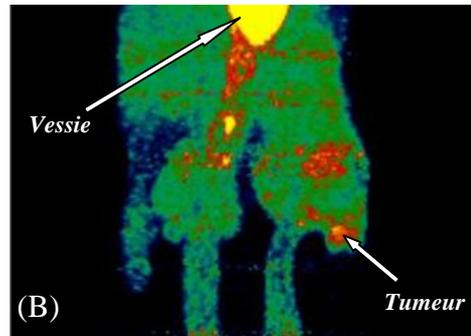
Bien que ces premiers résultats soient encourageants, de nouvelles études de cytotoxicité devront être réitérées pour confirmer ces observations.

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

Tumeur de chondrosarcome de rat (SRC) :



Stade J₃₀ post implantation
Aucune fixation



Stade J₄₅ post implantation
Une fixation est observée pour un seul rat (T/M = 1,83)

Tumeur de xénogreffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) sur souris SCID :

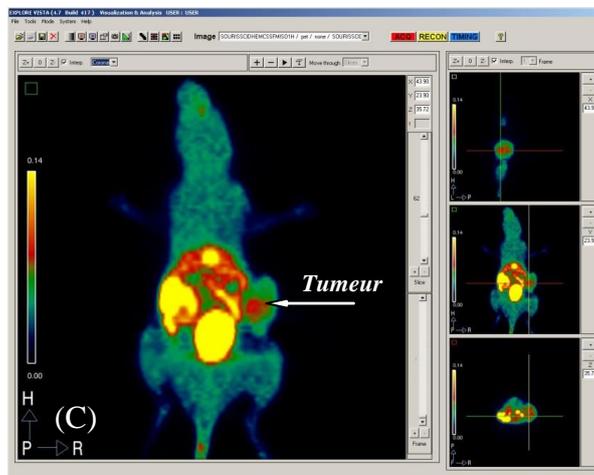


Figure 131 : Imagerie scintigraphique au ¹⁸F-FMISO d'une tumeur de chondrosarcome de rat Swarm au stade J₃₀ (A) et J₄₅ (B) post implantation, ainsi que d'une tumeur de xénogreffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) sur souris SCID (C) au stade J₇₀ post inoculation

IV. Evaluation in vivo

Selon l'étude *in vitro* précédente, parmi les composés **15a**, **15b** et **15c**, le composé **15b** semble posséder un meilleur différentiel "cytotoxicité en hypoxie / cytotoxicité en normoxie". Nous avons alors envisagé l'étude *in vivo* de ce composé comparativement à son équivalent non clivable et vectorisé **11** mais aussi à son équivalent clivable et non vectorisé **23** (*Figure 130*).

Pour cette étude, il nous a fallu sélectionner, au préalable, un modèle de tumeur de chondrosarcome en hypoxie. Pour ce faire, nous avons réalisé des scintigraphies au ^{18}F -FMISO, un traceur spécifique des tissus en hypoxie, sur le modèle de rat porteur de chondrosarcome (SRC) et sur le modèle de xéno greffe de chondrosarcome humain sur souris SCID (*Figure 131*).

A. ^{18}F -FMISO – Validation du modèle d'étude

1. Le ^{18}F -FMISO ne fixe pas la tumeur du modèle SRC

Huit rats porteurs de chondrosarcome Swarm ont été utilisés pour cette étude. Chaque rat a reçu une dose de 20 MBq de ^{18}F -FMISO administrée en i.v. Les acquisitions étaient réalisées entre une heure et une heure et demie après injection. La durée de l'acquisition était de vingt minutes.

Les scintigraphies ont été réalisées au stade J₈, J₂₅, J₃₀ et J₄₅.

Aucune fixation du radiotracer n'a été observée pour les stades J₈ à J₃₀ (*Figure 131, A*). Concernant le stade J₄₅, une fixation faible (T/M = 1,83) du traceur a été observée pour un seul rat (*Figure 131, B*). Ces résultats démontrent que la tumeur de chondrosarcome de rat Swarm n'est pas une tumeur hypoxique au stade précoce de son développement et ne constitue pas un bon modèle pour notre étude *in vivo*.

2. Le ^{18}F -FMISO fixe la tumeur de xéno greffe de chondrosarcome humain HEMC-SS sur souris SCID

Cinq souris ont été utilisées pour cette étude. Chaque souris a reçu une administration en i.v. de $13,0 \pm 3,7$ MBq de ^{18}F -FMISO au stade J₇₀ post inoculation. L'imagerie a été réalisée entre 1 h et 1 h 30 post injection avec des acquisitions corps entier, deux positions de

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

Dose (mg/kg)	Dose (µmol/kg)	Score clinique	Nombre d'animaux	Nombre de mort	% de mort	
80	149	0	5	5	100	
60	111	0	5	5	100	
55	102	0	5	5	100	
50	93	0	5	2	40	
40	74	0	5	2	40	Perte de poids max à 24h
35	65	0	5	0	0	-11,00%
30	56	0	5	0	0	-
20	37	0	5	0	0	-

Composé 11

Dose (mg/kg)	Dose (µmol/kg)	Score clinique	Nombre d'animaux	Nombre de morts	% de mort
80	136	0	5	5	100
70	119	0	5	4	80
60	102	0	5	1	20
55	94	0	5	0	0
50	85	0	5	0	0
40	68	0	5	0	0

Composé

15b

Figure 132 : Détermination de la DMT sur souris OF1 pour les composés 15b et 11

■ Dose maximale tolérée (DMT)

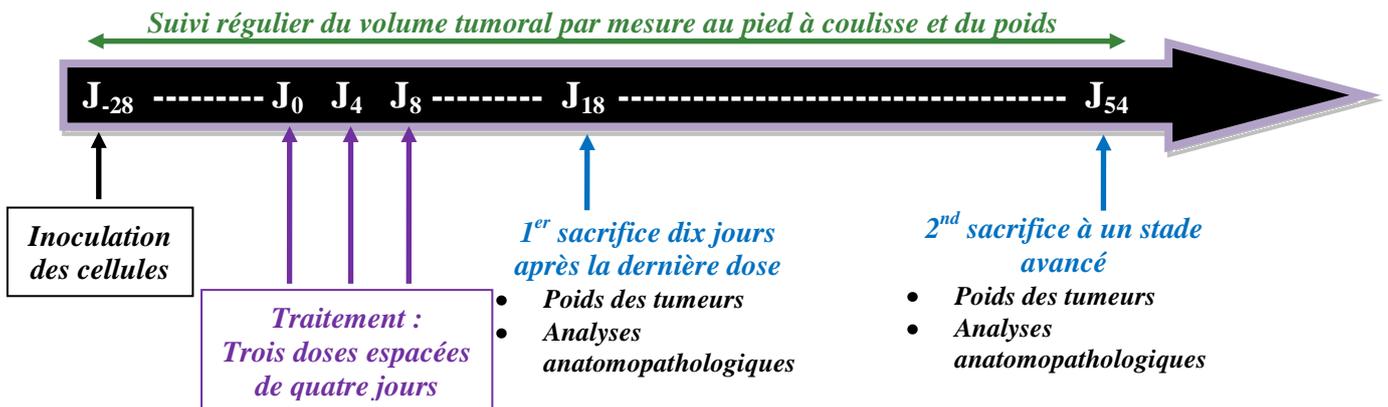


Figure 133 : Protocole schématisé de l'étude in vivo des dérivés phosphoramides

lit, pendant 15 à 20 minutes. La quantification est effectuée en déterminant le pourcentage de l'activité de la région d'intérêt (ROI) par rapport à l'activité corporelle totale.

Les scintigraphies obtenues démontrent une accumulation du radiotracer au niveau de la tumeur ($4,74 \pm 1,2$ % de l'activité corporelle totale et $T/M = 3,41 \pm 0,50$) (**Figure 131, C**). Ces données permettent de qualifier d'hypoxique cette tumeur qui constitue donc un bon modèle pour notre étude *in vivo*.

Nous avons donc choisi le modèle de xénogreffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) sur souris SCID pour l'étude *in vivo* des composés **15a-c**.

B. Détermination de la DMT

La détermination de la DMT des composés **15b**, **23** et **11**, après administration en i.v., a été réalisée sur des souris OF1 ($n = 30$) (**Figure 132**). Les composés **11** et **15b** sont solubilisés dans du sérum physiologique pur. En ce qui concerne le composé **23**, non soluble dans le sérum physiologique pur, il est solubilisé au préalable dans de l'éthanol de telle sorte que le pourcentage final d'éthanol dans le sérum physiologique soit de 2 %.

Pour les trois composés, lorsque l'injection entraîne la mort, cette dernière est immédiate après quelques spasmes. Les souris qui survivent sont contrôlées régulièrement selon la méthodologie présentée précédemment (*p75*) Aucune diarrhée ni signes de léthargie ne sont observés, les scores cliniques sont par conséquent de 0 et la DMT est déterminée en considérant uniquement le nombre d'animaux morts ainsi que la perte de poids maximum observée à 24 h.

Pour le composé **11**, à la dose de 35 mg/kg, aucune mort n'est observée. Cependant, à cette dose, une souris sur cinq montre une perte de poids de plus de 10 %, nous déterminons donc la DMT, pour ce composé, à 30 mg/kg soit 56 $\mu\text{mol/kg}$. En effet, à cette dose, aucune perte de poids n'est observée.

Pour le composé **15b**, la DMT correspond à 55 mg/kg soit 94 $\mu\text{mol/kg}$ puisque, pour cette dose, aucune mort ni perte de poids ne sont observées.

Concernant le composé **23**, aucune des doses testées jusqu'à 80 mg/kg, n'a conduit à la mort d'animaux. Seule une légère perte de poids de 1,8 %, à la dose de 80 mg/kg, est rapportée pour une souris uniquement. Le composé **23**, dépourvu de son ammonium quaternaire, semble être beaucoup mieux toléré que les composés **11** et **15b**.

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

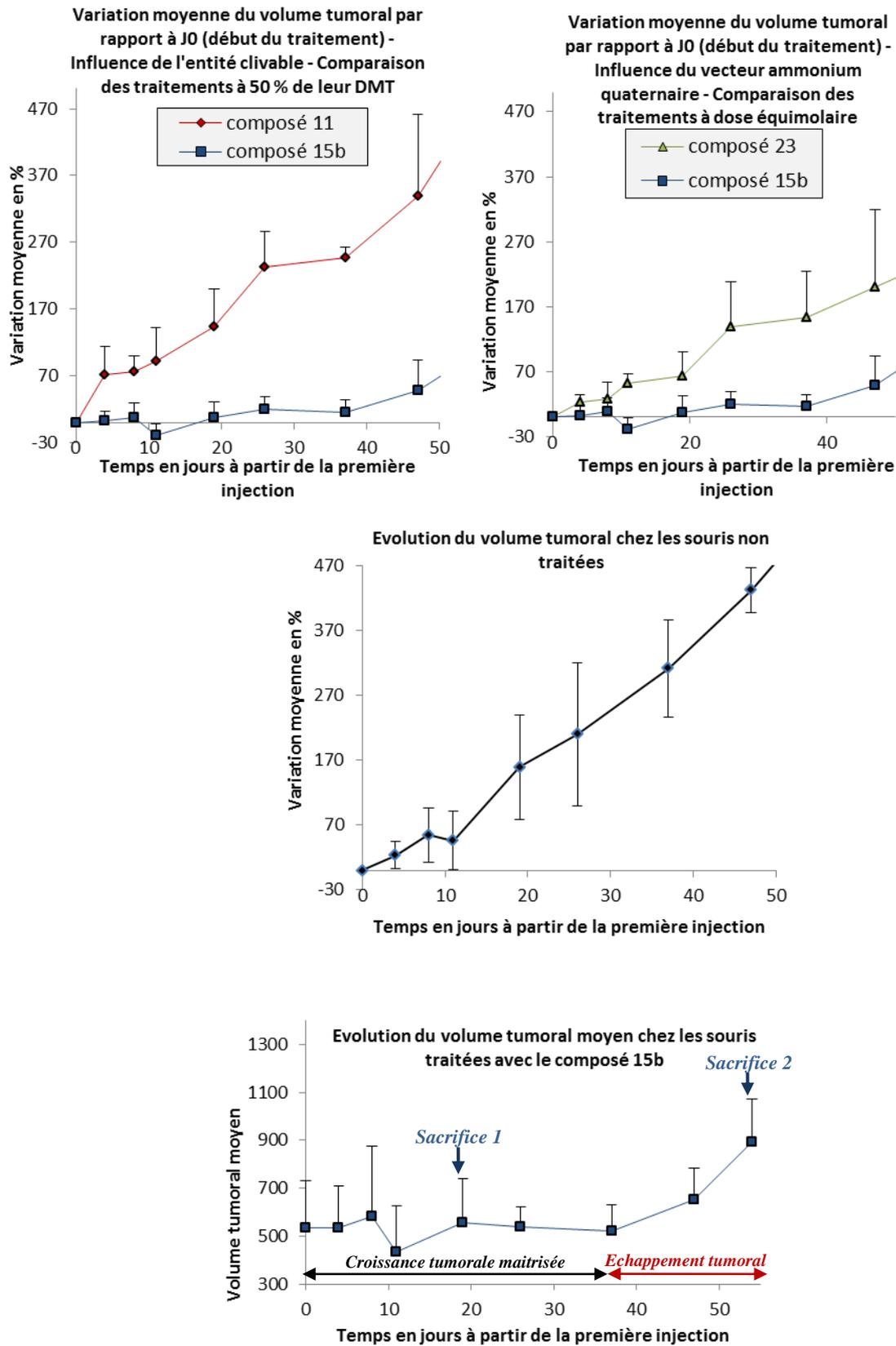


Figure 134 : Evolution du volume tumoral moyen chez les souris traitées – Mesure au pied à coulisse

C. Etude sur le modèle de xénogreffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS)

1. Protocole de traitement

Le protocole de traitement est illustré *Figure 133*.

Le traitement débute à J₂₈ post-inoculation, stade à partir duquel la xénogreffe devient mesurable. Trois injections des composés **11**, **15b** ou **23** sont administrées en i.v. à J₂₈, J₃₂ et J₃₆ post inoculation :

- Le composé **15b** est évalué comparativement à son équivalent non clivable, le composé **11**, aux doses correspondant à 50 % de leur DMT respective, soit 27,5 mg/kg (47 µmol/kg) pour le composé **15b** et 15 mg/kg (28 µmol/kg) pour le composé **11**.
- Le composé **23** étant beaucoup moins toxique que les deux autres, sa DMT n'ayant pas été déterminée, il est évalué à dose équimolaire comparativement au composé **15b** soit à 47 µmol/kg ce qui correspond à 18,9 mg/kg.

Les souris sont suivies régulièrement pendant 54 jours après le début du traitement par la mesure du volume tumoral au pied à coulisse, comme évoqué *p77*. Les résultats sont alors exprimés par la variation moyenne du volume tumoral par rapport à J₀ (Jour de la première dose, soit 28 jours post inoculation). La moitié des souris est sacrifiée au stade J₁₈, soit dix jours après la fin du traitement, la seconde moitié est, quant à elle, sacrifiée à un stade très avancé, stade J₅₄, soit trente-six jours après la fin du traitement.

Après sacrifice des souris, au stade J₁₈ ou J₅₄, les tumeurs sont prélevées, pesées et analysées en anatomopathologie.

2. Résultats

Pour les souris traitées avec les composés **11** ou **23**, l'évolution du volume tumoral suit une courbe exponentielle avec des temps de doublement respectifs de 24,6 et 29,1 jours (*Figure 134*). Concernant les souris traitées avec le composé **15b**, la croissance tumorale semble maîtrisée jusqu'à trente-six jours après le début du traitement ; à ce stade la variation du volume tumoral par rapport au début du traitement n'est seulement que de 15,9 ± 18,6 %, alors que la variation du volume tumoral à ce même stade est de 247,6 ± 14,4 % pour les sou-

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

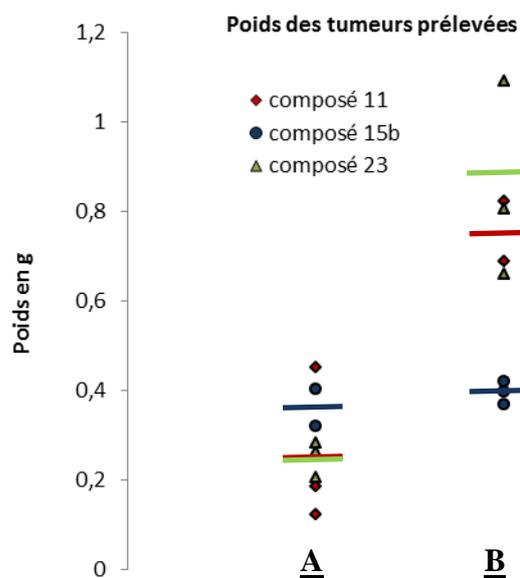


Figure 135 : Poids des tumeurs prélevées dix jours après la fin du traitement (A) et quarante-six jours après la fin du traitement (B)

Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

ris traitées avec le composé **11** et de $153,4 \pm 70,1$ % pour les souris traitées avec le composé **23**. Après ce stade, un échappement tumoral est observé, la croissance tumorale ne semble plus maîtrisée.

Concernant les tumeurs des souris traitées avec le composé **15b**, elles sont, en moyenne, au stade J₅₄, deux fois plus petites que les tumeurs des souris traitées avec le composé **11** ou **23** (*Figure 135*).

Les résultats anatomopathologiques sont en cours, toutefois les colorations au bleu alcian des coupes de tumeurs ont pu être réalisées et aucune différence significative de fixation n'a été observée entre les trois groupes. Cependant, il est intéressant de noter que, contrairement aux résultats anatomopathologiques obtenus lors de l'étude *in vivo* du radiotracer ^{99m}Tc-NTP 15-5 sur ce même modèle, les tumeurs semblent fixer d'avantage le bleu alcian et sont donc susceptibles de contenir des protéoglycanes (colorations modérées à fortes). Cette observation est tout à fait en accord avec l'absence d'efficacité antitumorale observée pour le composé **23** et dont la seule différence avec le composé **15b** est l'absence du vecteur ammonium quaternaire.

Ces premiers résultats obtenus *in vivo* sont très encourageants et soulignent le double intérêt de la vectorisation et du concept de prodrogue activable en milieu hypoxique.

*Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues
dérivées des phosphoramides*



V. Conclusions du chapitre

Dans cette partie, nous avons synthétisé des prodrogues dérivées du cyclophosphamide, activables en milieu hypoxique et vectorisées par une fonction ammonium quaternaire. En termes de structure, nous avons envisagé deux possibilités, la greffe du vecteur ammonium quaternaire sur l'entité active ainsi que celle sur l'entité clivable.

A ce jour, seules les prodrogues portant le vecteur ammonium quaternaire sur l'entité active ont été évaluées.

Concernant les suivis par RMN ^{31}P , nous avons mis en évidence la stabilité des composés, à 37 °C dans un tampon cacodylate et à 20 °C dans le sérum physiologique, ainsi que leur clivage très rapide en présence d'un agent réducteur. Le signal correspondant à un déplacement chimique d'environ 12 ppm en RMN ^{31}P (par rapport à H_3PO_4), et qui apparaît après clivage de la prodrogue, a été attribué à l'entité active après analyse par CLP-MS.

Nous avons, de plus, démontré, *in vitro*, qu'il existait un différentiel de cytotoxicité entre les conditions normoxiques et les conditions hypoxiques et que ce dernier semblait plus intéressant pour le composé dont l'entité clivable était un nitroimidazole, composé **15b**.

Nous avons alors évalué le composé **15b** *in vivo* sur un modèle de xénogreffe de chondrosarcome humain sur souris SCID comparativement à son équivalent non vectorisé, le composé **23**, ainsi qu'à un équivalent non clivable, le composé **11**. Les résultats sont très encourageants puisqu'ils mettent en évidence un net ralentissement de la croissance tumorale pour les souris traitées avec le composé **15b** comparativement aux deux autres composés.

Nous avons ainsi validé le double intérêt de la vectorisation par l'ammonium quaternaire et de la spécificité vis à vis du milieu hypoxique.

*Chapitre IV – Amélioration de la spécificité – Synthèse et évaluation de prodrogues
dérivées des phosphoramides*



Chapitre V

Discussion et conclusion générale

Chapitre V - Discussion et conclusion générale



Le travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans une stratégie de vectorisation de molécules d'intérêt consistant à utiliser une structure chimique de reconnaissance, un groupement ammonium quaternaire, pour vectoriser spécifiquement une entité vers les protéoglycanes de la matrice extracellulaire du cartilage. Cette entité peut être un radioisotope pour l'imagerie scintigraphique, ou bien un principe actif pour la thérapie.

Cette stratégie a été, ici, plus particulièrement appliquée à la prise en charge du chondrosarcome, ou tumeur du cartilage, puisque les cellules du tissu tumoral synthétisent une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes et comparable à celle du cartilage.

Du fait de la nature chondrogénique, peu vascularisée et en hypoxie du tissu tumoral, il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode *in vivo* sensible et spécifique pour le diagnostic de cette pathologie. De plus, l'efficacité de la radiothérapie et de la chimiothérapie anticancéreuse reste très limitée, du fait d'une matrice extracellulaire dense qui limite la diffusion des molécules jusqu'à leur cible et d'un environnement hypoxique entraînant des phénomènes de résistance vis-à-vis, notamment, de la radiothérapie [201].

Le radiotracteur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ est un outil de diagnostic précoce et spécifique, et de suivi du chondrosarcome en médecine nucléaire

Un certain nombre de résultats précliniques ont déjà démontré tout l'intérêt du traceur $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour l'imagerie fonctionnelle des pathologies du cartilage dont une pathologie dégénérative, l'arthrose [165,169].

Nos études expérimentales, réalisées sur le modèle syngénique Swarm implanté en situation orthotopique chez le rat, nous permettent de démontrer tout l'intérêt de l'imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour la pathologie du chondrosarcome.

Le modèle syngénique Swarm a déjà fait l'objet de nombreuses caractérisations biochimiques et physiopathologiques [202,203]. Il se comporte histologiquement et cliniquement comme un chondrosarcome humain de grade II, avec une croissance locale de la tumeur qui envahit progressivement les tissus environnants et détruit l'os. A un stade plus avancé, des métastases pulmonaires peuvent être observées [148]. Implanté au niveau tibial, le tissu tumoral se caractérise par un tissu de nature chondrogénique, très peu vascularisé, organisé en lobules délimités par des cloisons fines et fibreuses. Dans notre étude, nous avons

Chapitre V - Discussion et conclusion générale



confirmé ces observations par des analyses anatomopathologiques et nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux protéoglycanes. Les dosages biochimiques et les études histologiques nous ont permis de caractériser la tumeur comme étant très concentrée en protéoglycanes, engendrant ainsi une forte densité de charges négatives au niveau de la matrice extracellulaire. Cette forte densité de charges négatives est à l'origine de la fixation du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ puisqu'il est susceptible de créer des liaisons ioniques par l'intermédiaire de sa fonction ammonium quaternaire chargée positivement.

Nos résultats démontrent une accumulation préférentielle au niveau des tissus riches en protéoglycanes. L'étude de biodistribution par prélèvement met ainsi en évidence une fixation au niveau du tissu tumoral, mais aussi au niveau du cartilage, de 3,5 à 5 fois supérieure à celle observée pour les tissus « non cibles » tels que les os ou les muscles. ***Cette accumulation préférentielle au niveau des tissus cibles, comparativement aux tissus environnants, est d'ailleurs à l'origine de l'excellent contraste obtenu, in vivo, en imagerie.***

Concernant l'imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ *in vivo*, ***l'accumulation du radiotracer au niveau de la tumeur est rapide.*** Une accumulation tumorale est mise en évidence dès sept minutes post injection. Un plateau débute dès quinze minutes et se poursuit, sur quatre-vingt-dix minutes, jusqu'à la fin de l'acquisition, avec un rapport moyen de fixation tumeur/muscle de $2,91 \pm 0,58$, au stade de la pathologie J₂₀. ***Le $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ permet donc une imagerie scintigraphique in vivo du chondrosarcome pendant au moins quatre-vingt-dix minutes.***

Cette imagerie est, d'ailleurs, bien attribuable à un ciblage actif de la cible (les protéoglycanes) par la partie vectrice (l'ammonium quaternaire). En effet, après administration de la couronne $^{99m}\text{Tc-15-5}$ (macrocycle technétié ne comportant pas la partie vectrice), aucun différentiel de fixation n'est observé entre la tumeur et le muscle (rapport T/M = $1,22 \pm 0,16$ au temps cinq minutes et T/M = $1,32 \pm 0,27$ au temps une heure). Ce résultat nous permet de confirmer ***le rôle du vecteur ammonium quaternaire dans la fixation et l'imagerie tumorale.*** Ce résultat est, de plus, en accord avec le résultat d'une étude de liaison *in vitro* à l'agrécan synthétique, étude qui a mis en évidence une absence d'interaction entre la couronne $^{99m}\text{Tc-15-5}$ et l'agrécan, ***une liaison entre l'agrécan et le $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ de liaison ionique forte.***

Chapitre V - Discussion et conclusion générale



Chapitre V - Discussion et conclusion générale

Pour améliorer nos connaissances relatives au comportement du radiotracer vis-à-vis des cellules tumorales du cartilage, une étude de captation cellulaire *in vitro* a été réalisée, sur différentes lignées : lignées de mélanome, de chondrosarcome et de chondrocytes sains. Sur ces cultures cellulaires, la majorité de la dose incubée est retrouvée au niveau du milieu extracellulaire (au temps une heure, pour la lignée HEMC-SS, $0,18 \pm 0,05$ % de D.I. sont retrouvés dans le surnageant contre $0,01 \pm 0,01$ % de D.I. dans le culot cellulaire). Ce résultat suggère que ***le radiotracer pénètre très peu dans la cellule***. Par ailleurs, concernant la radioactivité retrouvée au niveau du culot cellulaire, aucune différence significative n'est observée entre les différents types cellulaires : une captation intracellulaire ne peut donc pas expliquer le différentiel de fixation observée *in vivo* entre les différents modèles. ***La fixation du radiotracer ne s'effectuerait pas en intracellulaire mais en péri ou en extracellulaire.***

Nous avons ensuite évalué le potentiel de l'imagerie ^{99m}Tc -NTP 15-5 pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome en médecine nucléaire, et ce, comparativement aux radiotraceurs actuellement disponibles en routine clinique, le ^{18}F -FDG (marqueur de l'activité métabolique) et le ^{99m}Tc -HMDP (marqueur du remodelage osseux).

Lorsque des analyses scintigraphiques sont réalisées régulièrement au cours du développement tumoral, une accumulation du radiotracer ^{99m}Tc -NTP15-5 est observée dès les stades précoces (J₄ post implantation), avant même que la tumeur ne soit palpable et mesurable. Le suivi en imagerie ^{18}F -FDG n'a pas permis la détection *in vivo* du chondrosarcome (ratio Tumeur/Muscle = $1,17 \pm 0,23$ au stade J₂₅). Il faut attendre un stade tardif de pathologie (J₅₀ post implantation) pour observer une fixation tumorale du ^{18}F -FDG, avec un rapport T/M = $2,75 \pm 0,12$, liée certainement à l'augmentation de l'activité métabolique du tissu.

Ces résultats expérimentaux reproduisent bien la réalité clinique, qui considère ***l'utilisation du ^{18}F -FDG comme limitée dans la pathologie du chondrosarcome, et particulièrement dans les chondrosarcomes de bas grade.***

En ce qui concerne la scintigraphie osseuse au ^{99m}Tc -HMDP, elle n'a pas permis la détection *in vivo* du chondrosarcome, à quelque stade que ce soit.

Concernant le suivi du chondrosarcome, les analyses semi-quantitatives au cours du développement tumoral mettent en évidence une augmentation du ratio T/M qui est multipliée

Chapitre V - Discussion et conclusion générale



par un facteur 2,6 entre le stade J₄ et le stade J₄₅ et est liée à l'augmentation du volume tumoral. En revanche, lorsque les animaux sont soumis à un traitement anticancéreux (zolédronate mais aussi melphalan-AQ), ***une diminution de la fixation du ^{99m}Tc-NTP 15-5 corrélée à une inhibition de la croissance tumorale*** est observée. ***Ces résultats montrent par conséquent, tout l'intérêt du suivi scintigraphique au ^{99m}Tc-NTP 15-5 pour le suivi de la réponse du chondrosarcome à un traitement de chimiothérapie anticancéreuse.***

Une question doit néanmoins être abordée : "*L'imagerie au ^{99m}Tc-NTP 15-5 permettrait-elle de réaliser un diagnostic différentiel entre un enchondrome (tumeur bénigne du cartilage) et un chondrosarcome de bas grade?*".

Du point de vue clinique, la distinction entre ces deux manifestations "prolifératives" du cartilage, est connue pour être extrêmement difficile tant sur le plan radiologique qu'histologique [17,204]. Selon des études histologiques [205,206], les tumeurs bénignes du cartilage ne produiraient pas, ou en quantité moindre, une réelle matrice cartilagineuse riche en protéoglycanes ce qui laisserait espérer une accumulation du radiotracer ^{99m}Tc-NTP 15-5 plus importante dans le cas d'un tissu malin. Des études précliniques *in vivo* sur des modèles d'enchondrome (tels que des souris mutantes pour la voie de signalisation Hedgehog ou pour le gène encodant l'exostine Ext1/Ext2 [206,207]) devront être engagées pour tester notre hypothèse.

L'ensemble des résultats précliniques que nous avons mis en évidence démontre bien la pertinence et la sensibilité de l'imagerie ^{99m}Tc-NTP 15-5 pour le diagnostic précoce et spécifique du chondrosarcome, le staging de la pathologie et le suivi de sa réponse à la thérapie.

Le ^{99m}Tc-NTP 15-5 est actuellement en phase de transfert clinique, dans le cadre d'un projet OSEO/Fond Régional d'Innovation, en partenariat avec la société Cyclopharma, pour l'imagerie diagnostique, en médecine nucléaire, des pathologies dégénératives du cartilage. ***Ce travail a ainsi permis de proposer une extension de l'application à la pathologie tumorale du cartilage, le chondrosarcome.***

Dans la continuité de cette étude, notons que des dérivés du NTP 15-5 sont actuellement en cours de synthèse. L'objectif est ici de développer des radiotraceurs permettant une double

Chapitre V - Discussion et conclusion générale



application : l'imagerie diagnostique TEP du chondrosarcome (imagerie permettant une quantification absolue de la fixation *in vivo*) d'une part, mais aussi la radiothérapie interne du chondrosarcome d'autre part. Pour cela, le ^{99m}Tc doit être remplacé par des isotopes du cuivre ($^{64}\text{Cu}/^{67}\text{Cu}$) ; la structure du macrocycle devant être modifiée pour pouvoir chélater l'atome de cuivre, mais le vecteur ammonium quaternaire restant le même.

La vectorisation vers les protéoglycanes permet l'amélioration de l'index thérapeutique des agents de chimiothérapies anticancéreuses

Compte tenu des résultats très encourageants obtenus avec le ^{99m}Tc -NTP 15-5, ainsi que des perspectives de développement en médecine nucléaire, nous avons choisi de développer la stratégie "ammonium quaternaire" en l'appliquant à la vectorisation d'agents cytotoxiques afin de proposer, en complément du diagnostic, une prise en charge thérapeutique innovante du chondrosarcome.

Actuellement, la chimiothérapie demeure souvent inefficace du fait de la nature chondrogénique du tissu tumoral qui représente un handicap majeur pour l'acheminement des agents anticancéreux conventionnels [208]. Il est par conséquent primordial, pour cette pathologie, de mettre en place une technique visant à acheminer les principes actifs anticancéreux vers le tissu tumoral, et ce, le plus sélectivement possible afin d'améliorer les taux de réponses et de survie des patients. En effet, les traitements de chimiothérapie anticancéreux sont limités par leur toxicité vis à vis des tissus sains, du fait d'une absence de spécificité. Ainsi la vectorisation spécifique d'anticancéreux vers les cellules du chondrosarcome devrait permettre de limiter la distribution des principes actifs aux tissus sains et donc d'améliorer leur index thérapeutique.

Nous avons choisi dans un premier temps de vectoriser, par un ammonium quaternaire, un agent alkylant utilisé en oncologie mais souffrant d'une absence de sélectivité qui lui confère de nombreux effets indésirables, le melphalan.

Les études *in vitro*, nous ont permis de vérifier que ***la greffe du vecteur ammonium quaternaire au niveau de la fonction acide du melphalan ne supprimait pas l'activité***. En effet, le melphalan, sous sa forme quaternisée, entraîne un blocage en phase S et une réponse

Chapitre V - Discussion et conclusion générale



apoptotique des cellules (temps et concentration dépendants) semblables à la molécule parent.

In vivo, sur le modèle swarm de chondrosarcome orthotopique, les traitements au melphalan-AQ ou melphalan, engendrent une inhibition importante de la croissance tumorale de l'ordre de 60 à 80 %. La différence se situe au niveau des effets indésirables, la vectorisation par l'ammonium quaternaire minimisant ces effets (perte de poids, syndrome myélodysplasique aigu). ***La vectorisation permet donc de diminuer considérablement les effets indésirables et d'augmenter l'index thérapeutique du melphalan. Elle pourrait ainsi permettre une meilleure prise en charge des patients.***

Toutefois, une question se pose: "*Le melphalan-AQ ciblant les tissus contenant des protéoglycanes ne peut-il pas cibler également le cartilage sain et engendrer une certaine toxicité?*" L'étude *in vitro*, réalisée sur différentes lignées cellulaires, a mis en évidence une absence de cytotoxicité du melphalan-AQ sur les chondrocytes sains. Ce différentiel de cytotoxicité chondrocytes tumoraux/sains nous semble plutôt « rassurant ».

Une autre interrogation survient : la cible (les protéoglycanes) est majoritairement située au niveau de la matrice extracellulaire. Néanmoins, les études de caractérisation de l'activité cytotoxique ont confirmé une action au niveau de l'ADN, impliquant une pénétration cellulaire. "*La structure du Mel-AQ demeure-t-elle inchangée lorsque celui-ci pénètre dans la cellule?*" Nous supposons que des modifications, telles que la perte du bras ammonium quaternaire, pourrait se produire avant la pénétration intracellulaire. Pour répondre à notre interrogation, des études mécanistiques, et notamment une étude de captation cellulaire par CPL-MS, ont été initiées.

La double exploitation de l'environnement hypoxique et de la nature chondrogénique du chondrosarcome permet une nouvelle approche très encourageante de la pathologie.

L'incapacité à traiter les tumeurs, marquées par un microenvironnement hypoxique, représentent un véritable besoin thérapeutique non satisfait et un attrait considérable pour le développement de nouveaux traitements du chondrosarcome. Nous avons choisi de nous intéresser à la famille des phosphoramides, dont certains membres ont démontré une efficacité prometteuse sur un autre type de tumeur osseuse primitive : l'ostéosarcome [172,173].

Chapitre V - Discussion et conclusion générale



Chapitre V - Discussion et conclusion générale

Nous avons synthétisé des dérivés du cyclophosphamide, activables en milieu hypoxique et vectorisés par un ammonium quaternaire. Deux possibilités ont alors été envisagées : la greffe du vecteur ammonium sur l'entité clivable ou sur l'entité active.

Dans un premier temps, nous nous sommes plutôt focalisés sur des prodrogues portant la fonction ammonium quaternaire sur la partie moutarde phosphoramide. Trois prodrogues ont été obtenues, les composés **15a**, **15b** et **15c**, en utilisant trois groupements nitro(hétéro)aromatiques sensibles à l'hypoxie, de type 2-nitrofurane, 1-*N*-méthyl-2-nitroimidazole ou 4-nitrophényle.

Leurs synthèses s'appuient sur une séquence réactionnelle commune, au départ des alcools correspondant préalablement synthétisés. L'obtention de ces alcools conditionne nettement le rendement global de la synthèse de ces dérivés puisqu'il est respectivement de 33, 5 et 57 % pour les dérivés 2-nitrofurane **15a**, 1-*N*-méthyl-2-nitroimidazole **15b** et 4-nitrophényle **15c**, alors qu'à partir de l'alcool les rendements sont quasi-équivalents (42, 44 et 57 % respectivement). L'évolution des réactions faisant intervenir des dérivés phosphorés a pu être suivie par RMN phosphore, ce qui s'est avéré particulièrement profitable pour la mise au point des réactions.

Afin d'étudier le clivage de la prodrogue avec libération de la moutarde phosphoramide correspondante, une étude de stabilité et de cinétique de clivage par RMN phosphore a été réalisée, en milieu réducteur ou non. Les composés **15a** et **15b** montrent des cinétiques de clivage équivalentes (temps de demi-vie de 2 minutes 50) et libèrent bien la moutarde attendue (confirmé par une analyse CPL-MS combinée à une analyse RMN ³¹P). Pour le composé **15c**, la libération de la moutarde apparaît plus difficile. En effet, le nombre d'équivalent de réducteur à utiliser doit être augmenté pour assurer le clivage total de la molécule.

La cytotoxicité de ces trois prodrogues a été évaluée en hypoxie et en normoxie sur différentes lignées cellulaires. Le différentiel d'activité hypoxie/normoxie le plus intéressant a été observé pour le composé **15b**.

S'appuyant sur ce résultat, une étude *in vivo* d'efficacité antitumorale du composé **15b** a été réalisée comparativement à un équivalent non clivable, le composé **11**, et à un équivalent non vectorisé, le composé **23**.

Les premiers résultats *in vivo* obtenus dans un modèle hypoxique de xénogreffe de chondrosarcome humain sont très encourageants. En effet, ils mettent en évidence une

Chapitre V - Discussion et conclusion générale



Chapitre V - Discussion et conclusion générale

inhibition de la croissance tumorale jusqu'à trente-six jours après administration de la première dose, pour le composé **15b** comparativement aux deux autres molécules **11** et **23**, qui se se révèlent être inefficaces.

Du fait de la réponse antitumorale observée uniquement pour le composé **15b**, nous sommes tentés de dire que cette molécule a bien été adressée au tissu tumoral et a subi une activation à l'origine de l'efficacité observée. Néanmoins, la vectorisation devra être confirmée par une étude de distribution tissulaire, après marquage radioactif (un marquage au tritium est envisagé).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à des prodrogues portant la fonction ammonium quaternaire sur la partie sensible à l'hypoxie. A l'heure actuelle, le composé **29** de type 4-nitrophényle et portant le vecteur ammonium quaternaire sur la partie aromatique a été synthétisé. Son évaluation *in vitro* devrait bientôt débiter.

Par ailleurs, compte-tenu des résultats de l'étude *in vitro*, nous avons envisagé la synthèse d'un analogue nitroimidazole du composé **29**, dont la synthèse est actuellement en cours. Enfin, nous souhaitons étendre notre étude à des dérivés de type ifosfamide.

Là encore et tout comme pour l'approche avec le melphalan, l'interrogation relative au mécanisme de pénétration cellulaire de ces molécules, à la perte ou non du vecteur ammonium quaternaire persiste. Des études mécanistiques, notamment de captation cellulaire par CPL-MS, devront permettre d'élucider le mécanisme de pénétration.

En conclusion, l'ensemble des résultats précliniques obtenus au cours de cette thèse valident la preuve de concept de la vectorisation par une fonction ammonium quaternaire d'agents diagnostiques et cytotoxiques vers le chondrosarcome. De plus, l'application de cette stratégie à la vectorisation de prodrogues activables par l'environnement hypoxique de la tumeur, semble permettre une approche encore plus sélective de cette pathologie certes rare, mais particulièrement redoutable.

L'ensemble de ce travail expérimental a permis d'apporter un certain "espoir" pour le management de la pathologie tumorale du cartilage, tant sur le plan diagnostique que sur le

Chapitre V - Discussion et conclusion générale



Chapitre V - Discussion et conclusion générale

plan thérapeutique, mais aussi, a soulevé un certain nombre d'interrogations pour lesquelles nous avons émis des hypothèses. Des études supplémentaires devront être réalisées afin de les confirmer et de pouvoir valider notre démarche jusqu'au transfert clinique.



Matériel et méthodes - Chimie

Indications générales

- Les spectres infrarouges (IR) ont été réalisés sur un spectromètre FTIR Nicolet Impact 410 ou un spectromètre FT Vector 22 instrument en pastille de bromure de potassium (KBr) pour les produits solides ou sur un spectromètre Nicolet IS 10 en mode ATR « corrigé ». Les nombres d'onde (ν) sont exprimés en cm^{-1} .

- Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés au moyen d'un spectromètre Bruker AM 200 (4,5 T) (^1H : 200 MHz ; ^{13}C : 50 MHz) ou d'un spectromètre Bruker AVANCE 500 MHz (11,7 T) (^1H : 500 MHz ; ^{31}P : 202 MHz). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm en se servant du pic résiduel du solvant comme référence en RMN ^1H et ^{13}C et après calibration sur H_3PO_4 à 1 % dans D_2O placé dans un tube coaxial en RMN ^{31}P . Les constantes de couplage (J) sont exprimées en hertz (Hz). Les abréviations suivantes sont utilisées pour indiquer la multiplicité des signaux :

s = singulet,

se = singulet élargi,

d = doublet,

dd = doublet de doublet,

t = triplet,

te = triplet élargi,

q = quadruplet,

qd = quadruplet dédoublé

qt = quintuplet,

m = multiplet ou massif complexe,

h = hexuplet.

- Les spectres de masse ont été enregistrés en électrospray (ESI) en mode positif ou négatif suivant la nature des composés en utilisant un spectromètre de masse Esquire-LC.

- Pour la chromatographie en phase liquide couplée à la détection UV à 254 nm et à la spectrométrie de masse (CPL-UV-SM) réalisée selon la technique d'ionisation ESI, les conditions suivantes ont été utilisées :

Les paramètres du spectromètre de masse, TSQ7000, sont les suivants :

- Source électrospray : 350 °C pour la température et 4,5 kV pour la tension du capillaire, 60 Psi pour le gaz rideau (N_2) et 40 UA pour le gaz auxiliaire (N_2).
- Analyseur triple quadripolaire : mode d'acquisition "SCAN", mode positif, gamme de masse : m/z 100 à m/z 600.

- Les conditions de chromatographie sont les suivantes :
- Colonne : Luna C18 100A, 3 μ m, 120 x 3 mm Phenomenex
- Phase mobile : **Solvant A** : eau 15 mM TFA ; **Solvant B** : acétonitrile 15 mM TFA
- Mode gradient (Débit : 0,4 mL/min ; Volume injecté : 5 μ L) :

Temps en minutes	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	80	20
3	75	25
5	60	40
10	50	50
11	80	20
20	80	20

- Les analyses élémentaires (carbone, oxygène, hydrogène, azote, chlore, iode) ont été réalisées au service central d'analyse du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, Solaize, France).

- Les points de fusion ont été déterminés en utilisant un appareil à point de fusion Electrothermal IA930 par la méthode du tube capillaire et sont donnés non corrigés.

- Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice SDS 60 F₂₅₄ (épaisseur 0,25 mm) ou d'oxyde d'aluminium Merck 60 F₂₅₄ neutre sur support aluminium.

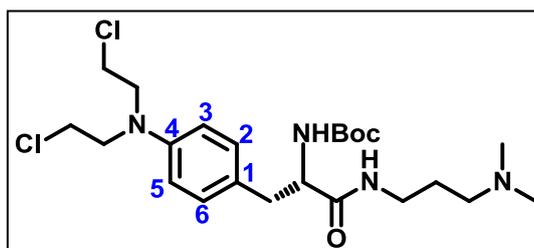
Les chromatographies ont été observées après détection à l'ultraviolet (254 nm) et/ou après révélation avec un réactif à la NBP. Pour le test à la NBP, la plaque de chromatographie est plongée dans une solution de NBP à 2,5 % dans l'acétone, chauffée, puis plongée dans une solution méthanolique de potasse à 10 %. Les composés possédant la fonction chloroéthylamine apparaissent en bleu-violet profond en raison de la formation d'un complexe de résonance.

- Les purifications sur colonne ont été réalisées en utilisant du gel de silice Chromagel SDS (silice 50 ACC, 35-70 μ m), ou de l'alumine (60 F254 neutre, Merck).

Synthèses chimiques

I - Synthèses des dérivés du melphalan

1-({N-(tert-Butyloxycarbonyl)-4-[bis(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalananyl}amino)-3-(diméthylamino)propane (**3**)



A une solution de melphalan **1** (1,48 g ; 4,84 mmol) dans le méthanol (20 mL) sont successivement ajoutés, à température ambiante, la triéthylamine (3,4 mL ; 24,4 mmol) et le dicarbonate de di-*tert*-butyle (2,3 mL ; 10,0 mmol). Le mélange est agité à température ambiante pendant 50 minutes puis évaporé sous pression réduite. L'huile jaune obtenue est traitée par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (1 N) jusqu'à pH=1. La solution est alors extraite par de l'acétate d'éthyle (3 x 50 mL). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée sous pression réduite. Le melphalan-Boc obtenu est aussitôt engagé dans la réaction de couplage. A une solution du melphalan-Boc dans le dichlorométhane (50 mL) sont ajoutés successivement le 1-hydroxy-1*H*-benzotriazole (666 mg ; 4,93 mmol), le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (1,08 g ; 5,23 mmol) solubilisé dans le dichlorométhane (10 mL) puis la 3-(diméthylamino)-propylamine **2** (0,64 mL ; 5,09 mmol). Le milieu est laissé sous agitation à température ambiante pendant 20 heures puis filtré pour éliminer la *N,N'*-dicyclohexylurée formée. Le filtrat est ensuite lavé par une solution aqueuse saturée d'hydrogencarbonate de sodium (3 x 70 mL) puis par de l'eau (3 x 70 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : gradient d'éthanol de 0 à 50 % dans le dichlorométhane ; puis dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 50/48/2, v/v/v). Le dérivé **3** est isolé sous forme d'une poudre jaunâtre (1,27 g ; 2,59 mmol).

Formule brute : C₂₃H₃₈Cl₂N₄O₃

Poids moléculaire : 489,48 g.mol⁻¹

Rendement : 54 %

Aspect : poudre jaunâtre

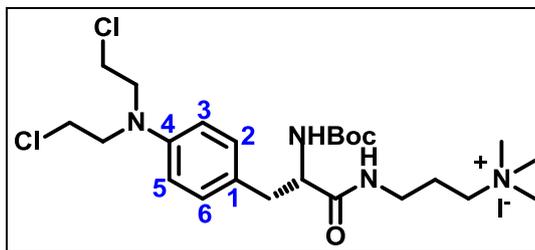
CCM (silice, éluant : dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 50/48/2, v/v/v) R_f = 0,45

IR (KBr) ν cm^{-1} 3299 (ν_{NH}) ; 1705 et 1662 ($\nu_{\text{C=O}}$ carbonate et $\nu_{\text{C=O}}$ amide) ; 1520 (δ_{NH}) ; 1166 ($\nu_{\text{C-O}}$).

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ ppm 7,31 (se, 1H, NH amide, échange avec D_2O) ; 7,01 (d, 2H, $^3J = 8,6$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar}(2,6)}$) ; 6,55 (d, 2H, $^3J = 8,6$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar}(3,5)}$) ; 5,06 (d, 1H, $^3J = 7,8$ Hz, NH -Boc, échange avec D_2O) ; 4,19-4,15 (m, 1H, CHNH_2Boc) ; 3,68-3,50 (m, 8H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 3,32 (q, 2H, $^3J = 5,8$ Hz, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 2,87 (d, 2H, $^3J = 6,6$ Hz, PhCH_2) ; 2,20 (t, 2H, $^3J = 6,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ; 2,07 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ; 1,54 (qt, 2H, $^3J = 6,5$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) ; 1,34 (s, 9H, CH_3 Boc).

RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ ppm 171,18 (C=O amide) ; 153,34 (C=O Boc) ; 145,06 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{N}$) ; 130,81 ($\text{CH}_{\text{Ar}(2,6)}$) ; 125,83 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2$) ; 112,20 ($\text{CH}_{\text{Ar}(3,5)}$) ; 78,99 ($\text{C}(\text{CH}_3)_2$ Boc) ; 58,49 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ; 56,08 (CHCO) ; 53,59 ($(\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 45,23 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ; 40,58 ($(\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$) ; 39,36 (NHCH_2) ; 37,90 (PhCH_2) ; 28,43 (CH_3 Boc) ; 25,78 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

Iodure de [3-({N-(tert-butyloxycarbonyl)-4-[bis(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalananyl)amino)propyl]triméthylammonium (4)



A une solution du dérivé **3** (1,25 g ; 2,55 mmol) dans l'éthanol anhydre (20 mL) est ajouté en quatre fois pendant 24 h, sous atmosphère d'argon, de l'iodure de méthyle (1,28 mL ; 20,6 mmol). Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite puis solubilisé dans le minimum de méthanol avant d'être jeté dans 250 mL d'éther éthylique anhydre. Le précipité obtenu est filtré dans une enceinte inerte, lavé abondamment à l'éther éthylique anhydre puis séché. Le composé **4** est alors obtenu sous forme d'un solide blanc très hygroscopique (1,36 g ; 2,15 mmol).

Formule brute : C₂₄H₄₁Cl₂IN₄O₃

Poids moléculaire : 631,42 g.mol⁻¹

Rendement : 84 %

Aspect : solide blanc

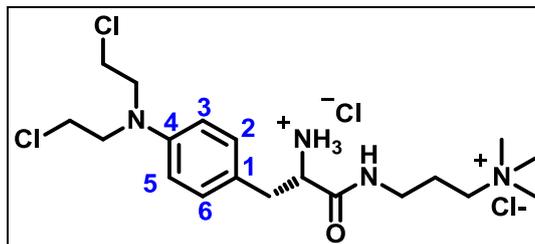
CCM (silice, éluant : dichlorométhane/éthanol/ammoniaque, 50/49/1, v/v/v) R_f = 0,05

IR (KBr) ν cm⁻¹ 3208 (ν_{NH}) ; 1706 et 1654 (ν_{C=O} carbonate et ν_{C=O} amide).

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,04 (se, 1H, NH_{amide}, échange avec D₂O) ; 7,08 (d, 2H, ³J = 8,5 Hz, CH_{Ar(2,6)}) ; 6,89 (d, 1H, ³J = 8,0 Hz, NH_{Boc}, échange avec D₂O) ; 6,65 (d, 2H, ³J = 8,5 Hz, CH_{Ar(3,5)}) ; 3,93-4,00 (m, 1H, CH_{NHBoc}) ; 3,69 (s, 8H, N(CH₂CH₂Cl)) ; 2,50-3,55 (m, 15H, PhCH₂, CH₂CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃) ; dans ce massif, présence d'un singulet à 3,02 pour N⁺(CH₃)₃) ; 1,80 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂) ; 1,31 (s, 9H, CH₃ Boc).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 172,04 (C=O amide) ; 155,30 (C=O Boc) ; 144,69 (C_{Ar}N) ; 130,20 (CH_{Ar(2,6)}) ; 126,17 (C_{Ar}CH₂) ; 111,57 (CH_{Ar(3,5)}) ; 77,95 (C(CH₃) Boc) ; 63,43 (CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 56,21 (CHCO) ; 52,14 ((NCH₂CH₂Cl)₂) ; 52,14 (N⁺(CH₃)₃) ; 41,13 ((NCH₂CH₂Cl)₂) ; 36,42 et 35,48 (PhCH₂ et NHCH₂) ; 28,43 (CH₃ Boc) ; 22,82 (CH₂CH₂CH₂).

Chlorhydrate du chlorure de [3-({4-[bis(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalananyl}amino)propyl]triméthylammonium, melphalan-AQ (5)



Le composé 4 (1,259 g ; 1,99 mmol), sous atmosphère inerte (Argon), est traité par une solution d'éthanol chlorhydrique 2N (60 mL) à température ambiante pendant quatre heures. La solution est ensuite évaporée sous pression réduite et le résidu est passé sur une résine Dowex 1X2-400 (éluant méthanol). Les fractions méthanoliques sont rassemblées et évaporées sous pression réduite. Le résidu est alors repris par le minimum de méthanol puis jeté dans l'éther éthylique anhydre (200 mL). Une filtration sous argon et un lavage à l'éther éthylique anhydre du précipité permettent d'isoler le composé 5 sous forme d'une poudre blanc-beige très hygroscopique (813 mg, 1,71 mmol).

Formule brute : C₁₉H₃₄Cl₄N₄O

Poids moléculaire : 476,31 g.mol⁻¹

Rendement : 86 %

Aspect : solide blanc-beige

Point de fusion : 80 °C

IR (KBr) ν cm⁻¹ 2500-3200 ($\nu_{\text{NH}_3^+}$) ; 1682 ($\nu_{\text{C=O}}$ carbonate) ; 1520 (δ_{NH})

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,91 (se, 1H, NH amide, échange avec D₂O) ; 8,48 (se, 3H, NH₃⁺, échange avec D₂O) ; 7,09 (d, 2H, ³J = 8,3 Hz, CH_{Ar(2,6)}) ; 6,69 (d, 2H, ³J = 8,4 Hz, CH_{Ar(3,5)}) ; 3,98 (m, 1H, CHCO) ; 3,70 (s, 8H, N(CH₂CH₂Cl)) ; 2,80-3,50 (m, 15H, PhCH₂, CH₂CH₂CH₂N⁺(CH₃)₃) ; dans ce massif, présence d'un singulet à 3,06 pour N⁺(CH₃)₃) ; 2,08 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168,28 (C=O amide) ; 145,35 (C_{Ar}N) ; 130,45 (CH_{Ar(2,6)}) ; 127,30 (C_{Ar}CH₂) ; 111,89 (CH_{Ar(3,5)}) ; 64,86 (CH₂N⁺(CH₃)₃) ; 56,21 (CHCO) ; 53,16 ((NCH₂CH₂Cl)₂) ; 52,16 (N⁺(CH₃)₃) ; 41,13 ((NCH₂CH₂Cl)₂) ; 36,42 et 35,40 (PhCH₂ et NHCH₂) ; 22,58 (CH₂CH₂CH₂).

Analyse centésimale :

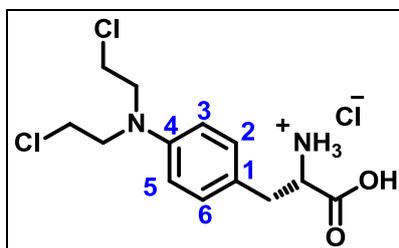
Valeurs théoriques : %C : 47,90 ; %H : 7,20 ; %N : 11,80 ; %O : 3,40 ; %Cl : 29,80

Valeurs trouvées : %C : 42,56 ; %H : 7,41 ; %N : 9,70 ; %O : 7,98 ; %Cl : 32,97

Formule brute : C₁₉H₃₃Cl₃N₄O.1,5H₂O.2HCl

Masse molaire expérimentale : 539,80 g.mol⁻¹

Chlorhydrate de la 4-[bis(2-chloroéthyl)amino]-L-phénylalanine, melphalan chlorhydrate (6)



A une suspension de melphalan **1** (0,236 g ; 0,773 mmol) dans du dichlorométhane anhydre placée sous argon, est additionné une solution d'éther éthylique chlorhydrique 2N. Après une dizaine de minutes d'agitation, le milieu est évaporé et un grand volume d'éther éthylique anhydre est ajouté (100 mL). Après une nuit d'agitation sous argon suivie d'une évaporation, le chlorhydrate **6** est obtenu sous forme d'une poudre blanche (0,217 mg, 0,635 mmol).

Formule brute : C₁₃H₁₉Cl₃N₂O₂

Poids moléculaire : 341,66 g.mol⁻¹

Rendement : 82 %

Aspect : poudre blanche

Point de fusion : 204 °C

IR (KBr) ν cm⁻¹ 2500-3100 ($\nu_{\text{NH}_3^+}$, ν_{OH}) ; 1737 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1614 ($\nu_{\text{asNH}_3^+}$) ; 1521 ($\nu_{\text{sNH}_3^+}$) ; 1227 ($\nu_{\text{C-O}}$).

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,31 (se, 3H, ⁺NH₃) ; 7,09 (d, 2H, ³J = 8,6 Hz, CH_{Ar(2,6)}) ; 6,70 (d, 2H, ³J = 8,7 Hz, CH_{Ar(3,5)}) ; 4,05 (m, 1H, CHCO) ; 3,71 (s, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂) ; 2,99 (d, 2H, ³J = 6,1 Hz, PhCH₂).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171,06 (C=O acide) ; 146,10 (C_{Ar}N) ; 131,17 (CH_{Ar(2,6)}) ; 123,10 (C_{Ar}CH₂) ; 112,55 (CH_{Ar(3,5)}) ; 53,91 (CHCO) ; 52,65 ((NCH₂CH₂Cl)₂) ; 41,13 ((NCH₂CH₂Cl)₂) ; 35,31 (PhCH₂).

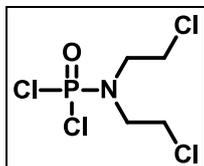
Analyse centésimale :

Valeurs théoriques : %C : 45,70 ; %H : 5,60 ; %N : 8,20 ; %O : 9,40 ; %Cl : 31,10

Valeurs trouvées : %C : 42,95 ; %H : 5,66 ; %N : 7,46 ; %O : 9,25 ; %Cl : 34,38

Formule brute : C₃H₁₈Cl₂N₂O₂.1,5HCl

Masse molaire expérimentale : 359,89 g.mol⁻¹

II – Synthèse du dérivé non clivable en hypoxie, le composé 11**Dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique (8)**

Un mélange du chlorhydrate de la bis(2-chloroéthyl)amine 7 (50 g ; 280 mmol) et de l'oxychlorure de phosphore (130 mL ; 1,39 mol) est chauffé à reflux pendant 17 heures. Le mélange devient marron et limpide. Après refroidissement, le mélange est distillé sous pression atmosphérique pour éliminer l'excès de POCl₃ puis une distillation sous pression réduite permet d'isoler le composé 8 (63,7 g ; 18,5 mmol).

Formule brute : C₄H₈Cl₄NOP

Poids moléculaire : 258,90 g.mol⁻¹

Rendement : 88 %

Aspect : cristaux blancs

Point de fusion : 51 °C (*D'après la littérature : 50 - 51 °C [209]; 57 - 59 °C [210]*)

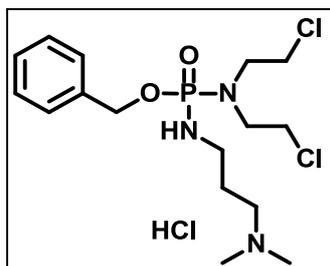
IR (ATR) ν cm⁻¹ 1275, 1265 (ν_{P=O})

CCM (silice, éluant : acétate d'éthyle/cyclohexane, 5/5, v/v) R_f = 0,70

RMN ³¹P (202 MHz, THF) δ ppm 15,78

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm 3,77 – 3,58 (m, 8H, N(CH₂CH₂Cl)₂).

O-Benzyl N,N-bis(2-chloroéthyl)-N'-[3-(diméthylamino)propyl]phosphorodiamidate
(10)



Une solution d'alcool benzylique (1,5 mL ; 14,4 mmol) dans du toluène anhydre (4 mL) est additionnée goutte à goutte, sous agitation, à une suspension d'hydrure de sodium (577 mg ; 14,4 mmol, NaH à 60% dans l'huile) dans du toluène anhydre (10 mL), refroidie dans de la glace et sous atmosphère inerte. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant une nuit à froid dans un Dewar contenant un mélange glace/chlorure de sodium.

La suspension de benzylate de sodium obtenue est ajoutée goutte à goutte à une solution de dichlorure de l'acide *N,N*-bis(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** (3,73 g ; 14,3 mmol) dans du toluène anhydre (15 mL), maintenue sous agitation, dans un bain de glace et sous atmosphère inerte. Après quatre heures la 3-diméthylamino-1-propylamine **2** (3,6 mL ; 28,6 mmol) est ajoutée goutte à goutte, et sous atmosphère inerte, au milieu réactionnel toujours maintenu dans un bain de glace. Après deux heures d'agitation à 0°C, un suivi par chromatographie sur colonne de silice (silice, éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 7/3, v/v) montre la disparition de l'intermédiaire, le chlorure de l'acide benzyl *N,N*-bis-(2-chloroéthyl)phosphoramidique **9**. Le mélange réactionnel est évaporé sous vide puis purifié par chromatographie sur colonne de gel silice éluee par un mélange équimoléculaire acétate d'éthyle/éthanol contenant 5% d'ammoniaque pour donner le produit **10** sous forme de chlorhydrate (5,08 g ; 11,7 mmol).

Formule brute : C₁₆H₂₈Cl₂N₃O₂P,HCl

Poids moléculaire : 432,75 g.mol⁻¹

Rendement : 88 %

Aspect : huile jaune

CCM (Silice, éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 8/2, v/v) R_f = 0,08

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,80 (se, 1H, NH⁺) ; 7,32-7,52 (m, 5H, Ph) ; 5,11 (td, 1H, ³J = 6,9 Hz, ²J_{H,P} = 11,2 Hz, CH₂NHP) ; 4,91 (m, 2H, OCH₂Ph) ; 3,61-3,70 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 3,25-3,35 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 3,05 (m, CH₂NH⁺) ; 2,83 (qd, 2H, ³J = 6,6 Hz, ³J_{H,P} = 11,4 Hz, CH₂NHP) ; 2,69 (s, 6H, (CH₃)₂) ; 1,82 (qt, 2H, ³J = 6,9 Hz, CH₂CH₂CH₂).

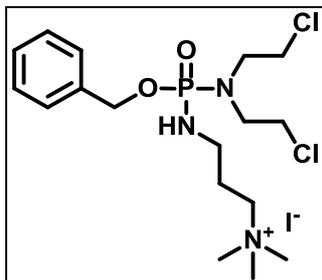
RMN ³¹P (202 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 17,23

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 137,79 (d, $^3J = 7,4$ Hz, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}$) ; 128,95, 128,46, 128,02 ($\underline{\text{C}}_{\text{HAr}}$) ; 66,57 (d, $^2J = 4,7$ Hz, $\underline{\text{O}}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Ph}$) ; 54,85 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NH}^+$) ; 49,05 (d, $^2J = 4,3$ Hz, $\underline{\text{N}}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 43,04 (d, $^3J = 0,9$ Hz, $\text{NCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Cl}$) ; 42,46 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$) ; 37,99 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NHP}$) ; 26,50 (d, $^3J = 5,3$ Hz, $\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$).

Ces attributions ont été appuyées par des expériences 2D de type COSY et HSQC.



Iodure de 3-((benzyloxy)[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl)amino)-N,N,N-triméthylpropane-1-aminium (11)



A une solution du composé **10** (1 g, 2,31 mmol) dans du THF anhydre (23 mL) est additionnée du carbonate de sodium (1,6 g, 15,1 mmol) et de l'iodure de méthyle (778 μ L, 12,6 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation, sous atmosphère inerte, et à température ambiante pendant deux heures puis, il est filtré et le précipité lavé avec du méthanol. Le filtrat est évaporé sous vide pour donner le produit **11** (966 mg, 1,79 mmol).

Formule brute : C₁₇H₃₁Cl₂IN₃O₂P

Poids moléculaire : 538,23 g.mol⁻¹

Rendement : 78 %

Aspect : poudre blanche très hygroscopique
donnant ensuite une huile

CCM (silice, éthanol/ammoniaque, 9/1, v/v) R_f = 0,02

IR (KBr) ν cm⁻¹ 3451 (H₂O), 1217 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-O}}$), 1017 ($\nu_{\text{C-O}}$)

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,32-7,43 (m, 5H, Ph) ; 5,08 (td, 1H, ³J = 6,8 Hz, ²J_{H,P} = 10,8 Hz, CH₂NHP) ; 4,91 (d, 2H, ³J = 7,0 Hz, OCH₂Ph) ; 3,62-3,70 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 3,24-3,36 (m, 6H, NCH₂CH₂Cl, CH₂N⁺) ; 3,06 (s, 9H, (CH₃)₃) ; 2,83 (qd, 2H, ³J = 6,4 Hz, ²J_{H,P} = 11,4 Hz, CH₂NHP) ; 1,79-1,88 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

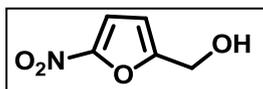
RMN ³¹P (202 MHz) DMSO-*d*₆ δ ppm 17,12 ; CD₃OD δ ppm 17,63

RMN ¹³C (50 MHz, CD₃OD) δ ppm 138,06 (d, ³J = 7,3 Hz, C_{Ar}) ; 129,67, 129,43, 129,02 (CH_{Ar}) ; 68,60 (d, ²J = 5,1 Hz, OCH₂Ph) ; 65,77 (CH₂N⁺) ; 53,90, 53,82, 53,74 ((CH₃)₃) ; 50,27 (d, ²J = 4,6 Hz, NCH₂CH₂Cl) ; 43,17 (d, ³J = 1,3 Hz, NCH₂CH₂Cl) ; 38,75 (CH₂NHP) ; 26,25 (d, ³J = 5,0 Hz, CH₂CH₂CH₂).

Ces attributions ont été appuyées par des expériences 2D de type COSY et HSQC

III- Synthèses des prodrogues vectorisées et activables en hypoxie, les composés 15a-c

2-hydroxyméthyl-5-nitrofurane (12a)



A une solution de 5-nitro-2-furaldéhyde (5,35 g ; 37,9 mmol) dans du THF (80 mL), agitée et refroidie à 0 °C dans un bain de glace, est ajoutée une solution aqueuse de borohydrure de sodium (1,15 g ; 30,3 mmol). La solution devient marron et est agitée à température ambiante pendant 1 h 30. Le brut réactionnel est dilué par addition d'eau (60 mL) puis extrait par de l'acétate d'éthyle (3 × 60 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium puis filtrées. Après évaporation, le 2-hydroxyméthyl-5-nitrofurane 12a (4,3 g ; 30,0 mmol) est obtenu.

Formule brute : C₅H₅NO₄

Poids moléculaire : 143,10 g.mol⁻¹

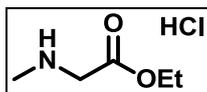
Rendement : 79 %

Aspect : huile marron

CCM (silice, éluant : AcOEt/cyclohexane 5/5 v/v) R_f = 0,5

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3370 (ν_{OH}), 1497 (ν_{asNO2}), 1356 (ν_{sNO2}), 1238, 1018 (ν_{C-O}).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm 2,51 (se, 1H, OH) ; 4,71 (s, 2H, CH₂) ; 6,55 (d, 1H, ³J = 3,6 Hz, CH) ; 7,26 (d, 1H, ³J = 3,6 Hz, CH).

Chlorhydrate de l'ester éthylique de la sarcosine (17)

Du chlorure de thionyle (18 mL, 248 mmol) est ajoutée lentement dans de l'éthanol (100 mL) de façon à maintenir la température entre -15 °C et -5 °C. De la *N*-méthylglycine (sarcosine) **16** (20 g, 224 mmol) est alors ajoutée et la solution chauffée pendant 2 heures à 55°C. Après évaporation de l'éthanol, le chlorhydrate de l'ester éthylique de la sarcosine **17** (32,4 g, 212 mmol) est obtenu sans autre purification.

Formule brute : C₅H₁₂ClNO₂

Poids moléculaire : 153,06 g.mol⁻¹

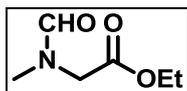
Rendement = 85 %

Aspect : poudre blanche

IR (ATR) ν cm⁻¹ 2970-2440 ($\nu_{\text{asNH}_2^+}$, $\nu_{\text{sNH}_2^+}$) ; 1742 ($\nu_{\text{C=O}}$) ; 1229 ($\nu_{\text{C-O}}$).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm 9,66 (se, 2H, NH₂⁺) ; 4,24 (q, 2H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃), 3,84 (te, 2H, ³J = 5,5 Hz, NH₂⁺CH₂) ; 2,80 (te, 3H, ³J = 5,5 Hz, NH₂⁺CH₃) ; 1,27 (t, 1H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ ppm 166,15 (C=O) ; 62,65 (CH₂CH₃) ; 48,95 (NH₂⁺CH₂) ; 33,34 (NH₂⁺CH₃) ; 14,05 (CH₂CH₃).

Ester éthylique de la N-formylsarcosine (18)

Une solution dans l'éthanol (130 mL) contenant du formiate d'éthyle (130 mL), du chlorhydrate de l'ester éthylique de la sarcosine **17** (31 g, 203 mmol) et du carbonate de potassium (28 g, 202 mmol) est agitée, à température ambiante, pendant une nuit. Après filtration et lavage du précipité à l'éthanol, le filtrat est évaporé puis extrait avec de l'acétate d'éthyle (5 × 200 mL). Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation, le composé **18** (27 g, 186 mmol) est obtenu sous la forme de deux rotamères.

Formule brute : C₆H₁₁NO₃

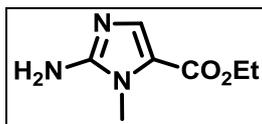
Poids moléculaire : 145,16 g.mol⁻¹

Rendement = 92 %

Aspect : liquide rose

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) 2 rotamères δ ppm 8,06 et 7,99 (s, 1H, CHO) ; 4,16 et 4,18 (q, 2H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃) ; 4,04 et 3,94 (s, 2H, NCH₂) ; 2,99 et 2,88 (s, 3H, NCH₃) ; 1,27 et 1,23 (t, 3H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CD₃OD) 2 rotamères δ ppm 168,82 ; 168,38 (CO₂) ; 163,17 et 162,96 (CHO) ; 61,78 et 61,47 (OCH₂CH₃) ; 50,97 et 45,68 (NCH₂) ; 35,31 et 30,89 (NCH₃) ; 14,20 (CH₂CH₃).

Ester éthylique de l'acide 2-amino-1-N-méthyl-1H-imidazole-5-carboxylique (20)

De l'hydrure de sodium (5 g, 125 mmol, 60 % dans l'huile) est additionné par fractions à une solution de l'ester éthylique de la *N*-formylsarcosine **18** (26 g, 177 mmol) dans du formiate d'éthyle (85 mL) et refroidie dans de la glace. La température est ramenée à température ambiante et le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant une nuit. Après évaporation, le résidu obtenu est trituré avec de l'hexane (2 × 50 mL) avant d'être solubilisé dans un mélange éthanol/acide chlorhydrique concentré (50/30 mL) puis chauffé à 110 °C. Après une heure, le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante puis filtré. Le précipité est lavé à l'éthanol et le filtrat est évaporé pour donner une huile brune. Celle-ci est ajoutée à une solution aqueuse à 10 % d'acide acétique (100 mL) contenant du cyanamide (16 g, 380 mmol) et de l'acétate de sodium (41 g, 500 mmol). Le mélange réactionnel est chauffé à 95 °C pendant une heure puis concentré par évaporation à environ un tiers du volume initial. Le pH du milieu réactionnel est ajusté à 9 par addition lente de carbonate du sodium, puis extrait avec de l'acétate d'éthyle (12 × 100 mL). Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation, le résidu est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 95/5, v/v) pour donner l'amine **20** (11,7 g ; 69,2 mmol).

Formule brute : C₇H₁₁N₃O₂

Poids moléculaire : 169,18 g.mol⁻¹

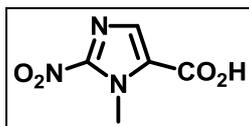
Rendement = 55 %

Aspect : poudre jaune

CCM (silice, éluant : acétate d'éthyle / éthanol, 9/1, v/v) R_f = 0,33

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3393 (ν_{asNH2}) ; 3143 (ν_{sNH2}) ; 1652 (ν_{C=O}) ; 1522 (δ_{NH2}).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,43 (s, 1H, CH) ; 4,59 (se, 2H, NH₂) ; 4,25 (q, 2H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃) ; 3,66 (s, 3H, NCH₃) ; 1,32 (t, 3H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃).

Acide 1-N-méthyl-2-nitro-1H-imidazole-5-carboxylique (22)

A une solution de nitrite de sodium (15 g, 217 mmol) dans l'eau (45 mL) refroidie à - 5 °C, est additionnée goutte à goutte une solution du composé **20** (5,5 g ; 32,7 mmol) dans l'acide acétique (30 mL). Après retour à température ambiante, le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant une nuit puis extrait avec du dichlorométhane (3 × 50 mL). Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation, le résidu est purifiée par chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée avec un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (7/3, v/v) pour donner le produit **21** (6,75 g) sous la forme d'une huile jaune, utilisée directement pour l'étape suivante.

Formule brute : C₇H₉N₃O₄

Poids moléculaire : 199,16 g.mol⁻¹

CCM (silice, éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 7/3, v/v) Rf = 0,40

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,73 (s, 1H, CH) ; 4,31 (s, 3H, NCH₃) ; 4,38 (q, 3H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃) ; 1,38 (t, 3H, ³J = 7,1 Hz, CH₂CH₃).

Une suspension aqueuse de l'ester **21** (6,75 g) dans de la soude 1 N (110 mL) est laissée sous agitation, à température ambiante pendant la nuit. Le pH de la réaction est ajusté à 1 par addition lente d'acide chlorhydrique concentré et le mélange réactionnel est extrait avec l'acétate d'éthyle (7 × 50 mL). Après séchage sur sulfate de magnésium et évaporation, l'acide **22** (3,31 g ; 19,3 mmol) est obtenu.

Formule brute : C₅H₅N₃O₄

Poids moléculaire : 171,11 g.mol⁻¹

Rendement = 59 %

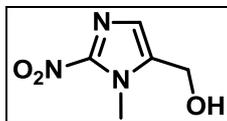
Aspect : poudre blanche

CCM (silice, éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 7/3, v/v) Rf = 0,36

IR (ATR) ν cm⁻¹ 2900-2400 (ν_{OH}) ; 1714 (ν_{C=O}) ; 1523 (ν_{asNO₂}) ; 1495 (δ_{OH}) ; 1363 (ν_{sNO₂})

RMN ¹H (200 MHz, acétone-d₆) δ ppm 7,73 (s, 1H, CH) ; 4,32 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, acétone-d₆) δ ppm 160,58 (COOH) ; 148,96 (C_{Ar}NO₂) ; 135,00 (CH_{Ar}) ; 127,30 (C_{Ar}COOH) ; 35,65 (NCH₃).

Synthèse du 5-Hydroxyméthyl-1-N-méthyl-2-nitro-1H-imidazole 12b

A une solution d'acide 1-*N*-méthyl-2-nitro-1H-imidazole-5-carboxylique **22** (1,46 g ; 8,54 mmol) en solution dans du THF fraîchement distillé (15 mL), est ajoutée de la triéthylamine (1,87 mL ; 13,5 mmol) puis le mélange est refroidit dans un bain de carboglace. Du chloroformiate d'isobutyle est ajouté goutte à goutte (1,77 mL ; 13,7 mmol) et l'agitation est maintenue pendant deux heures avant l'addition de borohydrure de sodium (1,62 g ; 42,9 mmol). 15 mL d'eau sont alors ajoutés lentement pendant environ 1 h 30 en veillant à maintenir la température du milieu en-dessous de - 20 °C. Après avoir atteint une température de 0 °C, le solide formé est filtré puis lavé avec du THF. Le filtrat est concentré sous pression réduite pour donner 2,69 g d'un solide orange/jaune, qui est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée par de l'acétate d'éthyle pour conduire au 5-hydroxyméthyl-1-*N*-méthyl-2-nitro-1H-imidazole **12b** (1 g ; 6,36 mmol).

Formule brute : C₅H₇N₃O₃

Poids moléculaire : 157,13 g.mol⁻¹

Rendement = 75 %

Aspect : poudre jaunâtre

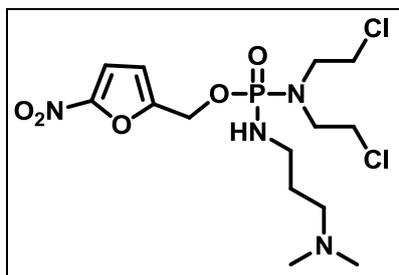
CCM (silice, éluant : AcOEt) R_f = 0,50

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3249 (ν_{OH}), 1495 (ν_{asNO2}), 1362 (ν_{sNO2}), 1041 (ν_{C-O}).

RMN ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,11 (s, 1H, CH) ; 5,50 (t, 1H, ³J = 5,4 Hz, OH) ; 4,53 (d, 2H, ³J = 5,4 Hz, CH₂OH) ; 3,91 (s, 3H, NCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 138,67 (C_{Ar}CH₂) ; 126,58 (CH) ; 52,99 (CH₂) ; 34,15 (CH₃).

***O*-{(5-nitrofurane-2-yl)méthyl}-*N,N*-bis(2-chloroéthyl)-*N'*-[3-diméthyl
amino)propyl]phosphorodiamidate (**14a**)**



Sous atmosphère inerte, une solution de lithium bis(triméthylsilyl)amide (4,05 mL ; 4,05 mmol ; 1 M dans le THF) est ajoutée goutte à goutte à une solution de 5-nitro-2-hydroxyméthylfurane **12a** (526 mg ; 3,68 mmol) dans 6 mL de THF fraîchement distillé et refroidi à - 78 °C. Le milieu devient orange-marron. Après quelques minutes d'agitation, une solution de dichlorure de l'acide *N,N*-bis-(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** (1,04 g ; 4 mmol) dans 12 mL de THF anhydre est ajouté rapidement. Après 30 min d'agitation à -78 °C et quasi-disparition du produit de départ d'après le suivi par RMN ³¹P, la 3-diméthylamino-1-propylamine **2** (928 µL ; 7,36 mmol) est ajoutée au milieu réactionnel toujours maintenu à -78°C. Un suivi par RMN ³¹P montre la disparition de l'intermédiaire **13a** dès 20 min. Après 2h d'agitation, le mélange réactionnel est dilué par addition d'eau (40 mL) puis extrait par de l'acétate d'éthyle (3 × 20 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (80 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée par un mélange équimoléculaire AcOEt/EtOH avec un gradient d'ammoniaque de 0 à 5 % pour donner le produit **14a** (720 mg ; 1,67 mmol).

Formule brute : C₁₄H₂₅Cl₂N₄O₅P

Poids moléculaire : 431,25 g.mol⁻¹

Rendement : 42 %

Aspect : huile jaune

CCM (silice, éluant : AcOEt/EtOH, 5/5, v/v avec 5 % NH₄OH) R_f = 0,4

IR (ATR) ν cm⁻¹ 1504 (ν_{as}NO₂), 1352 (ν_sNO₂), 1241 (ν_{P=O}, ν_{C-O}), 1034 (ν_{C-O}).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm 7,44 (d, 1H, ³J = 3,7 Hz, CH) ; 6,81 (d, 1H, ³J = 3,7 Hz, CH) ; 5,04 (d, 1H, ³J_{H,P} = 8,7 Hz, OCH₂) ; 5,03 (d, 1H, ³J_{H,P} = 9,0 Hz, OCH₂) ; 3,66 (t, 4H, ³J = 7,2 Hz, NCH₂CH₂Cl) ; 3,33-3,49 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 2,93 (td, 2H, ³J_{H,P} = 11,1 Hz, ³J = 6,9 Hz, CH₂NHP) ; 2,43 (m, 2H, CH₂N) ; 2,28 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 1,71 (qt, 2H, ³J = 7,3 Hz, CH₂CH₂CH₂).

RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 7,69 (d, 1H, $^3J = 3,7$ Hz, $\underline{\text{CH}}$) ; 6,92 (d, 1H, $^3J = 3,7$ Hz, $\underline{\text{CH}}$) ; 4,88 (td, 1H, $^3J = 6,7$ Hz, $^2J_{H,P} = 11,7$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{NHP}}$) ; 4,96 (d, 2H, $^3J_{H,P} = 8,7$ Hz, $\underline{\text{OCH}_2}$) ; 3,61-3,69 (m, 4H, $\underline{\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}}$) ; 3,20-3,36 (m, 4H, $\underline{\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}}$) ; 2,75 (qd, 2H, $^3J_{H,P} = 11,0$ Hz, $^3J = 6,7$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{NHP}}$) ; 2,24 (t, 2H, $^3J = 6,8$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{N}}$) ; 2,12 (s, 6H, $\text{N}(\underline{\text{CH}_3})_2$) ; 1,53 (qt, 2H, $^3J = 6,9$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2}$).

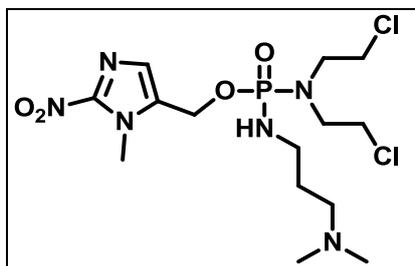
RMN ^{31}P (202 MHz, CD_3OD) δ ppm 18,33

RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) *forme chlorhydrate* δ ppm 154,26 (d, $^3J = 8,1$ Hz, $\underline{\text{CCH}_2\text{O}}$) ; 113,69 ; 113,59 ($\underline{\text{CH}_{\text{Ar}}}$) ; 58,14 (d, $^2J = 3,8$ Hz, $\underline{\text{OCH}_2}$) ; 54,30 ($\underline{\text{CH}_2\text{NH}^+}$) ; 48,34 (d, $^2J = 4,3$ Hz, $\underline{\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}}$) ; 42,35 (d, $^3J = 1,5$ Hz, $\underline{\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}}$) ; 41,99 ($(\underline{\text{CH}_3})_2$) ; 37,37 ($\underline{\text{CH}_2\text{NHP}}$) ; 25,94 (d, $^3J = 5,2$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2}$).

MS (ESI) Valeur théorique : m/z 431,10 $[\text{M}+1]^+$

Valeur expérimentale : m/z 431,18 $[\text{M}+1]^+$

O-((1-méthyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)méthyl)-N,N-bis(2-chloroéthyl)-N'-[3-diméthylamino]propyl]phosphorodiamidate (14b)



Sous atmosphère inerte, une solution de lithium bis(triméthylsilyl)amide (2,75 mL ; 2,75 mmol ; 1M dans le THF) est ajoutée goutte à goutte à une solution de 5-hydroxyméthyl-1-*N*-méthyl-2-nitro-1*H*-imidazole **12b** (399 mg ; 2,54 mmol) dans 11 mL de THF fraîchement distillé et refroidi à -78 °C. Le milieu devient orange-marron. Après quelques minutes d'agitation, une solution de dichlorure de l'acide *N,N*-bis-(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** (714 mg ; 2,76 mmol) dans 8 mL de THF anhydre est ajoutée rapidement. Après 55 min d'agitation à -78 °C et disparition du produit de départ d'après le suivi par RMN ³¹P, la 3-diméthylamino-1-propylamine **2** (630 µL ; 5 mmol) est ajoutée au milieu réactionnel toujours maintenu à -78 °C. Après deux heures d'agitation et disparition de l'intermédiaire **13b** (suivi par RMN ³¹P), le mélange réactionnel est dilué par addition d'eau (20 mL) puis extrait par de l'acétate d'éthyle (3 × 20 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (80 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées sous pression réduite. Le résidu marron obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée par un mélange équimoléculaire AcOEt/EtOH avec un gradient d'ammoniaque de 1 à 8 % pour donner le produit **14b** (495 mg ; 1,11 mmol).

Formule brute : C₁₄H₂₇Cl₂N₆O₄P

Poids moléculaire : 445,28 g.mol⁻¹

Rendement = 44 %

Aspect : huile jaune

CCM (silice, éluant : AcOEt/EtOH, 5/5, v/v avec 12% NH₄OH) R_f = 0,40

IR (ATR) ν cm⁻¹ 1492 (ν_{as}NO₂) ; 1353 (ν_sNO₂) ; 1221 (ν_{P=O}, ν_{C-O}) ; 1013 (ν_{C-O}).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm 7,24 (s, 1H, CH) ; 5,11 (d, 2H, ³J = 8,1 Hz, OCH₂) ; 4,07 (s, 3H, NCH₃) ; 3,62-3,70 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 3,34-3,48 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 2,91 (td, 2H, ³J_{H,P} = 10,8 Hz, ³J = 6,8 Hz, CH₂NHP) ; 2,40 (m, 2H, CH₂N) ; 2,27 (s, 6H, N(CH₃)₂) ; 1,73 (qt, 2H, ³J = 7,4 Hz, CH₂CH₂CH₂).

RMN ³¹P (202 MHz, CD₃OD) δ ppm 18,20

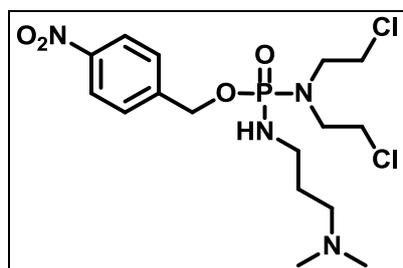
RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) δ ppm 129,16 ($\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}}$) ; 57,76 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2$) ; 57,59 (d, $^2J = 4,4$ Hz, $\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2$) ; 50,17 (d, $^2J = 5,0$ Hz, $\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 45,01 ($\text{N}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$) ; 43,09 (d, $^3J = 1,4$ Hz, $\text{NCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Cl}$) ; 39,86 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{NHP}$) ; 35,08 ($\text{N}\underline{\text{C}}\text{H}_3$) ; 29,79 (d, $^3J = 5,7$ Hz, $\text{CH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2$).

Ces attributions ont été appuyées par des expériences 2D de type COSY et HSQC.

MS (ESI) Valeur théorique : m/z 445,13 $[\text{M}+1]^+$

Valeur expérimentale : m/z 445,17 $[\text{M}+1]^+$

***O*-(4-nitro)benzyl *N,N*-bis(2-chloroéthyl)-*N'*-[3-(diméthylamino)propyl]phosphorodiamidate (**14c**)**



Sous atmosphère inerte, une solution de lithium bis(triméthylsilyl)amide (7,18 mL ; 7,18 mmol ; 1 M dans le THF) est ajoutée goutte à goutte à une solution d'alcool 4-nitrobenzylique **12c** (1 g ; 6,53 mmol) dans 10 mL de THF fraîchement distillé et refroidi à -78 °C. Le milieu devient orange-marron. Après quelques minutes d'agitation, une solution de dichlorure de l'acide *N,N*-bis-(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** (1,84 g ; 7,12 mmol) dans 22 mL de THF anhydre est ajoutée rapidement. Après trente minutes d'agitation à -78 °C et quasi disparition du produit de départ d'après le suivi par RMN ^{31}P , la 3-diméthylamino-1-propylamine **2** (1,62 mL ; 12,86 mmol) est ajoutée au milieu réactionnel toujours maintenu à -78 °C. Un suivi par RMN ^{31}P montre la disparition de l'intermédiaire **13c** dès quarante minutes. Après 1 h 20 d'agitation, le mélange réactionnel est dilué par addition d'eau (40 mL) puis extrait par de l'acétate d'éthyle (3 × 40 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées sous pression. Le résidu jaunâtre obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée par un mélange équimoléculaire AcOEt/EtOH contenant 2 % d'ammoniaque pour donner le produit **14c** (1,64 g ; 3,72 mmol).

Formule brute : $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4\text{P}$

Poids moléculaire : $441,29 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement = 57 %

Aspect : huile très visqueuse jaune

CCM (silice, éluant : AcOEt/EtOH, 5/5, v/v avec 12% NH_4OH) $R_f = 0,35$

IR (ATR) $\nu \text{ cm}^{-1}$ 1522 (ν_{asNO_2}) ; 1347 (ν_{sNO_2}) ; 1220 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-O}}$) ; 1046 ($\nu_{\text{C-O}}$).

RMN ^1H (500 MHz, MeOD) δ ppm (*forme chlorhydrate*) 8,26 (d, 2H, $^3J = 8,7 \text{ Hz}$, CH_{Ar}) ; 7,67 (d, 2H, $^3J = 8,7 \text{ Hz}$, CH_{Ar}) ; 5,14 (d, 2H, $^3J = 7,5 \text{ Hz}$, OCH_2) ; 3,65-3,68 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 3,38-3,51 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 2,98 (td, 2H, $^3J = 6,7 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{H,P}} = 11,6 \text{ Hz}$, CH_2NHP) ; 2,78 (t, 2H, $^3J = 7,8 \text{ Hz}$, CH_2NH^+) ; 2,55 (s, 6H, CH_3) ; 1,81 (qt, 2H, $^3J = 7,2 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

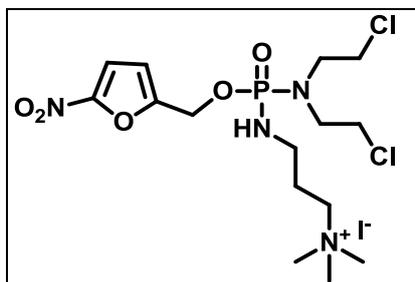
RMN ^1H (500 MHz, MeOD) δ ppm (*forme non chlorydrate*) 8,26 (d, 2H, $^3J = 7,7$ Hz, CH_{Ar}) ; 7,67 (d, 2H, $^3J = 7,7$ Hz, CH_{Ar}) ; 5,12 (d, 2H, $^3J = 7,5$ Hz, OCH_2) ; 3,63-3,70 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 3,35-3,50 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 2,95 (td, 2H, $^3J = 6,9$ Hz, $^3J_{\text{H,P}} = 10,8$ Hz, CH_2NHP) ; 2,37-2,44 (m, 2H, CH_2N) ; 2,26 (s, 6H, CH_3) ; 1,71 (qt, 2H, $^3J = 7,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

RMN ^{31}P (202 MHz, CD_3OD) δ ppm 18,30

RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) δ ppm (*forme chlorydrate*) 145,63 (d, $^3J = 7,3$ Hz, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{CH}_2\text{O}$) ; 129,21 ; 124,70 (CH_{Ar}) ; 67,06 (d, $^2J = 4,4$ Hz, OCH_2) ; 57,39 (CH_2NH^+) ; 50,23 (d, $^2J = 4,6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 44,45 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$) ; 43,10 (d, $^3J = 1,4$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 39,50 (CH_2NHP) ; 29,10 (d, $^3J = 5,2$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

Ces attributions ont été appuyées par des expériences 2D de type COSY et HSQC

Iodure de 3-([bis(2(chloroéthyl)amino)][(5-nitrofurane-2-yl)méthoxy]phosphoryl)amino)-N,N,N-triméthylpropane-1-aminium (15a)



A une solution de *O*-(5-nitrofurane-2-yl)méthyl)-*N,N*-bis(2-chloroéthyl)-*N'*-[3-diméthylamino)propyl]phosphorodiamidate **14a** (323 mg ; 0,754 mmol) dans 10 mL de THF fraîchement distillé, est ajouté de l'iodure de méthyle (254 μ L ; 4,07 mmol). Le mélange est agité sous atmosphère inerte et à température ambiante pendant 22 heures jusqu'à disparition du produit de départ (suivi par ccm silice, éluant AcOEt/MeOH 5/5 avec 12 % d'ammoniaque). Le brut réactionnel est évaporé sous pression réduite sans chauffer pour donner le produit **15a** (471 mg ; 0,821 mmol).

Formule brute : C₁₅H₂₈Cl₂N₄O₅PI

Poids moléculaire : 573,19 g.mol⁻¹

Rendement = 100 %

Aspect : huile très visqueuse jaune

CCM (silice, éluant : AcOEt/EtOH, 5/5, v/v avec 12% NH₄OH) R_f = 0,03

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3444 (H₂O) ; 1500 (ν_{asNO_2}) ; 1353 (ν_{sNO_2}) ; 1242, 1218 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-O}}$) ; 1020 ($\nu_{\text{C-O}}$).

RMN ¹H (200 MHz, CD₃OD) δ ppm 7,46 (d, 2H, ³*J* = 3,7 Hz, CH) ; 6,85 (d, 2H, ³*J* = 3,4 Hz, CH) ; 5,09 (d, 2H, ³*J*_{H,P} = 8,9 Hz, OCH₂) ; 3,65-3,72 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 3,35-3,53 (m, 6H, NCH₂CH₂Cl, CH₂N⁺) ; 3,18 (s, 9H, (CH₃)₃) ; 3,04 (td, 2H, ³*J* = 6,4 Hz, ³*J*_{H,P} = 12,5 Hz, CH₂NHP) ; 2,03-2,10 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

RMN ³¹P (202 MHz, CD₃OD) δ ppm 17,95

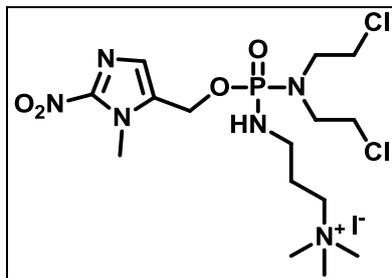
RMN ¹³C (50 MHz, CD₃OD) δ ppm 154,70 (d, ³*J* = 7,3 Hz, C_{Ar}CH₂O) ; 114,39, 113,33 (CH_{Ar}) ; 65,82 (CH₂N⁺) ; 60,16 (d, ²*J* = 4,5 Hz, OCH₂) ; 53,90, 53,82, 53,74 ((CH₃)₃) ; 50,11 (d, ²*J* = 4,6 Hz, NCH₂CH₂Cl) ; 43,08 (d, ³*J* = 1,5 Hz, NCH₂CH₂Cl) ; 38,81 (CH₂NHP) ; 26,31 (d, ³*J* = 4,6 Hz, CH₂CH₂CH₂).

Ces attributions ont été appuyées par des expériences 2D de type COSY et HSQC.

MS (ESI) Valeur théorique : m/z 445,12 [M]⁺

Valeur expérimentale : m/z 445,21 [M]⁺

Iodure de 3-({[bis(2(chloroéthyl)amino)][(1-méthyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)methoxy]phosphoryl}amino)-N,N,N-triméthylpropane-1-aminium (15b)



A une solution de *O*-{(1-méthyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)méthyl}-*N,N*-bis(2-chloroéthyl)-*N'*-[3-diméthylamino)propyl]phosphorodiamidate **14b** (494 mg ; 1,11 mmol) dans 20 mL de THF fraîchement distillé, est ajouté de l'iodure de méthyle (380 μ L ; 6,10 mmol). Le mélange est agité sous atmosphère inerte et à température ambiante pendant 3h30 jusqu'à disparition du produit de départ (suivi par ccm silice, éluant AcOEt/MeOH 5/5 avec 12 % d'ammoniaque). Le brut réactionnel est évaporé sous pression réduite sans chauffer pour donner le produit **15b** (646 mg ; 1,10 mmol)

Formule brute : C₁₅H₃₀Cl₂IN₆O₄P

Poids moléculaire : 587,22 g.mol⁻¹

Rendement = 99 %

Aspect : solide jaune

CCM (silice, éluant : AcOEt/EtOH, 5/5, v/v avec 12 % NH₄OH) R_f = 0,03

IR (ATR) ν cm⁻¹ 3441 (H₂O) ; 1490 (ν_{asNO_2}) ; 1352 (ν_{sNO_2}) ; 1223 ; 1193 ($\nu_{\text{P=O}}$, $\nu_{\text{C-O}}$) ; 1012 ($\nu_{\text{C-O}}$).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm 7,28 (s, 1H, CH) ; 5,20 (dd, 1H, ³J_{H,P} = 8,5 Hz, ²J = 13,4 Hz, OCH₂) ; 5,16 (dd, 1H, ³J_{H,P} = 8,5 Hz, ²J = 13,4 Hz, OCH₂) ; 4,08 (s, 3H, NCH₃) ; 3,65-3,73 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 3,36-3,51 (m, 6H, NCH₂CH₂Cl, CH₂N⁺) ; 3,18 (s, 9H, N(CH₃)₂) ; 3,01 (td, 2H, ³J = 6,4 Hz, ³J_{H,P} = 11,9 Hz, CH₂NHP) ; 1,96-2,05 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

RMN ³¹P (202 MHz, CD₃OD) ppm 17,95

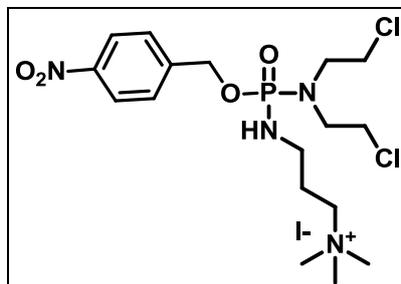
RMN ¹³C (50 MHz, CD₃OD) δ ppm 134,95 (d, ³J = 7,5 Hz, C_{Ar}CH₂O) ; 129,37 (CH_{Ar}) ; 65,77 (CH₂N⁺) ; 57,96 (d, ²J = 4,7 Hz, OCH₂) ; 54,02, 53,94, 53,86 ((CH₃)₃) ; 50,03 (d, ²J = 4,7 Hz, NCH₂CH₂Cl) ; 43,27 (d, ³J = 1,5 Hz, NCH₂CH₂Cl) ; 38,74 (CH₂NHP) ; 35,53 (NCH₃) ; 26,25 (d, ³J = 5,1 Hz, CH₂CH₂CH₂).

Ces attributions ont été appuyées par des expériences 2D de type COSY et HSQC.

MS (ESI) Valeur théorique : m/z 459,14 [M]⁺

Valeur expérimentale : m/z 459,20 [M]⁺

Iodure de 3-({(4-nitrobenzyloxy)[bis(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl}amino)-N,N,N-triméthylpropane-1-aminium (15c)



A une solution de *O*-(4-nitro)benzyl *N,N*-bis(2-chloroéthyl)-*N'*-[3-(diméthylamino)propyl]phosphorodiamidate **14c** (1,34 g ; 3,03 mmol) dans 45 mL de THF fraîchement distillé, est ajouté de l'iodure de méthyle (1 mL ; 16,1 mmol). Le mélange est agité sous atmosphère inerte et à température ambiante pendant trois heures jusqu'à disparition du produit de départ (suivi par ccm silice, éluant AcOEt/MeOH 5/5 avec 12 % d'ammoniaque). Le brut réactionnel est évaporé sous pression réduite sans chauffer pour donner le produit **15c** (1,76 g ; 3,02 mmol).

Formule brute : C₁₇H₃₀Cl₂IN₄O₄P

Poids moléculaire : 583,23 g.mol⁻¹

Rendement = 100 %

Aspect : solide jaune

CCM (silice, éluant : AcOEt/EtOH, 5/5, v/v avec 12 % NH₄OH) R_f = 0,03

IR (ATR) v cm⁻¹ 3439 (H₂O) ; 1520 (ν_{as}NO₂) ; 1348 (ν_sNO₂) ; 1221 (ν_{P=O}, ν_{C-O}) ; 1046 (ν_{C-O}).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm 8,27 (d, 2H, ³J = 8,7 Hz, CH_{Ar}) ; 7,68 (d, 2H, ³J = 8,6 Hz, CH_{Ar}) ; 5,17 (d, 2H, ³J_{H,P} = 7,4 Hz, OCH₂) ; 3,68-3,72 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 3,41-3,50 (m, 6H, NCH₂CH₂Cl, CH₂N⁺) ; 3,17 (s, 9H, N(CH₃)₃) ; 3,05 (td, 2H, ³J = 6,4 Hz, ³J_{H,P} = 12,0 Hz, CH₂NHP) ; 1,97-2,07 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂).

RMN ³¹P (202 MHz, CD₃OD) δ ppm 18,09

RMN ¹³C (50 MHz, CD₃OD) δ ppm 145,48 (C_{Ar}) ; 129,29 ; 124,71 (CH_{Ar}) ; 67,16 (d, ²J = 4,7 Hz, OCH₂) ; 65,80 (CH₂N⁺) ; 53,85, 53,77, 53,69 ((CH₃)₃) ; 50,15 (d, ²J = 4,7 Hz, NCH₂CH₂Cl) ; 43,16 (d, ³J = 1,5 Hz, NCH₂CH₂Cl) ; 38,77 (CH₂NHP) ; 26,34 (d, ³J = 4,8 Hz, CH₂CH₂CH₂).

Ces attributions ont été appuyées par des expériences 2D de type COSY et HSQC.

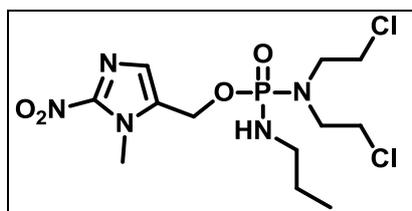
MS (ESI) Valeur théorique m/z 455,14 [M]⁺

Valeur expérimentale m/z 455,24 [M]⁺

IV- Synthèse d'un équivalent non vectorisé du composé

15b, le composé 23

O-{(1-méthyl-2-nitro-1H-imidazol-5-yl)méthyl}-*N,N*-bis(2-chloroéthyl)-*N'*-propylphosphorodiamidate (23)



Sous atmosphère inerte, une solution de lithium bis(triméthylsilyl)amide (1,38 mL ; 1,38 mmol ; 1 M dans le THF) est ajoutée goutte à goutte à une solution de l'alcool 12b (200 mg ; 1,27 mmol) dans 5 mL de THF fraîchement distillé et refroidi à - 78°C. Le milieu devient orange-marron. Après quelques minutes d'agitation, une solution de dichlorure de l'acide *N,N*-bis-(2-chloroéthyl)phosphoramidique 8 (357 mg ; 1,38 mmol) dans 4 mL de THF anhydre est ajoutée rapidement. Après trente minutes d'agitation à - 78 °C et quasi disparition du produit de départ d'après le suivi par RMN ³¹P, la 3-diméthylamino-1-propylamine 2 (206 µL ; 2,5 mmol) est ajoutée au milieu réactionnel toujours maintenu à - 78 °C. Un suivi par RMN ³¹P montre la disparition de l'intermédiaire dès quinze minutes. Après deux heures d'agitation, le mélange réactionnel est dilué par addition d'eau (10 mL) puis extrait par de l'acétate d'éthyle (3 × 10 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (40 mL), séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis concentrées sous pression. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice, éluée par un mélange AcOEt/EtOH, 98/2, v/v pour donner le produit 23 (140 mg ; 0,348 mmol).

Formule brute : C₁₂H₂₂Cl₂N₅O₄P

Poids moléculaire : 402,21 g.mol⁻¹

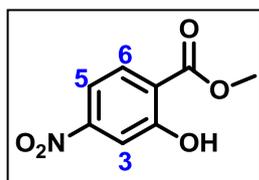
Rendement = 27 %

Aspect : huile visqueuse jaune

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,22 (s, 1H, CH) ; 5,10 (dd, 1H, ³J_{H,P} = 7,7 Hz, ²J = 13,3 Hz, OCH₂) ; 5,04 (dd, 1H, ³J_{H,P} = 7,7 Hz, ²J = 13,3 Hz, OCH₂) ; 4,09 (s, 3H, NCH₃) ; 3,61-3,68 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 3,39-3,52 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 2,84-2,91 (m, 2H, CH₂NHP) ; 1,73 (h, 2H, ³J = 7,2 Hz, CH₂CH₂CH₃) ; 0,92 (t, 2H, ³J = 7,3 Hz, CH₂CH₂CH₃).

V – Synthèse du dérivé portant le vecteur ammonium quaternaire sur l'entité clivable, le composé 29

Ester méthylique de l'acide 2-hydroxy-4-nitrobenzoïque (24)



A une solution d'acide 2-hydroxy-4-nitrobenzoïque (2,03 g ; 11,1 mmol) dans du méthanol (20 mL) refroidie à 0 °C, est ajouté goutte à goutte du chlorure de thionyle (1,2 mL ; 16,5 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une heure puis chauffé à 60 °C pendant une nuit. Après évaporation, le résidu est repris avec 30 mL d'eau et extrait par de l'acétate d'éthyle (3 × 30 mL). Les phases organiques sont réunies, lavées par une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées. Le composé 24 est obtenu sous forme d'une poudre jaunâtre (2,12 g ; 10,8 mmol).

Formule brute : C₈H₇NO₅

Poids moléculaire : 197,14 g.mol⁻¹

Rendement : 97 %

Aspect : poudre jaunâtre

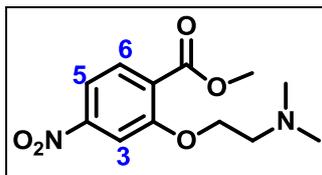
Point de fusion : 96 °C (99,5-102°C d'après la littérature [211,212])

CCM (silice, éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle, 7/3, v/v) R_f = 0,55

IR (KBr) ν cm⁻¹ 3117 (ν_{OH}) ; 1683 (ν_{C=O}) ; 1521 (ν_{asNO2}) ; 1331 (ν_{sNO2}) ; 1205 (ν_{C-O}).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm 10,99 (s, 1H, OH) ; 8,03 (d, 1H, ³J = 8,7 Hz, CH₍₆₎) ; 7,81 (d, 1H, ⁴J = 2,3 Hz, CH₍₃₎) ; 7,70 (dd, 1H, ³J = 8,7 Hz, ⁴J = 2,3 Hz, CH₍₅₎) ; 4,03 (s, 3H, OCH₃).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ ppm 169,37 (C_{OOCH3}) ; 162,10 (C_{ArOH}) ; 131,35 (CH_{Ar(6)}) ; 117,28 (C_{ArCOO}) ; 113,63 ; 113,16 (CH_{Ar(3,5)}) ; 53,22 (CH₃).

Ester méthylique de l'acide 2-[2-(diméthylamino)éthoxy]-4-nitrobenzoïque (25)

A une solution de l'alcool **24** (893 mg ; 4,53 mmol) dans du diméthylformamide (25 mL) est ajouté du carbonate de potassium (974 mg ; 7,05 mmol). La solution jaune vire alors au rouge-brun et l'agitation est maintenue quarante minutes. Le chlorhydrate de la 2-chloro-*N,N*-diméthyléthylamine (1,03 g ; 7,15 mmol) est additionné puis le milieu réactionnel est chauffé à 100 °C pendant une nuit. Le lendemain, le milieu réactionnel est évaporé puis dilué dans 100 mL d'eau avant d'être extrait avec de l'acétate d'éthyle (5 × 50 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (50 mL), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice éluée par un mélange acétate d'éthyle/éthanol (9/1, v/v). Le composé **25** est alors obtenu sous forme d'une huile brune (840 mg ; 3,13 mmol).

Formule brute : C₁₂H₁₆N₂O₅

Poids moléculaire : 268,27 g.mol⁻¹

Rendement : 69 %

Aspect : huile brune

CCM (silice, éluant : acétate d'éthyle/éthanol 5/5, v/v) R_f = 0,18

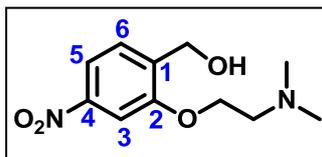
IR (KBr) ν cm⁻¹ 1731 (ν_{C=O}) ; 1528 (ν_{asNO2}) ; 1348 (ν_{sNO2}) ; 1256 et 1027 (ν_{C-O}).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,84-7,77 (m, 3H, CH_{Ar}) ; 4,21 (t, ³J = 5,6 Hz, 2H, OCH₂) ; 3,88 (s, 3H, OCH₃) ; 2,82 (t, ³J = 5,6 Hz, 2H, CH₂N) ; 2,36 (s, 6H, N(CH₃)₂).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ ppm 165,77 (C_{COOCH3}) ; 157,95 (C_{ArO}) ; 150,74 (C_{ArNO2}) ; 131,81 (CH_{Ar(6)}) ; 127,22 (C_{ArCOO}) ; 115,66 (CH_{Ar(5)}) ; 108,86 (CH_{Ar(3)}) ; 68,74 (PhOCH₂) ; 57,81 (CH₂N) ; 53,00 (OCH₃) ; 46,20 (N(CH₃)₂).

MS (ESI) Valeur théorique : m/z 269,12 [M+H]⁺

Valeur expérimentale : m/z 269,11 [M+H]⁺

[2-{2-(diméthylamino)éthoxy}-4-nitrophényl]méthanol (26)

A une solution refroidie à 0 °C de l'ester **25** (662 mg ; 2,47 mmol) dans le THF anhydre (50 mL), sous argon, est ajouté goutte à goutte de l'hydrure de diisobutylaluminium (1 M dans l'hexane ; 7,2 mL ; 7,2 mmol). Le milieu est agité à 0 °C pendant une heure, puis la réaction est stoppée par addition d'une solution aqueuse de tartrate de magnésium (1 M ; 50 mL). Après trente minutes d'agitation, le milieu est extrait par 2 × 50 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est ensuite lavée à l'eau (50 mL) puis avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (50 mL) avant d'être séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée. Le composé **26** est obtenu sous forme de poudre jaunâtre (570 mg ; 2,37 mmol).

Formule brute : C₁₁H₁₇N₂O₄

Poids moléculaire : 240,26 g.mol⁻¹

Rendement : 96 %

Aspect : poudre jaunâtre

Point de fusion : 95 °C

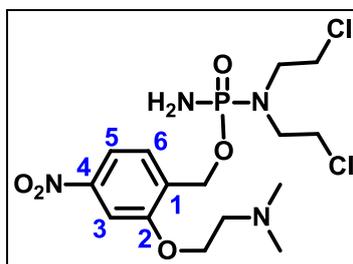
CCM (silice, éluant : acétate d'éthyle/éthanol, 5/5, v/v + 4 % NH₃OH) R_f = 0,72

IR (KBr) ν cm⁻¹ 3116 (ν_{OH}) ; 1522 (ν_{asNO2}) ; 1359 (ν_{sNO2}) ; 1239 et 1057 (ν_{C-O}).

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ ppm 7,84 (dd, 1H, ⁴J = 2,1 Hz, ³J = 8,0 Hz, CH₍₅₎) ; 7,77 (d, 1H, ⁴J = 2,1 Hz, CH₍₃₎) ; 7,42 (d, 1H, ³J = 8,1 Hz, CH₍₆₎) ; 4,67 (s, 2H, CH₂OH) ; 4,31 (t, 2H, ³J = 5,1 Hz, OCH₂) ; 2,84 (t, 2H, ³J = 5,2 Hz, CH₂N) ; 2,39 (s, 6H, N(CH₃)₂).

RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ ppm 139,28 (C_{Ar(1)}) ; 130,02 (CH_{Ar(6)}) ; 117,11 (CH_{Ar(5)}) ; 108,84 (CH_{Ar(3)}) ; 66,46 (PhOCH₂) ; 61,29 (CH₂OH) ; 57,90 (CH₂N) ; 44,90 (N(CH₃)₂).

***O*-([2-{2-(diméthylamino)éthoxy}-4-nitrophényl)méthyl] *N,N*-bis-(2-chloroéthyl)phosphorodiamidate (**28**)**



Sous atmosphère inerte, une solution de lithium bis(triméthylsilyl)amide (1,4 mL ; 1,4 mmol ; 1 M dans le THF) est ajoutée goutte à goutte à une solution de l'alcool **26** (300 mg ; 1,25 mmol) dans 30 mL de THF fraîchement distillé et refroidi à - 78 °C. Après cinq minutes d'agitation, une solution de dichlorure de l'acide *N,N*-bis-(2-chloroéthyl)phosphoramidique **8** (365 mg ; 1,40 mmol) dans 6 mL de THF anhydre est ajouté rapidement. L'avancement de la réaction est contrôlé par RMN ^{31}P . Après quarante minutes d'agitation à - 78 °C et quasi-disparition du produit de départ d'après le suivi par RMN ^{31}P , un courant d'ammoniac gazeux barbote pendant 5 minutes dans le milieu réactionnel toujours maintenu à -78 °C. Un suivi par RMN ^{31}P montre la disparition de l'intermédiaire **27** dès cinq minutes. De l'eau est ajouté au milieu réactionnel (50 mL) qui est extrait par du dichlorométhane (4 × 30 mL). Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de magnésium, filtrées puis évaporées sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur colonne d'alumine, éluée par un mélange acétate d'éthyle/éthanol avec un gradient d'éthanol variant de 1 % à 10 % pour obtenir le produit **28** (281 mg ; 0,634 mmol).

Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_5\text{P}$

Poids moléculaire : 443,26 g.mol $^{-1}$

Rendement : 51 %

Aspect : huile orange

CCM : (Alumine, éluant acétate d'éthyle/éthanol, 9/1, v/v) $R_f = 0,45$

IR $\nu\text{ cm}^{-1}$ 3232 (ν_{asNH_2}) ; 3108 (ν_{sNH_2}) ; 1524 (ν_{asNO_2}) ; 1349 (ν_{sNO_2}) ; 1249 ($\nu_{\text{P=O}}$) ; 1034 ($\nu_{\text{C-O}}$)

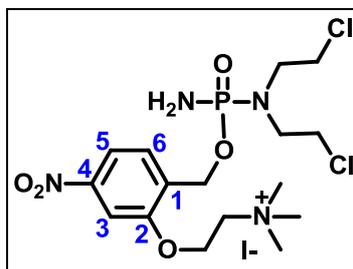
RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,89 (dd, 1H, $^3J = 8,3$ Hz, $^4J = 2,1$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar}(5)}$) ; 7,84 (d, 1H, $^4J = 2,1$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar}(3)}$) ; 7,67 (d, 1H, $^3J = 8,3$ Hz, $\text{CH}_{\text{Ar}(6)}$) ; 5,16 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,P}} = 7,2$ Hz, $^2J = 13,9$ Hz, PhCH_2O) ; 5,10 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,P}} = 6,4$ Hz, $^2J = 13,9$ Hz, PhCH_2O) ; 4,31-4,24 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 3,70-3,63 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 3,50-3,39 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$) ; 2,91-2,82 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 2,38 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$). **RMN ^{31}P** (202 MHz, CD_3OD) δ ppm 19,63.

RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD) δ ppm 157,52 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{O}$) ; 150,05 ($\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{NO}_2$) ; 134,32 (d, $^3J = 8,4$ Hz, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar}}\text{C}$) ; 129,47 ($\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}(6)}$) ; 116,79 ($\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}(5)}$) ; 106,96 ($\underline{\text{C}}\text{H}_{\text{Ar}(3)}$) ; 67,73 ($\text{O}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 63,07 (d, $^2J = 4,3$ Hz, $\text{Ph}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{O}$) ; 58,81 ($\text{OCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$) ; 50,59 (d, $^2J = 4,8$ Hz, $\text{NCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Cl}$) ; 45,94 ($\text{N}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_2$) ; 43,09 (d, $^3J = 1,4$ Hz, $\text{NCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{Cl}$).

Ces attributions ont été appuyées par des expériences 2D de type COSY et HSQC.



Iodure de 2-{2-([N,N-bis-(2-chloroéthyl)amino]phosphoryl) oxyméthyl}-5-nitrophénoxy}-N,N,N-triméthyléthane-1-aminium (29)



À une solution du composé **28** (78 mg ; 0,176 mmol) dans du THF fraîchement distillé (5 mL), est ajouté de l'iodure de méthyle (53 μ L ; 0,849 mmol). Le mélange est agité sous atmosphère inerte et à température ambiante. Après 22 heures de réaction, de l'iodure de méthyle est ajouté (53 μ L ; 0,849 mmol) et l'agitation est maintenue pendant 20 heures supplémentaires jusqu'à disparition du produit de départ (suivi par CCM silice, éluant AcOEt/MeOH 5/5 avec 12 % d'ammoniaque). Le mélange réactionnel est évaporé sous pression réduite sans chauffer pour donner le produit **29** (90,9 mg ; 0,155 mmol).

Formule Brute : C₁₆H₂₈Cl₂IN₄O₅P

Poids Moléculaire : 585,20 g.mol⁻¹

Rendement : 97%

Aspect : huile orange

CCM (Silice, éluant acétate d'éthyle/méthanol, 5/5, v/v avec 12% NH₄OH) R_f = 0,06

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm 7,97 (dd, 1H, ³J = 8,3 Hz, ⁴J = 2,0 Hz, CH_{Ar(5)}) ; 7,84 (d, 1H, ⁴J = 2,0 Hz, CH_{Ar(3)}) ; 7,75 (d, 1H, ³J = 8,3 Hz, CH_{Ar(6)}) ; 5,16-5,08 (m, 2H, PhCH₂O) ; 4,70 (m, 2H, OCH₂CH₂N) ; 3,99 (m, 2H, OCH₂CH₂N) ; 3,68 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 3,51-3,41 (m, 4H, NCH₂CH₂Cl) ; 3,34 (s, 9H, N(CH₃)₂).

RMN ³¹P (202 MHz, CD₃OD) δ ppm 19,48.

RMN ¹³C (50 MHz, CD₃OD) δ ppm 156,42 (C_{Ar}O) ; 150,07 (C_{Ar}NO₂) ; 134,13 (d, ³J = 3,3 Hz, C_{Ar}C) ; 129,98 (CH_{Ar(6)}) ; 117,67 (CH_{Ar(5)}) ; 107,46 (CH_{Ar(3)}) ; 66,48 (CH₂N⁺) ; 63,90 (OCH₂CH₂N) ; 62,89 (d, ²J = 1,7 Hz, PhCH₂O) ; 54,77 (N(CH₃)₃) ; 50,50 (d, ²J = 1,9 Hz, NCH₂CH₂Cl) ; 43,19 (d, ³J = 0,6 Hz, NCH₂CH₂Cl).



Table des abréviations

CI₅₀	Concentration nécessaire pour Inhiber 50% de cellules
CPL	Chromatographie en Phase Liquide
cpm	Coups par minutes
DMT	Dose Maximale Tolérée
DCC	Dicyclocarbodiimide
DI	Dose Injectée / Dose Incubée
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ESI	Electrospray
Et₃N	Triéthylamine
HES	Haematoxyline Eosine Safran
HOBt	Hydroxybenzotriazole
IRM	Imagerie par résonance magnétique
i.p.	Injection en intrapéritonéale
i.v.	Injection en intraveineuse
NBP	4-(4'-nitrobenzyl)pyridine
PGs	Protéoglycanes
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROI	Région d'intérêt
SRC	Modèle Swarm de Rat porteur de Chondrosarcome
TEMP	Tomographie par Emission MonoPhotonique
TEP	Tomographie par Emission de Positon
TGI	Tumoral Growth Inhibition
THF	Tétrahydrofurane
u.m.a	Unité monoatomique



Table des illustrations

Figures

Chapitre I – Revue Bibliographique

Figure 1 : Localisations fréquentes des chondrosarcomes	6
Figure 2 : Représentation schématique illustrant les principaux critères de classification d'un chondrosarcome conventionnel [7]	7
Figure 3 : Photographie de chondrosarcomes conventionnels localisés au niveau de la métaphyse du fémur [7] 8	
Figure 4 : Chondrosarcome conventionnel central [12]	8
Figure 5 : Envahissement du tissu osseux par le chondrosarcome, coloration HES, grossissement x 40 [13]	8
Figure 6 : Espérance de vie pour des patients atteints d'un chondrosarcome conventionnel [14]	9
Figure 7 : Critères d'agressivité visibles en radiographie dans le cas d'une tumeur cartilagineuse [16]	10
Figure 8 : Management d'une tumeur cartilagineuse proposé par Parlier-Cuaua [16]	10
Figure 9 : Les petites cellules indifférenciées qui composent le tissu d'un chondrosarcome mésoenchymateux sont positives à CD99 [7].....	12
Figure 10 : Scanner d'un chondrosarcome à cellules claires localisé en épiphyse métaphyse du fémur proximal.	12
Figure 11 : Pièce chirurgicale d'un chondrosarcome à cellules claires, observation macro et microscopique [21]	13
Figure 12 : Observation microscopique d'un chondrosarcome dédifférencié avec deux composantes histologiques : un chondrosarcome de grade I juxtaposé à un rhabdomyosarcome de haut grade. Grossissement x 100 [22].	13
Figure 13 : Visualisation par radiographie d'un chondrosarcome localisé au niveau tibia proximal [26]	14
Figure 14 : Scanner, coupe axiale d'un chondrosarcome d'une femme de 56 ans [27]	14
Figure 15 : Radiographie d'un chondrosarcome central du fémur [26].	14
Figure 16 : Visualisation d'un chondrosarcome dédifférencié de la diaphyse tibiale gauche par IRM [25].	15
Figure 17 : Structure des principaux agents de contraste au gadolinium commercialisé	15
Figure 18 : Structure du ¹⁸ F-FDG	16
Figure 19 : Pénétration intracellulaire du ¹⁸ F-FDG dans les cellules tumorales et accumulation.....	17
Figure 20 : Imagerie TEP au ¹⁸ F-FDG, récurrence d'un chondrosarcome maxillaire [35].	17
Figure 21 : Structures de différents radiotraceurs spécifiques de l'hypoxie	19
Figure 22 : Mécanisme de radio et de chimiorésistance pour le chondrosarcome [50]	21
Figure 23 : Résultats de l'étude clinique de Potluri et al. concernant la dose administrée en radiothérapie et le volume tumoral [52].....	22
Figure 24 : Contrôle de différents processus cellulaires par le proto-oncogène Myc en conditions normales ou lors de la tumorigénèse [66].	24

Table des illustrations

Figure 25 : Activation de la voie PI3K/Akt/mTOR [67]	24
Figure 26 : Les différents rôles de mTOR [73].....	25
Figure 27 : Activation des MMPs au niveau du tissu chondrosarcome [74].....	25
Figure 28 : Radiographie d'un chondrosarcome de grade I au niveau fémoral avant et après cryothérapie	26
Figure 29 : Quelques études cliniques actuellement en cours pour le traitement du chondrosarcome [82]	26
Figure 30 : Altération du réseau vasculaire dans un tissu tumoral [90].....	27
Figure 31 : Régulation de l'activité HIF-1[95].....	28
Figure 32 : Activation des gènes par le complexe hétérodimérique HIF-1 [94].....	29
Figure 33 : Exemple de quinones activées en hypoxie.....	30
Figure 34 : Structure de la camptothécine	30
Figure 35 : Stratégie d'amélioration des propriétés physicochimiques et de la sélectivité de la camptothécine .	31
Figure 36 : Exemple de quinones greffées à des moutardes azotées.....	31
Figure 37 : Structures de quelques nitroaromatiques	31
Figure 38 : Exemples de structures de dérivés N-oxydes.....	32
Figure 39 : Structure d'un agrégat de protéoglycanes.....	33
Figure 40 : Structure des unités disaccharidiques constituant les GAGs	34
Figure 41 : Structure du monomère d'agrécan	34
Figure 42 : Structure et fonctions des protéoglycanes de surface [141]	36
Figure 43 : Chondrosarcome dédifférencié - Coloration bleu de toluidine [142].....	36
Figure 44 : Exemples de molécules vectorisées par des ammoniums quaternaires synthétisées par Shindo et al.	39
Figure 45 : Dérivés synthétisés et évalués par Huang et al.	39
Figure 46 : Exemples de molécules vectorisées par un ammonium quaternaire	39
Figure 47 : Exemple de fluorophores vectorisés par un ammonium quaternaire développés par Gibbs-Strauss et al. [160].....	40
Figure 48 : Colonne vertébrale de rat après injection du GE003098 et du Pam800, un traceur osseux [160]	40
Figure 49 : Stratégie de ciblage des protéoglycanes par la fonction ammonium quaternaire	41
Figure 50 : Structure du ^{99m} Tc-1-[(triéthylammonio)propyl]-1,4,7,10,13-pentaazacyclopentadécane, le ^{99m} Tc-NTP 15-5	41
Figure 51 : Images scintigraphiques réalisées après injection de ^{99m} Tc-NTP 15-5 sur des cobayes aux stades J ₅₀ et J ₁₈₀ après ménistectomie du genou de l'articulation arrière gauche [165]	42
Figure 52 : Mécanisme de l'alkylation bifonctionnelle d'une guanine par une moutarde azotée	43
Figure 53 : Etude de biodistribution du melphalan-AQ et du melphalan marqué au carbone 14, Rapp et al. [2]43	43
Figure 54 : Exemples de dérivés des phosphoramides	44
Figure 55 : Vectorisation par la fonction ammonium quaternaire de prodrogues dérivées ducyclophosphamide et activables en hypoxie	45

Chapitre II - Intérêt du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour le diagnostic et le suivi du chondrosarcome

Figure 56 : Pourcentage de Dose Incubée (compartiment 1 + 2) pour les lignées HEMC-SS, Swarm et B16F0..... 48

Figure 57 : Pourcentage de D.I. (Dose Incubée) du compartiment 1 et du compartiment 2 après centrifugation pour la lignée HEMC-SS..... 48

Figure 58 : Evolution du volume tumoral mesuré au pied à coulisse du modèle SRC..... 49

Figure 59 : Architecture lobulaire d'un chondrosarcome de rat Swarm 50

Figure 60 : Analyses histologiques de tumeur de SRC 50

Figure 61 : Dosage biochimique du taux de protéoglycanes de tumeurs de chondrosarcome (SRC) au stade J_{45} post implantation et de tumeurs de mélanome murin B16F0 au stade J_{20} post inoculation 51

Figure 62 : Croissance du modèle de xéno greffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) sur souris SCID au cours du temps..... 51

Figure 63 : Analyse anatomopathologique d'une xéno greffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) implantée sur souris SCID – coloration au bleu alcian, grossissement x 10 51

Figure 64 : Positionnement d'un rat sur la gamma-camera pour l'imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ 53

Figure 65 : Distribution in vivo du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ chez des rats porteurs de chondrosarcome, acquisitions planaires et dynamiques 53

Figure 66 : Pourcentage de DI (Dose Injectée) par gramme de tumeur à 30, 60 et 180 minutes après l'injection. 54

Figure 67 : Taux de rats diagnostiqués positifs au chondrosarcome selon le stade du développement tumoral et la technique : Scintigraphies au $^{99m}\text{Tc-HMDP}$, Scintigraphies au $^{18}\text{F-FDG}$, palpation, ou Scintigraphies au $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ 54

Figure 68 : Fixation du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ au cours du développement tumoral..... 55

Figure 69 : Imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ des rats Shams au stade J_4 post intervention..... 55

Figure 70 : Imagerie $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ d'une xéno greffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) implantée sur souris SCID (1) au stade J_{66} post inoculation, et sur un modèle de mélanome murin sur souris C57BL6J au stade J_{20} post inoculation (2)..... 56

Figure 71 : Rapport T/M de la fixation du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ pour la tumeur Swarm (Stade J_4 et J_{25}), B16F0 (Stade J_{20}) et HEMC-SS (Stade J_{66}) 56

Figure 72 : Taux de protéoglycanes dans les tumeurs Swarm (J_{45}), B16F0 (J_{20}) et HEMC-SS (J_{66}) 56

Figure 73 : Evolution du volume tumoral, mesuré au pied à coulisse, chez des rats porteurs de chondrosarcome et traités par du zolédronate comparativement aux rats non traités..... 57

Figure 74 : Analyse histologique de la tumeur d'un rat traité au zolédronate, coloration HES, grossissement x 10 57

Figure 75 : Rapport T/M de la fixation du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ chez des rats porteurs de chondrosarcome et traités par du zolédronate comparativement aux rats non traités 57

Figure 76 : Etude de la fixation du radiotracer $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ aux protéoglycanes 58

Figure 77 : Rapport de fixation tumeur/muscle du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ comparativement à la couronne $^{99m}\text{Tc-15-5}$ au cours du temps sur le modèle de rat Swarm 58

Figure 78 : Scintigraphies obtenues avec les radiotraceurs $^{99m}\text{Tc-HMDP}$ (1) et $^{18}\text{F-FDG}$ (2) chez le modèle SRC.. 59

Chapitre III - Application à la vectorisation d'agents cytotoxiques avec le melphalan ammonium quaternaire

Figure 79 : Détermination du pouvoir alkylant - Test à la NBP 73

Figure 80 : Valeur des CI_{50} en μM déterminées pour quatre lignées cellulaires après traitement au melphalan,HCl ou au melphalan-AQ 73

Figure 81 : Répartition cellulaire dans les différentes phases du cycle cellulaire après traitement au melphalan,HCl ou au melphalan-AQ à la dose correspondant à leur CI_{50} pendant 15 h, 24 h, 48 h et 72 h sur la lignée HEMC-SS 74

Figure 82 : Répartition cellulaire dans les différentes phases du cycle cellulaire après traitement au melphalan,HCl ou au melphalan-AQ à la dose de 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM ou 20 μM pendant 24 h sur la lignée HEMC-SS 74

Figure 83 : Synopsis de l'étude in vivo 78

Figure 84 : Evolution du volume tumoral moyen pour les rats traités au melphalan-AQ (A) et les rats non traités (B) 78

Figure 85 : Evolution du volume tumoral moyen pour les rats traités au melphalan,HCl 79

Figure 86 : Volume tumoral moyen au stade J_{30} pour les trois groupes 79

Figure 87 : Valeurs du T/C en pourcentage quatre jours et quinze jours après administration de la dernière dose. 79

Figure 88 : Photographies des tumeurs prélevées en fin d'étude 79

Figure 89 : Rapport de fixation T/M du $^{99m}\text{Tc-NTP 15-5}$ chez les rats traités au melphalan-AQ ou au melphalan,HCl, et chez les rats non traités avant (stade J_2) et après (stade J_{15}) traitement 80

Figure 90 : Variation moyenne du poids des rats traités au melphalan,HCl ou au melphalan-AQ à dose équimolaire comparativement à l'évolution moyenne du poids chez les rats non traités 80

Figure 91 : Taux de globules blancs ($10^3/\mu\text{L}$) dans le sang des rats après traitement, au stade J_{13} 81

Figure 92 : Diminution du nombre de mitoses chez les rats traités 81

Figure 93 : Coupes de tumeurs, coloration HES, grossissement x 20 81

Figure 94 : Coupes de tumeur, coloration HES, grossissement x 10 81

Figure 95 : Intensité de la coloration au bleu alcian dans les tumeurs 81

Figure 96 : Dosage biochimique des protéoglycanes dans les tumeurs 81

Figure 97 : Synopsis de l'étude in vivo 83

Figure 98 : Poids des tumeurs prélevées à J_{22} 83

Figure 99 : Photographies des tumeurs prélevées à J_{22} 83

Figure 100 : Activité surfacique de la tumeur sur activité surfacique du muscle pour les rats diagnostiqués positifs au ^{99m}Tc -NTP 15-5, stade J ₂₂	84
Figure 101 : Evolution du poids moyen pour les trois groupes.....	84
Figure 102 : Analyses hématologiques du sang des rats traités au melphalan,HCl ou au melphaln-AQ comparativement aux rats non traités.....	85
Figure 103 : Nombre moyen de mitoses observées par champs.....	85
Figure 104 : Tumeur d'un rat traité au melphalan,HCl - Coloration HES, grossissement x 10	85
Figure 105 : Dosage biochimique des protéoglycanes dans les tumeurs	86
Figure 106 : Analyse anatomopathologique d'une tumeur de rat traité au melphalan-AQ.....	86
Chapitre IV - Amélioration de la spécificité - Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides	
Figure 107 : Structure des prodrogues synthétisées, activables en hypoxie et dérivées du cyclophosphamide ...	94
Figure 108 : Suivi par RMN ^{31}P du milieu réactionnel lors de la formation de l'intermédiaire 9	95
Figure 109 : Suivi réactionnel par RMN ^{31}P des trois réactions, ref H_3PO_4 à 1 % dans D_2O	99
Figure 110 : Suivi par RMN ^{31}P de la formation de 14a , ref H_3PO_4 à 1 % dans D_2O	99
Figure 111 : Structure générale des composés 14	100
Figure 112 : Structure générale des composés 15	102
Figure 113 : Chromatographes CPL-UV pour du dérivé 15c	103
Figure 114 : Suivi par RMN ^{31}P de la formation du composé 23 , ref : H_3PO_4 à 1 % dans D_2O	104
Figure 115 : Suivi par RMN ^{31}P de la formation du composé 28	106
Figure 116 : Structure du composé 28	106
Figure 117 : Structure du composé 29	107
Figure 118 : Structures des prodrogues étudiées	108
Figure 119 : Suivi par RMN ^{31}P de la stabilité du composé 15c dans un tampon cacodylate à 37 °C en l'absence de réducteur – Référence : PPh_3 (5 % dans le DMSO)	109
Figure 120 : Clivage du composé 15c et libération de l'entité active en présence de trois équivalents de réducteurs	109
Figure 121 : Suivi par RMN ^{31}P de la stabilité du composé 11 dans un tampon cacodylate à 37 °C en présence de trois équivalents de réducteur – Référence : PPh_3 (5 % dans le DMSO)	109
Figure 122 : Suivi par RMN ^{31}P du clivage du composé 15c sur 24 h, à 37°C, en présence de trois équivalents de réducteur - Référence : PPh_3 (5 % dans le DMSO)	110
Figure 123 : Cinétique de la disparition de la prodrogue 15a au cours du temps - Analyse : Table Curve 2D	110
Figure 124 : Suivi de la disparition de la prodrogue 15c et de l'apparition de l'entité active et de l'ion phosphate au cours du temps après ajout de trois équivalents de réducteur (A) ou de neuf équivalents de réducteur (B). 110	
Figure 125 : Evolution du composé 15a , suivie en RMN ^{31}P , en présence de onze équivalents de réducteur dans un tampon cacodylate à 37 °C - Référence : PPh_3 (5 % dans le DMSO).....	111

Figure 126 : Chromatogrammes et spectres de masse obtenus avec le composé 15c dans un tampon cacodylate avant (A) et après clivage (B).....	111
Figure 127 : Cinétique de formation et de dégradation de l'entité active libéré.....	112
Figure 128 : Pourcentage de viabilité cellulaire en hypoxie à la dose de 10 µM pour les quatre dérivés, sur les lignées B16F0, HEMC-SS, PC3 et Saos-2	113
Figure 129 : Résultat de l'étude de cytotoxicité sur la lignée HEMC-SS en hypoxie et en normoxie des quatre dérivés	113
Figure 130 : Structure des trois dérivés phosphoramides testés in vivo.....	113
Figure 131 : Imagerie scintigraphique au ¹⁸ F-MISO d'une tumeur de chondrosarcome de rat Swarm au stade J ₃₀ (A) et J ₄₅ (B) post implantation, ainsi que d'une tumeur de xénogreffe de chondrosarcome humain (HEMC-SS) sur souris SCID (C) au stade J ₇₀ post inoculation	114
Figure 132 : Détermination de la DMT sur souris OF1 pour les composés 15b et 11	115
Figure 133 : Synopsis de l'étude in vivo des dérivés phosphoramides.....	115
Figure 134 : Evolution du volume tumoral moyen chez les souris traitées – mesure au pied à coulisse.....	116
Figure 135 : Poids des tumeurs prélevées dix jours après la fin du traitement (A) et quarante-six jours après la fin du traitement (B).....	117

Tableaux

Chapitre I – Revue bibliographique

Tableau 1 : Les différents types de chondrosarcomes, leur fréquence, l'âge moyen et le taux de survie à cinq ans [7].....	6
Tableau 2 : Localisation des différents protéoglycanes	33

Chapitre III - Application à la vectorisation d'agents cytotoxiques avec le melphalan ammonium quaternaire

Tableau 3 : Détermination de la DMT du melphalan-AQ 5 administré en i.v. sur souris OF1	75
---	----

Chapitre IV - Amélioration de la spécificité - Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

Tableau 4 : Déplacement chimiques des signaux relatifs aux méthyles et méthylènes en α et β de l'amine du composé 10 selon sa forme chlorydrate ou sa forme base	96
Tableau 5 : Identification de la forme basique ou chlorydrate des composés 14a et 14c par RMN ¹ H selon les déplacements chimiques en ppm des protons vicinaux de la fonction amine.....	101
Tableau 6 : Déplacements chimiques des carbones portés en α de la fonction amine lors de la quaternisation	102
Tableau 7 : Caractérisation par spectrométrie de masse des composés 15a-c	102

Tableau 8 : Composition de la phase mobile au cours du temps 102
 Tableau 9 : Analyse par spectrométrie de masse des composés **15a-c**..... 103

Schémas

Chapitre I – Revue bibliographique

Schéma 1 : Réduction intracellulaire des nitro-imidazolés conduisant à la rétention de ces composés [40]..... 19
 Schéma 2 : Schéma général de bioréduction des quinones [89] 30
 Schéma 3 : Activation de la mitomycine C en milieu hypoxique 30
 Schéma 4 : Réduction des composés nitroaromatiques et réoxygénation du radical anion en présence d'oxygène [108]..... 31
 Schéma 5 : Schéma d'activation de la tirapazamine 32
 Schéma 6 : Mécanisme d'activation hépatique du cyclophosphamide 44
 Schéma 7 : Activation réductrice des nitroaromatiques [170] 44
 Schéma 8 : Mécanisme d'activation, proposé par Hu et al., d'un dérivé nitobenzylé du cyclophosphamide [180] 45

Chapitre III - Application à la vectorisation d'agents cytotoxiques avec le melphalan ammonium quaternaire

Schéma 9 : Synthèse du melphalan-AQ **5**..... 67
 Schéma 10 : Synthèse du melphalan chlorhydrate **6**..... 68

Chapitre IV - Amélioration de la spécificité - Synthèse et évaluation de prodrogues dérivées des phosphoramides

Schéma 11 : Synthèse de l'équivalent non clivable, le composé **11** 94
 Schéma 12 : Principe de l'indicateur coloré spécifique des agents alkylants à base de 4-(4'-nitrobenzyl) pyridine ou NBP..... 95
 Schéma 13 : Synthèse des prodrogues **15a**, **15b** et **15c** 96
 Schéma 14 : Synthèse du 2-hydroxyméthyl-5-nitrofurane **12a** 97
 Schéma 15 : Synthèse du 5-hydroxyméthyl-1-N-méthyl-2-nitro-1H-imidazole **12b** 97
 Schéma 16 : Mécanisme de la synthèse de Marckwald [196]..... 98
 Schéma 17 : Synthèse de la prodrogue non vectorisée **23** 104
 Schéma 18 : Synthèse de l'iodure de 2-{2-[(N,N-bis-(2-chloroéthyl)amino)phosphoryl]oxyméthyl}-5-nitrophénoxy}-N,N,N-triméthyléthananonium **29**..... 105



Références bibliographiques

1. Vidal A, Sabatini M, Rolland-Valognes G, Renard P, Madelmont JC, Mounetou E (2007) Synthesis and *in vitro* evaluation of targeted tetracycline derivatives: effects on inhibition of matrix metalloproteinases. *Bioorg Med Chem* 15:2368-2374
2. Rapp M, Giraud I, Maurizis JC, Galmier MJ, Madelmont JC (2003) Synthesis and *in vivo* biodisposition of [14C]-quaternary ammonium-melphalan conjugate, a potential cartilage-targeted alkylating drug. *Bioconj Chem* 14:500-506
3. Vidal A, Chezal JM, Mounetou E (2010) New quaternary ammonium oxacam derivatives: synthesis and *in vitro* antiosteoarthritis evaluation. *Eur J Med Chem* 45:405-410
4. Lichtenstein L, Jaffe HL (1943) Chondrosarcoma of Bone. *Am J Pathol* 19:553-589
5. Rozeman L.B. C-JAM, Hogendoorn P.C.W. (2006) Pathology of primary malignant bone and cartilage tumours. *International Orthopaedics* 30:437 - 444
6. Anract P, De Pinieux G, Tomeno B (2001) Chondrosarcomes intraosseux. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 14:12
7. Kim MJ, Cho KJ, Ayala AG, Ro JY (2011) Chondrosarcoma: with updates on molecular genetics. *Sarcoma* 2011:405 - 437
8. Hefti F, Jundt G, Cserhati MD, Dutoit M, Exner GU, Kaelin A, Siebenrock K, von Hochstetter A (2007) Tumeurs du cartilage (enchondrome, chondrosarcome). *Forum Med Suisse* 7:393-396
9. Evans HL, Ayala AG, Romsdahl MM (1977) Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. *Cancer* 40:818-831
10. Bovée JVMG, Hogendoorn PCW, Wunder JS, Alman BA (2010) Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer* 10:481-488
11. Bovée JVMG, Hogendoorn PCW, Wunder JS, Alman BA (2010) Cartilage tumours and bone development: molecular pathology and possible therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer* 10:481-488
12. Rozeman LB, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC (2006) Pathology of primary malignant bone and cartilage tumours. *Int Orthop* 30:437-444
13. David E, Blanchard F, Heymann MF, De Pinieux G, Gouin F, Redini F, Heymann D (2011) The Bone Niche of Chondrosarcoma: A Sanctuary for Drug Resistance, Tumour Growth and also a Source of New Therapeutic Targets. *Sarcoma* 2011:doi: 10.1155/2011/932451
14. Widhe B, Bauer HC (2009) Surgical treatment is decisive for outcome in chondrosarcoma of the chest wall: a population-based Scandinavian Sarcoma Group study of 106 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 137:610-614
15. Frances-Munoz E, Gallego-Pinazo R, Pardo-Lopez D, Diaz-Llopis M (2011) Choroidal metastasis from chondrosarcoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* DOI : 10.1007/s00417-011-1736-3
16. Parlier-Cuaua C, Boussona V, Ogilvieb CM, Lackmanb RD, J.D. L (2011) When should we biopsy a solitary central cartilaginous tumor of long bones? Literature review and management proposal *European journal of radiology* 77:6-12
17. Gelderblom H, Hogendoorn PC, Dijkstra SD, van Rijswijk CS, Krol AD, Taminiau AH, Bovee JV (2008) The clinical approach towards chondrosarcoma. *Oncologist* 13:320-329
18. Granter SR, Renshaw AA, Fletcher CD, Bhan AK, Rosenberg AE (1996) CD99 reactivity in mesenchymal chondrosarcoma. *Hum Pathol* 27:1273-1276
19. Wehrli BM, Huang W, De Crombrugge B, Ayala AG, Czerniak B (2003) Sox9, a master regulator of chondrogenesis, distinguishes mesenchymal chondrosarcoma from other small blue round cell tumors. *Hum Pathol* 34:263-269
20. Unni KK, Dahlin DC, Beabout JW, Sim FH (1976) Chondrosarcoma: clear-cell variant. A report of sixteen cases. *J Bone Joint Surg Am* 58:676-683
21. Kuroda N, Sogoh T, Ohara M, Hirouchi T, Mizuno K, Hayashi Y, Lee GH (2009) Clear cell chondrosarcoma: an ultrastructural study. *Med Mol Morphol* 42:185-188

Références bibliographiques

22. Hameed M, Dorfman H (2011) Primary malignant bone tumors--recent developments. *Semin Diagn Pathol* 28:86-101
 23. Dahlin DC, Beabout JW (1971) Dedifferentiation of low-grade chondrosarcomas. *Cancer* 28:461-466
 24. Grimer RJ, Gosheger G, Taminiau A, Biau D, Matejovsky Z, Kollender Y, San-Julian M, Gherlinzoni F, Ferrari C (2007) Dedifferentiated chondrosarcoma: prognostic factors and outcome from a European group. *Eur J Cancer* 43:2060-2065
 25. Bierry G, Feydy A, Larousserie F, Pluot E, Guerini H, Campagna R, Dufau-Andreu C, Anract P, Babinet A, Dietemann JL, Chevrot A, Drapé JL (2010) Chondrosarcomes dédifférenciés : revue iconographique radio-pathologique *Journal de la radiologie* 91:271 - 279
 26. Shmookler B. BJ, Jelinek J., Sugarbaker P., Malawer M.M. (2001) Bone and Soft-tissue Sarcomas: Epidemiology, Radiology, Pathology and Fundamentals of Surgical Treatment. *Musculoskeletal cancer surgery: treatment of sarcomas and allied diseases*:3-35
 27. O'Sullivan P.; O'Dwyer H.; Flint J. MP, Muller NL. (2007) Malignant chest wall neoplasms of bone and cartilage: a pictorial review of CT and MR findings. *British Journal of Radiology* 80:678-684
 28. Littrell LA, Wenger DE, Wold LE, Bertoni F, Unni KK, White LM, Kandel R, Sundaram M (2004) Radiographic, CT, and MR imaging features of dedifferentiated chondrosarcomas: a retrospective review of 174 de novo cases. *Radiographics* 24:1397-1409
 29. Arsoos G, Venizelos I, Karatzas N, Koukoulidis A, Karakatsanis C (2002) Low-grade chondrosarcomas: a difficult target for radionuclide imaging. Case report and review of the literature. *Eur J Radiol* 43:66-72
 30. Lavini C, Pikaart BP, de Jonge MC, Schaap GR, Maas M (2009) Region of interest and pixel-by-pixel analysis of dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging parameters and time-intensity curve shapes: a comparison in chondroid tumors. *Magn Reson Imaging* 27:62-68
 31. Yakushiji T, Oka K, Sato H, Yorimitsu S, Fujimoto T, Yamashita Y, Mizuta H (2009) Characterization of chondroblastic osteosarcoma: gadolinium-enhanced versus diffusion-weighted MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 29:895-900
 32. Geirnaerdt MJ, Hogendoorn PC, Bloem JL, Taminiau AH, van der Woude HJ (2000) Cartilaginous tumors: fast contrast-enhanced MR imaging. *Radiology* 214:539-546
 33. Laurent D, Wasvary J, Rudin M, O'Byrne E, Pellas T (2003) *In vivo* assessment of macromolecular content in articular cartilage of the goat knee. *Magn Reson Med* 49:1037-1046
 34. Liu S, Shen S, Zhu T, Liang W, Huang L, Chen H, Wu H (2010) Gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging of the knee: an experimental approach. *Skeletal Radiol* 39:885-890
 35. Feldman F, Van Heertum R, Saxena C, Parisien M (2005) ¹⁸F-FDG-PET applications for cartilage neoplasms. *Skeletal Radiol* 34:367-374
 36. Douis H, James SL, Grimer RJ, Davies MA (2011) Is bone scintigraphy necessary in the initial surgical staging of chondrosarcoma of bone? *Skeletal Radiol* PMID : 21892729
 37. Kaya GC, Demir Y, Ozkal S, Sengoz T, Manisali M, Baran O, Koc M, Tuna B, Ozaksoy D, Havitcioglu H (2010) Tumor grade-related thallium-201 uptake in chondrosarcomas. *Ann Nucl Med* 24:279-286
 38. Pneumaticos SG, Chatzioannou SN, Moore WH, Johnson M (2001) The role of radionuclides in primary musculoskeletal tumors beyond the 'bone scan'. *Crit Rev Oncol Hematol* 37:217-226
 39. Choong PF, Kunisada T, Slavin J, Schlicht S, Hicks R (2004) The role of thallium-201 and pentavalent dimercaptosuccinic acid for staging cartilaginous tumours. *Int Semin Surg Oncol* 1:10
 40. Vera P, Thureaub S, Bohna P (2011) Traceurs de l'hypoxie en tomographie par émission de positons. *Médecine nucléaire* 35:433-444
 41. Koch CJ, Evans SM (2003) Non-invasive PET and SPECT imaging of tissue hypoxia using isotopically labeled 2-nitroimidazoles. *Adv Exp Med Biol* 510:285-292
 42. Rajendran JG, Hendrickson KR, Spence AM, Muzi M, Krohn KA, Mankoff DA (2006) Hypoxia imaging-directed radiation treatment planning. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33 Suppl 1:44-53
-

43. Obata A, Kasamatsu S, Lewis JS, Furukawa T, Takamatsu S, Toyohara J, Asai T, Welch MJ, Adams SG, Saji H, Yonekura Y, Fujibayashi Y (2005) Basic characterization of ⁶⁴Cu-ATSM as a radiotherapy agent. *Nucl Med Biol* 32:21-28
44. Lewis J, Laforest R, Buettner T, Song S, Fujibayashi Y, Connett J, Welch M (2001) Copper-64-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone): An agent for radiotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1206-1211
45. Piert M, Machulla HJ, Picchio M, Reischl G, Ziegler S, Kumar P, Wester HJ, Beck R, McEwan AJ, Wiebe LI, Schwaiger M (2005) Hypoxia-specific tumor imaging with ¹⁸F-fluoroazomycin arabinoside. *J Nucl Med* 46:106-113
46. Kumar P, Emami S, Kresolek Z, Yang J, McEwan AJ, Wiebe LI (2009) Synthesis and hypoxia selective radiosensitization potential of beta-2-FAZA and beta-3-FAZL: fluorinated azomycin beta-nucleosides. *Med Chem* 5:118-129
47. Schuetz M, Schmid MP, Potter R, Kommata S, Georg D, Lukic D, Dudczak R, Kletter K, Dimopoulos J, Karanikas G, Bachtary B (2010) Evaluating repetitive ¹⁸F-fluoroazomycin-arabinoside (¹⁸FAZA) PET in the setting of MRI guided adaptive radiotherapy in cervical cancer. *Acta Oncol* 49:941-947
48. Riedl CC, Brader P, Zanzonico P, Reid V, Woo Y, Wen B, Ling CC, Hricak H, Fong Y, Humm JL (2008) Tumor hypoxia imaging in orthotopic liver tumors and peritoneal metastasis: a comparative study featuring dynamic ¹⁸F-MISO and ¹²⁴I-IAZG PET in the same study cohort. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35:39-46
49. Sun X, Niu G, Chan N, Shen B, Chen X (2011) Tumor hypoxia imaging. *Mol Imaging Biol* 13:399-410
50. Onishi AC, Hincker AM, Lee FY (2010) Surmounting chemotherapy and radioresistance in chondrosarcoma: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Sarcoma* 2011:DOI 10.1115/2011/381564
51. Staals EL, Bacchini P, Bertoni F (2006) Dedifferentiated central chondrosarcoma. *Cancer* 106:2682-2691
52. Potluri S, Jefferies SJ, Jena R, Harris F, Burton KE, Prevost AT, Burnet NG (2010) Residual postoperative tumour volume predicts outcome after high-dose radiotherapy for chordoma and chondrosarcoma of the skull base and spine. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 23:199-208
53. Takada Y, Hachiya M, Park SH, Osawa Y, Ozawa T, Akashi M (2002) Role of reactive oxygen species in cells overexpressing manganese superoxide dismutase: mechanism for induction of radioresistance. *Mol Cancer Res* 1:137-146
54. Marples B, Greco O, Joiner MC, Scott SD (2002) Molecular approaches to chemo-radiotherapy. *Eur J Cancer* 38:231-239
55. Myerson RJ, Singh AK, Bigott HM, Cha B, Engelbach JA, Kim J, Lamoreaux WT, Moros E, Novak P, Sharp TL, Straube W, Welch MJ, Xu M (2006) Monitoring the effect of mild hyperthermia on tumour hypoxia by Cu-ATSM PET scanning. *Int J Hyperthermia* 22:93-115
56. Wardam P (2007) Chemical Radiosensitizers for Use in Radiotherapy. *Clinical Oncology* 19:397-417
57. Beck R, Roper B, Carlsen JM, Huisman MC, Lebschi JA, Andratschke N, Picchio M, Souvatzoglou M, Machulla HJ, Piert M (2007) Pretreatment ¹⁸F-FAZA PET predicts success of hypoxia-directed radiochemotherapy using tirapazamine. *J Nucl Med* 48:973-980
58. Tarjan G, Haines GK, 3rd, Vesper BJ, Xue J, Altman MB, Yarmolyuk YR, Khurram H, Elseth KM, Roeske JC, Aydogan B, Radosevich JA Part II. Initial molecular and cellular characterization of high nitric oxide-adapted human tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Tumour Biol* 32:87-98
59. Goda JS, Ferguson PC, O'Sullivan B, Catton CN, Griffin AM, Wunder JS, Bell RS, Kandel RA, Chung PW (2011) High-risk extracranial chondrosarcoma: Long-term results of surgery and radiation therapy. *Cancer* doi: 10.1002/cncr.25806
60. DeLaney TF, Liebsch NJ, Pedlow FX, Adams J, Dean S, Yeap BY, McManus P, Rosenberg AE, Nielsen GP, Harmon DC, Spiro IJ, Raskin KA, Suit HD, Yoon SS, Hornicek FJ (2009) Phase II study of high-dose photon/proton radiotherapy in the management of spine sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74:732-739
61. Kim DW, Seo SW, Cho SK, Chang SS, Lee HW, Lee SE, Block JA, Hei TK, Lee FY (2007) Targeting of cell survival genes using small interfering RNAs (siRNAs) enhances radiosensitivity of Grade II chondrosarcoma cells. *J Orthop Res* 25:820-828
62. Moussavi-Harami F, Mollano A, Martin JA, Ayoob A, Domann FE, Gitelis S, Buckwalter JA (2006) Intrinsic radiation resistance in human chondrosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 346:379-385
63. Asp J, Sangiorgi L, Inerot SE, Lindahl A, Molendini L, Benassi MS, Picci P (2000) Changes of the p16 gene but not the p53 gene in human chondrosarcoma tissues. *Int J Cancer* 85:782-786

Références bibliographiques

64. Daugaard S, Christensen LH, Hogdall E (2009) Markers aiding the diagnosis of chondroid tumors: an immunohistochemical study including osteonectin, bcl-2, cox-2, actin, calponin, D2-40 (podoplanin), mdm-2, CD117 (c-kit), and YKL-40. *Apmis* 117:518-525
65. Morioka H, Weissbach L, Vogel T, Nielsen GP, Faircloth GT, Shao L, Hornicek FJ (2003) Antiangiogenesis treatment combined with chemotherapy produces chondrosarcoma necrosis. *Clin Cancer Res* 9:1211-1217
66. Vita M, Henriksson M (2006) The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 16:318-330
67. Méjean A, Leuret T (2008) Genèse de la métastase - cibles, voies et molécules. *Progrès en urologie Suppl.* 7:S173-177
68. Klenke FM, Abdollahi A, Bertl E, Gebhard MM, Ewerbeck V, Huber PE, Sckell A (2007) Tyrosine kinase inhibitor SU6668 represses chondrosarcoma growth via antiangiogenesis in vivo. *BMC Cancer* 7:49
69. Papachristou DJ, Papavassiliou AG (2007) Osteosarcoma and chondrosarcoma: new signaling pathways as targets for novel therapeutic interventions. *Int J Biochem Cell Biol* 39:857-862
70. Papachristou DJ, Goodman MA, Cieply K, Hunt JL, Rao UN (2006) Comparison of allelic losses in chondroblastoma and primary chondrosarcoma of bone and correlation with fluorescence in situ hybridization analysis. *Hum Pathol* 37:890-898
71. Morrison C, Radmacher M, Mohammed N, Suster D, Auer H, Jones S, Rigganbach J, Kelbick N, Bos G, Mayerson J (2005) MYC amplification and polysomy 8 in chondrosarcoma: array comparative genomic hybridization, fluorescent in situ hybridization, and association with outcome. *J Clin Oncol* 23:9369-9376
72. Jiang BH, Liu LZ (2008) Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist Updat* 11:63-76
73. Advani SH (2010) Targeting mTOR pathway: A new concept in cancer therapy. *Indian J Med Paediatr Oncol* 31:132-136
74. Bloch O, Sughrue ME, Mills SA, Parsa AT (2011) Signaling pathways in cranial chondrosarcoma: potential molecular targets for directed chemotherapy. *J Clin Neurosci* 18:881-885
75. Bjornsti MA, Houghton PJ (2004) The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4:335-348
76. Brown RE (2004) Morphoproteomic portrait of the mTOR pathway in mesenchymal chondrosarcoma. *Ann Clin Lab Sci* 34:397-399
77. Moriceau G, Ory B, Mitrofan L, Riganti C, Blanchard F, Brion R, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, Denis MG, Shultz LD, Monkkonen J, Redini F, Heymann D (2010) Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 (Everolimus): pivotal role of the prenylation process. *Cancer Res* 70:10329-10339
78. Hou CH, Chiang YC, Fong YC, Tang CH (2011) WISP-1 increases MMP-2 expression and cell motility in human chondrosarcoma cells. *Biochem Pharmacol* 81:1286-1295
79. Pei Y, Harvey A, Yu XP, Chandrasekhar S, Thirunavukkarasu K (2006) Differential regulation of cytokine-induced MMP-1 and MMP-13 expression by p38 kinase inhibitors in human chondrosarcoma cells: potential role of Runx2 in mediating p38 effects. *Osteoarthritis Cartilage* 14:749-758
80. Jiang X, Dutton CM, Qi WN, Block JA, Garamszegi N, Scully SP (2005) siRNA mediated inhibition of MMP-1 reduces invasive potential of a human chondrosarcoma cell line. *J Cell Physiol* 202:723-730
81. Miyaji T, Nakase T, Onuma E, Sato K, Myoui A, Tomita T, Joyama S, Ariga K, Hashimoto J, Ueda T, Yoshikawa H (2003) Monoclonal antibody to parathyroid hormone-related protein induces differentiation and apoptosis of chondrosarcoma cells. *Cancer Lett* 199:147-155
82.
<file:///C:/Documents%20and%20Settings/peyrode/Local%20Settings/Temporary%20Internet%20Files/Content.IE5/KFWPB EE6/clinical%20trials.htm>
83. Fiorenza F, Abudu A, Grimer RJ, Carter SR, Tillman RM, Ayoub K, Mangham DC, Davies AM (2002) Risk factors for survival and local control in chondrosarcoma of bone. *J Bone Joint Surg Br* 84:93-99
84. Han I, Lee YM, Cho HS, Oh JH, Lee SH, Kim HS (2010) Outcome after surgical treatment of pelvic sarcomas. *Clin Orthop Surg* 2:160-166
-

85. Bergh P, Gunterberg B, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG (2001) Prognostic factors and outcome of pelvic, sacral, and spinal chondrosarcomas: a center-based study of 69 cases. *Cancer* 91:1201-1212
86. Veth R, Schreuder B, van Beem H, Pruszczynski M, de Rooy J (2005) Cryosurgery in aggressive, benign, and low-grade malignant bone tumours. *Lancet Oncol* 6:25-34
87. Ahlmann ER, Menendez LR, Fedenko AN, Learch T (2006) Influence of cryosurgery on treatment outcome of low-grade chondrosarcoma. *Clin Orthop Relat Res* 451:201-207
88. Souna BS, Belot N, Duval H, Langlais F, Thomazeau H (2010) No recurrences in selected patients after curettage with cryotherapy for grade I chondrosarcomas. *Clin Orthop Relat Res* 468:1956-1962
89. Abouafia AJ, Rosenbaum DH, Sicard-Rosenbaum L, Jelinek JS, Malawer MM (1994) Treatment of large subchondral tumors of the knee with cryosurgery and composite reconstruction. *Clin Orthop Relat Res*:189-199
90. Brown JM, Wilson WR (2004) Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 4:437-447
91. Jain RK (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307:58-62
92. Minchinton AI, Tannock IF (2006) Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 6:583-592
93. Tredan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF (2007) Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 99:1441-1454
94. Tredan O, Grantab R, Dumontet C (2008) L'hypoxie tumorale peut-elle devenir un avantage pour la chimiothérapie? *Bull Cancer* 95:528-534
95. Powis G, Kirkpatrick L (2004) Hypoxia inducible factor-1alpha as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther* 3:647-654
96. Vaupel P (2004) The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 9 Suppl 5:10-17
97. Gothié E, Pouyssegur J (2002) HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie *Med Sci* 18:70-78
98. Baillet G, Groheux D, Barré E, Toubert ME, Dechaud C, Teyton P, Le Beau de Hemricourt E, Moretti JL (2008) Nouveaux traceurs en tomographie par émission de positons : un second souffle pour le ciblage de l'hypoxie tumorale ? . *Médecine nucléaire* 32:607-613
99. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157:411-421
100. Boeuf S, Bovee JV, Lehner B, Hogendoorn PC, Richter W (2010) Correlation of hypoxic signalling to histological grade and outcome in cartilage tumours. *Histopathology* 56:641-651
101. Chen C, Zhou H, Wei F, Jiang L, Liu X, Liu Z, Ma Q (2010) Increased levels of hypoxia-inducible factor-1alpha are associated with Bcl-xL expression, tumor apoptosis, and clinical outcome in chondrosarcoma. *J Orthop Res* 29:143-151
102. Kubo T, Sugita T, Shimose S, Matsuo T, Arihiro K, Ochi M (2008) Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and its relationship to tumour angiogenesis and cell proliferation in cartilage tumours. *J Bone Joint Surg Br* 90:364-370
103. Singh Y, Palombo M, Sinko PJ (2008) Recent trends in targeted anticancer prodrug and conjugate design. *Curr Med Chem* 15:1802-1826
104. Wang Y, Gray JP, Mishin V, Heck DE, Laskin DL, Laskin JD (2010) Distinct roles of cytochrome P450 reductase in mitomycin C redox cycling and cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* 9:1852-1863
105. Saunders MP, Jaffar M, Patterson AV, Nolan J, Naylor MA, Phillips RM, Harris AL, Stratford IJ (2000) The relative importance of NADPH: cytochrome c (P450) reductase for determining the sensitivity of human tumour cells to the indolequinone EO9 and related analogues lacking functionality at the C-2 and C-3 positions. *Biochem Pharmacol* 59:993-996
106. Pavlidis N, Hanauske AR, Gamucci T, Smyth J, Lehnert M, te Velde A, Lan J, Verweij J (1996) A randomized phase II study with two schedules of the novel indolequinone EO9 in non-small-cell lung cancer: a study of the EORTC Early Clinical Studies Group (ECSG). *Ann Oncol* 7:529-531
107. Dirix LY, Tonnesen F, Cassidy J, Epelbaum R, ten Bokkel Huinink WW, Pavlidis N, Sorio R, Gamucci T, Wolff I, Te Velde A, Lan J, Verweij J (1996) EO9 phase II study in advanced breast, gastric, pancreatic and colorectal carcinoma by the EORTC Early Clinical Studies Group. *Eur J Cancer* 32A:2019-2022

Références bibliographiques

108. Newsome JJ, Swann E, Hassani M, Bray KC, Slawin AMZ, Beall HD, Moody CJ (2007) Indolequinone antitumour agents: Correlation between quinone structure and rate of metabolism by recombinant human NAD(P)H: quinone oxidoreductase. *Org Biomol chem* 5:1629-1640
109. Chen Y, Longkin H (2008) Design of anticancer prodrugs for reductive activation. *Med Res Rev* 29:29-64
110. Pessah N, Reznik M, Shamis M, Yantiri F, Xin H, Bowdish K, Shomron N, Ast G, Shabat D (2004) Bioactivation of carbamate-based 20(S)-camptothecin prodrugs. *Bioorg Med Chem* 12:1859-1866
111. Thomas CJ, Rahier NJ, Hecht SM (2004) Camptothecin: current perspectives. *Bioorg Med Chem* 12:1585-1604
112. Zhang Z, Tanabe K, Hatta H, Nishimoto S (2005) Bioreduction activated prodrugs of camptothecin: molecular design, synthesis, activation mechanism and hypoxia selective cytotoxicity. *Org Biomol chem* 3:1905-1910
113. Flader C, Liu J, Borch RF (2000) Development of novel quinone phosphorodiamidate prodrugs targeted to DT-diaphorase. *J Med Chem* 43:3157-3167
114. Hernick M, Flader C, Borch RF (2002) Design, synthesis, and biological evaluation of indolequinone phosphoramidate prodrugs targeted to DT-diaphorase. *J Med Chem* 45:2540-2548
115. Hernick M, Borch RF (2003) Studies on the mechanisms of activation of indolequinone phosphoramidate prodrugs. *J Med Chem* 46:148-154
116. Chen Y, Hu L (2009) Design of anticancer prodrugs for reductive activation. *Med Res Rev* 29:29-64
117. Patterson AV, Williams KJ, Cowen RL, Jaffar M, Telfer BA, Saunders M, Airley R, Honess D, van der Kogel AJ, Wolf CR, Stratford IJ (2002) Oxygen-sensitive enzyme-prodrug gene therapy for the eradication of radiation-resistant solid tumours. *Gene Ther* 9:946-954
118. Wood PJ, Horsman MR, Khalil AA, Steinberg F, Streffer C, Overgaard J, Stratford IJ, Adams GE (1996) A comparison of the physiological effects of RSU1069 and RB6145 in the SCCVII murine tumour. *Acta Oncol* 35:989-994
119. Patterson AV, Ferry DM, Edmunds SJ, Gu Y, Singleton RS, Patel K, Pullen SM, Hicks KO, Syddall SP, Atwell GJ, Yang S, Denny WA, Wilson WR (2007) Mechanism of action and preclinical antitumor activity of the novel hypoxia-activated DNA cross-linking agent PR-104. *Clin Cancer Res* 13:3922-3932
120. Jameson MB, Rischin D, Pegram M, Gutheil J, Patterson AV, Denny WA, Wilson WR (2010) A phase I trial of PR-104, a nitrogen mustard prodrug activated by both hypoxia and aldo-keto reductase 1C3, in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 65:791-801
121. Abou-Alfa GK, Chan SL, Lin CC, Chiorean EG, Holcombe RF, Mulcahy MF, Carter WD, Patel K, Wilson WR, Melink TJ, Gutheil JC, Tsao CJ (2011) PR-104 plus sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 68:539-545
122. McKeown SR, Cowen RL, Williams KJ (2007) Bioreductive drugs: from concept to clinic. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 19:427-442
123. Siim BG, Pruijn FB, Sturman JR, Hogg A, Hay MP, Brown JM, Wilson WR (2004) Selective potentiation of the hypoxic cytotoxicity of tirapazamine by its 1-N-oxide metabolite SR 4317. *Cancer Res* 64:736-742
124. Craighead PS, Pearcey R, Stuart G (2000) A phase I/II evaluation of tirapazamine administered intravenously concurrent with cisplatin and radiotherapy in women with locally advanced cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48:791-795
125. Rischin D, Peters L, Hicks R, Hughes P, Fisher R, Hart R, Sexton M, D'Costa I, von Roemeling R (2001) Phase I trial of concurrent tirapazamine, cisplatin, and radiotherapy in patients with advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 19:535-542
126. Hay MP, Pchalek K, Pruijn FB, Hicks KO, Siim BG, Anderson RF, Shinde SS, Phillips V, Denny WA, Wilson WR (2007) Hypoxia-selective 3-alkyl 1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxides: the influence of hydrogen bond donors on extravascular transport and antitumor activity. *J Med Chem* 50:6654-6664
127. Hay MP, Gamage SA, Kovacs MS, Pruijn FB, Anderson RF, Patterson AV, Wilson WR, Brown JM, Denny WA (2003) Structure-activity relationships of 1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxides as hypoxia-selective analogues of tirapazamine. *J Med Chem* 46:169-182
-

128. Patterson LH, McKeown SR (2000) AQ4N: a new approach to hypoxia-activated cancer chemotherapy. *Br J Cancer* 83:1589-1593
129. Redini F (2001) Structure et régulation de l'expression des protéoglycanes du cartilage articulaire. *Pathol Biol (Paris)* 49:364-375
130. Chevalier X, Richette P (2005) Cartilage articulaire normal : anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement. *EMC - Rhumatologie-Orthopédie* 2:41-58
131. Wasa J, Nishida Y, Shinomura T, Isogai Z, Futamura N, Urakawa H, Arai E, Kozawa E, Tsukushi S, Ishiguro N (2011) Versican V1 isoform regulates cell-associated matrix formation and cell behavior differentially from aggrecan in Swarm rat chondrosarcoma cells. *Int J Cancer*
132. Yee AJ, Akens M, Yang BL, Finkelstein J, Zheng PS, Deng Z, Yang B (2007) The effect of versican G3 domain on local breast cancer invasiveness and bony metastasis. *Breast Cancer Res* 9:0-11
133. Serra M, Miquel L, Domenzain C, Docampo MJ, Fabra A, Wight TN, Bassols A (2005) V3 versican isoform expression alters the phenotype of melanoma cells and their tumorigenic potential. *Int J Cancer* 114:879-886
134. Touab M, Villena J, Barranco C, Arumi-Uria M, Bassols A (2002) Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol* 160:549-557
135. Pukkila MJ, Kosunen AS, Virtaniemi JA, Kumpulainen EJ, Johansson RT, Kellokoski JK, Nuutinen J, Kosma VM (2004) Versican expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *J Clin Pathol* 57:735-739
136. Domenzain-Reyna C, Hernandez D, Miquel-Serra L, Docampo MJ, Badenas C, Fabra A, Bassols A (2009) Structure and regulation of the versican promoter: the versican promoter is regulated by AP-1 and TCF transcription factors in invasive human melanoma cells. *J Biol Chem* 284:12306-12317
137. Schaefer L, Iozzo RV (2008) Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem* 283:21305-21309
138. Melrose J, Fuller ES, Roughley PJ, Smith MM, Kerr B, Hughes CE, Caterson B, Little CB (2008) Fragmentation of decorin, biglycan, lumican and keratan is elevated in degenerate human meniscus, knee and hip articular cartilages compared with age-matched macroscopically normal and control tissues. *Arthritis Res Ther* 10:R79
139. Kafienah W, Cheung FL, Sims T, Martin I, Miot S, Von Ruhland C, Roughley PJ, Hollander AP (2008) Lumican inhibits collagen deposition in tissue engineered cartilage. *Matrix Biol* 27:526-534
140. Douglas T, Heinemann S, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H (2006) Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules* 7:2388-2293
141. Velasco CR, Collic-Jouault S, Redini F, Heymann D, Padrines M (2010) Proteoglycans on bone tumor development. *Drug Discov Today* 15:553-560
142. Dornauer K, Soder S, Inwards CY, Bovee JV, Aigner T Matrix biochemistry and cell biology of dedifferentiated chondrosarcomas. *Pathol Int* 60:365-372
143. Svensson G, Hyrenius Wittsten A, Linse S, Mani K (2011) The Structural Role of N-Linked Glycans on Human Glypican-1. *Biochemistry* DOI: 10.1021/bi200218s
144. Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR (2010) Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *Febs J* 277:3876-3889
145. Soder S, Oliveira AM, Inwards CY, Muller S, Aigner T (2006) Type II collagen, but not aggrecan expression, distinguishes clear cell chondrosarcoma and chondroblastoma. *Pathology* 38:35-38
146. Dornauer K, Soder S, Inwards CY, Bovee JV, Aigner T (2010) Matrix biochemistry and cell biology of dedifferentiated chondrosarcomas. *Pathol Int* 60:365-372
147. Aigner T, Muller S, Neureiter D, Illstrup DM, Kirchner T, Bjornsson J (2002) Prognostic relevance of cell biologic and biochemical features in conventional chondrosarcomas. *Cancer* 94:2273-2281

Références bibliographiques

148. Hamm CA, Stevens JW, Xie H, Vanin EF, Morcuende JA, Abdulkawy H, Seftor EA, Sredni ST, Bischof JM, Wang D, Malchenko S, Bonaldo Mde F, Casavant TL, Hendrix MJ, Soares MB (2010) Microenvironment alters epigenetic and gene expression profiles in Swarm rat chondrosarcoma tumors. *BMC Cancer* 10:471
149. Grimaud E, Damiens C, Rousselle AV, Passuti N, Heymann D, Gouin F (2002) Bone remodelling and tumour grade modifications induced by interactions between bone and swarm rat chondrosarcoma. *Histol Histopathol* 17:1103-1111
150. Kuiper JI, Verbeek JH, Frings-Dresen MH, Ikkink AJ (1998) Keratan sulfate as a potential biomarker of loading of the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 23:657-663
151. Kairemo KJ, Lappalainen AK, Kaapa E, Laitinen OM, Hyytinen T, Karonen SL, Gronblad M (2001) In vivo detection of intervertebral disk injury using a radiolabeled monoclonal antibody against keratan sulfate. *J Nucl Med* 42:476-482
152. Korn N, Huang CC, Seevers RH, Rothwell C, Counsell RE (1979) Bisquaternary ammonium compounds as potential tumor imaging agents. *Int J Nucl Med Biol* 6:153-161
153. Asghar K, Roth LJ (1971) Distribution of hexamethonium and other quaternary ammonium compounds in cartilage. *J Pharmacol Exp Ther* 176:83-92
154. Yu SW, Shaw SM, Van Sickle DC (1999) Radionuclide studies of articular cartilage in the early diagnosis of arthritis in the rabbit. *Ann Acad Med Singapore* 28:44-48
155. Yu WK, Bartlett JM, van Sickle DC, Mock BH (1988) Biodistribution of bis-[beta-(N,N,N-trimethylamino)ethyl]selenide-75Se diiodide, a potential articular cartilage imaging agent. *Int J Rad Appl Instrum B* 15:229-230
156. Shindo H, Nakajima E, miyakoshi N, Shigehar E (1974) Autoradiographic studies on the distribution of quaternary ammonium compounds. III Distribution, excretion and metabolism of ¹⁴C-labeled pancuronium bromide in rats. *Chem Pharm Bull* 22:2502-2510
157. Shindo H, Nakajima E, Shigehar E (1975) Autoradiographic studies on the distribution of quaternary ammonium compounds. IV Adsorption of bisonium ions to rat tissues as revealed by *in vitro* whole-body adsorption autoradiography. *Chem Pharm Bull* 24:2327-2334
158. Shindo H, Takahashi I, Nakajima E (1971) Autoradiographic studies on the distribution of quaternary ammonium compounds. II. Distribution of ¹⁴C-labeled decamethonium, hexamethonium and dimethonium in Mice. *Chem Pharm Bull* 19:1876-1885
159. Yu WK, Shaw SM, Bartlett JM, Van Sickle DC, Mock BH (1989) The biodistribution of [75Se]bis-[beta-(N,N,N-trimethylamino)ethyl]selenide diiodide in adult guinea pigs. *Int J Rad Appl Instrum B* 16:255-259
160. Gibbs-Strauss SL, Vooght C, Fish KM, Nasr KA, Siclován TM, Barnhardt NE, Tan Hehir CA, Frangioni JV (2010) Molecular imaging agents specific for the annulus fibrosus of the intervertebral disk. *Mol Imaging* 9:128-140
161. Maurizis JC, Rapp M, Nicolas C, Ollier M, Verny M, Madelmont JC (2000) Disposition in rats of *N*-pyridinium-propyl-cyclam, *N*-triethylammonium-propyl-cyclam, and *N*-[Triethylammonium]-3-propyl-[15]ane-N5, potential cartilage imaging agents. *Drug Metab Dispos* 28:418-422
162. Maurizis JC, Ollier M, Nicolas C, Madelmont JC, Garrigue H, Veyre A (1992) *In vitro* binding of oxime acetylcholinesterase reactivators to proteoglycans synthesized by cultured chondrocytes and fibroblasts. *Biochem Pharmacol* 44:1927-1933
163. Nicolas C, Verny M, Giraud I, Ollier M, Rapp M, Maurizis JC, Madelmont JC (1999) New quaternary ammonium oximic derivatives targeted toward cartilage: synthesis, pharmacokinetic studies, and antiinflammatory potency. *J Med Chem* 42:5235-5240
164. Giraud I, Rapp M, Maurizis JC, Madelmont JC (2000) Application to a cartilage targeting strategy: synthesis and *in vivo* biodistribution of ¹⁴C-labeled quaternary ammonium-glucosamine conjugates. *Bioconjug Chem* 11:212-218
165. Miot-Noirault E, Vidal A, Pastoureau P, Bonafous J, Chomel A, Sarry L, Audin L, Madelmont JC, Moins N (2007) Early detection and monitoring of cartilage alteration in the experimental meniscectomised guinea pig model of osteoarthritis by ^{99m}Tc-NTP 15-5 scintigraphy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34:1280-1290
166. Cachin F, Chezal JM, Miot-Noirault E, Moins N, Auzeloux P, Vidal A, Bonnet-Duquennoy M, Boisgard S, Filaire M, Mestas D, Kelly A, Merlin C, Redini F, D'Incan M, Madelmont JC, Veyre A, Maublant J (2009) Nouveaux traceurs TEMP : exemple des traceurs des protéoglycanes et de la mélanine. *Médecine nucléaire* 33:161-169
-

167. Miot-Noirault E, Vidal A, Auzeloux P, Madelmont JC, Maublant J, Moins N (2008) First *In Vivo* SPECT Imaging of Mouse Femorotibial Cartilage Using ^{99m}Tc -NTP 15-5. *Mol Imaging* 7:263-271
168. Miot-Noirault E, Gouin F, Vidal A, Rapp M, Maublant J, Askienazy S, Chezal JM, Heymann D, Redini F, Moins N (2009) First preclinical imaging of primary cartilage neoplasm and its local recurrence using ^{99m}Tc -NTP 15-5 radiotracer. *J Nucl Med* 50:1541-1547
169. Cachin F, Boisgard S, Vidal A, Filaire M, Auzeloux P, Culot D, Askienazy S, Madelmont JC, Chezal JM, Miot-Noirault E (2011) First *ex vivo* study demonstrating that ^{99m}Tc -NTP 15-5 radiotracer binds to human articular cartilage. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38:2077-2082
170. Ollier M, Maurizis JC, Nicolas C, Bonafous J, de Latour M, Veyre A, Madelmont JC (2001) Joint scintigraphy in rabbits with ^{99m}Tc -*N*-[3-(triethylammonio)propyl]-15ane-N5, a new radiodiagnostic agent for articular cartilage imaging. *J Nucl Med* 42:141-145
171. Jaffar M, Williams KJ, Stratford IJ (2001) Bioreductive and gene therapy approaches to hypoxic diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 53:217-228
172. Mulder RL, Paulides M, Langer T, Kremer LC, van Dalen EC (2011) Cyclophosphamide versus ifosfamide for paediatric and young adult bone and soft tissue sarcoma patients. *The Cochrane Library*:DOI: 10.1002/14651858.CD14006300.pub14651852
173. Daw NC, Neel MD, Rao BN, Billups CA, Wu J, Jenkins JJ, Quintana J, Luchtman-Jones L, Villarreal M, Santana VM (2011) Frontline treatment of localized osteosarcoma without methotrexate: results of the St. Jude Children's Research Hospital OS99 trial. *Cancer* 117:2770-2778
174. Chen CS, Lin JT, Goss KA, He YA, Halpert JR, Waxman DJ (2004) Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: identification of cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics. *Mol Pharmacol* 65:1278-1285
175. Dantas AC, Batista-Junior FF, Macedo LF, Mendes MN, Azevedo IM, Medeiros AC (2010) Protective effect of simvastatin in the cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Acta Cir Bras* 25:43-46
176. Borch RF, Liu J, Joswig C, Baggs RB, Dexter DL, Mangold GL (2001) Antitumor activity and toxicity of novel nitroheterocyclic phosphoramidates. *J Med Chem* 44:74-77
177. Borch RF, Liu J, Schmidt JP, Marakovits JT, Joswig C, Gipp JJ, Mulcahy RT (2000) Synthesis and evaluation of nitroheterocyclic phosphoramidates as hypoxia-selective alkylating agents. *J Med Chem* 43:2258-2265
178. Jiang Y, Hu L (2008) *N*-(2,2-Dimethyl-2-(2-nitrophenyl)acetyl)-4-aminocyclophosphamide as a potential bioreductively activated prodrug of phosphoramidate mustard. *Bioorg Med Chem Lett* 18:4059-4063
179. Duan JX, Jiao H, Kaizerman J, Stanton T, Evans JW, Lan L, Lorente G, Banica M, Jung D, Wang J, Ma H, Li X, Yang Z, Hoffman RM, Ammons WS, Hart CP, Matteucci M (2008) Potent and highly selective hypoxia-activated achiral phosphoramidate mustards as anticancer drugs. *J Med Chem* 51:2412-2420
180. Ganjoo KN, Cranmer LD, Butrynski JE, Rushing D, Adkins D, Okuno SH, Lorente G, Kroll S, Langmuir VK, Chawla SP (2011) A phase I study of the safety and pharmacokinetics of the hypoxia-activated prodrug TH-302 in combination with doxorubicin in patients with advanced soft tissue sarcoma. *Oncology* 80:50-56
181. Hu L, Wu X, Han J, Chen L, Vass SO, Browne P, Hall BS, Bot C, Gobalakrishnapillai V, Searle PF, Knox RJ, Wilkinson SR (2011) Synthesis and structure-activity relationships of nitrobenzyl phosphoramidate mustards as nitroreductase-activated prodrugs. *Bioorg Med Chem Lett* 21:3986-3991
182. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, Double JA, Everitt J, Farningham DA, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA (2010) Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br J Cancer* 102:1555-1577
183. Maibenco HC, Krehbiel RH, Nelson D (1967) Transplantable osteogenic tumor in the rat. *Cancer Res* 27:362-366
184. Clark JC, Dass CR, Choong PF (2009) Development of chondrosarcoma animal models for assessment of adjuvant therapy. *ANZ J Surg* 79:327-236

Références bibliographiques

185. Gouin F, Ory B, Redini F, Heymann D (2006) Zoledronic acid slows down rat primary chondrosarcoma development, recurrent tumor progression after intralesional curettage and increases overall survival. *Int J Cancer* 119:980-984
186. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267:5421-5426
187. Meijer L (2006) Le cycle de division cellulaire et sa réplication. *Bull Cancer hors série*:41-53
188. Gullbo J, Lindhagen E, Bashir-Hassan S, Tullberg M, Ehrsson H, Lewensohn R, Nygren P, De La Torre M, Luthman K, Larsson R (2004) Antitumor efficacy and acute toxicity of the novel dipeptide melphalanyl-*p*-L-fluorophenylalanine ethyl ester (J1) *in vivo*. *Invest New Drugs* 22:411-420
189. Polin L, White K, Kushner J, Paluch J, Simpson C, Pugh S, Edelstein MK, Hazeldine S, Fontana J, LoRusso P, Horwitz JP, Corbett TH (2002) Preclinical efficacy evaluations of XK-469: dose schedule, route and cross-resistance behavior in tumor bearing mice. *Invest New Drugs* 20:13-22
190. Kassar M, Medoff E, Seropian S, Cooper DL (2007) Outpatient high-dose melphalan in multiple myeloma patients. *Transfusion* 47:115-119
191. Fenaux P, Dreyfus F (2006) Les syndromes myélodysplasiques de l'adulte. Collection FMC de la revue *Hématologie*:0-122
192. Codispoti KE, Depalma L (2010) Myelodysplastic syndrome in elderly patients: correlation of CBC with cytogenetic and FISH analysis. *Int J Lab Hematol* 32:443-448
193. Friedman OM, Boger E, Grubliauskas V, Sommer H (1963) Synthesis of *N*-Phosphorylated Derivatives of Nitrogen Mustards with Latent Cytotoxicity. *J Med Chem* 6:50-58
194. Engle TW, Zon G, Egan W (1982) ³¹P NMR kinetic studies of the intra- and intermolecular alkylation chemistry of phosphoramidate mustard and cognate *N*-phosphorylated derivatives of *N,N*-bis(2-chloroethyl)amine. *J Med Chem* 25:1347-1357
195. Kenten J, Von Borstel R, Casadei J, Kamireddy B, Martin M, Massey R, Napper A, Simpson D, Smith R, Titmas R, Williams R (1993) Prodrugs activated by targeted catalytic proteins. WO9302703 PCT US9206530
196. Chen H, Zhang H, McCallum CM, Szoka FC, Guo X (2007) Unsaturated cationic ortho esters for endosome permeation in gene delivery. *J Med Chem* 50:4269-4278
197. Milcent R (2003) Chimie organique hétérocyclique (Structures fondamentales). EDP Science:514-515
198. Hay MP, Atwell GJ, Wilson WR, Pullen SM, Denny WA (2003) Structure-activity relationships for 4-nitrobenzyl carbamates of 5-aminobenz[e]indoline minor groove alkylating agents as prodrugs for GDEPT in conjunction with *E. coli* nitroreductase. *J Med Chem* 46:2456-2466
199. Garrido-Hernandez H, Moon KD, Geahlen RL, Borch RF (2006) Design and synthesis of phosphotyrosine peptidomimetic prodrugs. *J Med Chem* 49:3368-3376
200. Tobias SC, Borch RF (2001) Synthesis and biological studies of novel nucleoside phosphoramidate prodrugs. *J Med Chem* 44:4475-4480
201. Fiorenza F, Abudu A, Grimer RJ, Carter SR, Tillman RM, Ayoub K, Mangham DC, Davies AM (2002) Risk factors for survival and local control in chondrosarcoma of bone. *J Bone Joint Surg Br* 84:93-99
202. Stevens JW (2004) Heterogeneity in growth properties of the rat Swarm chondrosarcoma. *Iowa Orthop J* 24:33-35
203. Hascall GK (1980) Ultrastructure of the chondrocytes and extracellular matrix of the swarm rat chondrosarcoma. *Anat Rec* 198:135-146
204. Wang XL, De Beuckeleer LH, De Schepper AM, Van Marck E (2001) Low-grade chondrosarcoma vs enchondroma: challenges in diagnosis and management. *Eur Radiol* 11:1054-1057
205. Aigner T (2002) Towards a new understanding and classification of chondrogenic neoplasias of the skeleton--biochemistry and cell biology of chondrosarcoma and its variants. *Virchows Arch* 441:219-230
206. Aigner T, Loos S, Inwards C, Perris R, Perissinotto D, Unni KK, Kirchner T (1999) Chondroblastoma is an osteoid-forming, but not cartilage-forming neoplasm. *J Pathol* 189:463-469
-

Références bibliographiques

207. Breitskreutz D, Diaz de Leon L, Paglia L, Gay S, Swarm RL, Stern R (1979) Histological and biochemical studies of a transplantable rat chondrosarcoma. *Cancer Res* 39:5093-5100
208. Chow WA (2007) Update on chondrosarcomas. *Curr Opin Oncol* 19:371-376
209. Mcguigan C, Narashiman P (1993) Synthesis of Some Amino Acid Linked Nitrogen Mustard Derivatives. *Synthesis* 3:311-314
210. Borch RF, Valente RR (1991) Synthesis, activation, and cytotoxicity of aldophosphamide analogues. *J Med Chem* 34:3052-3058
211. Wilder Smith AE, Frommel E (1962) The preparation of some 1,3,4-oxadiazol-2-ols and oxadiazol-2-thiols active as tuberculostatics. *Arzneimittelforschung* 12:485-487
212. Drain DJ, Martin DD, Mitchell BW, Seymour DE, Spring FS, From Journal of the Chemical Society (1949) -LU, Database: CAPLUS (1949) 4-Aminosalicylic acid and its derivatives *J Chem Soc*:1498-1503