HAL
open science

Développement d'outils bimodaux pour l'imagerie oncologique in vivo exploitant les modalités optique et nucléaire.

Morgane Detraz

To cite this version:

Morgane Detraz. Développement d'outils bimodaux pour l'imagerie oncologique in vivo exploitant les modalités optique et nucléaire.. Autre. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR138 . tel-02875411

HAL Id: tel-02875411

https://theses.hal.science/tel-02875411

Submitted on 19 Jun 2020

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.

Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

Spécialité CHIMIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Développement d'outils bimodaux pour l'imagerie oncologique *in vivo* exploitant les modalités optique et nucléaire

Development of bimodal *in vivo* oncologic imaging agent relying on optical and nuclear modalities

Présentée et soutenue par
DETRAZ Morgane

Thèse soutenue publiquement le Mercredi 10 Juillet 2019 devant le jury composé de		
BLUET Guillaume	Senior Research Investigator SANOFI	Examinateur
BOHN Pierre	Praticien Hospitalier – Radiopharmacien Centre Henri Becquerel	Directeur de thèse
DEMEUNYNCK Martine	Directrice de recherches Université Grenoble Alpes	Rapportrice
GAUTIER Arnaud	Maître de conférences ENS PSL Université Paris	Examinateur
HAEFELE Alexandre	Maître de conférences Université de Rouen Normandie	Membre invité (Encadrant)
MELNYK Oleg	Directeur de recherches Institut Pasteur de Lille	Président
RENARD Pierre-Yves	Professeur Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
SALAUN Mathieu	Maître de conférences – Praticien Hospitalier Université de Rouen Normandie	Membre invité (Collaborateur)
SZLOSEK-PINAUD Magali	Maître de conférences Université de Bordeaux 1	Rapportrice

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Laboratoire Cobra Chimie organique, Bioorganique, Réactivité et Analyse.

Centre de Lutte Contre le Cancer Henri Becquerel unicancer NORMANDIE - ROUEN

*A Titus, fondamentale et inconditionnelle, exceptionnelle et inspirante,
À notre lien unique et inaltérable qui m'aura porté jusqu'à cette épreuve,
Ta force et tes armes me font croire que tout est possible,
Je ne saurais jamais te rendre tout ce que tu m'as sacrifié, appris et apporté,
Infiniment, merci Maman.*

A mes précieux amis, talentueux et bienveillants, immergés et émergeants,
Je me sens si chanceuse d'avoir croisé vos routes et d'avoir partagé avec vous cette incroyable aventure,
Vous êtes, pour moi, les cosignataires de cette thèse, tant votre contribution aura été déterminante,
Vous y avez, trop souvent, cru bien plus que moi.

A mon papy, avec qui j'aurais voulu partager tellement plus de temps.

A mes directeurs de thèse et encadrant, pour avoir fait émerger ce projet qui,
jusqu'à ces dernières lignes, m'aura fait grandir,
Je vous suis reconnaissante pour votre pédagogie et votre confiance,
Pour m'avoir initié à votre passion de la recherche et permis de découvrir la mienne.

« Piti piti, toti ka monté montan »
Proverbe créole guyanais

*Si l'ascension est audacieuse, si la chute est vertigineuse, si les vagues nous immergent,
Si le doute et la peur nous assaillent, si l'épuisement et la souffrance nous abattent,
Si l'effondrement et la résignation nous menacent, si les sentiments nous bouleversent,
Alors, nous devons gravir et aimer, survivre et soutenir,
Intensément et constamment, silencieusement mais redoutablement, courageusement et sincèrement,
À s'y perdre,
Car, quoi qu'il advienne,
La défaite et la douleur ou la victoire et la fierté,
Feront de nous de plus féroces combattantes ou de souveraines conquérantes.*

Abréviations, acronymes et anglicismes

Å	ångström
abs	absorbance
Ac	acétate
ACN	acétonitrile
ADP	adénosine diphosphate
Ala A	alanine
Asp D	acide aspartique
ATP	adénosine triphosphate
AU	unité arbitraire
B	brillance
BHQ	black hole quencher
Boc	*tert*-butyloxycarbonyl
CASPASE	cysteine-dependent aspartate-directed protease
CuAAC	copper-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition
Cy	cyanine
Cys C	cystéine
d	jours
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCM	Dichloromethane
Dde	1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl
DIPEA	*N*,*N*-diisopropylethylamine
Dmab	4-(*N*-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)-3-methylbutyl]-amino)benzyl
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
em	emission
eq.	equivalent
Et	éthyle
EtOH	éthanol
Exc	excitation
Exc/Em	longueur d'onde d'excitation appliquée et longueur d'émission associée pour collecter la réponse photonique
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	förster resonance energy transfer
Glu E	acide glutamique
Gly G	glycine
h	heure
HBTU	*N*-[(1*H*-benzotriazol-1-yl)(dimethylamino)-methylene]-*N*-methylmethanaminium hexa, 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HOBt	1-hydroxybenzotriazole

HRMS	high resolution mass spectroscopy
ICG	indocyanine green
K_{cat}	constante catalytique
K_M	constante de Michaelis-Menten
LC-MS	liquid chromatography - mass spectroscopy
LRMS	low resolution mass spectroscopy
Lys K	lysine
M	mol/L
MAG3	benzoylmercaptoacetyltriglycine
MBHA resin	4-methylbenzhydrylamine resin
Me	méthyle
min	minutes
MOMIA	monomolecular multimodality imaging agent
MS	mass spectroscopy
MW	microwave irradiation
MW	molecular weight
n	numéro du composé
NHS	*N*-hydroxysuccinimide
NIR	near infra-red
nm	nanomètres
NMP	1-methylpyrrolidin-2-one
$NOBF_4$	nitrosonium tetrafluoroborate
n^S	numéro du composé supporté
NSCLC	non-small cell lung cancer
PBS	phosphate-buffered saline
pCLE	probe-based confocal laser endomicroscopy
PEG	polyethylene glycol
PET	positron emission tomography
Ph	phényle
Phe F	phénylalanine
QC	quality control
RP-HPLC	reverse phase - high pressure liquid chromatography
RT	température ambiante
RTK	receptor tyrosine kinase
SPAAC	strain-promoted alkyne-azide click chemistry
SPECT	single-photon emission computed tomography
SPPS	solid-phase peptide synthesis
TBTA	tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
^{t}Bu	*tert*-butyl
TEA	triethylamine
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofurane
TIPS	triisopropylsilane

TKI	tyrosine kinase inhibitor
TMI	triméthylindolénine
t_r	temps de rétention
TSTU	*N*,*N*,*N′*,*N′*-tetramethyl-O-(*N*-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate
Tyr Y	tyrosine
UE	unité enzymatique
Val V	valine
ε	coefficient d'absorption molaire
λ_{em}	longueur d'onde d'émission collectant le signal lors de l'acquition des spectres d'excitation
λ_{exc}	longueur d'onde d'excitation appliquée lors de l'acquition des spectres d'émission
λ_{MAX} Abs	longueur d'onde maximale d'absorption
λ_{MAX} Em	longueur d'onde maximale d'émission
Φ_F	rendement quantique de fluorescence

TABLE DES MATIERES

1. Les modalités nucléaire et optique pour l'imagerie diagnostique oncologique *in vivo* 13

1.1. L'imagerie nucléaire 14

1.2. L'imagerie optique de fluorescence 16

1.2.1. L'exploitation de l'imagerie optique de fluorescence en chirurgie guidée 18

1.2.1.1. Approche non ciblée 20

1.2.1.2. Approche ciblée 22

1.2.1.2.1. Approche ciblée always-ON 22

1.2.1.2.2. Approche ciblée turn-ON 24

1.2.1.2.2.1. Quenching par modification structurale du fluorophore 25

1.2.1.2.2.2. Quenching par FRET 26

1.3. La bimodalité nucléaire et optique 29

1.3.1. Considérations stratégiques pour la conception d'outils bimodaux 30

2. Développement de la plateforme moléculaire bimodale clickable polyvalente 31

2.1. Présentation 31

2.2. La modalité optique 33

2.2.1. Le bipode fluorescent $Cy5.0_A$ 36

2.2.1.1. Stratégie de synthèse 36

2.2.1.2. Synthèse 37

2.2.1.2.1. Formation des sels d'indolium 37

2.2.1.2.2. Synthèse de (hémi-)cyanine 37

2.2.1.3. Etude des propriétés spectroscopiques 39

2.2.2. Synthèse d'une librairie de Cy5.0 dissymétriques 39

2.3. La modalité nucléaire 41

2.3.1. Le tétrapeptide chélatant Fmoc-(Me)FGC(S^tBu)K-NH_2 43

2.3.1.1. Stratégie de synthèse 43

2.3.1.2. Synthèse 44

2.4. La plateforme bimodale clickable H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$ 45

2.4.1. Synthèse 45

2.4.2. Etude des propriétés spectroscopiques 47

2.5. Conclusion et perspectives 48

3. Développement de sondes bimodales spécifiques de la caspase-3 pour imager l'apoptose 49

3.1. La caspase-3, biomarqueur de l'apoptose 49

3.2. Imager une réponse apoptotique via la détection de l'activité enzymatique de la caspase-3 dans un contexte oncologique 51

3.2.1. Stratégies générales de détection enzymatique 51

3.2.1.1. Modalité optique 52

3.2.1.1.1. Sondes-suicide 52

3.2.1.1.2. Sondes-substrat 55

3.2.1.2. Modalité nucléaire 59

3.2.1.3. Bimodalité optique et nucléaire 60

3.3. Objectifs et stratégies 64

3.4. Sonde de première génération 67

3.4.1. Présentation de P1 (Probe 1) 67

3.4.2. Synthons constitutifs de P1 69

3.4.2.1. Le quencher BHQ3$_A$ 69

3.4.2.2. L'heptapeptide bifonctionnalisable Ac-KDEVDAK(Dde)-NH$_2$ 70

3.4.2.2.1. Stratégie de synthèse 70

3.4.2.2.2. Synthèse 72

3.4.3. Synthèse de P1 à partir des trois synthons Ac-KDEVDAK(Dde)-NH$_2$, Cy5.0$_B$ et BHQ3$_A$ 74

3.4.4. Validation *in vitro* 77

3.4.4.1. Etude des propriétés spectroscopiques du couple fluorophore/quencher 77

3.4.2.2. Tests *in vitro* 79

3.4.2.3. Evaluation de la stabilité 81

3.5. Sonde de seconde génération 82

3.5.1. Présentation de P2 (Probe 2) 82

3.5.2. Synthons constitutifs de P2 84

3.5.2.1. L'heptapeptide trifonctionnalisable H-D(ODmab)E(ODmab)VD(ODmab)AC(S^{t}Bu)G-OH 84

3.5.2.1.1. Stratégie de synthèse 84

3.5.2.1.2. Synthèse....88

3.6. Sonde de troisième génération....92

3.6.1. Présentation de P3 (Probe 3) 92

3.6.2. Synthons constitutifs de P3 94

3.6.2.1. L'octapeptide trifonctionnalisable pentynoyl-DEVDAKE(ODmab)F-NH_2 94

3.6.2.1.1. Stratégie de synthèse 94

3.6.2.1.2. Synthèse....96

3.6.3. Synthèse de P3 à partir de pentynoyl-DEVDAKE(ODmab)F-NH_2, $BHQ3_A$ et H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0_A)-NH_2 98

3.6.4. Vers une validation biologique *in vitro* anticipée du précurseur 22....108

3.7. Conclusion et perspectives 110

4. Développement de dérivés marqués d'inhibiteur de tyrosine kinase comme outils théranostiques prédictifs d'évaluation de la réponse tumorale déterminant l'accès aux thérapies ciblées 113

4.1. L'implication des récepteurs transmembranaires dans les voies de signalisation cellulaire 113

4.1.1. Les récepteurs à tyrosine kinase 115

4.1.2. Le rôle des TKR dans la carcinogenèse et les stratégies d'inhibition associées....116

4.2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR (TKI-EGFR) et leurs modalités d'indication....118

4.3. L'exploitation d'analogues de TKI (erlotinib) marqués pour l'imagerie 122

4.3.1. L'exploitation d'analogues d'erlotinib radiomarqués pour l'imagerie nucléaire 122

4.3.2. L'exploitation d'analogues d'erlotinib fluorescents pour l'imagerie optique 124

4.3.2.1. Approche indirecte 124

4.3.2.2. Approche directe 126

4.3.3. Conception et synthèse d'analogue d'erlotinib bimodal radioactif et fluorescent pour l'imagerie bimodale nucléaire et optique....132

4.4. Conclusion et perspectives 137

5. Conclusion et perspectives 138

5.1. Conclusion générale 138

5.2. Perspectives 140

5.2.1. La plateforme bimodale clickable 140

5.2.2. Le bipode fluorescent 140

5.2.3. Les éléments de ciblage cickables 140

5.2.4. Approche théranostique 141

6. Partie expérimentale 143

General procedures 145

1-(5-carboxypentyl)-2,3,3-trimethyl-3*H*-indol-1-ium bromide **1** 146

1-azido-6-iodohexane **2** 147

1-(6-azidohexyl)-2,3,3-trimethyl-3*H*-indol-1-ium iodide **3** 148

1-(6-azidohexyl)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(5-carboxypentyl)-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3*H*-indol-1-ium **Cy5.0$_A$** 149

Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$ 154

H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$ 155

(E)-3-((4-((3-carboxypropyl)(methyl)amino)phenyl)diazenyl)-7-(diethylamino)-5-phenylphenazin-5-ium **BHQ3$_A$** 158

Ac-KDEVDAK(Dde)-NH$_2$ 160

Ac-K(Cy5.0$_B$)DEVDAK(Dde)-NH$_2$ 162

Ac-K(Cy5.0$_B$)DEVDAK(BHQ3$_A$)-NH$_2$ P1 164

Pentynoyl-DEVDAKEF-NH$_2$ **20** 167

H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$-21)-NH$_2$ **22** 169

2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-(4-(3-((6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-yl)amino)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indol-1-ium-5-sulfonate **24** 171

2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-(4-(3-((6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-yl)amino)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-1-(5-carboxypentyl)-3,3-dimethyl-3*H*-indol-1-ium **25** 174

H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$-erlotinib)-NH$_2$ **26** 177

H-(Me)FGCK(Cy5.0$_A$-erlotinib)-NH$_2$ **27** 179

28 181

29 182

Références bibliographiques 184

1. LES MODALITES NUCLEAIRE ET OPTIQUE POUR L'IMAGERIE DIAGNOSTIQUE ONCOLOGIQUE *IN VIVO*

L'établissement du diagnostic oncologique, c'est-à-dire l'identification de la nature et de la cause du cancer, doit être fiable et précis. La qualité de cette première étape de prise en charge est déterminante pour le pronostic du patient car elle conditionne l'indication de la stratégie curative associée.

Ce diagnostic oncologique s'appuie sur plusieurs techniques de détection, ou modalités, permettant d'imager la tumeur à différentes échelles. Parmi ces différentes techniques, l'imagerie nucléaire permet l'obtention d'une image fonctionnelle et anatomique à l'échelle macroscopique, tandis que l'imagerie optique informe sur le développement tumoral à l'échelle moléculaire.

La qualité de la détection repose sur les paramètres intrinsèques de chaque modalité (résolution, sensibilité, profondeur), associée à l'utilisation d'agents de contraste compatibles.

Par exemple, l'imagerie nucléaire exploite des molécules radioactives, ou radiotraceurs, tandis que l'imagerie optique de fluorescence utilise des molécules fluorescentes.

Ces molécules de contraste, administrées aux patients, génèrent un signal dont la détection permettra, après acquisition, l'obtention d'une image analysable par le praticien.

Un contraste tumoral optimal est obtenu lorsqu'une différence est observée entre un tissu cancéreux et un tissu sain. Ce paramètre de contraste est défini par un ratio signal/bruit (SBR : Signal to Background Ratio). La qualité du diagnostic est corrélée à un SBR élevé.[1,2]

Quelle(s) que soi(en)t la (ou les) modalité(s) exploitée(s), deux conditions principales sont requises pour l'obtention d'une image tumorale contrastée :

- Une biodistribution homogène du traceur : si l'administration est effectuée par voie intraveineuse, la circulation sanguine est exploitée pour assurer une diffusion homogène de la molécule dans l'organisme.
- Une rétention spécifique du traceur au sein des cellules cancéreuses permettant une accumulation du signal, les tumeurs étant généralement vascularisées de manière plus importante.

L'efficacité d'un agent de contraste repose sur sa capacité à discriminer les cellules cancéreuses au sein d'un tissu ou d'un organisme donné, en ciblant spécifiquement les caractéristiques morphologiques, métaboliques, cellulaires ou moléculaires tumorales.

La discrimination cellulaire s'appuie généralement sur les mutations génétiques présentées par les cellules cancéreuses, notamment la surexpression protéique. Ces protéines constituent alors des biomarqueurs oncogéniques cibles car leur nombre de copies, pathologiquement augmentées dans les cellules cancéreuses, permet proportionnellement l'acquisition d'un signal plus élevé.

Idéalement, un contraste optimal est obtenu si ces protéines sont exclusivement exprimées par les cellules cancéreuses.

Si ces biomarqueurs cibles sont également exprimés par les cellules saines environnantes, un signal résiduel correspondant au bruit de fond de la réponse tumorale réduira le SBR.

Ces biomarqueurs protéiques sont généralement des récepteurs ou des enzymes, détectés à l'aide de sondes exogènes marquées, compétitives aux ligands endogènes.

Ces agents de contraste, associés à leur modalité d'imagerie correspondante, permettent *in fine* aux praticiens de localiser et visualiser la tumeur, de diagnostiquer son stade de développement et d'établir une stratégie curative. Cette combinaison modalité/sonde contribue donc à la précision et la fiabilité du diagnostic oncologique.

Dans un premier temps, nous définirons la modalité nucléaire, appliquée au diagnostic oncologique en médecine nucléaire, puis l'imagerie optique, exploitée dans un contexte intraopératoire via la chirurgie guidée par fluorescence. Une sélection d'exemples sera présentée afin d'illustrer les différents principes conceptuels impliqués et les applications associées.

1.1. L'IMAGERIE NUCLEAIRE

L'imagerie nucléaire est une technique privilégiée pour le diagnostic car la détection du signal radioactif est non-invasive.[3] La profondeur de détection illimitée permet la reconstruction d'une image en trois dimensions du corps entier. Le principal inconvénient de l'imagerie nucléaire repose sur les molécules contrastantes utilisées. Ces radiopharmaceutiques, émetteurs de radioactivité, exposent les patients (et le personnel médical) aux rayonnements ionisants, bien qu'inférieurs à l'exposition lors d'un examen radiologique (scanner).

L'imagerie nucléaire distingue deux modalités selon les propriétés nucléaires intrinsèques de l'isotope exploité.

Le type de rayonnement émis, l'énergie associée et la période radioactive ou demi-vie caractérisent les noyaux radioactifs.

La tomographie scintigraphique à émission monophotonique (SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography) repose sur la détection de rayons γ émis par le radionucléide.

Le ^{99m}Tc, pour ses propriétés nucléaires (temps de demi-vie de 6 heures, mode de désintégration par transition isomérique), est l'isotope le plus utilisé en examens SPECT. Les caméras γ, calibrées sur son énergie de rayonnement (141 keV), détectent le signal émis par rotation autour du sujet. (Figure 1)

Le ^{99m}Tc est généralement coordiné au sein d'une molécule vectrice par une structure chélatante, formant un complexe métallique stable avant son administration par voie intraveineuse. Ainsi, les radiotraceurs technéciés sont préparés *ad hoc* par addition d'un volume de perchnétate de sodium ($^{99m}TcO_4Na$) à un kit stérile contenant le précurseur à radiomarquer.

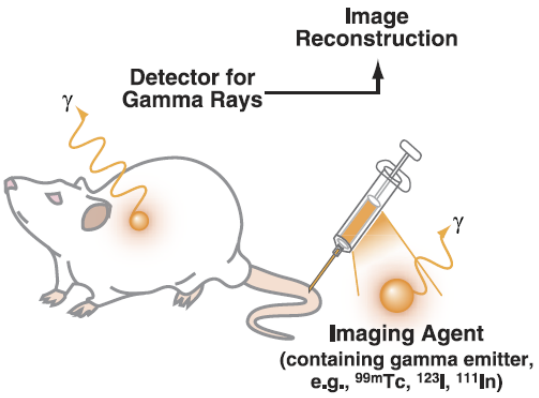


Figure 1 : Exploitation de radiotraceurs pour l'imagerie μ-SPECT[2]

La tomographie par émission de positons (PET : Positron Emission Tomography) exploite des isotopes émetteurs de positons β^+ de plus forte énergie que le rayonnement γ et de demi-vie brève.

Par exemple, le ^{18}FDG est un radiopharmaceutique indiqué pour imager un large spectre de cancers à différents stades. Ce dérivé glucidique radiofluoré, compétitif au glucose, est internalisé, retenu et accumulé dans les cellules cancéreuses présentant un métabolisme augmenté comparativement aux cellules saines environnantes, impliquant notamment la surexpression des transporteurs GLUT-1. (Figure 2)

L'accumulation du traceur, également observée dans les organes très consommateurs de glucose comme le muscle cardiaque ou le cerveau, génère le bruit de fond.

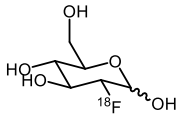


Figure 2 : Structure moléculaire du radiopharmaceutique ^{18}FDG

Les imageries SPECT et TEP sont utilisées en routine en médecine nucléaire pour le diagnostic oncologique.

1.2. L'IMAGERIE OPTIQUE DE FLUORESCENCE

Les molécules fluorescentes, exploitées en imagerie optique, présentent différentes propriétés spectroscopiques. En effet, sous irradiation photonique, un fluorophore présente :

- Des propriétés d'absorption correspondant à la promotion d'un électron photo-excité, occupant initialement un niveau énergétique fondamental S_0, vers un niveau excité de plus haute énergie S_1. (Figure 3)
- Des propriétés émissives correspondant au retour de cet électron vers le niveau énergétique fondamental initial.

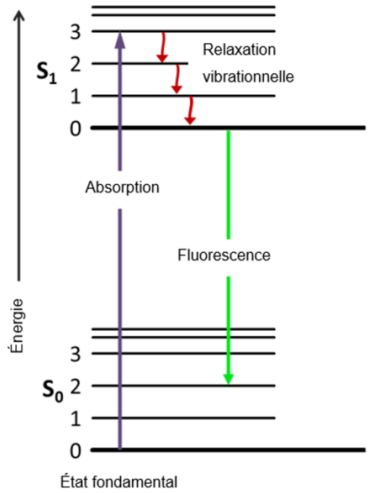


Figure 3 : Diagramme de Perrin-Jablonski simplifié

Ces propriétés spectroscopiques sont expérimentalement mesurées via :

- Le spectre d'absorption, caractérisé par une longueur d'onde maximale d'absorption λ_{MAX} Abs, permet de déterminer les longueurs d'ondes auxquelles la molécule absorbe l'énergie photonique.
- Le spectre d'émission, caractérisé par une longueur d'onde maximale d'émission λ_{MAX} Em, représente la réponse radiative obtenue en photo-excitant la molécule à une longueur d'onde donnée.
- Le spectre d'excitation est obtenu en détectant et collectant la réponse radiative fluorescente à une longueur d'onde donnée après photo-excitation sur l'ensemble de la gamme spectrale.
- Le déplacement de Stokes est la différence entre les maxima d'émission et d'absorption.
- Le coefficient d'absorption molaire (anciennement d'extinction) ε renseigne sur la capacité de la molécule à absorber l'énergie photonique.
- Le rendement quantique de fluorescence Φ_F est défini par le ratio du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Expérimentalement, il est déterminé de façon absolue ou relative par rapport à un fluorophore standard décrit.
- L'efficacité de fluorescence ou brillance B est proportionnelle au coefficient d'absorption molaire et au rendement quantique de fluorescence ($B = \varepsilon.\Phi_F$). Il s'agit du paramètre le plus informatif pour l'imagerie.

L'exploitation des fluorophores (et chromophores) dans un cadre biologique *in vivo* se limite à une gamme spectrale spécifique. En effet, les protéines (via les amino-acides aromatiques), les cofacteurs et les structures porphyriques métallochélatantes (hémoglobine, myoglobine, rubiline) présentent des propriétés spectroscopiques d'absorption puis d'émission sur l'ensemble de la gamme spectrale. (Figure 4)

En effet, l'absorption des tissus et leur autofluorescence génèrent un signal bruité résiduel permanent. Celui-ci est minimum dans la fenêtre de transparence biologique, étendue de 650 à 900 nm, correspondant à la gamme du proche infra-rouge (NIR : Near Infra Red). L'imagerie *in vivo* impose l'exploitation de fluorophores présentant des propriétés d'émission incluses dans cette gamme spectrale afin de limiter la superposition des signaux endogènes et exogènes.[4,5] Par ailleurs, les fluorophores émettant dans le vert (500-550 nm environ) peuvent également trouver une application biologique, toutefois restreinte à l'imagerie de surface permettant d'imager des structures superficielles.

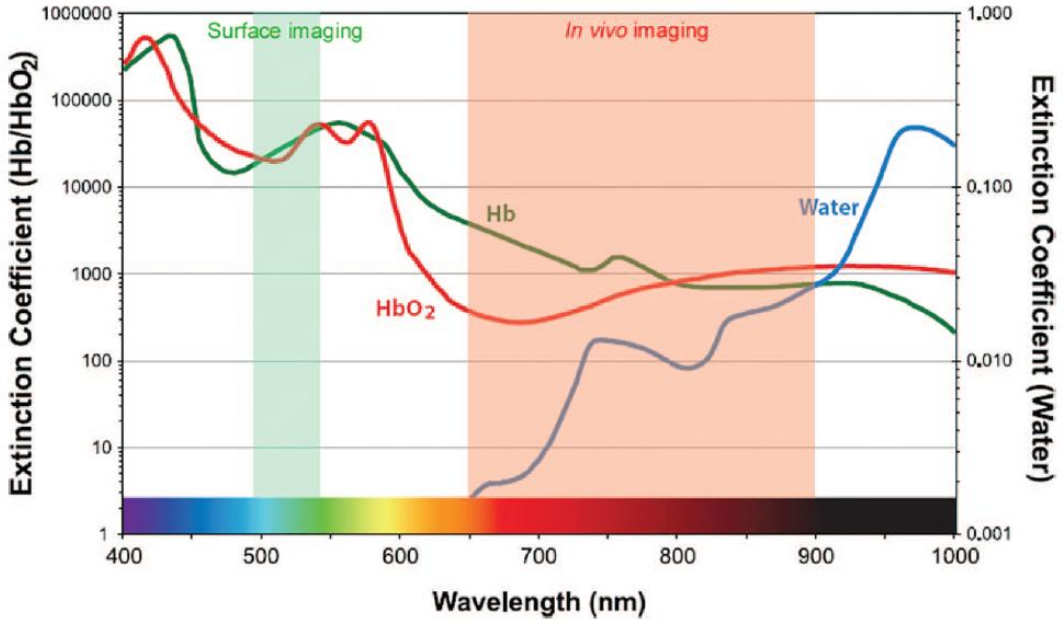


Figure 4 : Spectres d'absorbance de l'oxyhémoglobine, de l'hémoglobine et de l'eau et gammes spectrales de transparence associées[6]

1.2.1. L'EXPLOITATION DE L'IMAGERIE OPTIQUE DE FLUORESCENCE EN CHIRURGIE GUIDEE

Alternativement aux chimio-, radio- et immuno-thérapies, la résection tumorale constitue la stratégie curative la plus efficace.

L'enjeu principal repose sur l'évaluation et la définition des marges, frontières cellulaires séparant les cellules cancéreuses des cellules saines.

L'appréciation macroscopique et l'analyse histopathologique de la tumeur durant l'exérèse guident le geste chirurgical du praticien. Néanmoins, ces informations anatomopathologiques, issues de l'examen extemporané, sont parfois insuffisantes, entraînant une résection tumorale partielle. On parle alors de marge d'exérèse chirurgicale positive, observée dans le cas d'extension tumorale importante. Cette marge positive est associée à un risque élevé de récidive.

A l'inverse, une marge négative correspond à une tumorectomie complète incluant des cellules saines au contact de cette marge.

Ces deux approches sont associées à un pronostic faible. En effet, une marge positive entraine généralement une récidive locale puis disséminée, tandis qu'une marge négative affecte des tissus sains avec des effets secondaires conséquents, notamment dans le cas de lésions tumorales cérébrales ou pulmonaires.

Dans un contexte intraopératoire, l'imagerie optique de fluorescence est une modalité privilégiée car elle offre une détection spatiale et temporelle hautement résolutive associée à une excellente sensibilité. Via l'exploitation de traceurs fluorescents, elle facilite ainsi la visualisation des lésions tumorales et participe à la définition de marges d'exérèse, guidant le geste chirurgical plus précisément.[7–9] (Figure 5)

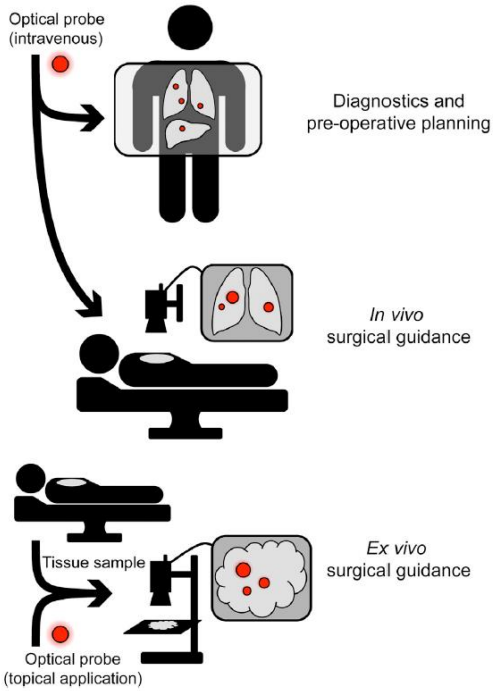


Figure 5 : Applications diagnostique, pré-opérative, intraopératoire et post-opératoire de l'imagerie optique[10]

Ces molécules fluorescentes de contraste sont exploitées selon deux stratégies conceptuelles opposées.

L'approche non spécifique exploite des molécules fluorescentes ne ciblant pas préférentiellement les biomarqueurs oncogéniques. Néanmoins, les différences morphologiques tumorales peuvent être imagées, notamment la vascularisation, plus importante et anarchique au sein des cellules tumorales.

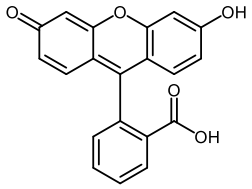
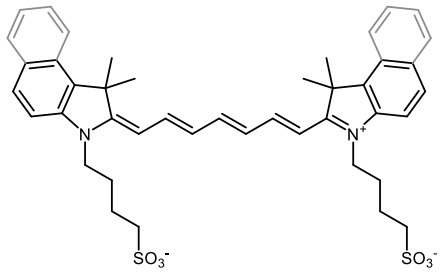
A l'inverse, l'approche ciblée s'appuie sur un élément moléculaire de ciblage ou de vectorisation interagissant spécifiquement avec ces biomarqueurs protéiques.[11]

1.2.1.1. APPROCHE NON CIBLEE

Parmi les quatre fluorophores approuvés par les autorités sanitaires et indiqués en chirurgie guidée de routine, l'indocyanine green (ICG) et la fluorescéine permettent une visualisation de la vascularisation tumorale par diffusion homogène dans le système circulatoire. (Figure 6)

La fluorescéine sodique est indiquée lors d'examens ophtalmiques de la surface oculaire. De même, les angiographies fluorescéiniques exploitent ce fluorophore par voie injectable.

L'indocyanine green (ICG), unique fluorophore émettant dans le NIR, est indiqué lors d'angiographies oculaires ou d'explorations fonctionnelles hépatique et cardiaque.

Noms	Fluorescéine	ICG
Structures moléculaires		
Exc/Em	497/516	788/813

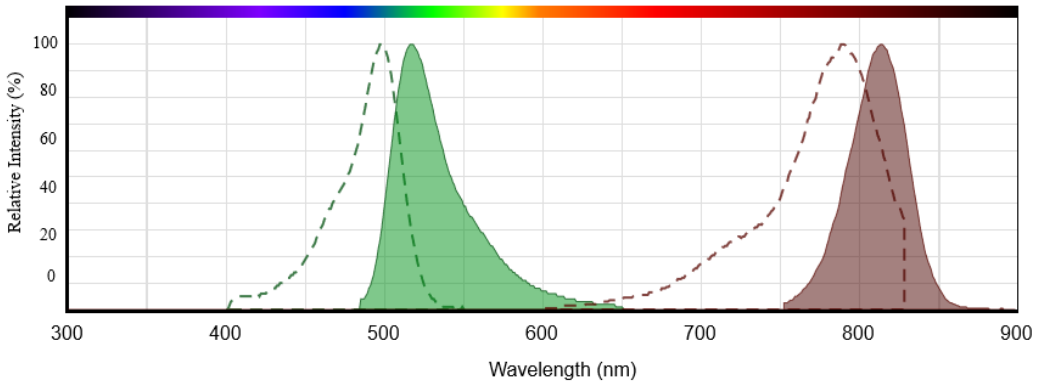


Figure 6 : Propriétés spectroscopiques de la fluorescéine et de l'ICG
Exc : longueur d'onde maximale d'excitation (nm)
Em : longueur d'onde maximale d'émission (nm)

1.2.1.2. APPROCHE CIBLEE

Généralement, l'exploitation d'un fluorophore seul ne permet pas de générer une image tumorale contrastée.

Dans le contexte de développement clinique d'outils fluorescents performants, l'approche ciblée permet d'augmenter le signal et/ou de réduire le bruit de fond. Deux stratégies conceptuelles se distinguent :

- Les sondes fluorescentes always-ON associent l'élément de ciblage ou de vectorisation à un reporteur fluorescent émissif.
- Les sondes quenchées activables turn-ON repose sur des mécanismes de quenching commutatif.

1.2.1.2.1. APPROCHE CIBLEE ALWAYS-ON

Cette stratégie image généralement des récepteurs par fixation d'un analogue compétitif, mimant le ligand endogène et leurrant le récepteur. Ce traceur exogène fluorescent est obtenu par conjugaison du substrat naturel ou d'un dérivé affin à un fluorophore donné.

Dans le cadre de l'imagerie tumorale intraopérative, les fluorophores dérivés de l'ICG sont généralement privilégiés pour leurs propriétés émissives dans le NIR et leur biocompatibilité. Des modifications structurales du fluorophore, c'est-à-dire l'introduction de site de ligation, permettent le couplage à la biomolécule cible. (Chapitre 2.2.)

Cette stratégie a été étendue au marquage d'anticorps. Par exemple, le cetuximab (erbitux) est un anticorps antinéoplasique exploité en immunothérapie et indiqué dans les traitements du cancer colorectal métastasique et carcinomes de la tête et du cou. Cette immunoglobuline monoclonale chimérique est dirigée contre le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR : epidermal growth factor receptor) surexprimé par les cellules tumorales (Chapitre 4.).

L'interaction spécifique ligand/récepteur (cetuximab/EGFR), générant une activité thérapeutique cytotoxique, a été exploitée dans un contexte pré-clinique intraopératoire. Couplé à un dérivé d'ICG (IRDye 800CW), l'anticorps marqué fluorescent Cetuximab-IRDye800 a été testé en tant qu'agent de contraste tumoral pour guider la navigation chirurgicale et l'exérèse de tumeurs de la tête et du cou sur des primates[12] puis des patients humains[13]. (Figure 7, Figure 8)

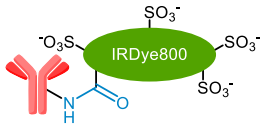
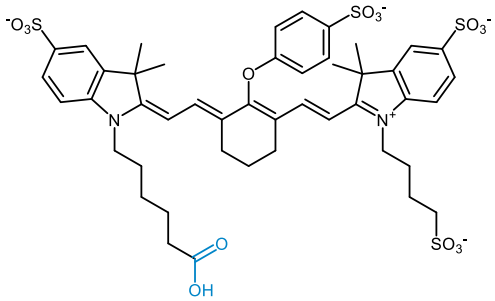
Nom	Cetuximab-IRDye800
Cible	EGFR
Représentation simplifiée de la sonde	
Modalité optique	
Structure moléculaire	
Dénomination	IRDye 800CW
Exc/Em	773/792

Figure 7 : Carte d'identité de la sonde fluorescente always-ON Cetuximab-IRDye800[13]
Exc : longueur d'onde maximale d'excitation (nm)
Em : longueur d'onde maximale d'émission (nm)

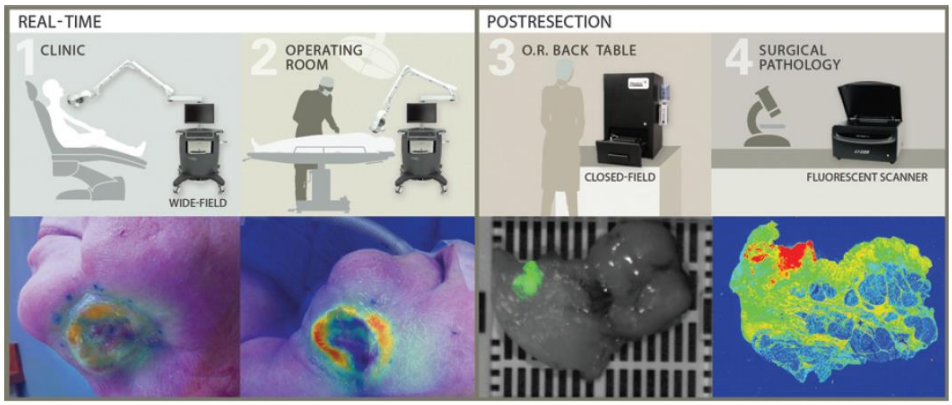


Figure 8 : Images pré-, intra- et post-opératoires obtenues par assistance du Cetuximab-IRDye800 lors de résections tumorales du cou et de la tête[13]

Ces traceurs fluorescents peuvent être accessibles en une étape de couplage entre le fluorophore et le ligand.
L'exploitation efficace de ces outils est conditionnée par différents paramètres :

- Une affinité et une sélectivité importantes pour la cible (généralement élevées pour les anticorps)
- Une étape de rinçage et/ou un temps d'excrétion afin d'éliminer les molécules non fixées, permettant l'augmentation du SBR.

Dans un contexte intraopératoire, cette dernière limitation est palliée par le mode d'administration des traceurs. En effet, la voie intraveineuse est généralement privilégiée car un délai est nécessaire pour la biodistribution homogène de la sonde et son accumulation dans les tissus cibles, générant un SBR exploitable. L'injection est donc effectuée quelques heures avant l'intervention.
Une approche alternative, plus élaborée, a été développée afin d'éviter le bruit généré par ces sondes non fixées. Cette stratégie turn-ON s'oppose à cette précédente approche always-ON.

1.2.1.2.2. APPROCHE CIBLEE TURN-ON

Contrairement aux noyaux radioactifs, les propriétés fluorescentes des molécules émissives peuvent être modulées par différents mécanismes d'extinction ou quenching.
Opposée à l'approche always-ON, la déclinaison turn-ON est généralement privilégiée pour la détection enzymatique. En effet, les sondes activables turn-ON recouvrent leurs propriétés émissives suite à l'activité catalytique de l'enzyme cible selon deux stratégies conceptuelles opposées[14] : (Chapitre 3.)

- Les sondes-suicide activables (ou quenched activity-based probe), inhibant l'activité catalytique de la cible, permettent une détection enzymatique directe, ratiométrique et localisée.
- Les sondes-substrat (ou substrate-based probe) clivées par l'enzyme sans inhibition de son activité catalytique, ni marquage de celle-ci. Cette approche indirecte non fluorométrique est privilégiée en chirurgie guidée par fluorescence car le contraste est obtenu par accumulation du signal, l'enzyme pouvant cliver plusieurs molécules de substrat en fonction de ses paramètres enzymatiques (turn-over enzymatique).

L'état natif de la sonde correspond à la molécule administrée, généralement éteinte ou non fluorescente, tandis que la structure émissive est générée après l'action catalytique de l'enzyme. L'extinction puis la restauration et l'exaltation du signal de fluorescence caractérisent la détection fluorogénique profluorescente.
La modulation des propriétés émissives de ces molécules est régie par différents mécanismes d'extinction (quenching), dont :

- La modification structurale du fluorophore
- Le FRET (Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfert), associant le fluorophore à un quencher

1.2.1.2.2.1. QUENCHING PAR MODIFICATION STRUCTURALE DU FLUOROPHORE

Ce mécanisme d'extinction s'appuie sur une variation structurale du fluorophore présentant une structure émissive et non émissive. Cette extinction de la fluorescence est généralement la conséquence d'une rupture de l'aromaticité, nécessaire à l'émission.

L'activité protéasique de l'enzyme cible restaure les propriétés émissives du fluorophore. Cette réponse enzymatique est corrélée à un contraste tumoral permettant d'imager les lésions cancéreuses.

Les rhodamines, dérivés azotés de la fluorescéine, présentent une structure non émissive spirolactonique et une structure émissive ouverte. L'ouverture de cette forme cyclisée éteinte, induite par l'action protéasique de l'enzyme cible, génère une exaltation du signal de fluorescence.

Cette approche a été largement étudiée par le groupe de Yasuteru Urano pour la détection de multiples enzymes (cathépsine[15], hepsine et matriptase[16]).

Parmi ces différentes cibles enzymatiques, la γ-glutamyltranspeptidase, surexprimée dans différents cancers (carcinomes, lymphomes), a été couplée à l'hydroxymethylrhodamine green (HMRG), dérivé hydroxybenzylique de la rhodamine 110.[17] (Figure 9)

La gamme d'émission de l'HMRG restreint son utilisation à l'imagerie de surface et à l'observation superficielle des tumeurs. Néanmoins, cette limitation a été exploitée pour proposer un mode d'administration innovant : l'application topique en spray lors de la prise de décision d'exérèse.

Les résultats obtenus sur le petit animal sur un large spectre de cancers (cancers ovariens[17], hépatique[18] et lymphoïdes[19]) soulignent la polyvalence de cet outil.

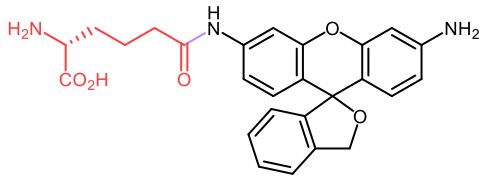
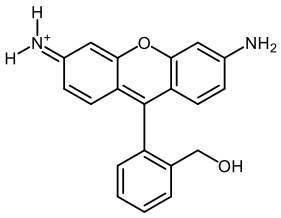
Nom	γGlu-HMRG
Cible	γ-glutamyl transpeptidase
Représentation simplifiée de la sonde	
Modalité optique	
Structure moléculaire	
Dénomination	HMRG
Exc/Em	499/521

Figure 9 : Carte d'identité de la sonde quenchée turn-ON γGlu-HMRG[17]
Exc : longueur d'onde maximale d'excitation (nm)
Em : longueur d'onde maximale d'émission (nm)

1.2.1.2.2.2. QUENCHING PAR FRET

Le quenching par FRET associe un fluorophore, structuralement émissif, à un quencher ou chromophore, non émissif après photo-excitation. Lorsque ces deux molécules sont spatialement proches (moins de 100 Å), un transfert d'énergie a lieu entre le donneur émissif et l'accepteur non émissif. Ce transfert énergétique a pour conséquence l'extinction du fluorophore, sans modification structurale de celui-ci. Si la distance entre le donneur et l'accepteur est supérieure à 100 Å alors le transfert énergétique s'interrompt, restaurant la capacité émissive du fluorophore donneur.[20]

Ce mécanisme est largement exploité pour la conception de sondes-substrat fonctionnalisées par un fluorophore et un quencher, de part et d'autre du site de clivage enzymatique. La protéolyse enzymatique ainsi génère deux fragments, assurant un éloignement spatial suffisant pour interrompre le FRET.[21]

Par exemple, cette stratégie a été exploitée par le groupe de Matthew Bogyo pour la détection de cathepsines, surexprimées par les cellules cancéreuses et les macrophages présents dans le microenvironnement tumoral.

La sonde 6QC-ICG présente au sein de sa séquence dipeptidique un résidu lysine clé doublement fonctionnalisé par un quencher (via son amine primaire latérale) et par l'ICG (via son extrémité *C*-terminale).[22,23] (Figure 10)

In vivo, le ratio signal/bruit détecté est exploitable et s'appuie sur une stratégie de rétention et d'accumulation lysosomale du fragment fluorescent (LLE : Lysosomal Latent Effect). En effet, la protonation à pH physiologique, de la fonction amine, issue de la liaison amide hydrolysée par l'enzyme, piège le reporteur fluorescent dans le compartiment lysosomal de la cellule cancéreuse.

Ces sondes enzymatiques, comme agents de contraste guidant le geste chirurgical, ont démontré leur performance en condition pré-clinique intraopératoire. (Figure 11, Figure 12)

Ces résultats remarquables sont prometteurs en tests cliniques et mettent en exergue l'importance de la compatibilité des outils moléculaires développés avec les outils de détection approuvés et disponibles en milieu hospitalier.

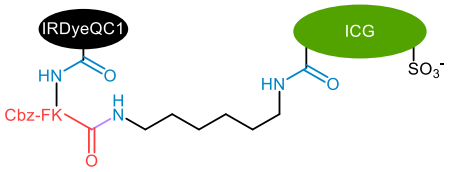
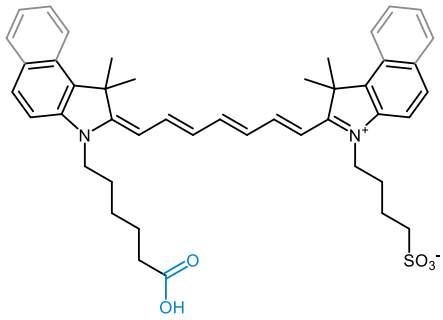
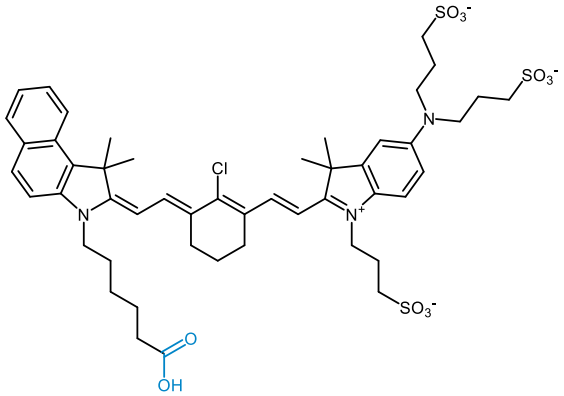
Nom	6QC-ICG	
Cible	Cathepsines	
Représentation simplifiée de la sonde		
Modalité optique	Fluorophore	Quencher
Structures moléculaires		
Dénominations	ICG	IRDyeQC1
Exc/Em	805/835	788/-

Figure 10 : Carte d'identité de la sonde quenchée turn-ON 6QC-ICG[22,23]
Exc : longueur d'onde maximale d'excitation (nm)
Em : longueur d'onde maximale d'émission (nm)

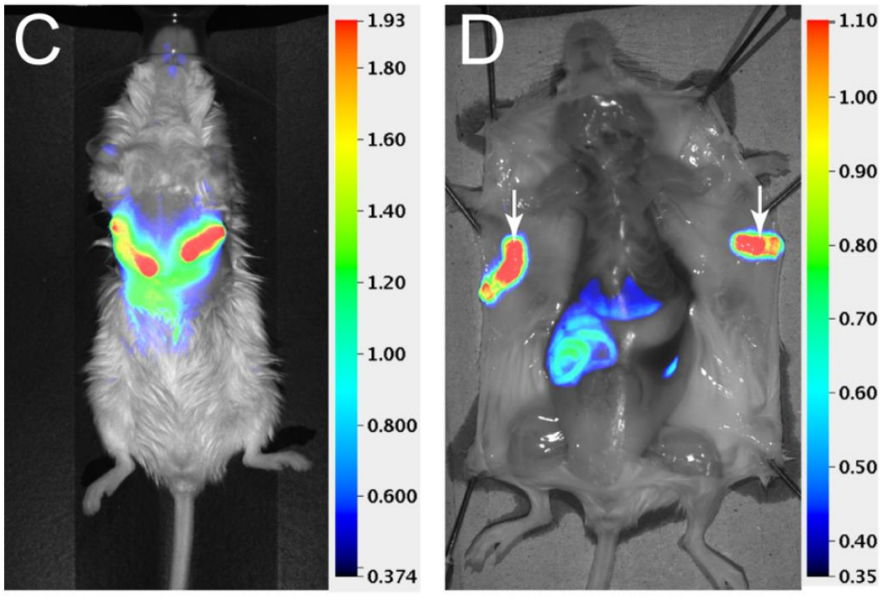


Figure 11 : Imagerie du petit animal obtenue après 90 min d'injection de 25 nmol de 6QC-ICG[23]

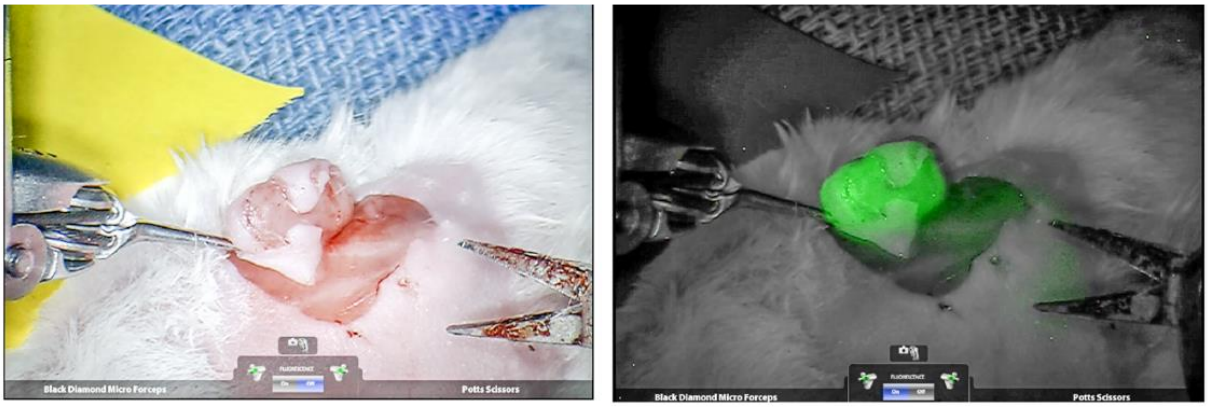


Figure 12 : Images comparatives obtenues pendant la résection tumorale guidée par le 6QC-ICG en lumière blanche (gauche) *versus* détection de fluorescence (à droite)[23]

Ainsi, la modalité nucléaire, pour sa profondeur de détection et sa standardisation, peut être complémentairement associée à la modalité optique, pour sa résolution et sensibilité.

1.3. LA BIMODALITE NUCLEAIRE ET OPTIQUE

Récemment, un type hybride d'imageurs a émergé, combinant plusieurs modalités au sein de la même structure moléculaire. Ces agents multimodaux ou MOMIA (MOnomolecular Multimodality Imaging Agent) constituent la nouvelle génération d'agents de contraste.[24–26]

Ils cumulent les avantages des modalités associées, tout en palliant leurs limitations respectives. L'association de l'imagerie optique et nucléaire permet la génération de sondes bimodales offrant une résolution spatiale et une sensibilité de détection élevées. La modalité nucléaire permet une localisation non invasive de la tumeur et la modalité optique permet sa visualisation à l'échelle cellulaire voire moléculaire. Ces deux avantages sont ainsi cumulés au sein d'une unique structure moléculaire.[27]

L'exploitation séquentielle de ces sondes propose un outil moléculaire diagnostique unique dans le contexte pré-opératoire de la médecine nucléaire et intraopératoire en chirurgie guidée. En effet, dans un premier temps, la scintigraphie permet une localisation et une évaluation tumorale macroscopique non invasive puis, dans un second temps et compte tenu de la décroissance radioactive, une définition microscopique des marges d'exérèse. (Figure 13)

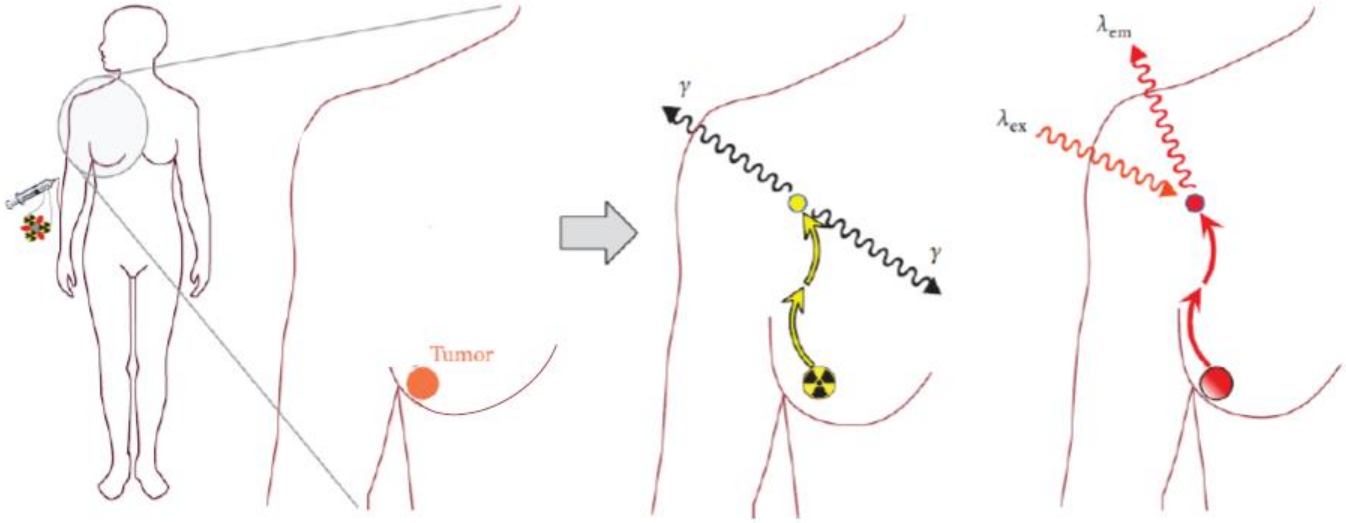


Figure 13 : Exploitation séquentielle de sondes bimodales via la détection des signaux radioactif et fluorescent[28]

1.3.1. CONSIDERATIONS STRATEGIQUES POUR LA CONCEPTION D'OUTILS BIMODAUX

Le développement d'outils bimodaux est en plein essor et s'appuie sur une conception respectueuse des deux modalités associées.

- Modalité optique : l'imagerie *in vivo* est restreinte aux fluorophores présentant des propriétés spectroscopiques inclues dans la fenêtre de transparence biologique.
- Modalité nucléaire : l'exploitation nucléaire de l'outil bimodal est principalement conditionnée par la stratégie de radiomarquage (chélation ou lien covalent) et par les propriétés intrinsèques du radionucléide (demi-vie).

La construction moléculaire de sondes bimodales engendre généralement des molécules massives associant les différents éléments constitutifs. En effet, le couplage d'éléments moléculaires de marquage (fluorescent et radioactif) à un élément moléculaire de ciblage induit une modification structurale de celui-ci. Cette complexification, par l'augmentation de l'encombrement stérique et/ou la modification des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques associées, peut impacter l'interaction avec la cible protéique.
Concernant la modalité optique, les cas idéaux exploitent des ligands fluorescents ou des fluorophores ciblant spécifiquement des organites (intercalant de l'ADN).
Les stratégies de radiomarquage sans modification structurale, par substitution d'un atome par son isotope radioactif (^{11}C), génèrent des radiotraceurs optimaux.

Ces contraintes structurales peuvent être palliées par le développement d'outils génériques modulables, de poids moléculaire moindres, conjugables à façon à l'élément moléculaire de ciblage.
L'exploitation performante de ces structures ou plateformes repose sur une stratégie de ligation clé permettant le couplage entre les éléments moléculaires de marquage et de ciblage, les réactions bio-orthogonales étant généralement privilégiées pour le marquage des biomolécules.
Parmi les quelques exemples publiés, des dérivés de BODIPY radiomarqués au ^{18}F ont été clickés, via une fonction azoture, sur différents peptides préalablement fonctionnalisés avec une fonction alcyne.[29]
Globalement, les plateformes multivalentes, par assemblage de structures chélatantes, permettent de générer à façon des sondes multimodales basées sur des combinaisons variables de modalités.[30]

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous proposons une association des modalités nucléaire et optique pour le développement de sondes bimodales pour l'imagerie oncologique *in vivo*.
Notre stratégie s'est appuyée sur le développement d'une plateforme bimodale polyvalente clickable exploitée pour la détection de deux cibles protéiques oncogéniques, un biomarqueur enzymatique de l'apoptose d'une part et un récepteur transmembranaire clé impliqué dans l'oncogenèse d'autre part.

2. DEVELOPPEMENT DE LA PLATEFORME MOLECULAIRE BIMODALE CLICKABLE POLYVALENTE

2.1. PRESENTATION

Notre approche bimodale repose sur l'exploitation d'une plateforme moléculaire clickable à toute (bio)molécule vectrice d'intérêt.

Alternative aux sondes d'une massive complexité structurale, cette plateforme permet, par cycloaddition cupro-catalysée (CuAAC) ou non (SPAAC)[31], la génération de senseurs bimodaux à façon. En effet, l'élément moléculaire de vectorisation, permettant d'atteindre la cible à imager, est clické lors de l'étape finale de synthèse.

L'unique condition d'exploitation de notre outil est la présence d'une fonction de ligation alcyne, portée par le partenaire moléculaire de ciblage, synthétiquement introduite si elle n'est pas initialement ou structuralement déjà présente.

Notre stratégie de synthèse implique trois synthons principaux : (Figure 14)

- **Cy5.0$_A$**
- **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$**
- le ligand clickable **L**

Le caractère bimodal de la plateforme est justifié par l'association synergique des modalités optique et nucléaire respectivement représentées par un fluorophore, éligible à l'imagerie *in vivo* et appartenant à la famille des cyanines, couplé à une structure tétrapeptidique chélatant un radionucléide (^{99m}Tc).

La construction moléculaire de la sonde bimodale finale s'appuie sur deux ligations orthogonales impliquées dans les formations d'une liaison amide et de son bio-isostère triazole. Ces couplages, basés respectivement sur une réaction de bio-conjugaison et une ligation bio-orthogonale, étendent largement les potentielles applications de notre outil polyvalent.

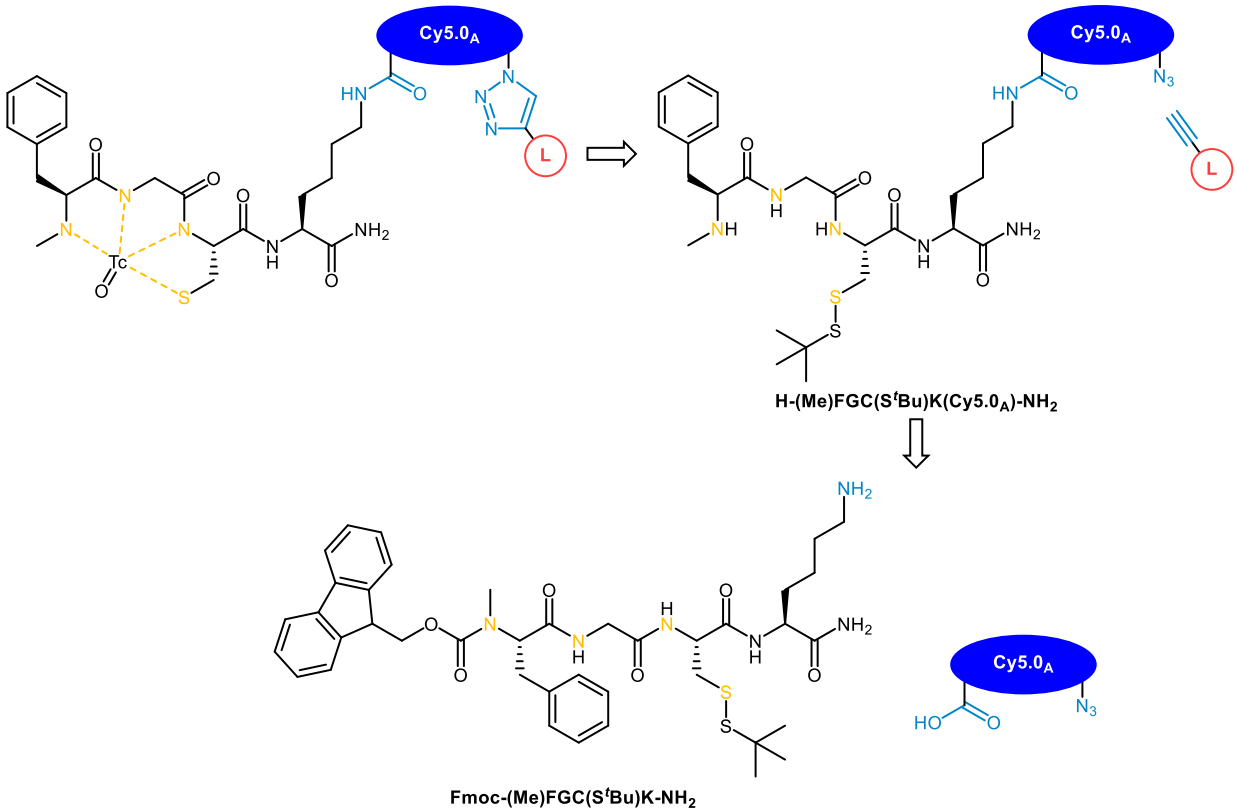


Figure 14 : Stratégie rétrosynthétique de génération de sondes bimodales dérivées de la plateforme clickable polyvalente

2.2. LA MODALITE OPTIQUE

Les cyanines (Cy) forment une famille de fluorophores privilégiée pour l'imagerie car ces molécules présentent des paramètres spectroscopiques remarquables.[32,33]

En outre, leurs propriétés émissives photo-induites s'appuient sur une structure aromatique monocationique impliquant deux hétérocycles azotés. Selon un mécanisme de délocalisation push-pull, la conjugaison est initiée par une aniline, relayée jusqu'à un iminium le long d'un espaceur conjugué et étendue aux noyaux benzéniques des hétérocycles. La structure de ces hétérocycles (dérivés indoliques ou benzoindoliques) et le nombre impair de carbones (3, 5 ou 7) les séparant définissent et modulent les gammes d'émission des cyanines. (Figure 16)

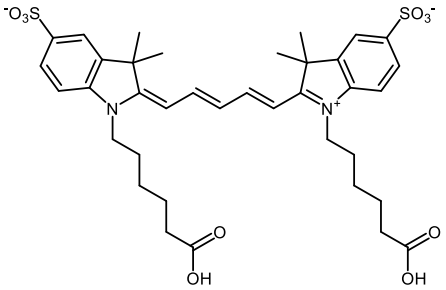
Plus précisément, l'addition d'un cycle benzénique, adjacent au noyau indolique, augmente la mésomérie et induit une émission bathochrome d'une vingtaine de nanomètres environ.

Ainsi, selon les longueurs d'onde d'émission souhaitées liées aux applications envisagées, la structure moléculaire des cyanines est modulable à façon.[34]

Par exemple, l'ICG (Chapitre 1.2.1.1.) est un dérivé de Cy7.5 hydrosoluble composé de deux noyaux benzoindoliques séparés par sept carbones. C'est également le cas de l'IRDye 800CW (Chapitre 1.2.1.2.1.) dont l'espaceur heptamethynique est stabilisé par un motif cyclohexyl.

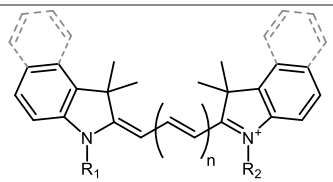
La mésomérie hautement étendue au sein de ces structures confère aux Cy5 et Cy7 des propriétés émissives dans la fenêtre de transparence biologique (NIR), justifiant leur exploitation clinique.

L'exploitation *in vivo* de ces fluorophores est également conditionnée par leur solubilisation dans les milieux biologiques aqueux. Envisagées dès les premières publications décrivant leurs voies de synthèse, les propriétés d'hydrosolubilisation de ces fluorophores organiques sont modulées par la présence de groupements sulfonates, maintenant des structures polychargées hydrophiles.[35] (Figure 15)



$(SO_3^{-})_2$-Cy5.0-$(CO_2H)_2$

Figure 15 : Structure originale d'une Cy5.0 symétrique hydrosoluble bisulfonatée en position 5 (Figure 18)

Structures moléculaires et dénominations associées						
	Cy3.0 (n = 1)	Cy3.5 (n = 1)	Cy5.0 (n = 2)	Cy5.5 (n = 2)	Cy7.0 (n = 3)	Cy7.5 (n = 3)
Exc/Em	554/568	579/589	650/669	682/702	754/778	788/813

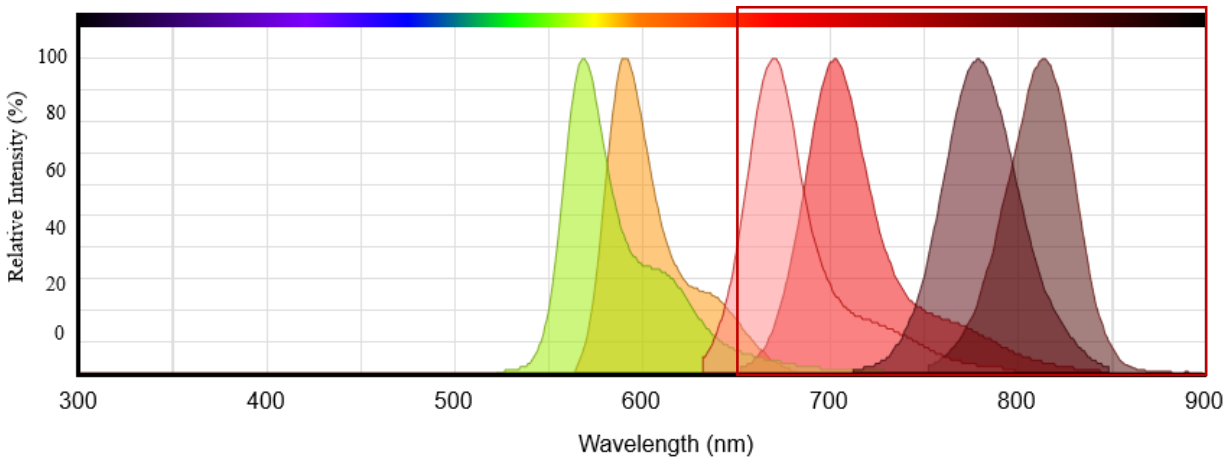


Figure 16 : Corrélation entre les structures des cyanines et les spectres d'émission associés
Exc : longueur d'onde maximale d'excitation (nm)
Em : longueur d'onde maximale d'émission (nm)
☐ : fenêtre de transparence biologique (650-900 nm)

Exceptée l'ICG dans un contexte exploratoire diagnostique (Chapitre 1.2.1.1.), un fluorophore est rarement exploité seul, c'est-à-dire sans conjugaison à un élément moléculaire de vectorisation ou de ciblage. En effet, la formation d'un lien covalent ou couplage, impliquant les deux fonctions de ligation portées par chacun des deux partenaires, est nécessaire.

Différentes fonctions de ligation sont disponibles sur les dérivés de cyanines et sont engagées dans des réactions de bio-conjugaison, bio-orthogonales ou chimiosélectives en fonction du partenaire moléculaire vecteur couplé.

Commercialisées à un prix élevé (150 euros/mg environ), les Cy5 disponibles présentent une unique fonction de ligation, généralement introduite par dérivatisation à partir d'un acide carboxylique. (Figure 17)

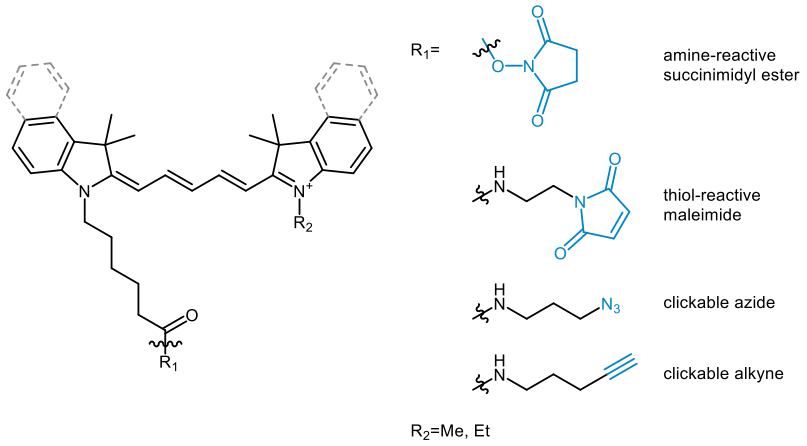


Figure 17 : Principales fonctions conjugables disponibles sur les dérivés commerciaux de Cy5

Des positions de fonctionnalisation alternatives sont disponibles. Par exemple, l'Alexa Fluor 647 (Chapitre 3.2.1.1.2.) est une Cy5.0 tétrasulfonatée dont l'un des groupements méthyles en position 3 (Figure 18) a été substitué par un point de ligation.

Par ailleurs, les cyanines présentent naturellement au moins deux sites de ligation, généralement sous-exploités.

Notre premier objectif a donc été la synthèse d'un dérivé de Cy5.0 bifonctionnalisé nommé bipode fluorescent, présentant deux fonctions de ligation orthogonales.

Nous proposons une stratégie de synthèse originale et convergente de Cy5.0 dissymétrique présentant des fonctions de ligation acide carboxylique et azoture, permettant deux couplages séquentiels à deux cibles moléculaires différentes, via la formation d'une liaison amide d'une part et d'un triazole d'autre part.

2.2.1. LE BIPODE FLUORESCENT **Cy5.0$_A$**

2.2.1.1. STRATEGIE DE SYNTHESE

La voie d'accès aux Cy5.0 met en jeu trois synthons : (Figure 18)

- Deux hétérocycles azotés cationiques (sels d'indolium), identiques ou différents, impliqués respectivement dans la formation d'une Cy5.0 symétrique homodimérique (Figure 18 : $R_1 = R_2$) ou dissymétrique hétérodimérique (Figure 18 : $R_1 \neq R_2$).
- Un linker conjugué, équivalent d'aldéhyde malonique protégé sous forme de bis-imine, contribuant à hauteur de trois carbones à la chaîne pentaméthynique centrale.

La réactivité de la triméthylindolenine (TMI ou 2,3,3-trimethyl-3*H*-indole), précurseur commercial commun aux sels d'indolium liposolubles, est exploitée pour générer les fragments clés engagés dans cette voie de synthèse :

- La quaternarisation de l'azote en position 1 génère une charge positive, nécessaire aux propriétés émissives du composé final. La formation de l'iminium, engageant le doublet non liant de l'azote, verrouille simultanément cette position nucléophile.

  Par ailleurs, un point de ligation peut être introduit lors de cette substitution nucléophile si le dérivé *N*-alkylant substitué présente une fonction de ligation.

  Cette stratégie convergente reposant sur la fonctionnalisation préalable des dérivés indoliques, dès la première étape de synthèse, s'oppose à la dérivatisation post-synthétique introduisant le(s) site(s) de ligation après la formation de la cyanine.[36]
- Le groupement méthyle en position 2 présente un caractère nucléophile s'additionnant sur les extrémités électrophiles du linker, lors de la seconde étape de synthèse.

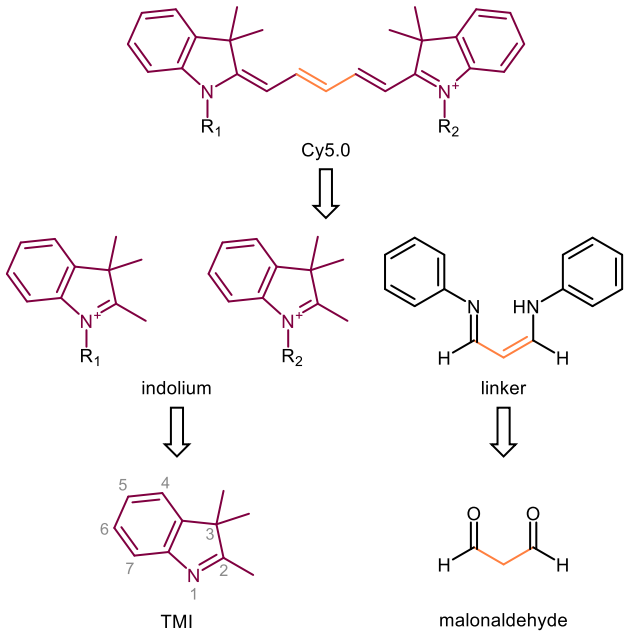


Figure 18 : Voie rétrosynthétique d'accès aux Cy5.0

2.2.1.2. SYNTHESE

2.2.1.2.1. FORMATION DES SELS D'INDOLIUM

La synthèse de sels d'iminium hétérocycliques, par *N*-quaternarisation de la TMI, a été réalisée en présence d'un excès de dérivé halogéné *N*-alkylant. En effet, les iminiums **1** et **3** ont été respectivement obtenus à partir de l'acide 6-bromohexanoïque commercial et l'1-azido-6-iodohexane **2**, synthétisé en deux étapes à partir du 1-bromo-6-chlorohexane. (Figure 19)

Le bromure d'indolium **1** a été synthétisé puis isolé quantitativement par précipitation.

Par ailleurs, le chauffage thermique, suffisant pour catalyser sa formation, a été inefficace pour obtenir **3**. Les conditions réactionnelles permettant la synthèse de ce second fragment indolique ont ainsi été optimisées, notamment avec l'assistance des micro-ondes.

Cependant, la réactivité explosive des composés azidés *N*-alkylants nous a contraints à allonger de deux carbones supplémentaires leur chaine aliphatique, initialement composée de quatre carbones.

Ainsi, plusieurs composés *N*-hexylants ont été synthétisés présentant une variation du nucléofuge (mésyle, tosyle, brome, iode).

Le dérivé iodé **2**, en présence de TMI, a finalement permis l'obtention de l'iminium **3** dans des conditions réactionnelles optimales sécurisées de chauffage *via* les micro-ondes (15 minutes à 150 °C).

En outre, le comportement de l'iodure d'indolium **3**, difficilement isolable par précipitation et instable sur silice, nous a contraint à l'engager sans purification intermédiaire dans la voie de synthèse. Sa formation a été vérifiée par RMN ^{1}H *via* la présence d'un triplet intégrant pour deux protons à 4.5 ppm environ correspondant au CH_2 en α de l'iminium.

2.2.1.2.2. SYNTHESE DE (HEMI-)CYANINE

L'addition nucléophile (du méthyle actif en position 2) du bromure d'indolium **1** sur la bis-imine a générée l'intermédiaire instable non isolé hémi-Cy5.0 **4**, caractérisé par une absorption maximale à 455 nm.

Cy5.0$_A$ a été finalement obtenue lors d'une seconde condensation de **3** sur **4** en condition basique. La signature spectroscopique caractérisant les Cy5.0 permet de vérifier leur formation au cours d'un suivi réactionnel.

En outre, les cyanines, en tant que fluorophores, sont des molécules photo-sensibles nécessitant donc d'être protégées de la lumière durant leur synthèse et leur stockage. Leur photo-dégradation (photo-bleaching) peut être observée par un drastique changement de couleur (bleu intense à rose pâle). (Figure 19 : Photos A et B)

La purification de **Cy5.0$_A$** a été exigeante car, bien que minoritaires, les sous-produits formés sont nombreux et difficilement séparables. En effet, la formation de Cy5.0 symétriques, par dimérisation de la même sous-unité indolique, impacte défavorablement la synthèse de la Cy5.0 hétérodimérique cible.

Cy5.0$_A$ a été obtenue avec un rendement de 31% (238 mg) sur deux étapes après quatre purifications successives par chromatographie sur gel de silice.

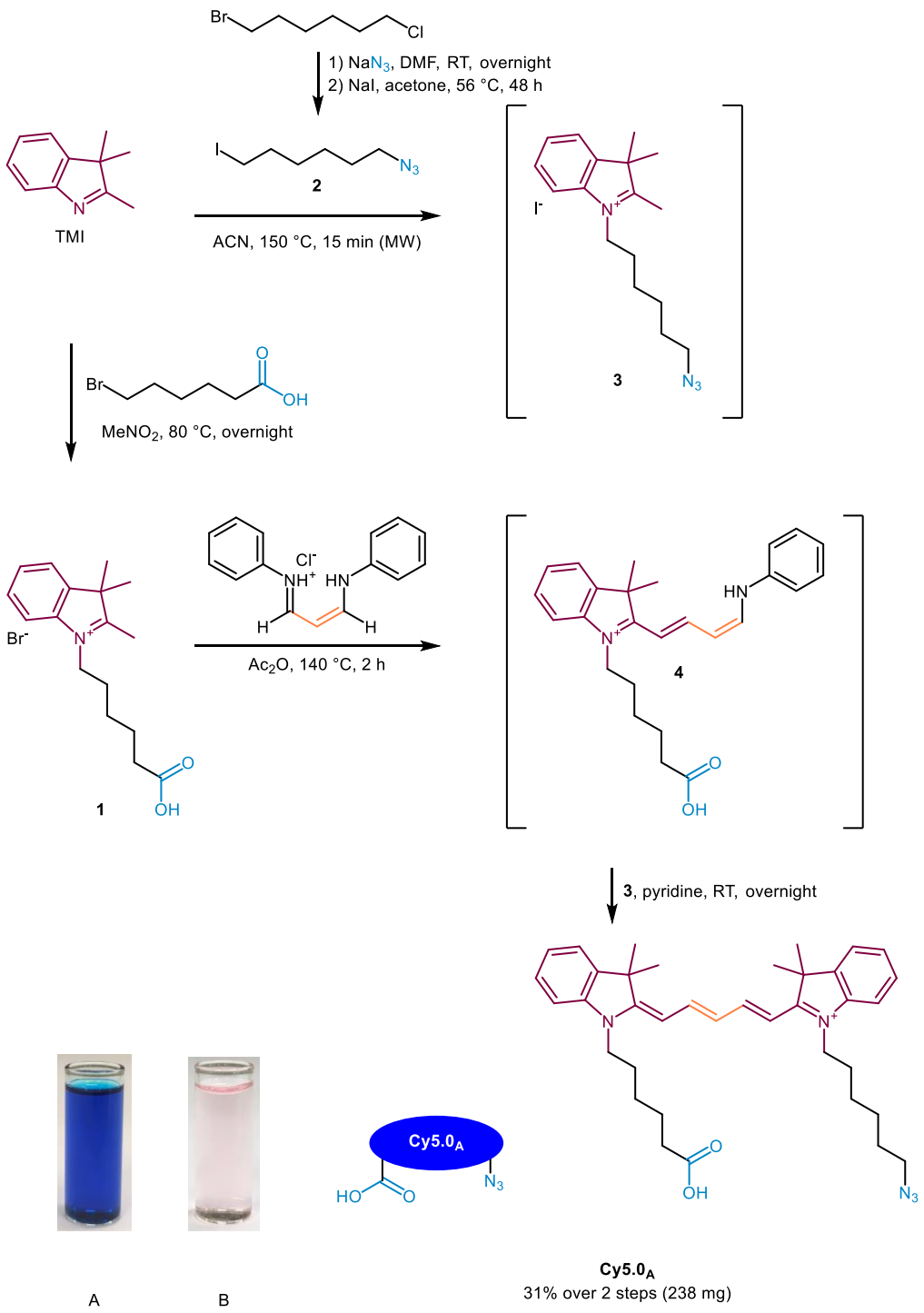
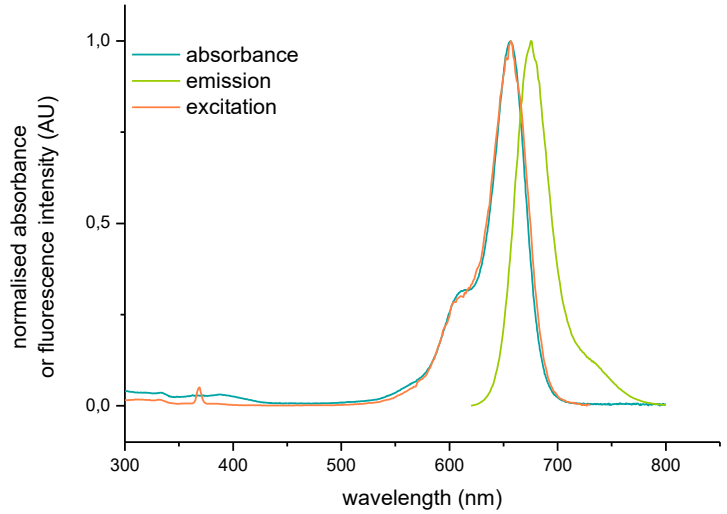


Figure 19 : Synthèse du bipode fluorescent **Cy5.0A**
A : **Cy5.0A** solubilisée dans le CH_2Cl_2
B : échantillon A photo-dégradé après une semaine d'exposition à la lumière du jour

2.2.1.3. ETUDE DES PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES

Les paramètres spectroscopiques de **Cy5.0$_A$** ont été mesurés et sont, de manière cohérente, comparables avec les données de la littérature décrivant les propriétés optiques des Cy5.0 apparentées. En effet, **Cy5.0$_A$** présente une bande d'absorption intense centrée à 656 nm avec un épaulement du côté des hautes énergies caractéristique des cyanines. Une excitation dans cette bande d'absorption entraine une émission dont le profil est l'image miroir de la bande d'absorption. (Figure 20)



Composés	Solvant	λ_{MAX} Abs (nm)	λ_{MAX} Em (nm)	Déplacement de Stokes (nm)	Déplacement de Stokes (cm^{-1})	Φ_F	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
$(SO_3^-)_2$-Cy5.0-$(CO_2H)_2$[a]	EtOH	658	677	19	427	0.4	250 000	100 000
Cy5.0$_A$	CH_2Cl_2	656	675	19	429	0.48[b]	230 400	110 600

Figure 20 : Propriétés spectroscopiques de **Cy5.0$_A$** déterminées à température ambiante
spectre d'émission acquis à λ_{exc} = 610 nm et spectre d'excitation acquis à λ_{em} = 740 nm
[a]propriétés spectrales originales décrites (structure de **$(SO_3^-)_2$-Cy5.0-$(CO_2H)_2$** explicitée en Figure 15)[35]
[b]rendement quantique de fluorescence relatif déterminé par rapport au Nile blue (Φ_F = 0.27 dans l'EtOH)[37]

2.2.2. SYNTHESE D'UNE LIBRAIRIE DE CY5.0 DISSYMETRIQUES

Notre méthode de synthèse a été également mise en œuvre pour générer une librairie de Cy5.0 dissymétriques exploitées ultérieurement (Chapitre 3 et 4).

Contrairement au bipode fluorescent **Cy5.0$_A$**, **Cy5.0$_B$** et **Cy5.0$_C$** sont monofonctionnalisables car elles présentent un unique point de ligation, une fonction acide carboxylique et azoture respectivement. (Figure 21)

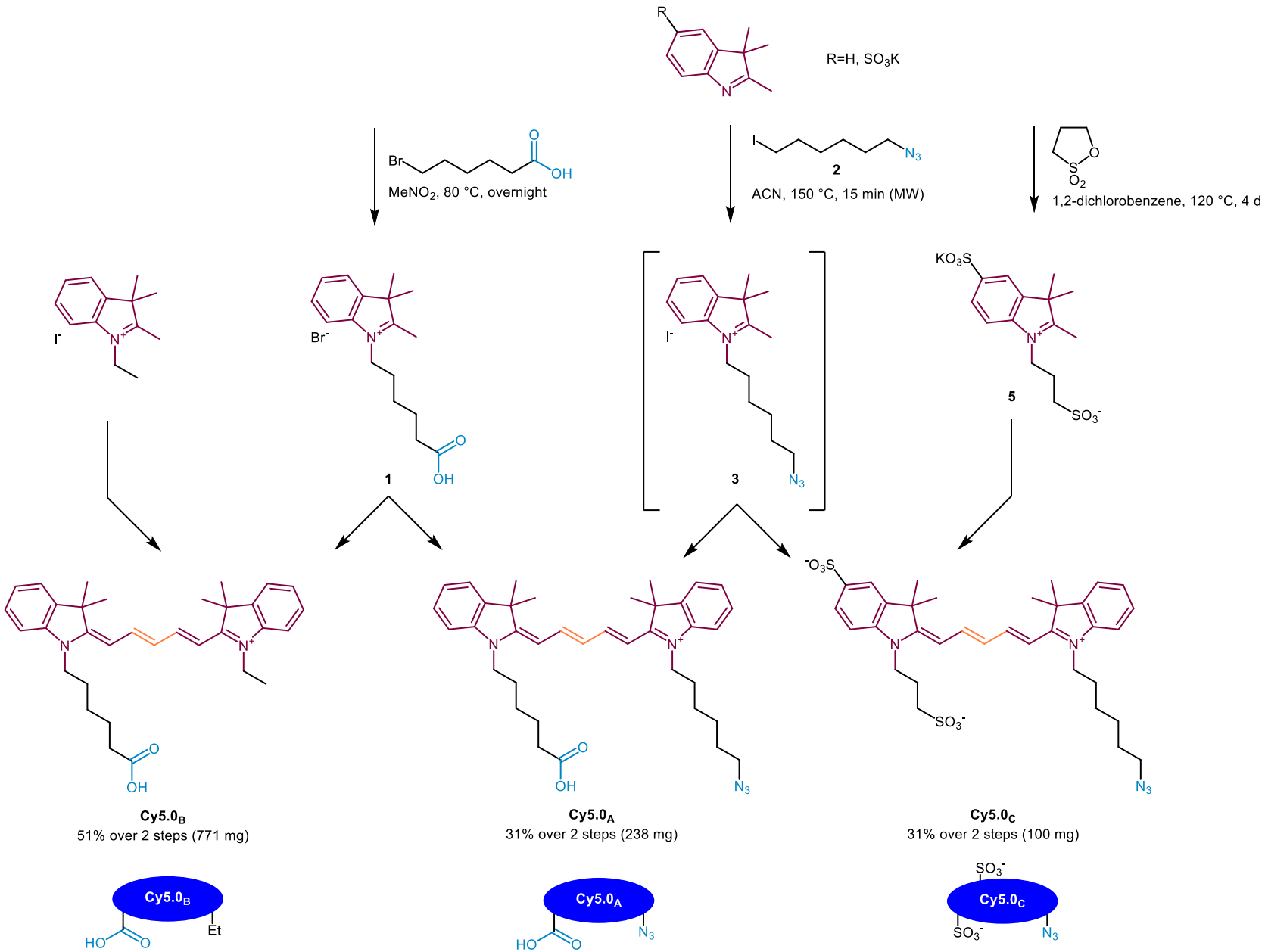


Figure 21 : Synthèse des **Cy5.0A**, **Cy5.0B** et **Cy5.0C**

2.3. LA MODALITE NUCLEAIRE

Notre stratégie de radiomarquage repose sur la chélation du ^{99m}Tc et la modalité SPECT associée.

Ce radionucléide est généré à partir du molybdène et se caractérise par un temps de demi-vie de 6 heures. Ses nombreux états d'oxydation (de +VII à -I) permettent de multiples stratégies de chélation par divers ligands coordinants.[38]

Par exemple, le benzoylmercaptoacétyltriglycine (TECHNESCAN MAG 3) ou bétiatide est un produit radiopharmaceutique, à usage diagnostique, destiné à l'exploration scintigraphique des troubles néphro- et uro-logiques, après marquage au ^{99m}Tc.[39] (Figure 22)

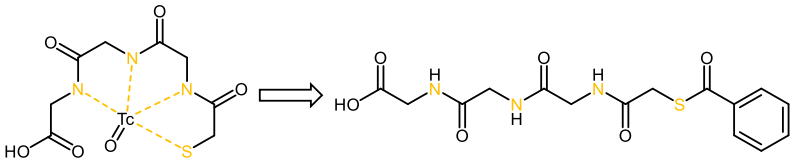


Figure 22 : Structure radiomarquée du radiopharmaceutique MAG 3

Cette stratégie de radiomarquage s'appuie sur une structure chélatante de type N_3S, présente au sein de structures peptidiques de synthèse ou de protéines endogènes.

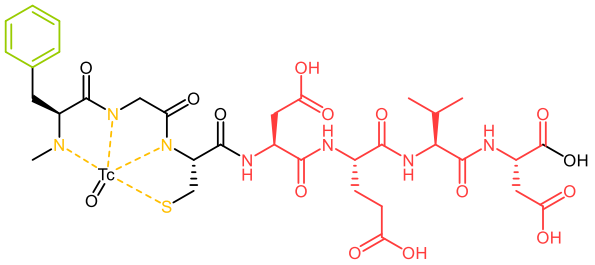
Par exemple, le radiomarquage d'anticorps au ^{99m}Tc exploite cette stratégie de chélation.[40]

A l'instar des cages chélatantes conjugables (DOTA, NOTA), une séquence peptidique composée de trois résidus amino-acides (N_3), dont une cystéine (S), constitue une structure coordinante simple et fonctionnalisable à façon.

De plus, une séquence peptidique de ciblage ou de vectorisation peut compléter cette structure radiomarquable chélatante pour générer des radiotraceurs peptidiques ciblant, par exemple, des enzymes.

Plus précisément, notre équipe de radiochimistes a exploré la détection de la caspase-3 *in vivo*, à partir d'une séquence tétrapeptidique de ciblage (analogue de substrat non clivable) couplée à un tripeptide chélatant N_3S impliquant les trois résidus amino-acides phénylalanine, glycine et cystéine.[41] (Figure 23)

La *N*-méthylation de l'extrémité *N*-terminale est inclue dans la stratégie de chélation, le groupement méthyle renforçant la densité électronique de l'azote participant à la radiochélation.



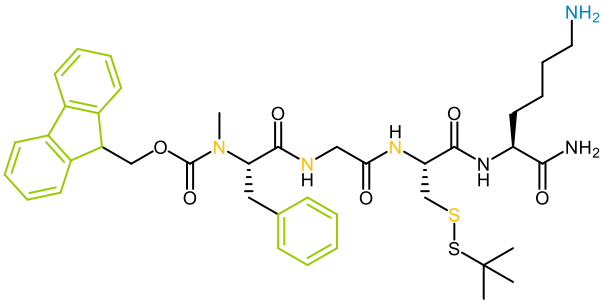
Séquence peptidique		**Phe**	**Gly**	**Cys**	**Asp**	**Glu**	**Val**	**Asp**
Résidu amino-acide		azote (de la fonction amine secondaire *N*-terminale) méthylé électro-enrichi chélatant	azote (de la fonction amide secondaire) chélatant	azote (de la fonction amide secondaire) chélatant	séquence tétrapeptidique de ciblage enzymatique			
Fonction latérale	Rôle	phényle de détection	-	soufre (de la fonction thiol) chélatant				
	Protection	-		benzoyle	stratégie de protection non explicitée			

Figure 23 : Structure peptidique de la sonde analogue de substrat (Me)FGCDEVD radiomarquée par chélation du ^{99m}Tc ciblant la caspase-3[41]

2.3.1. LE TETRAPEPTIDE CHELATANT **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$**

2.3.1.1. STRATEGIE DE SYNTHESE

A partir de l'exemple précédent (Figure 23), nous proposons une structure tétrapeptidique originale apparentée, présentant ce tripeptide chélatant additionné d'un résidu lysine, dont l'amine primaire latérale est conjugable à un partenaire présentant une fonction acide carboxylique. (Figure 24)



Séquence peptidique		**Extrémité *N*-terminale**	**Phe**	**Gly**	**Cys**	**Lys**	**Extrémité *C*-terminale**
Résidu amino-acide		azote (de la fonction carbamate) méthylé électro-enrichi chélatant		azote (de la fonction amide secondaire) chélatant	azote (de la fonction amide secondaire) chélatant		-
Fonction latérale	Rôle	-	phényle de détection	-	soufre (de la fonction thiol) chélatant	amine primaire de ligation	
	Protection	Fmoc de détection	-		S^{t}Bu	Boc[a]	amide primaire non réactif

Figure 24 : Conception du tétrapeptide chélatant conjugable **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$**
[a]protection acido-hydrolysée dans les conditions réactionnelles de clivage du support solide

2.3.1.2. SYNTHESE

La synthèse du tétrapeptide conjugable **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$** a été assistée (synthétiseur automatisé de peptides ABI-433A configuré en stratégie Fmoc/^{t}Bu) et réalisée en condition supportée par la résine Rink Amide MBHA. Les quatre acides aminés impliqués, issus de la série naturelle L, présentent une extrémité *N*-terminale protégée sous forme de carbamate Fmoc. Les étapes de couplages peptidiques ont été réalisées en présence de HOBt, HBTU et DIPEA, à l'échelle de 0,25 mmol.

Le tétrapeptide **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$** a été isolé, par clivage du support solide (95% TFA) puis par purification semi-préparative en phase inverse, à hauteur de 110 mg soit 57% de rendement (basé sur le loading théorique de la résine : 1 mmol/g).

Ces conditions réactionnelles de clivage ont simultanément permis l'hydrolyse acido-catalysée du carbamate Boc, protégeant l'amine primaire de la chaîne latérale du résidu lysine. (Figure 25)

La fonction amide primaire *C*-terminale générée après clivage du support solide permet, d'une part, d'augmenter la stabilité de la molécule en milieux biologiques (vis-à-vis des carboxypeptidases non spécifiques, par exemple) et de prévenir les couplages peptidiques croisés anarchiques, d'autre part.

En outre, les groupements protecteurs de la fonction thiol de la chaîne latérale du résidu cystéine et de l'extrémité *N*-terminale du résidu *N*-methylphénylalanine ont été stratégiquement conservés afin d'assurer un couplage peptidique sélectif entre le résidu lysine, dit de ligation, et la fonction acide carboxylique du bipode fluorescent **Cy5.0$_A$**.

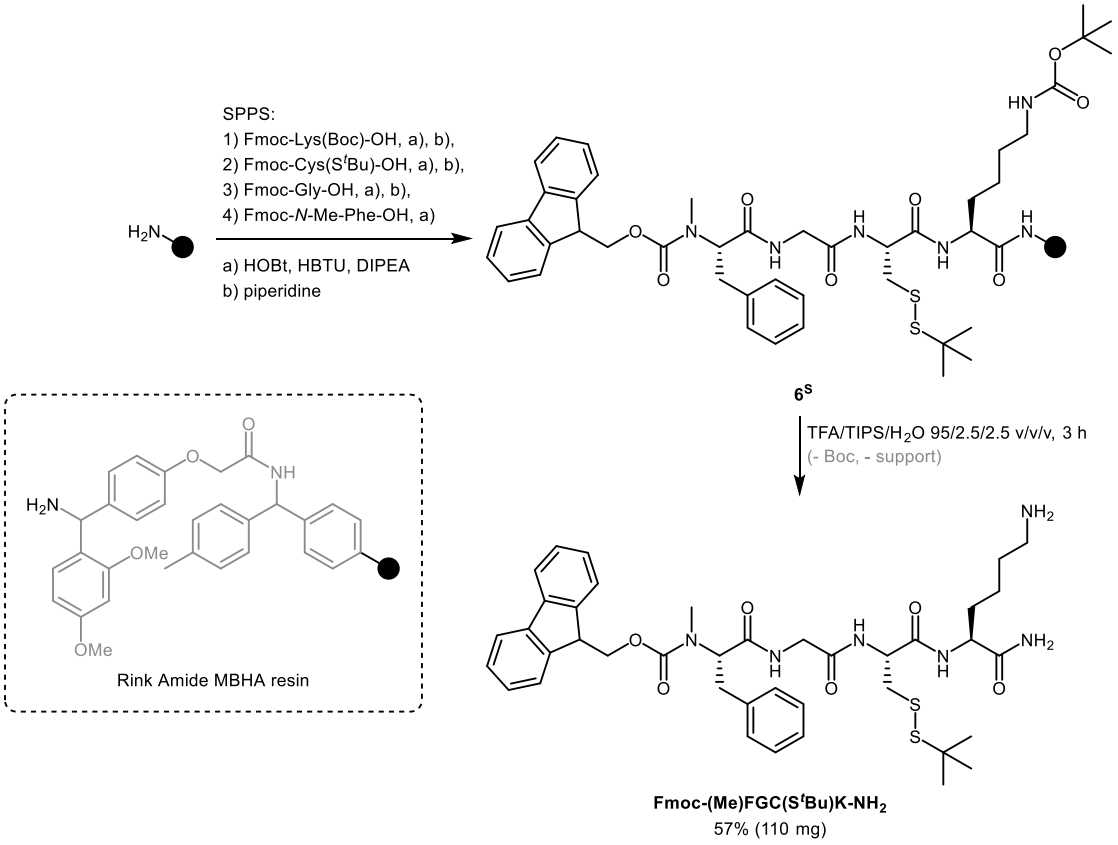


Figure 25 : Synthèse du tétrapeptide conjugable **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$**

2.4. LA PLATEFORME BIMODALE CLICKABLE **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$**

2.4.1. SYNTHESE

La construction moléculaire de la plateforme s'appuie sur un couplage peptidique constituant la première des deux ligations clés permises par le bipode fluorescent **Cy5.0$_A$**.

Généralement, la formation d'une liaison amide, engageant un acide carboxylique et une amine, nécessite une activation préalable de la fonction acide carboxylique. Cette activation transforme l'acide carboxylique, faiblement réactif, en ester activé, en présence d'agent de couplage.

Le sel d'uronium TSTU[42], activant *in situ* l'acide carboxylique de **Cy5.0$_A$** en ester *N*-hydroxysuccinimique, a été l'agent de couplage permettant ce couplage peptidique clé, entre l'amine primaire du résidu lysine du tétrapeptide **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$** et la fonction acide carboxylique du bipode fluorescent **Cy5.0$_A$**.

L'extrémité *N*-terminale de l'intermédiaire peptidique fluorescent **7** a ensuite été déprotégée. Généralement réalisée en présence de pipéridine (condition supportée), cette déprotection en conditions basiques a entrainé une dégradation partielle de la molécule finale.

Des conditions alternatives plus douces, en présence d'un excès de pipérazine et de DBU[43], ont permis l'obtention du peptide fluorescent **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$** à hauteur de 34% de rendement sur ces deux étapes (12 mg), après purification en phase normale.

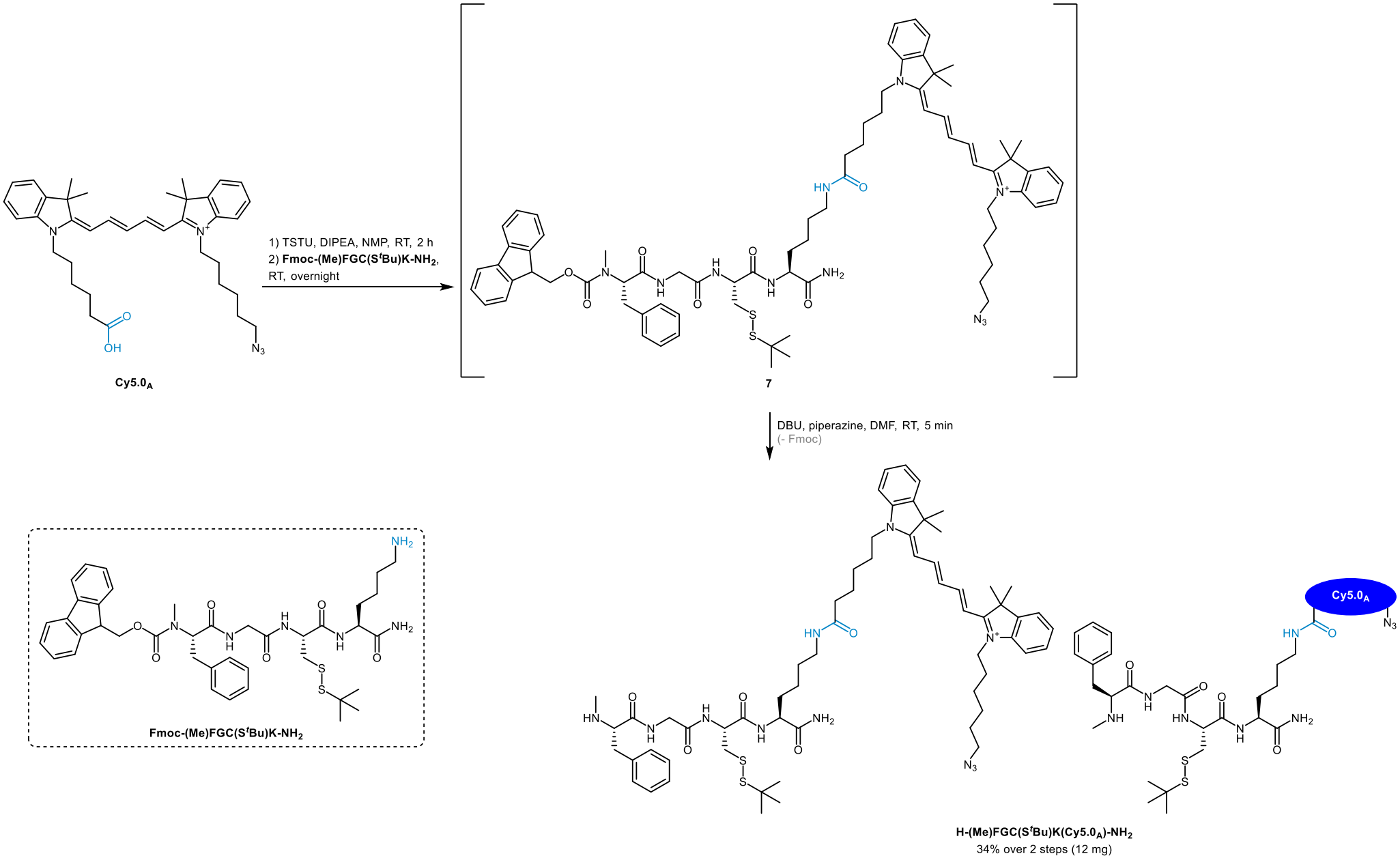
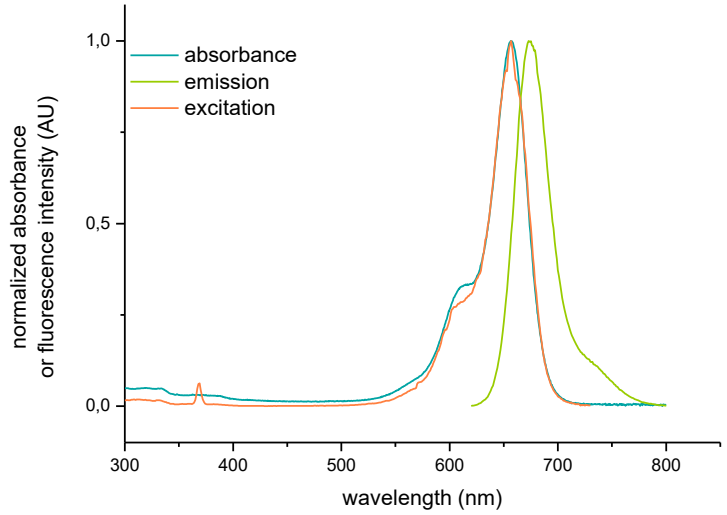


Figure 26 : Synthèse de la plateforme clickable **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$**

2.4.2. ETUDE DES PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES

Les paramètres spectroscopiques de **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$** ont été mesurés et sont, de manière cohérente, comparables et apparentés avec les données précédemment obtenues photo-caractérisant le bipode fluorescent **Cy5.0$_A$**. (Figure 27)



Composés	Solvant	λ_{MAX} Abs (nm)	λ_{MAX} Em (nm)	Déplacement de Stokes (nm)	Déplacement de Stokes (cm^{-1})	Φ_F[a]	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$	CH_2Cl_2	657	673	16	362	0.44	194 800	85 800
Cy5.0$_A$	CH_2Cl_2	656	675	19	429	0.48	230 400	110 600

Figure 27 : Propriétés spectroscopiques de **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$** déterminées à température ambiante
spectre d'émission acquis à λ_{exc} = 610 nm et spectre d'excitation acquis à λ_{em} = 740 nm
[a]rendement quantique de fluorescence relatif déterminé par rapport au Nile blue (Φ_F = 0.27 dans l'EtOH)[37]

2.5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La plateforme **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$** a été synthétisée en deux étapes à partir du bipode fluorescent **Cy5.0$_A$** et du tétrapeptide **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$**, obtenus respectivement en six et deux étapes.

Nous proposons une exploitation de notre plateforme dans un contexte oncologique d'imagerie diagnostique *via* deux applications distinctes. (Figure 28)

Le projet présenté dans le Chapitre 3 explore la thématique de détection enzymatique de la caspase-3 selon une approche de sonde-substrat activable pour imager l'apoptose.

Le second projet, explicité dans le Chapitre 4, implique notre plateforme bimodale clickée à un inhibiteur de tyrosine kinase de faible poids moléculaire.

Ainsi, nous démontrerons le caractère universel de notre outil *via* ces deux applications et proposerons des pistes conceptuelles et synthétiques d'amélioration.

Ligands clickables		
	Séquence peptidique de ciblage enzymatique	Inhibiteur de tyrosine kinase cytotoxique
Cibles	Caspase-3	EGFR
Applications	Détection de l'apoptose	Détection de l'EGFR
Projets	Chapitre 3	Chapitre 4

Figure 28 : Variation des éléments moléculaires de ciblage clickables à la plateforme bimodale

3. DEVELOPPEMENT DE SONDES BIMODALES SPECIFIQUES DE LA CASPASE-3 POUR IMAGER L'APOPTOSE

3.1. LA CASPASE-3, BIOMARQUEUR DE L'APOPTOSE

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus biologique, génétiquement régulé, permettant une élimination des cellules sénescentes ou potentiellement dangereuses (endommagées ou infectées).[44]

L'apoptose se manifeste par de nombreuses modifications de la morphologie cellulaire incluant la contraction cytoplasmique, la compaction et la marginalisation de la chromatine nucléaire, l'involution des membranes cytoplasmique, nucléaire et mitochondriale, générant finalement le démantèlement cellulaire.

Ce suicide cellulaire s'appuie sur une machinerie moléculaire hautement régulée impliquant une large arborescence protéique, incluant de nombreux récepteurs et enzymes. La régulation de l'apoptose est contrôlée par une cascade d'activation, assurant à la cellule un suicide parfaitement orchestré, sans réponse inflammatoire pouvant compromettre l'intégrité tissulaire. L'apoptose est ainsi opposée à la nécrose, correspondant à la mort cellulaire anarchique, incontrôlée et soudaine.

Jouant un double rôle central dans la régulation et l'exécution de l'apoptose, les caspases apoptotiques sont des protéases à cystéine dirigeant leur activité protéolytique sur un résidu aspartique (Cysteine-dependant ASPartate-directed proteASE) de leur substrat.[45]

Leur activité enzymatique est régulée par une activation post-traductionnelle de leur domaine catalytique, par protéolyse généralement. Les pro-caspases, précurseurs enzymatiques catalytiquement inactifs, sont initialement transcrites puis traduites sous une forme inactive zymogène. Présentes de façon ubiquitaire dans la cellule, leur activation catalytique s'intègre dans une cascade de régulation lorsque la voie apoptotique est engagée, leur permettant à leur tour de cliver leur substrat.

A l'image d'un système d'engrenage, l'activation successive de toutes les protéines impliquées dans cette cascade permet une régulation par l'action de rétrocontrôle négatif.

Les caspases apoptotiques sont différenciées en deux groupes fonctionnels distincts. Les caspases initiatrices ou apicales (caspase-2, -8, -9, -10) permettent l'activation des caspases effectrices (caspase-3, -6, -7). Ces dernières sont responsables de la destruction cellulaire par clivage protéolytique de plus d'une centaine de substrats. L'ensemble de la famille caspasique contribue donc à l'engagement apoptotique. (Figure 29)

La voie apoptotique est initiée par différents stimuli de mort, exogènes ou endogènes à la cellule, selon deux modes distincts. La voie extrinsèque est engagée après fixation de ligands extracellulaires aux récepteurs transmembranaires de mort, tandis que la voie intrinsèque ou mitochondriale est stimulée en réponse à une altération majeure de l'ADN et/ou un stress mitochondrial.

Quelle que soit la provenance du signal de mort, ces deux voies permettent l'activation des caspases initiatrices, la caspase-8 pour la voie extrinsèque et la caspase-9 pour la voie intrinsèque, entrainant l'activation des caspases effectrices.

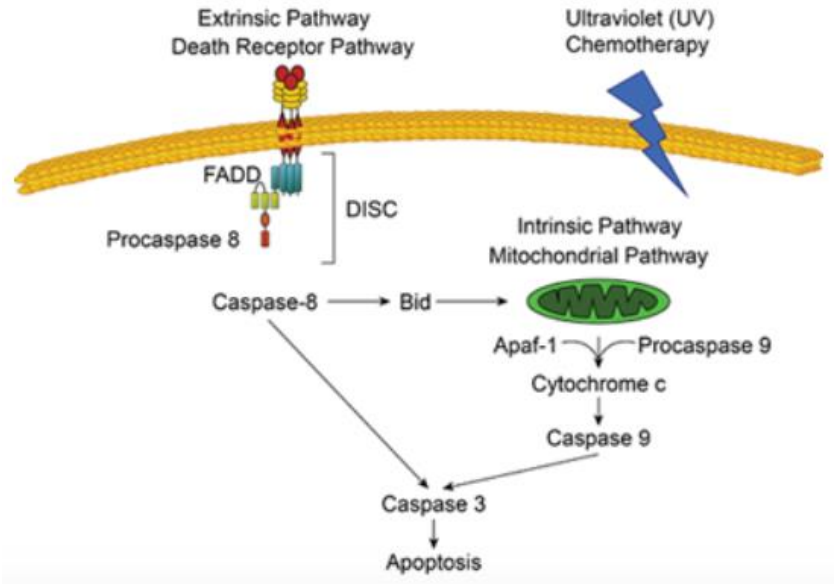


Figure 29 : Voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose impliquant les cascades de caspases

3.2. IMAGER UNE REPONSE APOPTOTIQUE VIA LA DETECTION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA CASPASE-3 DANS UN CONTEXTE ONCOLOGIQUE

Un équilibre entre prolifération et mort cellulaire permet de maintenir un état homéostasique, des conséquences pathologiques pouvant apparaitre en cas de dérégulation. En effet, l'excès d'apoptose est impliqué dans certaines pathologies neurodégénératives, tandis que le défaut d'apoptose est un des dix marqueurs de cancers.[46] Les cellules cancéreuses, « immortelles », se divisent anarchiquement et s'affranchissent du processus apoptotique.

Dans un contexte oncologique, une des stratégies antinéoplasiques vise à restaurer le programme apoptotique défaillant au sein des cellules cancéreuses.

Outre l'observation et la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués, imager l'apoptose dans un contexte clinique contribue au développement d'une médecine personnalisée, notamment par l'évaluation de l'efficacité de la thérapie.

Les différentes stratégies développées pour visualiser, suivre et quantifier le processus apoptotique ciblent généralement les biomarqueurs de l'apoptose et impliquent différentes modalités d'imagerie.[47]

Parmi les biomarqueurs intracellulaires de l'apoptose, la caspase-3 activée constitue la cible enzymatique privilégiée. En effet, l'activation de la caspase-3 est un marqueur de l'irréversibilité du programme apoptotique. Une corrélation est ainsi établie entre l'activité protéasique de la caspase-3 et l'état apoptotique de la cellule.[48]

3.2.1. STRATEGIES GENERALES DE DETECTION ENZYMATIQUE

Quelle(s) que soi(en)t la (ou les) modalité(s) d'imagerie impliquée(s), les stratégies de détection enzymatique exploitent l'activité protéolytique de l'enzyme cible sur un substrat exogène marqué. Ces sondes enzymatiques sont définies par deux éléments moléculaires cardinaux :

- Un élément moléculaire de ciblage assurant une interaction spécifique, voire sélective, entre l'enzyme et la sonde. Généralement, une séquence peptidique définie et identifiée, copiant le substrat naturel de l'enzyme, constitue le squelette de la sonde.
- Un ou plusieurs élément(s) moléculaire(s) de marquage décorant ce squelette peptidique et permettant la visualisation du clivage protéolytique. Ces éléments moléculaires de marquage sont variables selon la (ou les) modalité(s) d'imagerie impliquée(s) (molécules fluorescentes et/ou radioactives).

Dans le cadre de la détection de l'activité enzymatique de la caspase-3, DEVD constitue généralement le support peptidique. Diverses stratégies de fonctionnalisation de cette séquence tétrapeptidique de ciblage enzymatique ont été explorées.

3.2.1.1. MODALITE OPTIQUE

A l'image de la sonde analogue de substrat ^{99m}Tc(Me)FGCDEVD[41], la détection enzymatique impliquant l'imagerie optique de fluorescence s'appuie principalement sur les approches always-ON et turn-ON précédemment définies. (Chapitre 1.2.1.).

Deux stratégies conceptuelles se distinguent, exploitant des sondes structuralement différentes : sonde-suicide (activity-based probe) *versus* sonde-substrat (substrate-based probe).[49]

3.2.1.1.1. SONDES-SUICIDE

La détection enzymatique directe exploite la réactivité de l'enzyme pour former un lien covalent avec la sonde-suicide. En effet, l'addition nucléophile de la fonction thiol de la protéase à cystéine sur la fonction acyloxymethyl cétone (warhead AOMK), située sur l'extrémité *C*-terminale du résidu aspartique (R_1) de la sonde-suicide, induit une séquestration irréversible de l'enzyme entrainant l'inhibition de son activité catalytique.[50] (Figure 30)

Des nucléofuges alternatifs (FMK : fluoromethyl ketone) sont également exploités en tant qu'ogive électrophile.

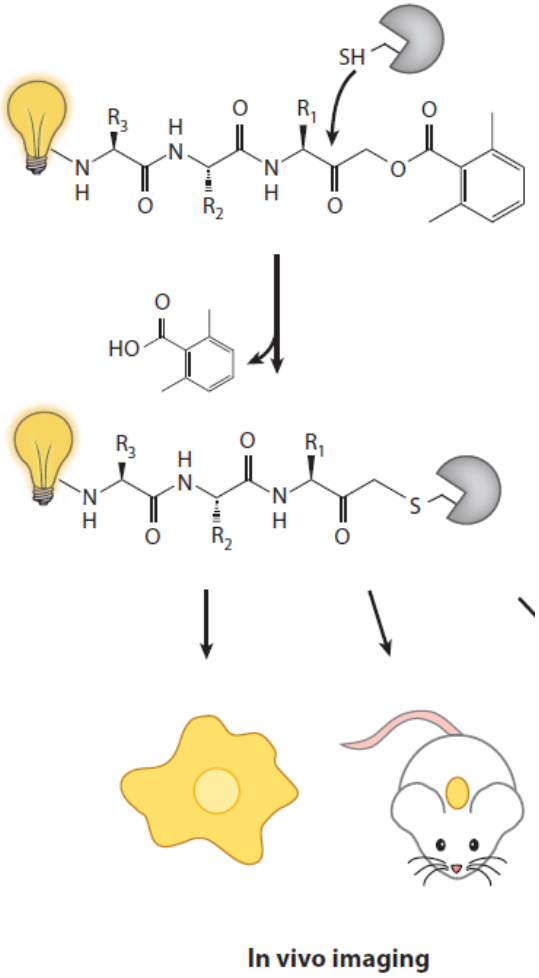


Figure 30 : Structure générale d'une sonde-suicide ciblant une protéase à cystéine et fragments générés par l'activité enzymatique permettant la détection de son activité catalytique *in cellulo* et *in vivo*[14]

: fluorophore émissif

Cette approche génère une réponse fluorométrique quantitative, une molécule de sonde-suicide inhibant une molécule d'enzyme cible. Cela présente l'avantage de localiser l'enzyme mais n'exploite pas son turn-over enzymatique.

Largement explorée par le groupe de Matthew Bogyo, cette stratégie de détection fluorométrique de la caspase-3 a été testée *in vivo*. La sonde always-ON AB50-Cy5, basée sur un tripeptide de ciblage enzymatique alternatif à la séquence DEVD, permet, d'après les auteurs, une sélectivité pour l'enzyme cible, prévenant la réactivité croisée d'enzymes concurrentes comme la cathépsine B ou la légumaine.[51] (Figure 31)

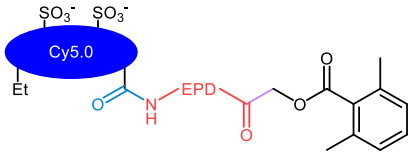
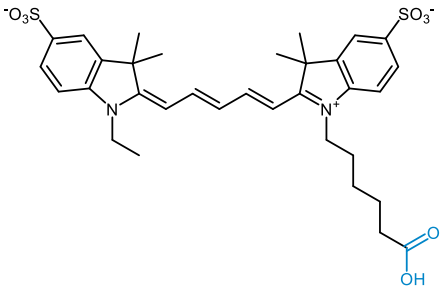
Nom	AB50-Cy5
Représentation simplifiée de la sonde	
Modalité optique	
Structure moléculaire	
Dénomination	Cy5.0
Exc/Em	647/665

Figure 31 : Carte d'identité de la sonde fluorescente always-ON AB50-Cy5[51]
Exc : longueur d'onde maximale d'excitation (nm)
Em : longueur d'onde maximale d'émission (nm)

Les sondes-suicide se déclinent également en version activable turn-ON avec l'addition d'un quencher de fluorescence sur l'ogive électrophile. (Figure 32)

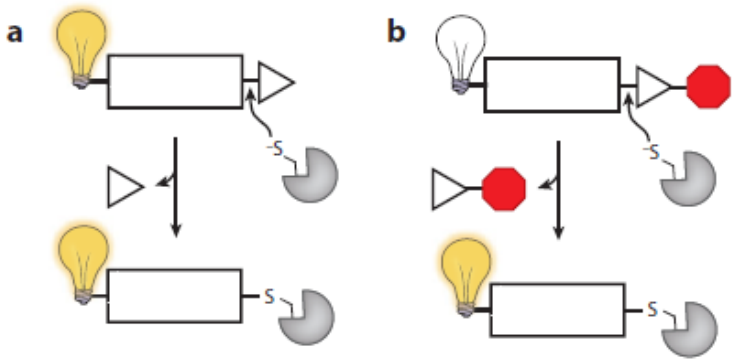


Figure 32 : Représentation schématique de sondes-suicide always-ON (a) versus turn-ON (b)[14]

: fluorophore émissif

: fluorophore quenché

: quencher

: séquence peptidique de ciblage enzymatique

: ogive électrophile permettant la séquestration enzymatique

Une version améliorée quenchée de la sonde-suicide AB50-Cy5 a été proposée par les groupes de Galia Blum et Doron Shabat avec l'addition du quencher QSY21 sur l'ogive.[52] (Figure 33)

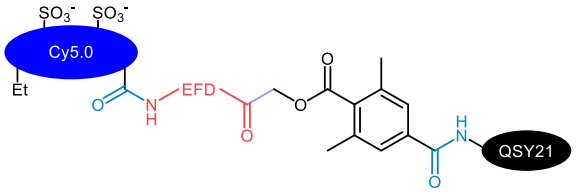
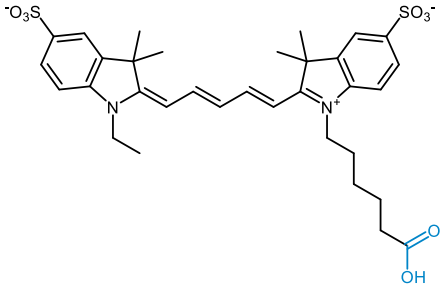
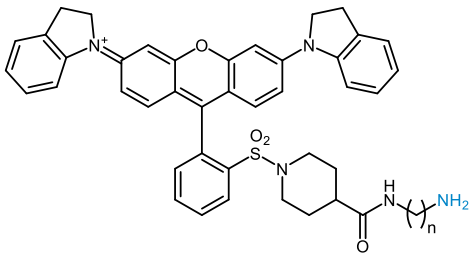
Nom	qAB50-Cy5	
Représentation simplifiée de la sonde		
Modalité optique	Fluorophore	Quencher
Structures moléculaires		
Dénominations	Cy5.0	QSY21
Exc/Em	647/665	661/-

Figure 33 : Carte d'identité de la sonde fluorescente turn-ON qAB50-Cy5[52]
Exc : longueur d'onde maximale d'excitation (nm)
Em : longueur d'onde maximale d'émission (nm)

3.2.1.1.2. SONDES-SUBSTRAT

La détection enzymatique indirecte exploite la réactivité de l'enzyme pour hydrolyser la sonde-substrat. La protéolyse enzymatique génère deux fragments, sans liaison covalente finale entre la sonde-substrat native et l'enzyme cible.

Cette stratégie pour la détection de la caspase-3 *in vivo* est exclusivement basée sur des sondes activables turn-ON et s'oppose à une détection ratiométrique. Comparativement, cette approche permet la génération d'un signal fluorescent plus important obtenu par accumulation, l'enzyme cible pouvant hydrolyser plusieurs molécules de sonde. (Figure 34)

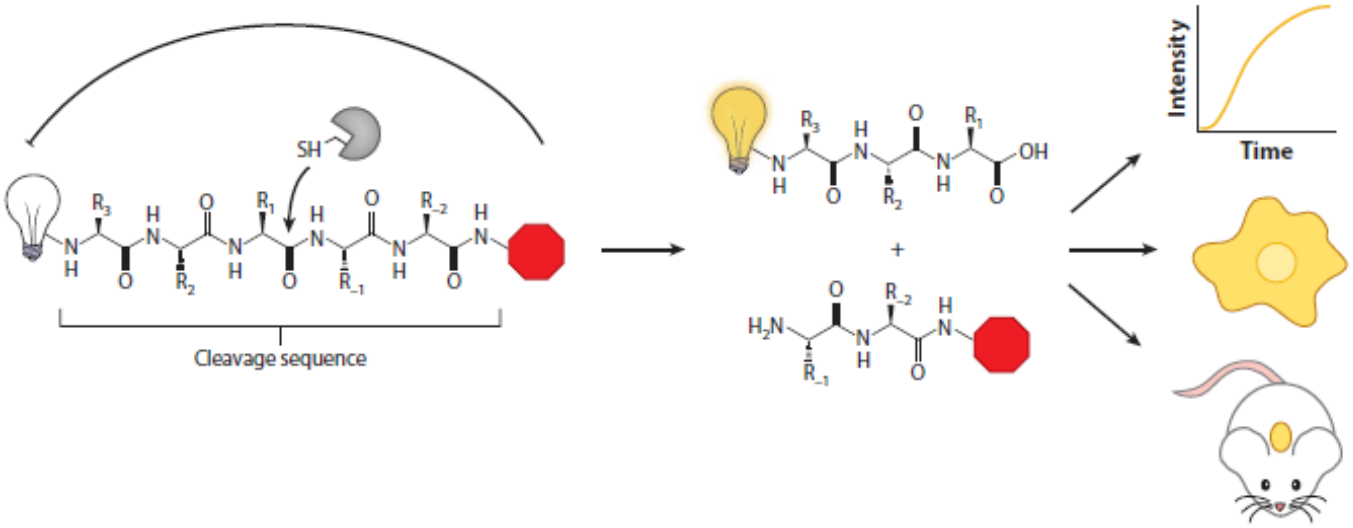


Figure 34 : Structure générale d'une sonde-substrat ciblant une protéase à cystéine et fragments générés par protéolyse enzymatique permettant la détection de son activité catalytique *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo*[14]

: fluorophore émissif

: fluorophore quenché

: quencher

Le groupe de David Piwnica-Worms a développé une première famille de sondes-substrat spécifiques de la caspase-3 testées *in vivo*.[53–55]

Conceptuellement, la séquence de ciblage enzymatique est fonctionnalisée, de part et d'autre, par un dérivé de Cy5.0 (Alexa Fluor 647) associé au QSY21, respectivement via les résidus de ligation lysine et cystéine. (Figure 35)

De plus, la vectorisation cytoplasmique de la sonde est assurée par une structure peptidique additionnelle, issue de résidus amino-acides polychargés non naturels (CPP : Cell Penetrating Peptide).

Une étude comparative approfondie de sélectivité enzymatique a été réalisée, mettant en exergue l'affinité et la sélectivité de la sonde-substrat pour l'enzyme cible. En effet, la détermination des paramètres enzymatiques caractérisant le couple caspase-3/KcapQ, comparativement aux caspases concurrentes, permet de lire une réponse apoptotique fiable.

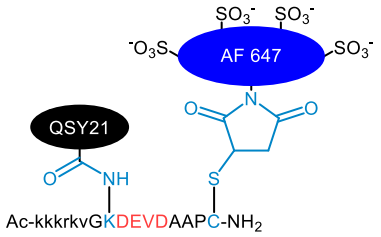
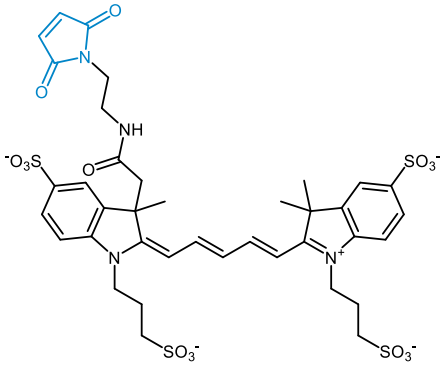
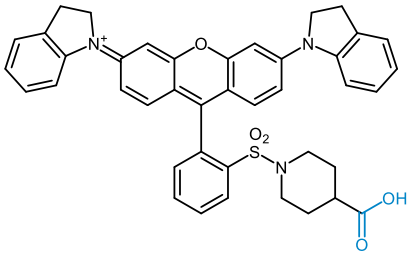
Nom	KcapQ	
Représentation simplifiée de la sonde		
Modalité optique	Fluorophore	Quencher
Structures moléculaires		
Dénominations	Alexa Fluor 647 (AF 647)	QSY21
Exc/Em	647/665	661/-

Figure 35 : Carte d'identité de la sonde fluorescente turn-ON KcapQ[55]
Exc : longueur d'onde maximale d'excitation (nm)
Em : longueur d'onde maximale d'émission (nm)

La sonde QCASP3.2, développée parallèlement par notre équipe (en collaboration avec QUIDD) et construite à partir de la séquence de ciblage enzymatique DEVDA et du couple Cy5.0/QSY21, a été testée dans un contexte hypoxique de l'ischémie cérébrale.[56,57] (Figure 36)

En effet, dans le cadre d'accidents vasculaires, la diminution voire l'arrêt de l'oxygénation des cellules entrainent des vagues apoptotiques responsables de conséquences neurologiques importantes en cas de survie. Cet exemple, testé *in vitro* et *ex vivo*, étend les applications biomédicales potentielles des sondes ciblant la caspase-3, complémentairement à un usage auxiliaire oncologique.

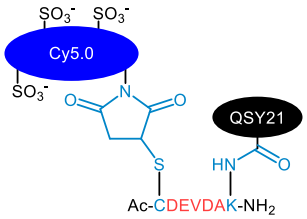
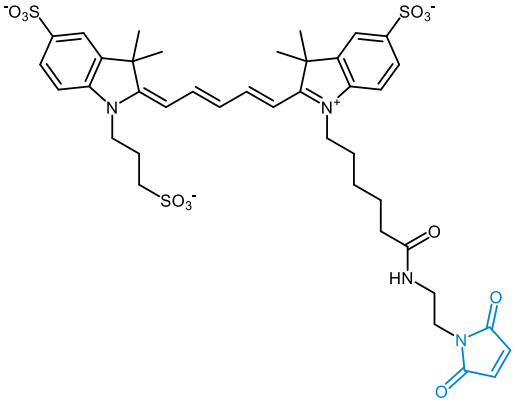
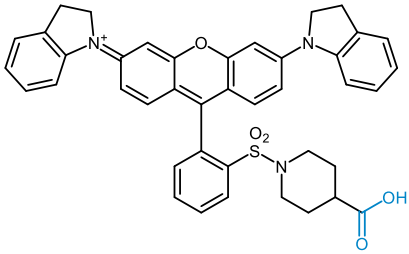
Nom	QCASP3.2	
Représentation simplifiée de la sonde		
Modalité optique	Fluorophore	Quencher
Structures moléculaires		
Dénominations	Cy5.0	QSY21
Exc/Em	647/665	661/-

Figure 36 : Carte d'identité de la sonde fluorescente turn-ON QCASP3.2[56,57]
Exc : longueur d'onde maximale d'excitation (nm)
Em : longueur d'onde maximale d'émission (nm)

Des références commerciales sont également disponibles pour imager l'apoptose au sein de cultures cellulaires. Généralement sous forme de kits prêts à l'emploi, ces dispositifs sont utilisés afin d'évaluer l'efficacité de molécules antinéoplasiques cytotoxiques testées sur des lignées cancéreuses.

Par exemple, le NucView 488 (Biotium) constitue un outil commercial performant de détection fluorogénique des caspases-3 et -7 au sein de cellules vivantes. Cette sonde profluorescente est composée de la séquence tétrapeptidique de ciblage DEVD couplée à un fluorophore (structure non explicitée et protégée : λ_{Exc} = 507 nm et λ_{Em} = 528 nm) s'intercalant dans l'ADN et colorant ainsi le noyau après hydrolyse enzymatique.

Cependant, les propriétés spectroscopiques de ces sondes limitent leur exploitation à l'imagerie de surface (microscopie, cytométrie de flux, …).

3.2.1.2. MODALITE NUCLEAIRE

Les radiotraceurs apoptotiques de la caspase-3 peuvent être associés à l'imagerie TEP ou SPECT.

Par exemple, [^{18}F]CP18[58,59], constitué du pentapeptide de ciblage enzymatique DEVDA, est radiomarqué par cycloaddition cupro-catalysée du [^{18}F]fluoropentyne sur l'extrémité *N*-terminale de la structure peptidique fonctionnalisée par une fonction azoture. (Figure 37)

De plus, la vectorisation cytoplasmique de la sonde est assurée par un groupement perméabilisant PEG (polyethylene glycol) couplé sur l'extrémité *C*-terminale du peptide support.

Ainsi, l'aspect conceptuel innovant de ce radiotraceur repose, dans un premier temps, sur la stratégie de vectorisation basée sur les groupements PEG, puis sur la séquestration intracellulaire du fragment clivé radioactif.

La rétention et l'accumulation cellulaire du signal radioactif pallie, dans le cas de la modalité nucléaire, l'absence de modulation de la radioactivité.

Cette stratégie de perméabilisation, couplée à une détection efficace de la caspase-3 activée, permet d'envisager des applications pré-cliniques de ce traceur après son évaluation *in vitro* et *in vivo*.

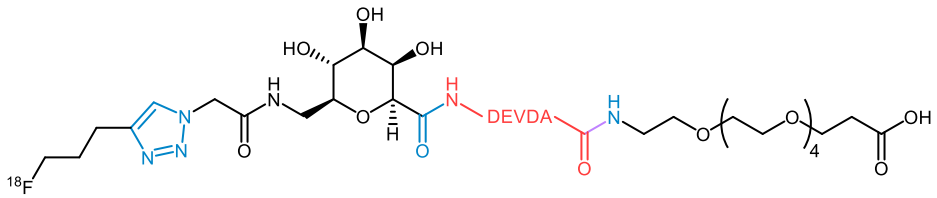
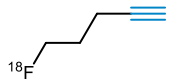
Nom	[^{18}F]CP18
Représentation simplifiée de la sonde	
Structure moléculaire du groupement prosthétique	

Figure 37 : Carte d'identité du radiotraceur apoptotique [^{18}F]CP18[58,59]

Précédemment présentée et structuralement corrélé à notre plateforme radiomarquable bimodale conjugable **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$**, la sonde ^{99m}Tc(Me)FGCDEVD[41] est un radiotraceur apoptotique SPECT. (Figure 23)

Enfin, ces différents exemples monomodaux mettent en exergue différentes stratégies de vectorisation cytoplasmique :

- Les peptides de pénétration cellulaire (CPP) présentant une séquence peptidique comportant des amino-acides chargés positivement (D/L-lysine ou D/L-arginine).
- Les molécules pégylées

Ce paramètre est crucial lorsque les cibles enzymatiques sont intracellulaires. La livraison cytoplasmique de la sonde s'appuie ainsi sur ces précédents éléments de pénétration cellulaire, renforcée par sa structure peptidique principale généralement hydrosoluble.

3.2.1.3. BIMODALITE OPTIQUE ET NUCLEAIRE

La multimodalité et plus précisément l'association des modalités optique et nucléaire a été également explorée pour la détection de la caspase-3.[60]

A notre connaissance, deux exemples de sondes-substrat bimodales activables ont été publiées. Les mécanismes de quenching mis en jeu sont la modification structurale du fluorophore d'une part et l'association d'un couple moléculaire fluorophore/quencher. (Chapitre 1.2.1.2.2.)

Le premier exemple s'appuie sur une stratégie synthétique de dissymétrisation de rhodamine profluorescente fonctionnalisée par la séquence peptidique de ciblage d'une part, et une cage chélatant le ^{99m}Tc, dérivée de structure peptidique (SAAC : single amino acid chelate), d'autre part.[61] (Figure 38)

Le clivage enzymatique libère une rhodamine sous forme d'aniline libre, entrainant l'ouverture spirolactonique et le retour de fluorescence du fluorophore.

Cet outil, testé sur le petit animal, a été breveté et est actuellement en phase de tests pré-cliniques. Cependant, les propriétés spectroscopiques de la rhodamine, hors de la fenêtre de transparence biologique, limitent la translation clinique.

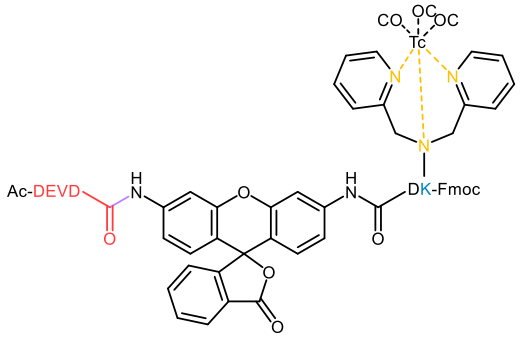
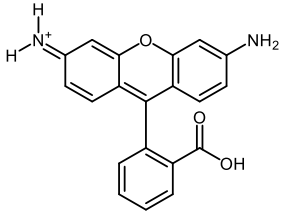
Nom	Ac-DEVD-R110-D-SAAC-Fmoc
Représentation simplifiée de la sonde	
Modalité optique	
Structure moléculaire	
Dénomination	R110
Exc/Em	499/521
Modalité nucléaire	Chélation du ^{99m}Tc par une structure SAAC

Figure 38 : Carte d'identité de la sonde quenchée turn-ON Ac-DEVD-R110-D-SAAC-Fmoc[61]
Exc : longueur d'onde maximale d'excitation (nm)
Em : longueur d'onde maximale d'émission (nm)

En outre, les sondes bimodales peuvent également associer un quencher, selon l'approche turn-ON, en plus d'un groupe prosthétique et d'un fluorophore. Le second exemple de sondes bimodales enzymatiques spécifiques de la caspase-3 exploite la structure coordinante DOTA pour chélater le ^{64}Cu pour l'imagerie TEP, tandis que la modalité optique est représentée par un dérivé de Cy7 associé au quencher IRDyeQC1. Le couplage de ces trois éléments de marquage exploite respectivement l'extrémité *N*-terminale et deux résidus de ligation lysines, incorporés de part et d'autre de la séquence de ciblage enzymatique. (Figure 40)

Par ailleurs, les résidus amino-acides additionnels présent sur le squelette peptidique de cette sonde permettent une solubilisation optimale de l'outil et augmente sa stabilité en milieu biologique, selon les auteurs.

Cette sonde bimodale a fait l'objet d'études enzymatiques *in vivo* sur le petit animal. L'acquisition des signaux fluorescent et radioactif a été parallèlement effectuée. Deux implants sous-cutanés contenant la sonde ^{64}Cu-LS498 ont été implantés : le premier, dans le flanc gauche de la souris, contenant une enzyme modèle (BSA) et le second, dans la partie droite, la caspase-3.[62] (Figure 39)

L'intensité de fluorescence détectée est plus importante en présence de l'enzyme cible, comparativement au témoin enzymatique non spécifique, et est maximale après 4 heures d'injection. De façon complémentaire, l'image scintigraphique co-localise le signal fluorescent.

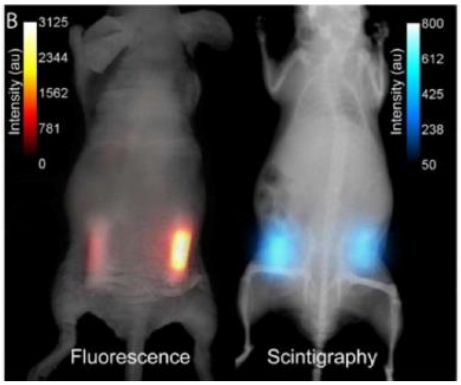


Figure 39 : Imagerie du petit animal obtenue 30 min après l'injection de la sonde ^{64}Cu-LS498[62]

La caspase-3, en tant que biomarqueur apoptotique, est une cible enzymatique attractive et le développement d'outils mono- et bi-modaux détectant son activité catalytique a constitué une large partie de cette thèse.

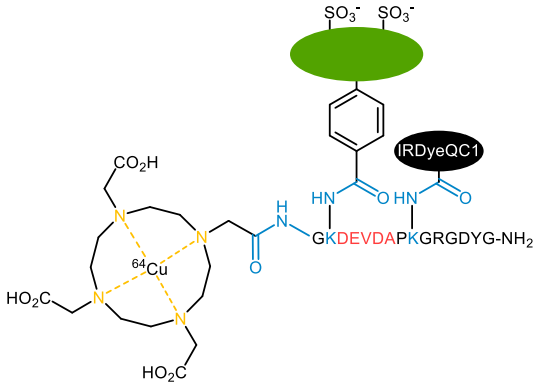
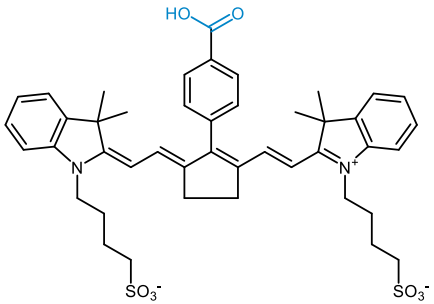
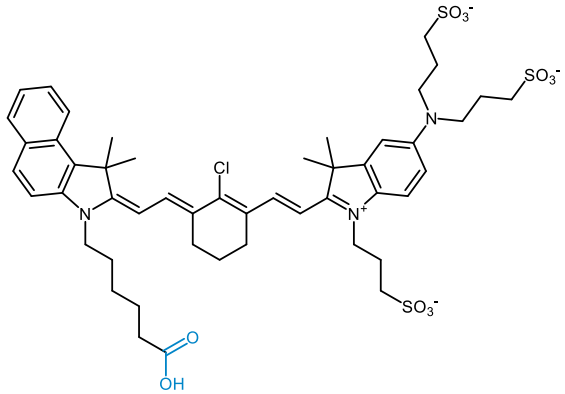
Nom	^{64}Cu-LS498	
Représentation simplifiée de la sonde		
Modalité optique	Fluorophore	Quencher
Structures moléculaires		
Dénominations	LS276 (dérivé de Cy7)	IRDyeQC1 (dérivé de Cy7)
Exc/Em	805/835	788/-
Modalité nucléaire	Chélation du ^{64}Cu par un DOTA	

Figure 40 : Carte d'identité de la sonde-substrat bimodale ^{64}Cu-LS498[62]
Exc : longueur d'onde maximale d'excitation (nm)
Em : longueur d'onde maximale d'émission (nm)

3.3. OBJECTIFS ET STRATEGIES

Ce projet couvre les étapes de conception et de synthèse, jusqu'à la validation biologique d'un nouvel outil moléculaire permettant d'imager l'apoptose *in vivo*.

Ce traceur apoptotique est envisagé comme un auxiliaire oncologique, complémentaire à une thérapie anti-cancéreuse (chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapie, …). Ainsi, l'exploitation d'un outil moléculaire imageant l'apoptose, parallèlement à la stratégie curative indiquée, permettrait d'apprécier son efficacité thérapeutique voire l'ajustement de la dose.

Notre objectif est d'imager la restauration du programme apoptotique au sein des cellules cancéreuses en exploitant une stratégie de détection enzymatique activable turn-ON spécifique de la caspase-3 activée.

La sonde inclue une séquence peptidique de ciblage d'une part, et plusieurs éléments de marquage d'autre part.

En effet, le pentapeptide DEVDA a été sélectionné comme séquence pentapeptidique de ciblage enzymatique, le résidu additionnel alanine permettant une meilleure affinité pour l'enzyme cible, l'hydrolyse enzymatique intervenant entre les résidus D et A.[63–65]

De plus, la détection du clivage protéolytique catalysé par la caspase-3, constituant l'aspect innovant du projet, repose sur la coopération synergique des techniques d'imagerie optique et nucléaire. Cette bimodalité permettrait de répondre au principal enjeu de ce projet : proposer une détection enzymatique *in vivo*, non-invasive, localisée, sensible et hautement résolue permettant d'imager l'apoptose.

Diverses problématiques ont été mises en exergue à travers les différents exemples explicités et interviennent également dans la conduite de cet ambitieux projet :

- La cohabitation des modalités optique et nucléaire au sein de la même structure moléculaire
  Elles seront donc, dans un premier temps, appréciées individuellement. Ainsi, la réalisation de ce projet s'appuiera sur plusieurs générations évolutives de sondes afin d'assurer un développement progressif et pérenne du projet.
- La pénétration intracellulaire
  C'est un des paramètres cruciaux dans le développement d'outils imageurs *in vivo*. En effet, la vectorisation et diffusion de la sonde dans le compartiment cytoplasmique contenant l'enzyme cible est un paramètre déterminant, la membrane cytoplasmique de la cellule constituant donc le premier obstacle à une détection enzymatique intracellulaire efficace.
- La stabilité en milieu physiologique

Une fois internalisée, le milieu intracellulaire est un environnement complexe, dense et hostile pour une sonde exogène. Outre les peptidases non spécifiques, la sonde peut être la cible de protéases apparentées. Les caspases présentent un domaine d'homologie de substrat entre elles et constituent donc une concurrence enzymatique non négligeable pouvant générer un signal non spécifique (faux positif) et/ou une dégradation anticipée.

Ainsi, ces éléments ont orienté la conception générale de notre outil reposant sur une stratégie de détection enzymatique activable turn-ON.

Dans un premier temps, la sonde native, c'est-à-dire avant clivage par la protéase cible, n'émet pas de fluorescence (état OFF) car le FRET, entre le fluorophore et le quencher, est actif.

L'hydrolyse enzymatique de la liaison amide, entre les résidus D et A, génère deux fragments, restaurant la capacité émissive du fluorophore (état ON).

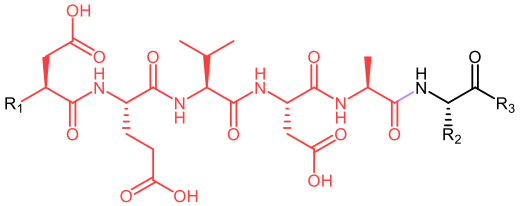
Parallèlement, la stratégie de perméabilisation devrait répondre à un triple objectif d'internalisation puis d'accumulation intracellulaire du premier fragment et d'externalisation du second fragment, après protéolyse. L'accumulation du premier fragment fluorescent est justifiée par la perte du motif perméabilisant, contrairement au second fragment.

Cette séquestration intracellulaire permettra une amplification du signal fluorescent et une accumulation du signal radioactif, induisant une augmentation du ratio signal/bruit.

Contrairement à la modalité optique, la modalité nucléaire ne peut être modulée, les rayons γ étant émis selon la décroissance physique naturelle du radionucléide. L'augmentation de la concentration locale en sonde représente ainsi la seule stratégie éligible.

Ce projet s'est principalement construit sur plusieurs générations évolutives de sondes (**P1**, **P2** et **P3**) basées sur la séquence de ciblage pentapeptidique DEVDA récurrente. (Figure 41)

La première génération a mis à l'épreuve la modalité optique, tandis que les suivantes, à vocation bimodale, ont tenté de répondre aux problématiques biologiques associées à la détection *in vivo* de caspase-3, malgré les impasses et difficultés synthétiques.



Générations de sondes	Séquence peptidique							
	R_1	Asp	Glu	Val	Asp	Ala	R_2	R_3
première génération	Ac-Lys-NH	séquence pentapeptidique de ciblage enzymatique					$(CH_2)_4NH_2$	NH_2
seconde génération	NH_2						CH_2SH	Gly-OH
troisième génération	$HCC(CH_2)_2CO$ (pentynoyl)						$(CH_2)_4NH_2$	Glu-Phe-NH_2

Figure 41 : Stratégies générales de fonctionnalisation du squelette peptidique des trois générations de sondes-substrat synthétisées

3.4. SONDE DE PREMIERE GENERATION

3.4.1. PRESENTATION DE **P1** (PROBE 1)

Dans un premier temps, la détection de l'activité enzymatique de la caspase-3 implique une seule des deux modalités envisagées. En effet, l'imagerie optique de fluorescence a d'abord été exploitée individuellement pour la génération d'une première sonde fluorogénique monomodale.

Cette première génération avait pour but de vérifier simultanément deux paramètres cruciaux :

- Valider l'association fluorophore/quencher en évaluant le fonctionnement et l'efficacité de l'interrupteur de fluorescence via le FRET.
- Apprécier la spécificité de la sonde-substrat, basée sur la séquence pentapeptidique de ciblage DEVDA, pour l'enzyme cible.

La synthèse de **P1**, proposée en six étapes et exploitant le savoir-faire de l'équipe[66], a été réalisée à partir de trois synthons : (Figure 42)

- Le fluorophore **Cy5.0$_B$** (synthèse explicitée au Chapitre 2.2.2.)
- Le quencher **BHQ3$_A$**
- L'heptapeptide bifonctionnalisable **Ac-KDEVDAK(Dde)-NH$_2$**

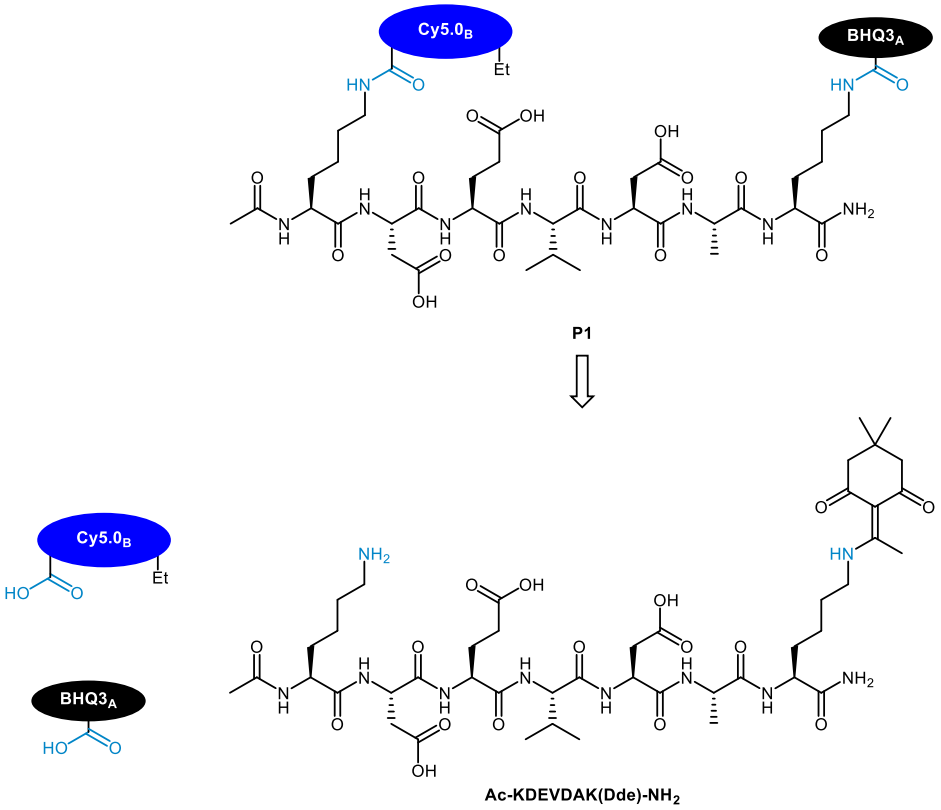


Figure 42 : Stratégie rétrosynthétique de **P1** à partir des trois synthons constitutifs

3.4.2. SYNTHONS CONSTITUTIFS DE **P1**

3.4.2.1. LE QUENCHER **BHQ3$_A$**

La famille des Black Hole Quenchers (BHQ) doivent leurs propriétés d'extinction de fluorescence à la présence d'un pont diazo, dont l'isomérisation entraîne une désexcitation non radiative.[67]

Le BHQ3, par ses propriétés d'absorption, est un quencher optimal pour un appariement FRET avec une Cy5.0.

La stratégie de synthèse du BHQ3 exploite une méthodologie développée par l'équipe.[68] (Figure 43)

Elle répond à un double objectif de formation du pont diazo, nécessaire à l'extinction d'une part, et d'introduction d'un point de ligation sous forme d'acide carboxylique d'autre part.

Dans un premier temps, le Methylene Violet 3RAX, précurseur commercial des dérivés de BHQ3, a été mis en présence du tetrafluoroborate de nitrosonium ($NOBF_4$), source de cation nitrosonium NO^+.

L'intermédiaire diazonium **8** a ensuite réagi avec l'aniline **9** pour former le quencher diazoïque final. **BHQ3$_A$** a été obtenu avec un rendement de 50% (109 mg) après purifications en phase normale puis en phase inverse.

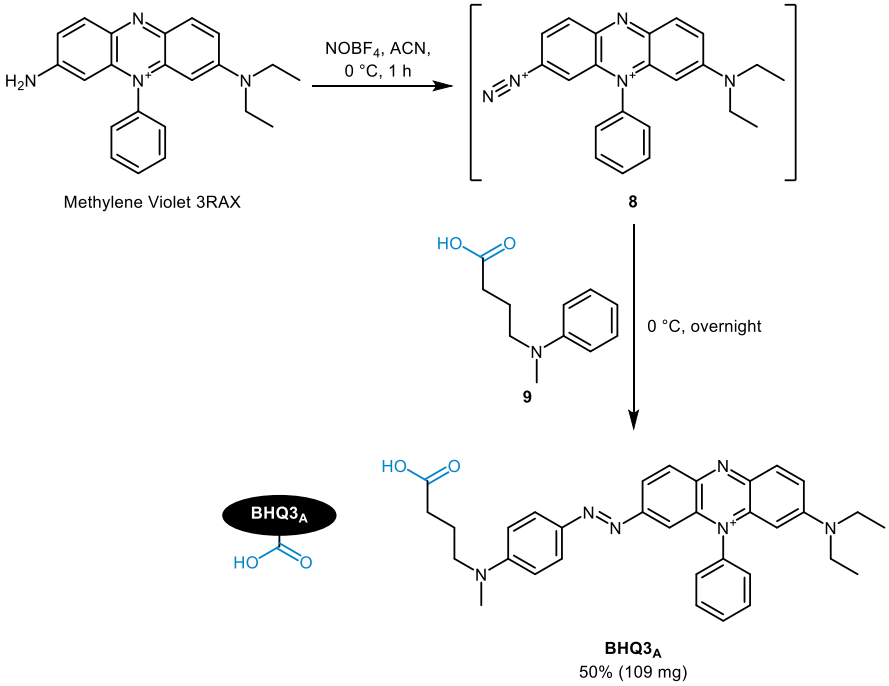


Figure 43 : Synthèse du quencher **BHQ3$_A$**

3.4.2.2. L'HEPTAPEPTIDE BIFONCTIONNALISABLE **AC-KDEVDAK(Dde)-NH_2**

3.4.2.2.1. STRATEGIE DE SYNTHESE

La synthèse de **P1** repose principalement sur une stratégie de double fonctionnalisation orthogonale d'une séquence heptapeptidique incluant le récurrent pentapeptide substrat de la caspase-3. En effet, ce peptide de ciblage enzymatique DEVDA est encadré, aux extrémités *N*- et *C*-terminales, par deux lysines qualifiées de résidus de ligation. (Figure 44)

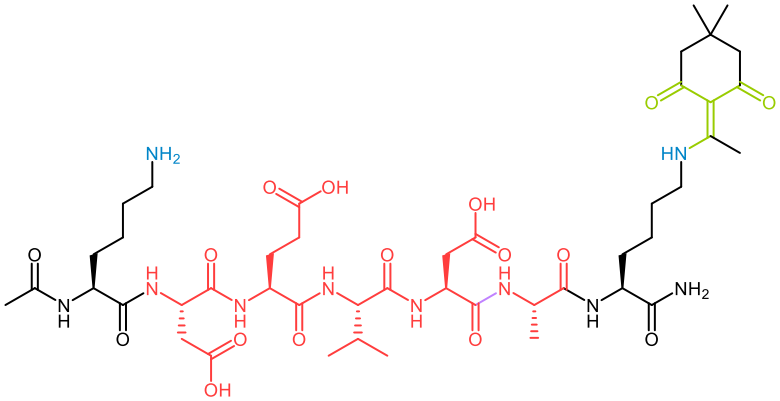
La double fonctionnalisation de cette séquence est réalisée par couplages peptidiques engageant, le résidu lysine *N*-terminal et le fluorophore **Cy5.0$_B$** d'une part, ainsi que le résidu lysine *C*-terminal et le quencher **BHQ3$_A$** d'autre part. Afin d'effectuer ces deux ligations séquentiellement, les amines primaires des chaines latérales des résidus lysines *N*- et *C*-terminaux sont respectivement protégées orthogonalement par le carbamate Boc et l'énaminone Dde. Ce dernier groupement protecteur présente le double avantage d'introduire une troisième dimension d'orthogonalité (dans les conditions de synthèse et de déprotection envisagées) et de présenter une signature spectroscopique caractérisée par deux bandes d'absorption à 255 et 314 nm.

Par ailleurs, les extrémités *C*- et *N*-terminales sont respectivement protégées par des fonctions amides primaire et secondaire non réactives afin de prévenir les digestions enzymatiques réalisées en milieux biologiques par les exoprotéases.

En outre, les acides aspartiques et glutamique présentent latéralement une fonction acide carboxylique réactive vis-à-vis de nucléophiles aminés. La protection de ces fonctions est donc capitale pour prévenir les couplages croisés anarchiques lors de la synthèse supportée du précurseur peptidique.

Compatibles avec la stratégie de synthèse supportée Fmoc/^{t}Bu mise en œuvre, les esters *tertio*-butyliques ont été sélectionnés pour protéger ces résidus.

Enfin, les résidus valine et alanine, présentant des chaînes latérales aliphatiques saturées (*iso*propyle et méthyle, respectivement), ne nécessitent pas de protection.



Séquence peptidique		**Extrémité *N*-terminale**	**Lys**	**Asp**	**Glu**	**Val**	**Asp**	**Ala**	**Lys**	**Extrémité *C*-terminale**
Résidu amino-acide		-	-	séquence pentapeptidique de ciblage enzymatique					-	-
Fonction latérale	Rôle		amine primaire de ligation						amine primaire de ligation	
	Protection	amide secondaire non réactif	Boc[a]	^{t}Bu[a]	^{t}Bu[a]	-	^{t}Bu[a]	-	Dde de détection	amide primaire non réactif

Figure 44 : Conception du synthon peptidique **Ac-KDEVDAK(Dde)-NH_2**
[a]protections acido-hydrolysées dans les conditions réactionnelles de clivage du support solide

3.4.2.2.2. SYNTHESE

La synthèse supportée de l'heptapeptide **10^{S}** a été assistée et effectuée selon les conditions précédemment explicitées (Chapitre 2.3.1.2.). (Figure 45)

Réalisée également en condition supportée, l'étape d'acétylation a permis le verrouillage de l'extrémité nucléophile *N*-terminale (capping) de **10^{S}** en présence d'anhydride acétique, générant l'intermédiaire peptidique supporté **11^{S}**.

A l'issue de ces deux étapes supportées, l'heptapeptide **Ac-KDEVDAK(Dde)-NH$_2$** a été isolé, par clivage du support solide (95% TFA) puis par purification semi-préparative en phase inverse, à hauteur de 123 mg soit 49% de rendement (basé sur le loading théorique de la résine : 1 mmol/g).

Ces conditions réactionnelles de clivage, générant la fonction amide primaire *C*-terminale, ont simultanément permis l'hydrolyse acido-catalysée des esters *tertio*-butyliques (protégeant les acides carboxyliques des chaînes latérales des résidus aspartiques et glutamique) et du carbamate Boc (protégeant l'amine primaire de la chaîne latérale du résidu lysine *N*-terminal).

En outre, le groupement Dde, protégeant l'amine primaire de la chaîne latérale du résidu lysine *C*-terminal, a été stratégiquement conservé afin d'assurer un couplage peptidique sélectif entre la fonction amine primaire du résidu lysine *N*-terminal et la fonction acide carboxylique de **Cy5.0$_B$**.

Par ailleurs, le chromophore Dde, protégeant l'amine primaire du résidu lysine *C*-terminal, permet la détection analytique de l'heptapeptide **Ac-KDEVDAK(Dde)-NH$_2$**.

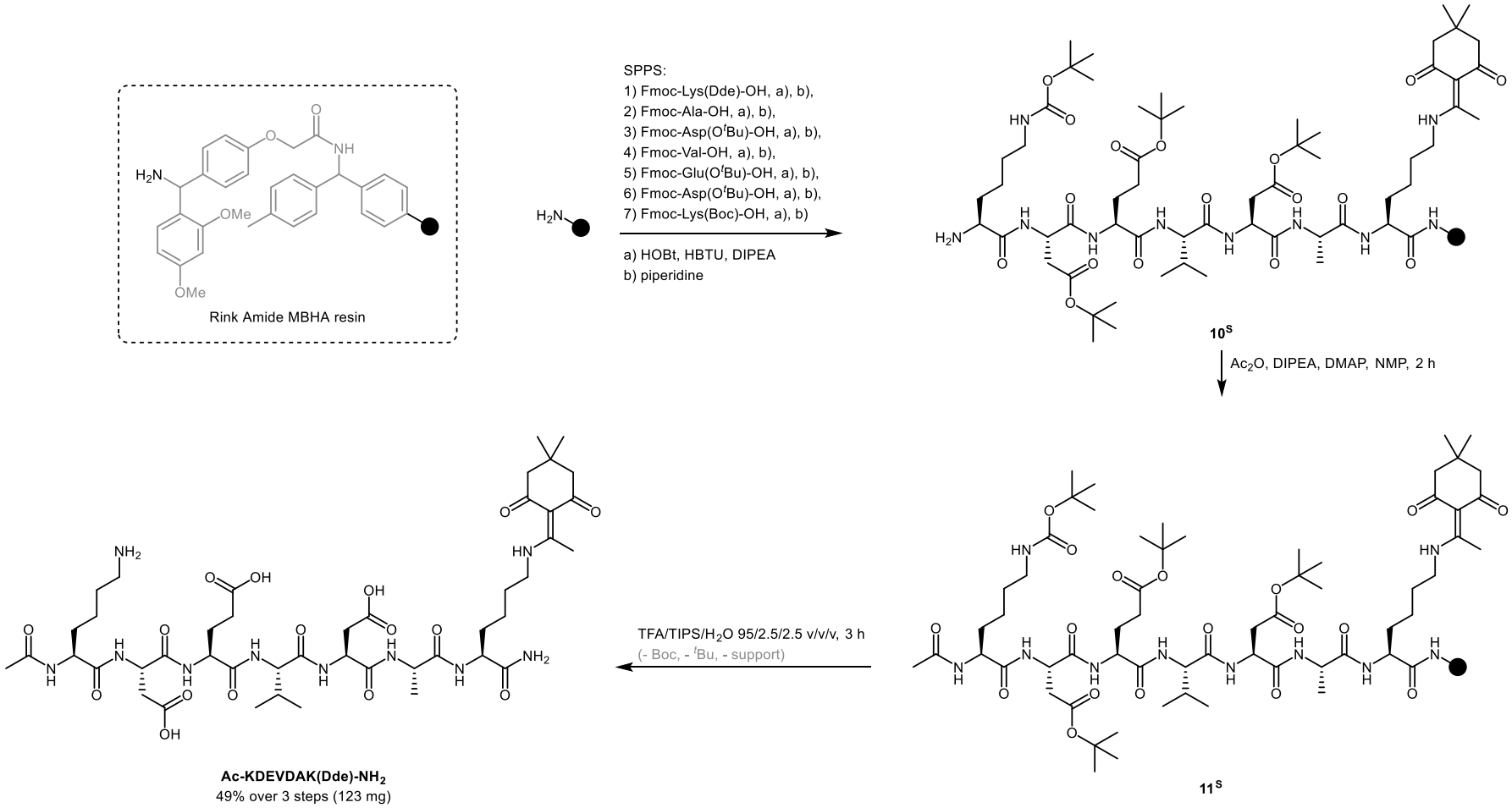


Figure 45 : Synthèse de l'heptapeptide bifonctionnalisable **Ac-KDEVDAK(Dde)-NH$_2$**

3.4.3. SYNTHESE DE **P1** A PARTIR DES TROIS SYNTHONS **Ac-KDEVDAK(Dde)-NH_2, Cy5.0$_B$** ET **BHQ3$_A$**

La construction moléculaire de **P1** s'appuie sur les couplages peptidiques séquentiels des trois synthons précédemment synthétisés.

Le premier couplage peptidique clé, entre l'amine primaire du résidu lysine *N*-terminal de **Ac-KDEVDAK(Dde)-NH_2** et l'acide carboxylique de **Cy5.0$_B$**, a été réalisé dans les conditions de couplage peptidique précédemment explicitées et optimisées (Chapitre 2.4.1.). (Figure 46)

Consécutivement, l'amine primaire du résidu lysine *C*-terminal de l'intermédiaire peptidique fluorescent **12** a été déprotégée en présence d'hydroxylamine, libérant le second point de ligation.

L'étape finale de couplage peptidique entre l'amine primaire du résidu lysine *C*-terminal de **Ac-K(Cy5.0$_B$)DEVDAK-NH_2** et l'acide carboxylique de **BHQ3$_A$** a généré la sonde de première génération **P1**.

La sonde-substrat **P1** a finalement été isolée, après purification semi-préparative en phase inverse à hauteur de 1,5 mg soit 26% de rendement sur ces trois étapes.

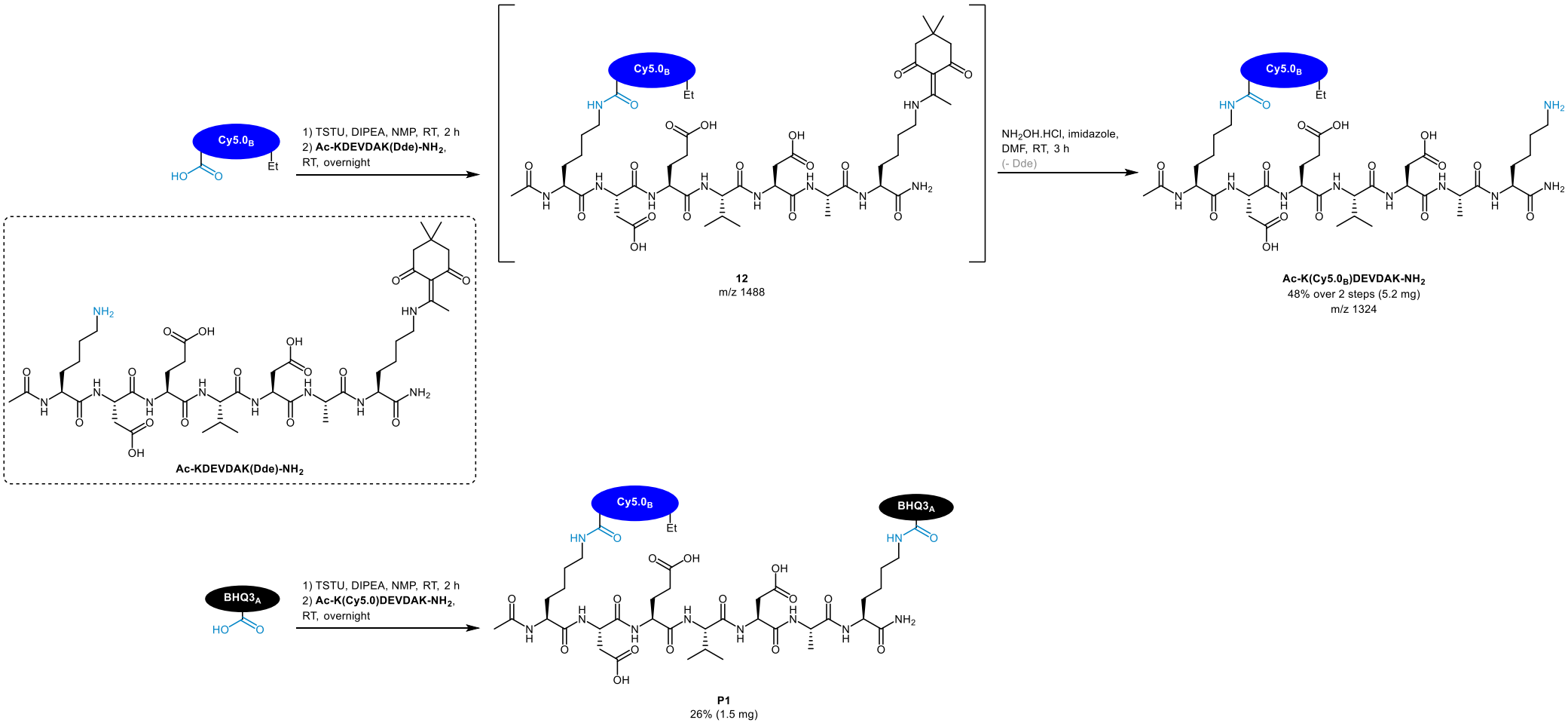


Figure 46 : Construction moléculaire de la sonde P1 à partir de **Ac-KDEVDAK(Dde)-NH$_2$**, **Cy5.0$_B$** et **BHQ3$_A$**

Tableau 1 : Bilan des étapes de la stratégie de synthèse de la première génération de sonde-substrat

Étapes	**Descriptifs**	**Molécules obtenues**	**Contrôle qualité**	**Figures correspondantes**
1/6[S]	SPPS de **10**[S]	**10**[S]	Test de Kaiser	Figure 45
2/6[S]	Acétylation de l'extrémité *N*-terminale de **11**[S]	**11**[S]		
3/6	Clivage du support solide et hydrolyse acido-catalysée des esters *tertio*-butyliques et du carbamate Boc	**Ac-KDEVDAK(Dde)-NH_2**	m/z 1009[H]	
4/6	Couplage entre le résidu lysine *N*-terminal et **Cy5.0**$_B$	**12**	m/z 1488[L]	Figure 46
5/6	Déprotection du résidu lysine *C*-terminal	**Ac-K(Cy5.0**$_A$**)DEVDAK-NH_2**	m/z 1324[H]	
6/6	Couplage entre le résidu lysine *C*-terminal et **BHQ3**$_A$	**P1**	m/z 959[H]	

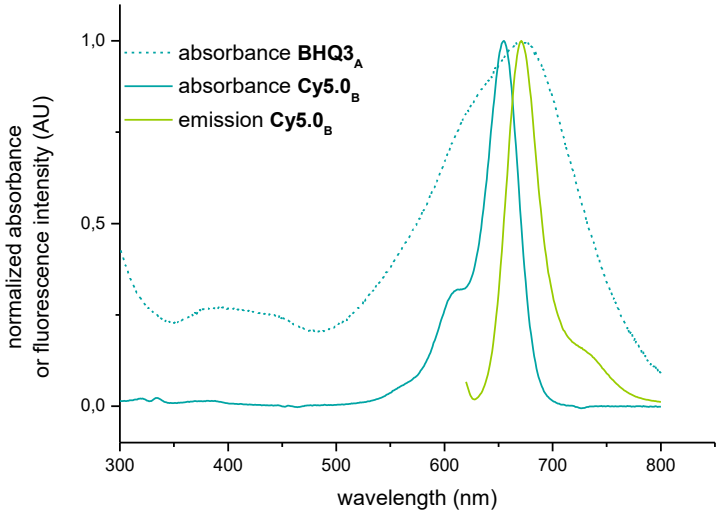
[S]étape supportée ; [H]détecté en spectroscopie de masse haute résolution (HRMS) ; [L]détecté en spectroscopie de masse basse résolution (LRMS)

3.4.4. VALIDATION *IN VITRO*

La molécule finale **P1**, précédemment synthétisée, a été testée en présence de caspase-3 recombinante humaine.

3.4.4.1. ETUDE DES PROPRIETES SPECTROSCOPIQUES DU COUPLE FLUOROPHORE/QUENCHER

Les propriétés spectroscopiques du couple **Cy5.0$_B$/BHQ3$_A$** ont été mesurées et révèlent un recouvrement idéal des spectres d'émission de **Cy5.0$_B$** et d'absorption de **BHQ3$_A$**, confirmant une association performante dans un système FRET. (Figure 47)



Composés	Solvant	λ_{MAX} Abs (nm)	λ_{MAX} Em (nm)	Déplacement de Stokes (nm)	Déplacement de Stokes (cm^{-1})	Φ_F	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Cy5.0$_B$	CH_2Cl_2	655	671	16	364	0.17[a]	123 800
BHQ3$_A$	CH_2Cl_2	673	-	-	-	-	82 050

Figure 47 : Propriétés spectroscopiques du couple **Cy5.0$_B$/BHQ3$_A$** déterminées à température ambiante
spectre d'émission acquis à λ_{exc} = 615 nm
[a]rendement quantique de fluorescence décrit dans le $CHCl_3$[69]

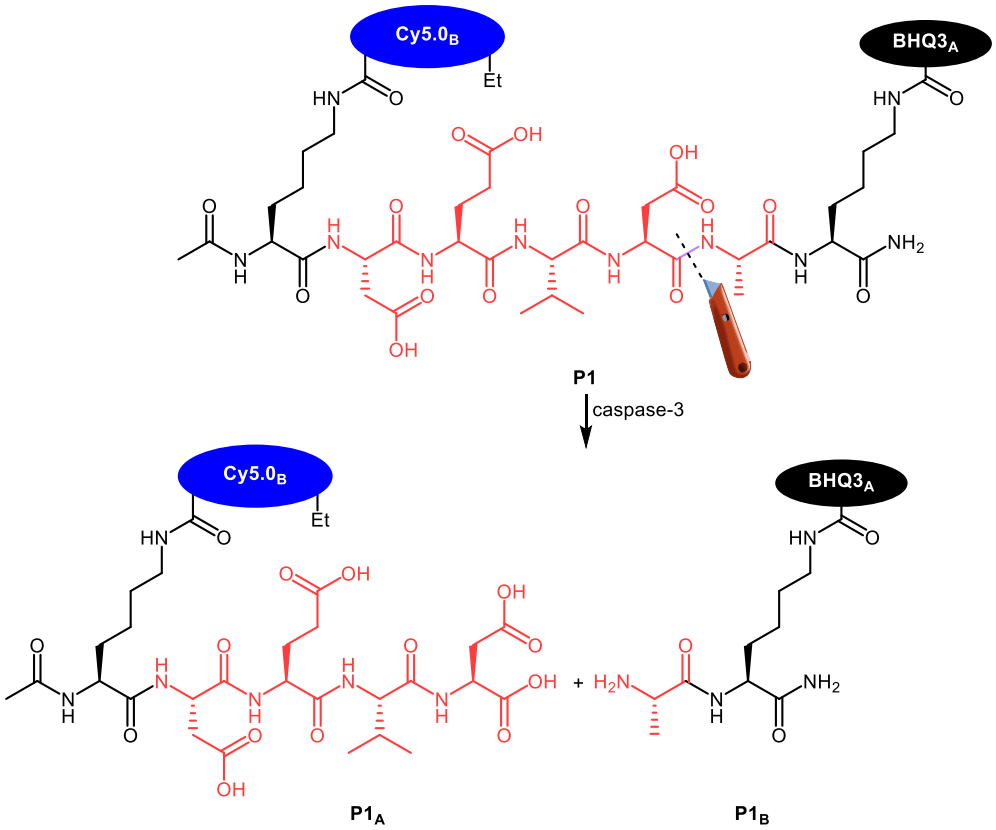


Figure 48 : Fragments moléculaires générés par protéolyse enzymatique de la caspase-3 sur la sonde **P1**

3.4.2.2. TESTS *IN VITRO*

Après avoir démontré que **Cy5.0$_B$** et **BHQ3$_A$** peuvent expérimentalement coopérer efficacement au sein d'un système FRET, l'évaluation du fonctionnement de l'interrupteur de fluorescence a été le second paramètre testé.

L'objectif est double :

- Contrôler l'extinction de fluorescence de **Cy5.0$_B$** par FRET lorsque la sonde **P1** est native.
- Mesurer la restauration et l'exaltation du signal de fluorescence lorsque la sonde est clivée en présence de caspase-3, générant les deux fragments **P1$_A$** et **P1$_B$**. (Figure 48)

Dans un premier temps, un suivi temporel fluorogénique a été effectué en incubant les deux partenaires enzyme/sonde-substrat (caspase-3/**P1**) dans un tampon enzymatique (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol).

Cette cinétique de déclenchement a permis l'observation de l'augmentation de l'intensité du signal de fluorescence au cours du temps. (Figure 49)

Ce signal fluorescent, détecté à 665 nm, correspond à la signature spectroscopique de la Cy5.0. (Figure 47)

Initialement extrêmement faible, ce signal augmente au cours du temps et atteint un plateau en fin de cinétique.

Le contrôle négatif sans enzyme permet de confirmer la stabilité de **P1**.

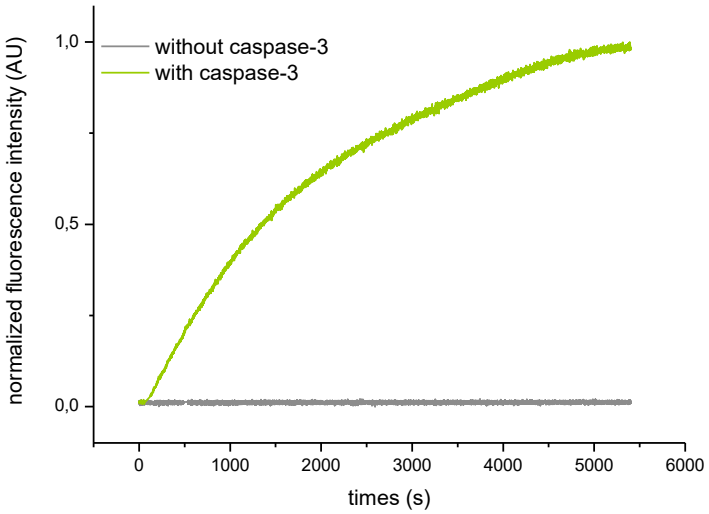


Figure 49 : Suivi cinétique de l'émission de fluorescence en fonction du temps de la sonde **P1** (1 µM) en présence (1 UE) et en absence de caspase-3

Acquisition du signal à 37 °C dans le tampon enzymatique (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol) à λ_{Exc} = 595 nm et λ_{Em} = 665 nm

Les spectres d'émission de la sonde **P1**, avant et après incubation avec la caspase-3, complètent les précédents résultats cinétiques. (Figure 50)

L'efficacité de quenching a été déterminée et évaluée à 98.3%. L'interrupteur de fluorescence, basé sur le couple **Cy5.0$_B$/BHQ3$_A$**, est ainsi considéré optimal, validant *de facto* notre hypothèse initiale.

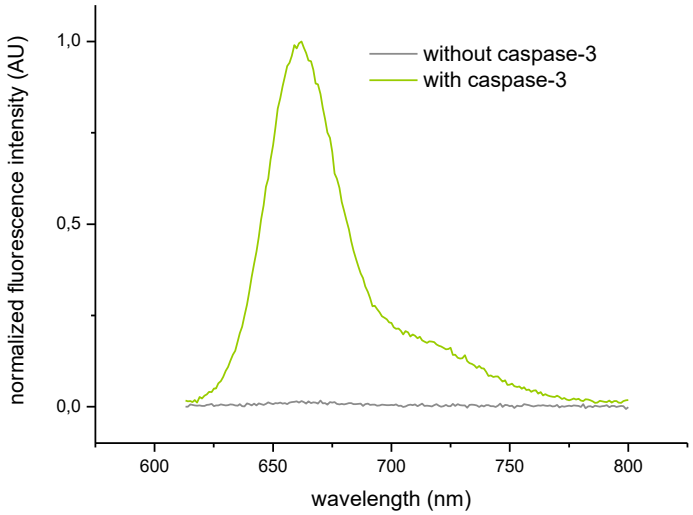


Figure 50 : Spectres d'émission de **P1** acquis à λ_{exc} = 595 nm et à 37 °C avant et après le suivi cinétique de déclenchement (Figure 49)

Ces résultats valident la première modalité optique de détection impliquée, en plus de confirmer l'affinité de la sonde-substrat pour l'enzyme cible.

Néanmoins, ces tests *in vitro*, restreints à la mise en présence de ces deux partenaires, ne prédisent pas le comportement de la sonde en milieu biologique, notamment sa stabilité.

3.4.2.3. EVALUATION DE LA STABILITE

La sonde **P1** a fait l'objet d'une étude préliminaire de stabilité en conditions physiologiques.

P1 a été solubilisée dans le PBS (à température ambiante et à l'abri de la lumière) et un suivi quotidien en RP-HPLC analytique a été effectué. Ces résultats encourageants indiquent cinq jours de stabilité sans dégradation.

Cette étude a été réalisée à la lumière de travaux émettant une réserve concernant l'exploitation de sondes-substrat impliquant un BHQ3 dans le cadre d'une détection *in vivo*, interrogeant la stabilité des quenchers diazoïques en milieu biologique.[70] Les conclusions des auteurs indiquent une dégradation par hydrolyse du pont diazo préalable à la protéolyse enzymatique ciblée.

Inspirée de leur méthodologie, la sonde **P1** a été incubée en présence de plasma sanguin humain puis analysée en RP-HPLC analytique. En effet, ce milieu biologique, issu de la centrifugation d'échantillon sanguin, mime le milieu circulant.

BHQ3$_A$ est stable après 24 heures d'incubation de la sonde **P1** en milieu plasmatique. Après 48 heures d'incubation dans les mêmes conditions, la sonde **P1** commence à être hydrolysée, générant un signal de fluorescence détectable à 665 nm.

Nous supposons donc que la sonde **P1**, comme toute molécule exogène, serait la cible de protéases non-spécifiques, des peptidases par exemple. Cependant, cette dégradation, intervenant après 48 heures d'incubation, permettrait un délai d'analyse relativement confortable, laissant présager une bonne stabilité dans les premières heures suivant l'injection de la sonde.

La synthèse de la sonde **P1** et ces études complémentaires préliminaires asseyent notre preuve de concept initial permettant d'envisager l'approfondissement de ce projet.

3.5. SONDE DE SECONDE GENERATION

3.5.1. PRESENTATION DE **P2** (PROBE 2)

Cette seconde génération, conçue comme une version améliorée de la première, doit répondre à un triple objectif. En plus des propriétés précédemment démontrées, cette seconde déclinaison doit permettre l'addition de la modalité nucléaire et la perméabilisation de la sonde vis-à-vis de la membrane plasmique.

Ainsi, les sites de ligation initiaux permettant les couplages des fluorophore et quencher doivent être conservés, tout en introduisant deux sites de ligation additionnels permettant le couplage de la structure peptidique chélatante radiomarquable d'une part et la pegylation d'autre part.

La synthèse de **P2** a été envisagée en sept étapes à partir des synthons suivants : (Figure 51)

- L'heptapeptide trifonctionnalisable **H-D(ODmab)E(ODmab)VD(ODmab)AC(S^{t}Bu)G-OH**
- Le bipode fluorescent **Cy5.0$_A$** (synthèse explicitée au Chapitre 2.2.1.2.)
- Les groupements perméabilisants PEG 4, 6, 8 et 12 présentant une fonction amine primaire conjugable avec une fonction acide carboxylique et disponibles commercialement
- Le quencher **BHQ3$_B$** présentant une fonction α-iodoacetamide conjugable avec la fonction thiol d'un résidu de ligation cystéine
- Le tétrapeptide chélatant **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)G-propargyl** dérivé de la structure apparentée **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$**

(Les synthèses de ces deux derniers synthons n'ont pas été finalisées suite aux résultats obtenus.)

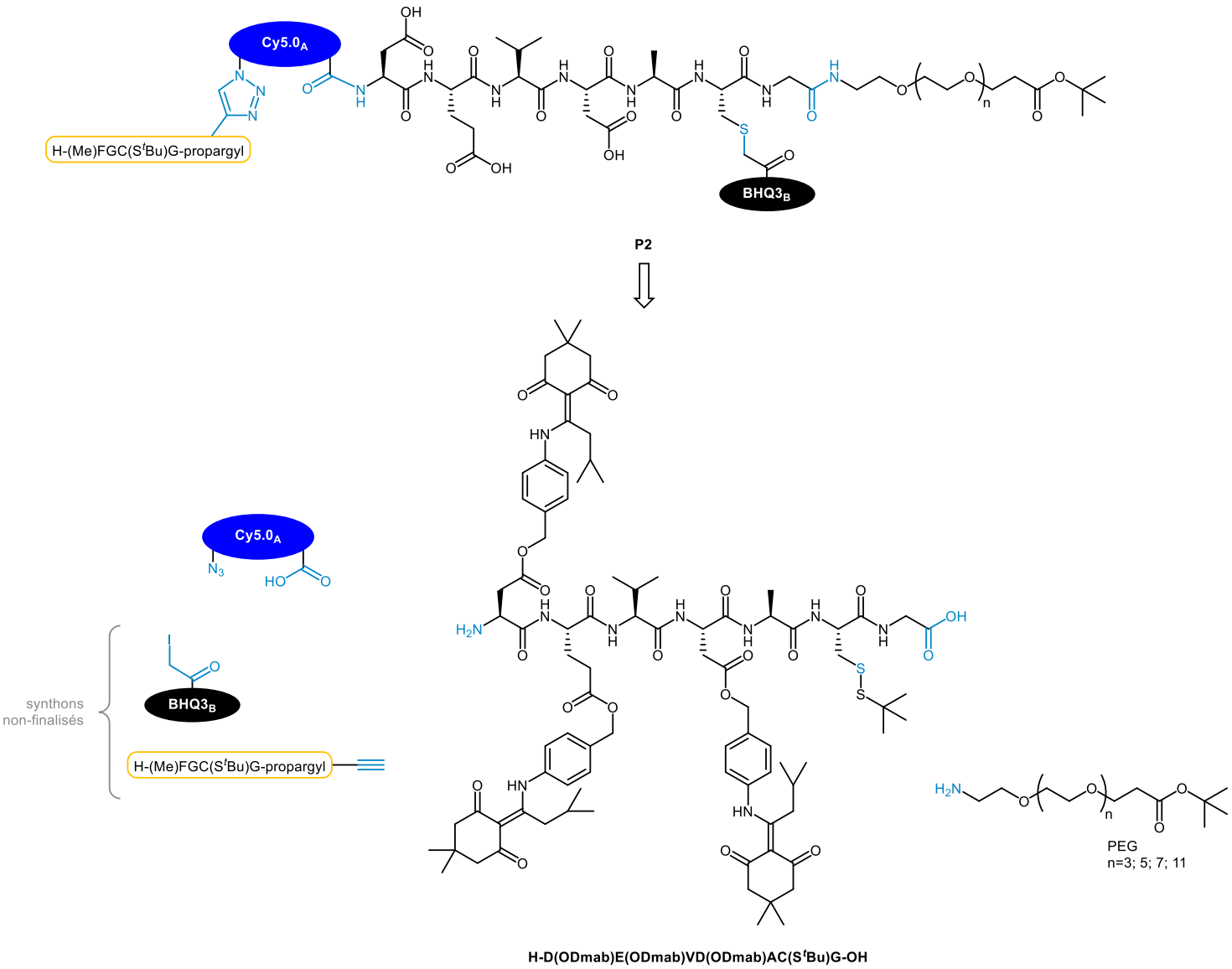


Figure 51 : Stratégie rétrosynthétique de **P2** à partir des cinq synthons constitutifs

3.5.2. SYNTHONS CONSTITUTIFS DE **P2**

3.5.2.1. L'HEPTAPEPTIDE TRIFONCTIONNALISABLE **H-D(ODmab)E(ODmab)VD(ODmab)AC(S^{t}Bu)G-OH**

3.5.2.1.1. STRATEGIE DE SYNTHESE

Comparativement à la sonde **P1**, trois modifications majeures ont été effectuées afin de permettre la trifonctionnalisation orthogonale du peptide-substrat récurrent de la caspase-3. (Figure 52)

Précédemment protégée sous la forme d'une fonction amide primaire, l'extrémité *C*-terminale, désormais sous la forme d'une fonction acide carboxylique, représente un nouveau point de ligation supplémentaire, non exploitable antérieurement.

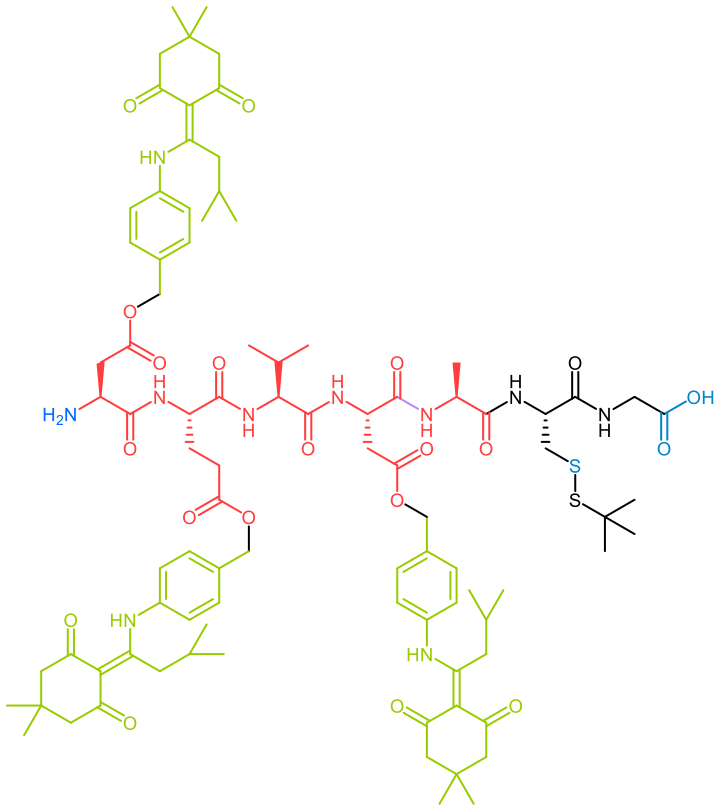
La résine Rink Amide MBHA, générant la fonction amide primaire *C*-terminale initiale, a ainsi été substituée par la résine 2-chlorotrityl. Clivable dès 1% de TFA, l'extrémité acide carboxylique *C*-terminale est générée dans des conditions douces de clivage, avantage supplémentaire lors de la manipulation de biomolécules sensibles comme les peptides. Néanmoins, l'usage de la résine 2-chlorotrityl peut induire, lors de son clivage, une racémisation du résidu amino-acide *C*-terminal. Des solutions commerciales sont proposées pour pallier cet inconvénient avec notamment des supports solides pré-chargés avec un résidu glycine.

Ce point de fonctionnalisation additionnel a pour but d'introduire, par couplage peptidique, le motif perméabilisant PEG. Disponibles commercialement de différentes longueurs (4, 6, 8 et 12 unités PEG), la génération de quatre peptides pegylés a été envisagée afin d'évaluer et d'optimiser la pénétration intracellulaire sur des outils de seconde génération.

En outre, la présence d'autres fonctions acides carboxyliques, issues des chaînes latérales des résidus récurrents de ciblage enzymatique aspartiques et glutamique, concurrencent ce nouveau site de ligation *C*-terminal.

Ainsi, les groupements protecteurs de ces trois résidus doivent être stratégiquement conservés afin d'assurer un couplage peptidique sélectif entre l'acide carboxylique de l'extrémité *C*-terminale et l'amine primaire des groupements perméabilisants PEG.

Une stratégie de protection alternative aux esters *tertio*-butyliques, protégeant initialement ces résidus aspartiques et glutamique de la séquence de ciblage enzymatique, doit donc être mise en œuvre.



Séquence peptidique		**Extrémité *N*-terminale**	**Asp**	**Glu**	**Val**	**Asp**	**Ala**	**Cys**	**Gly**	**Extrémité *C*-terminale**
Résidu amino-acide		-	séquence pentapeptidique de ciblage enzymatique					-	prévention de la racémisation	-
Fonction latérale	Rôle	amine primaire de ligation						thiol de ligation	-	acide carboxylique de ligation
	Protection	-	Dmab de détection	Dmab de détection	-	Dmab de détection	-	S^{t}Bu		-

Figure 52 : Conception du synthon peptidique **H-D(ODmab)E(ODmab)VD(ODmab)AC(S^{t}Bu)G-OH**

Parmi les différentes protections de la fonction acide carboxylique décrites et commercialement disponibles, le groupement Dmab a été introduit[71] et est reporté dans la synthèse de peptides fonctionnalisés[72,73] ou cycliques.

Développé par les industriels, ce groupement protecteur est apparenté au Dde et à sa déclinaison plus encombrée ivDde. (Figure 53)

Ces trois groupements protecteurs présentent un mécanisme de déprotection commun. La fonction amine primaire de la chaine latérale de résidu lysine est déprotégée en présence d'hydrazine, tandis que la déprotection de la fonction acide carboxylique est partielle dans ces conditions réactionnelles. En effet, l'aniline intermédiaire obtenue est finalement auto-immolée « spontanément », générant la fonction acide carboxylique et l'alcool benzylique *para*-aminé (PABA) après hydratation.

Les groupements protecteurs (iv)Dde et Dmab présentent le double avantage d'introduire une troisième dimension d'orthogonalité (dans les conditions de synthèse et de déprotection envisagées) et de présenter une signature spectroscopique caractérisée par deux bandes d'absorption à 255 et 314 nm.

Les groupements Dmab constituent ainsi la nouvelle stratégie de protection des résidus aspartiques et glutamique de la séquence de ciblage enzymatique.

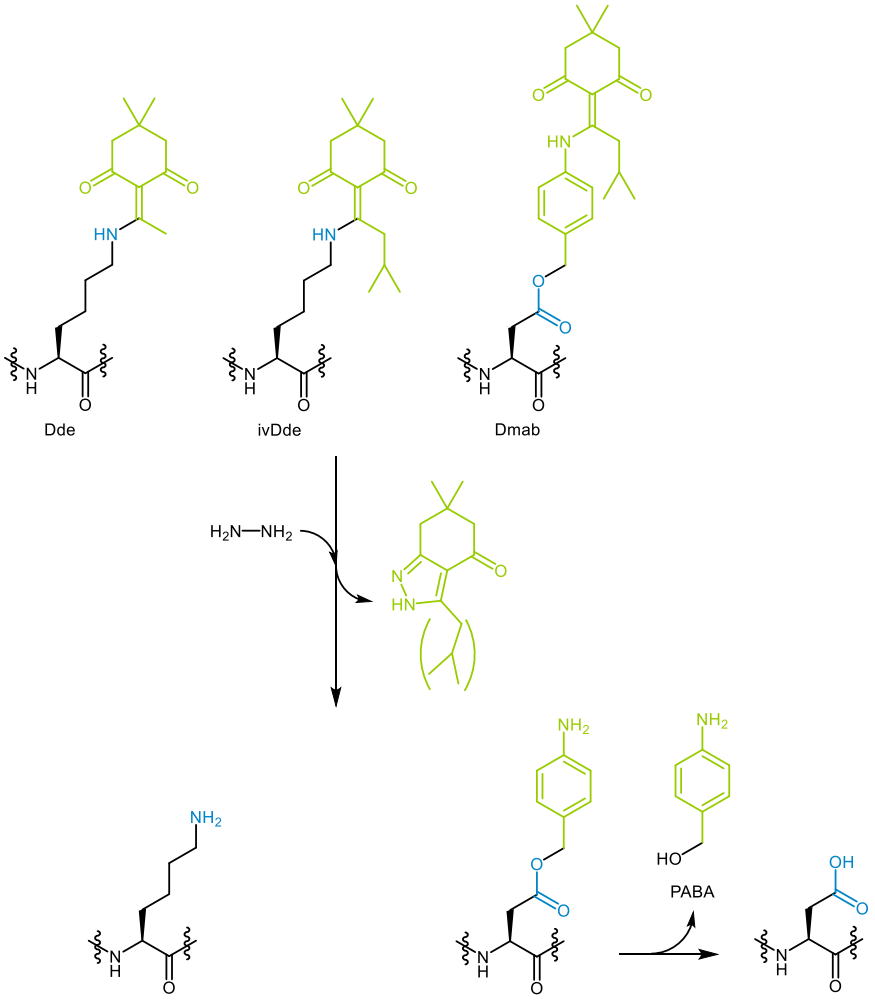


Figure 53 : Structures des groupements protecteurs (iv)Dde et Dmab des résidus lysine, aspartique et glutamique et mécanismes de déprotection associés

Enfin, l'initiale stratégie de double fonctionnalisation orthogonale du squelette peptidique par deux résidus lysines a été simplifiée par la fonctionnalisation de l'extrémité *N*-terminale d'une part et une stratégie de ligation impliquant une cystéine, résidu de ligation alternatif aux résidus lysines précédemment fonctionnalisés, d'autre part.

Ainsi, cette stratégie de double fonctionnalisation peptidique de seconde génération est envisagée par couplage peptidique entre l'extrémité *N*-terminale de **H-D(ODmab)E(ODmab)VD(ODmab)AC(S^{t}Bu)G-OH** et le bipode fluorescent **Cy5.0$_A$** d'une part, ainsi que le résidu de ligation cystéine et le quencher **BHQ3$_B$** d'autre part. Cette dernière stratégie alternative de ligation engage la fonction thiol de la chaîne latérale du résidu de ligation cystéine et la fonction α-iodoacetamide, synthétiquement introduite sur le quencher **BHQ3$_B$**.

3.5.2.1.2. SYNTHESE

Les étapes de synthèse supportées sont suivies par une procédure de contrôle spécifique. En effet, à l'issue d'étape supportée, quelques billes de résine supportant le peptide d'intérêt sont prélevées et traitées en conditions de clivage du support solide, permettant l'analyse en RP-HPLC et MS de la molécule-fille générée. Ces peptides-fils, issus de ce contrôle qualité (QC), sont représentées en orange.

La synthèse de l'heptapeptide trifonctionnalisable **13^{S}** a été assistée et réalisée en condition supportée par la résine 2-chlorotrityle selon les conditions précédemment explicitées (Chapitre 2.3.1.2.) puis suivie selon la procédure de contrôle (TFA/TIPS/H_2O 1/2.5/96.5 v/v/v). (Figure 54)

Le peptide-fils **H-D(ODmab)E(ODmab)VD(ODmab)AC(S^{t}Bu)G-OH** attendu, de poids moléculaire de 1730 g/mol, n'a cependant pas été détecté.

Alternativement, l'analyse MS a révélé la présence d'un unique produit, de poids moléculaire de 1400 g/mol.

A la lumière de la littérature[74,75], cette molécule a été identifiée comme un dérivé peptidique apparenté à **H-D(ODmab)E(ODmab)VD(ODmab)AC(S^{t}Bu)G-OH**, présentant une cyclisation intramoléculaire sous forme d'aspartimide, impliquant un des deux résidus acides aspartiques.

La formation d'aspartimides, bien documentée et décrite lors de synthèses peptidiques automatisées et supportées, dépend principalement du groupement protecteur précédemment installé sur l'acide aspartique cyclisé. En effet, une protection encombrée pourrait défavoriser cette cyclisation. De plus, les traitements répétés à la pipéridine, lors de la synthèse supportée, pourraient favoriser sa formation.

Aucune donnée analytique ne nous a permis de conclure quant à la formation privilégiée de l'un ou l'autre des deux dérivés aspartimiques **14** et **15**.

Cette formation d'aspartimide constitue un problème majeur et de nombreuses limitations émergent.

Si cette cyclisation est irréversible alors l'aspartimide induit une modification structurale importante du résidu aspartique et impacte potentiellement l'affinité de l'enzyme cible pour notre sonde-substrat.

Par conséquent, le peptide supporté **13^{S}** n'est pas exploitable et ne peut pas être engagé dans la stratégie de synthèse envisagée pour la sonde **P2**. Cette stratégie de synthèse de seconde génération a donc, dès la première étape, été prématurément arrêtée.

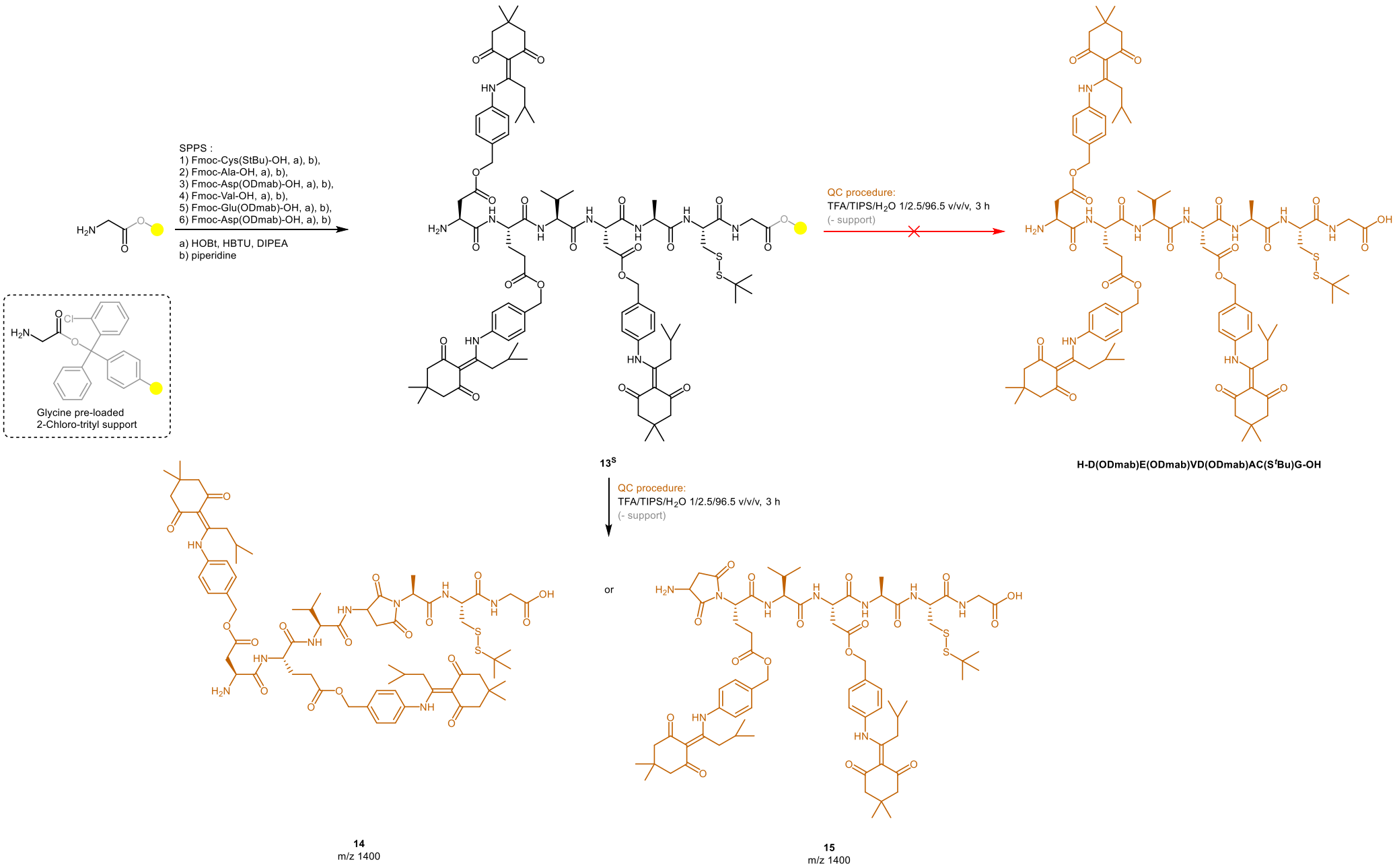


Figure 54 : Synthèse de l'heptapeptide trifonctionnalisable **H-D(ODmab)E(ODmab)VD(ODmab)AC(S^{t}Bu)G-OH**

Tableau 2 : Bilan des étapes de la stratégie de synthèse de la seconde génération de sonde-substrat

Étapes	**Descriptifs**	**Molécules obtenues**	**Contrôle qualité**	**Figure correspondante**
1/7[S]	SPPS de **13**[S]	**13**[S]	peptide-fils détecté: **14** ou **15** m/z 1400[L]	Figure 54
2/7[S]	Couplage peptidique entre **Cy5.0**$_{\mathbf{A}}$ et **13**[S]	-	étapes annulées	
3/7[S]	Déprotection en conditions réductrices du résidu cystéine de ligation	-		
4/7[S]	Couplage entre le résidu cystéine de ligation et **BHQ3**$_{\mathbf{B}}$			
5/7	Clivage du support solide	-		
6/7	Pegylation de l'extrémité *C*-terminale			
7/7	Déprotection acido-catalysée des résidus aspartiques et glutamique inclus dans la séquence de ciblage enzymatique			

[S]étape supportée ; [L]détecté en spectroscopie de masse basse résolution (LRMS)

Cette seconde stratégie de synthèse semblait prometteuse et présentait de nombreuses innovations synthétiques :

- Les couplages supportés des fluorophore et quencher permis par des conditions réactionnelles acido-catalysées douces du support solide.
- Les fonctionnalisations des extrémités *N*- et *C*-terminales permettant l'exploitation de ces sites de ligation naturels, économisant l'étape de capping *N*-terminal par acétylation.

Néanmoins, la mise en œuvre de cette stratégie de synthèse s'est heurtée à des difficultés liées à la synthèse peptidique dès la première étape. En effet, nous avons observé que le groupement Dmab ne constituait pas une protection fiable et robuste du résidu acide aspartique dans nos conditions, malgré les recommandations du fournisseur et son utilisation décrite dans la littérature. La formation d'aspartimides handicape trop lourdement notre seconde stratégie de synthèse. De notre point de vue, l'usage du groupement protecteur Dmab, s'il est performant, doit se restreindre à la protection des résidus acides glutamiques, moins prompts à la cyclisation intramoléculaire sous forme de glutamides.
De fait, les synthèses des synthons **BHQ3$_B$** et **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)G-propargyl** n'ont pas été finalisées.
La conception et la synthèse de ce tripeptide chélatant clickable ont été abandonnées au profit de notre plateforme **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$**.

3.6. SONDE DE TROISIEME GENERATION

3.6.1. PRESENTATION DE **P3** (PROBE 3)

Nos objectifs de radiomarquage et de perméabilisation cellulaire sont conservés. Ainsi, la stratégie de trifonctionnalisation orthogonale de la séquence peptidique enzymatique de ciblage a été revue à la lumière des obstacles précédemment identifiés.

La synthèse de **P3** a été envisagée en 8 étapes à partir de quatre synthons : (Figure 55)

- L'octapeptide trifonctionnalisable **pentynoyl-DEVDAKE(ODmab)F-NH_2**
- La plateforme radiomarquable clickable **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH_2** (synthèse explicitée au Chapitre 2.4.1.)
- Le quencher **BHQ3$_A$** (synthèse explicitée au Chapitre 3.3.2.1.)
- Les groupements perméabilisants PEG 4, 6, 8 et 12 présentant une fonction amine primaire conjugable avec une fonction acide carboxylique et disponibles commercialement

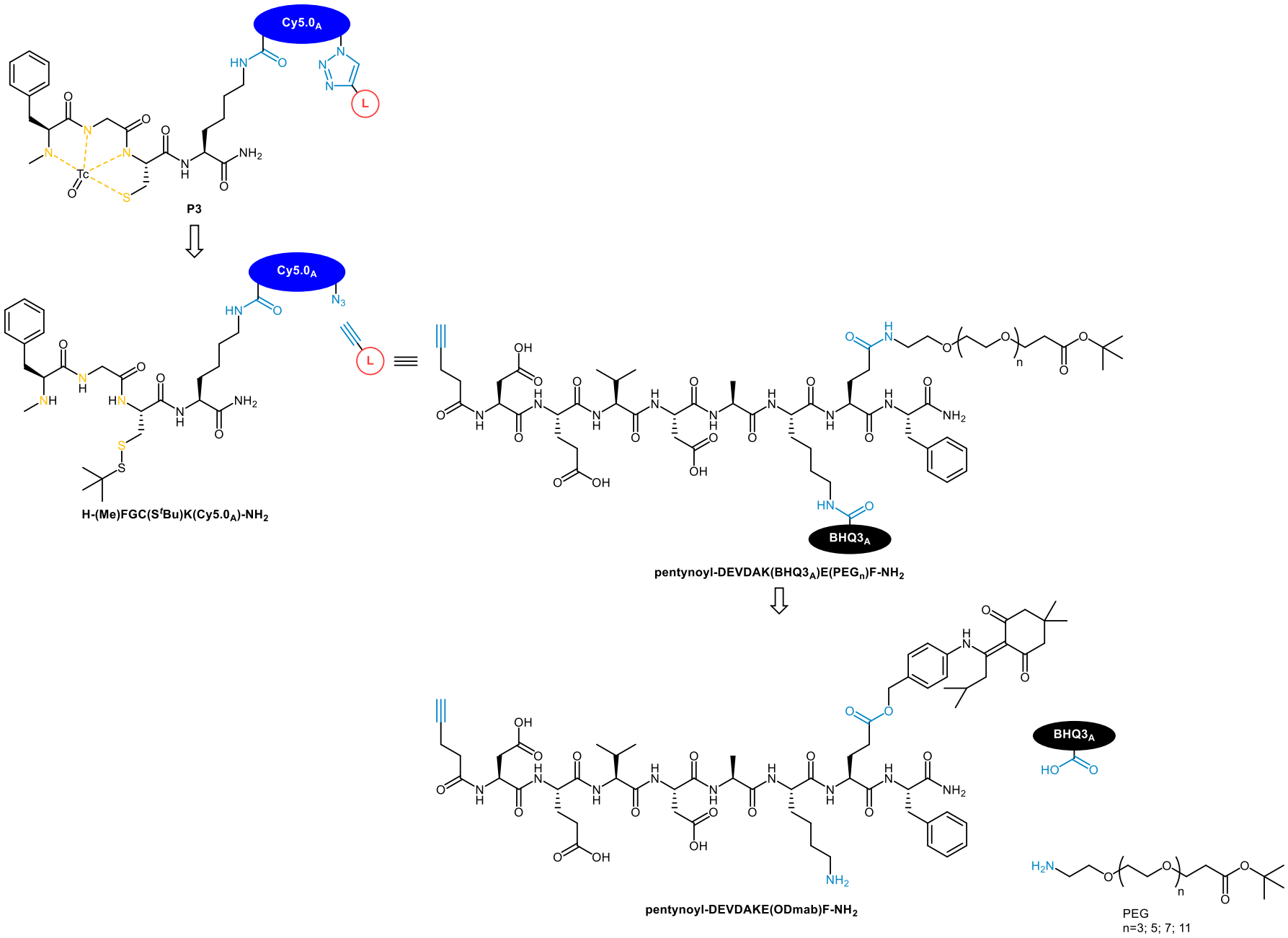


Figure 55 : Stratégie rétrosynthétique de **P3** à partir des quatre synthons constitutifs

3.6.2. SYNTHONS CONSTITUTIFS DE **P3**

3.6.2.1. L'OCTAPEPTIDE TRIFONCTIONNALISABLE **pentynoyl-DEVDAKE(ODmab)F-NH_2**

3.6.2.1.1. STRATEGIE DE SYNTHESE

La stratégie de trifonctionnalisation peptidique a exigé une profonde révision de la précédente voie de synthèse.

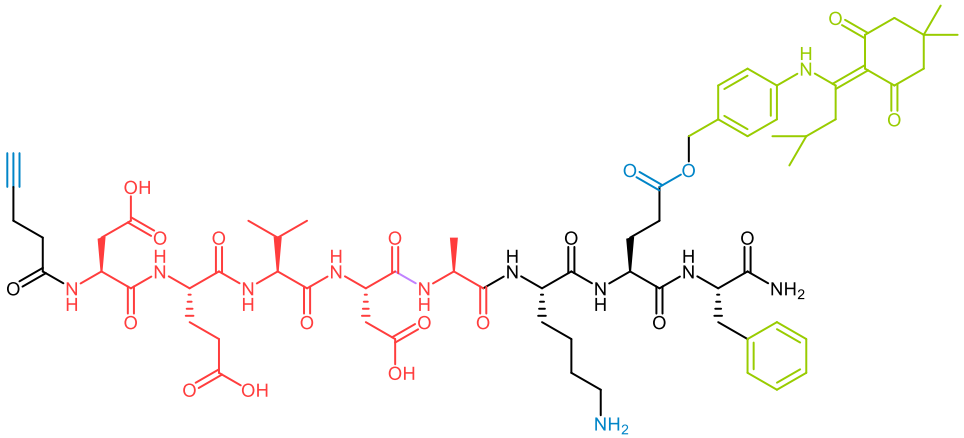
Les difficultés synthétiques ont révélé que le groupement Dmab ne constituait pas une protection fiable des résidus acides aspartiques et favorisait la formation d'aspartimides (**P2**), non observée avec les esters *tertio*-butyliques (**P1**).

La première combinaison, associant la résine Rink Amide MBHA avec les esters *tertio*-butyliques comme groupes protecteurs des résidus aspartiques et glutamique, a donc été restaurée pour cette troisième génération, excluant ainsi le précédent point de pegylation *C*-terminal. (Figure 56)

La fonctionnalisation de l'extrémité *C*-terminale a ainsi été abandonnée au profit d'une nouvelle stratégie de ligation. En effet, un résidu acide glutamique de ligation, protégé par le groupement Dmab, est inclus dans la nouvelle séquence octapeptidique **pentynoyl-DEVDAKE(ODmab)F-NH_2**.

La détection du peptide avant les couplages des fluorophore et quencher est assurée par les chromophores Dmab et le noyau benzénique de la chaine latérale du résidu phénylalanine.

Enfin, l'extrémité *N*-terminale de la séquence peptidique est couplée à l'acide pentynoïque, générant une fonction alcyne *N*-terminale, clickable à notre plateforme polyvalente **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH_2**.



Séquence peptidique		**Extrémité *N*-terminale**	**Asp**	**Glu**	**Val**	**Asp**	**Ala**	**Lys**	**Glu**	**Phe**	**Extrémité *C*-terminale**
Résidu amino-acide		-	séquence pentapeptidique de ciblage enzymatique					-	-	-	
Fonction latérale	Rôle	alcyne de ligation						amine primaire de ligation	acide carboxylique de ligation	phényl de détection	
	Protection	-	^{t}Bu[a]	^{t}Bu[a]	-	^{t}Bu[a]	-	Boc[a]	Dmab de détection	-	amide primaire non-réactif

Figure 56 : Conception du synthon peptidique **pentynoyl-DEVDAKE(ODmab)F-NH$_2$**
[a]protections acido-hydrolysées dans les conditions réactionnelles de clivage du support solide

3.6.2.1.2. SYNTHESE

La synthèse de l'octapeptide trifonctionnalisable **16^{S}** a été assistée et réalisée en condition supportée par la résine Rink Amide MBHA selon les conditions précédemment explicitées (Chapitre 2.3.1.2.) puis suivie selon la procédure de contrôle (TFA/TIPS/H_2O 95/2.5/2.5 v/v/v). (Figure 57)

Le peptide-fils attendu **pentynoyl-DEVDAKE(ODmab)F-NH_2** de poids moléculaire de 1342 g/mol, a été détecté, certifiant le bon déroulement de sa synthèse.

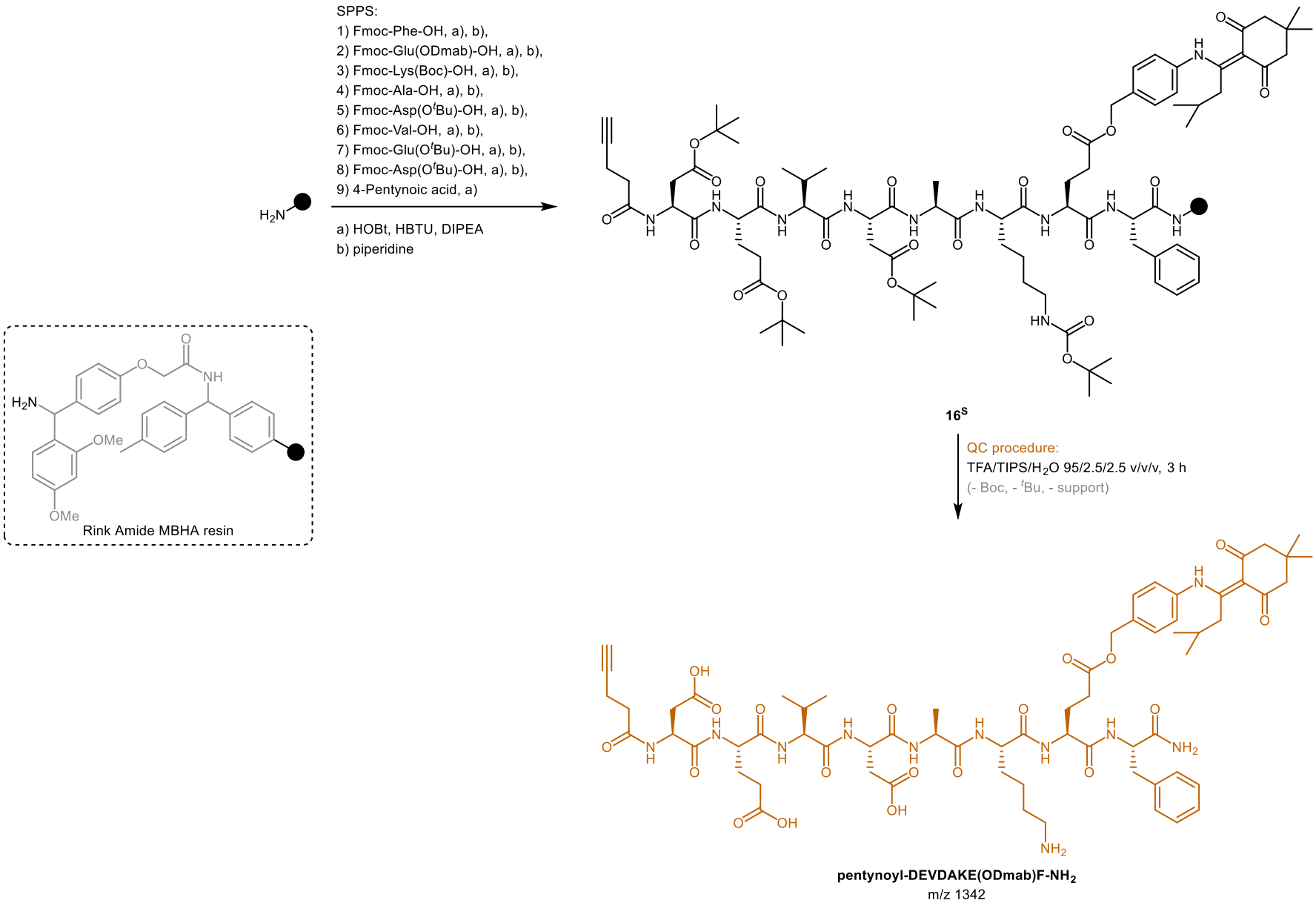


Figure 57 : Synthèse de l'octapeptide trifonctionnalisable **pentynoyl-DEVDAKE(ODmab)F-NH_2**

3.6.3. SYNTHESE DE **P3** A PARTIR DE **pentynoyl-DEVDAKE(ODmab)F-NH_2, BHQ3$_A$** ET **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH_2**

Ensuite, la seconde étape supportée de déprotection du résidu glutamique de ligation protégé par le groupement Dmab s'est révélée problématique, nécessitant l'application de nombreuses conditions de déprotection. (Tableau 3)

Tableau 3 : Optimisation de la déprotection du résidu glutamique de ligation

Entrées	Conditions de déprotection du groupement Dmab mises en œuvre	m/z détecté
1	$NH_2OH.HCl$ (5 eq.), imidazole (5 eq.), DMF, 3 h	1136 (**18**)
2	$(NH_2)_2.H_2O$/DMF 2/98, 4x5 min	1136 (**18**)
3	$(NH2)_2.H_2O$/DMF 3/97, 1 h	1136 (**18**)
4	20% DIPEA DMF/H_2O 90/10, 5 min	1136 (**18**)
5	20% DIPEA DMF/H_2O 90/10, 5 h	1136 (**18**)
6	20% DIPEA DMF/H_2O 90/10, 2 j	1136 (**18**)
7	NaOH 5 mM/MeOH 50/50, 3 h	1031 (**20**)

L'hydroxylamine a d'abord été utilisée pour déprotéger la fonction acide carboxylique du résidu glutamique, répétant les conditions de déprotection du résidu de ligation Lys(Dde) (Chapitre 3.3.3.) sans succès. (Entrée 1 ; Tableau 3)

L'hydrazine, dont l'usage est décrit et encouragé par le fournisseur, s'est également révélée inefficace. (Entrée 2 ; Tableau 3)

Ces traitements ont généré le peptide supporté **17^S**, dont le peptide-fils **18** a été identifié comme un intermédiaire peptidique partiellement déprotégé. En effet, la seconde étape d'auto-immolation, décrite comme spontanée, semblait être bloquée, malgré la prolongation des temps de déprotection. (Entrée 3 ; Tableau 3)

Des conditions basiques ont été appliquées afin de favoriser cette difficile immolation, via la déprotonation de l'aniline intermédiaire. (Entrée 4, 5, 6 ; Tableau 3)

Des exemples publiés exploitant des acides glutamiques, protégés par le groupement Dmab, comme résidus de ligation ont explicités des problèmes récurrents de déprotection et préconisent des conditions plus drastiques (NaOH) pour finaliser cette déprotection partielle.[73] (Entrée 7 ; Tableau 3)

Ces conditions basiques dures ont été appliquées et le peptide supporté **19^S** a finalement été obtenu, après analyse du peptide-fils contrôle **20**, via hypothétiquement un mécanisme de saponification de l'ester benzylique persistant. (Figure 58)

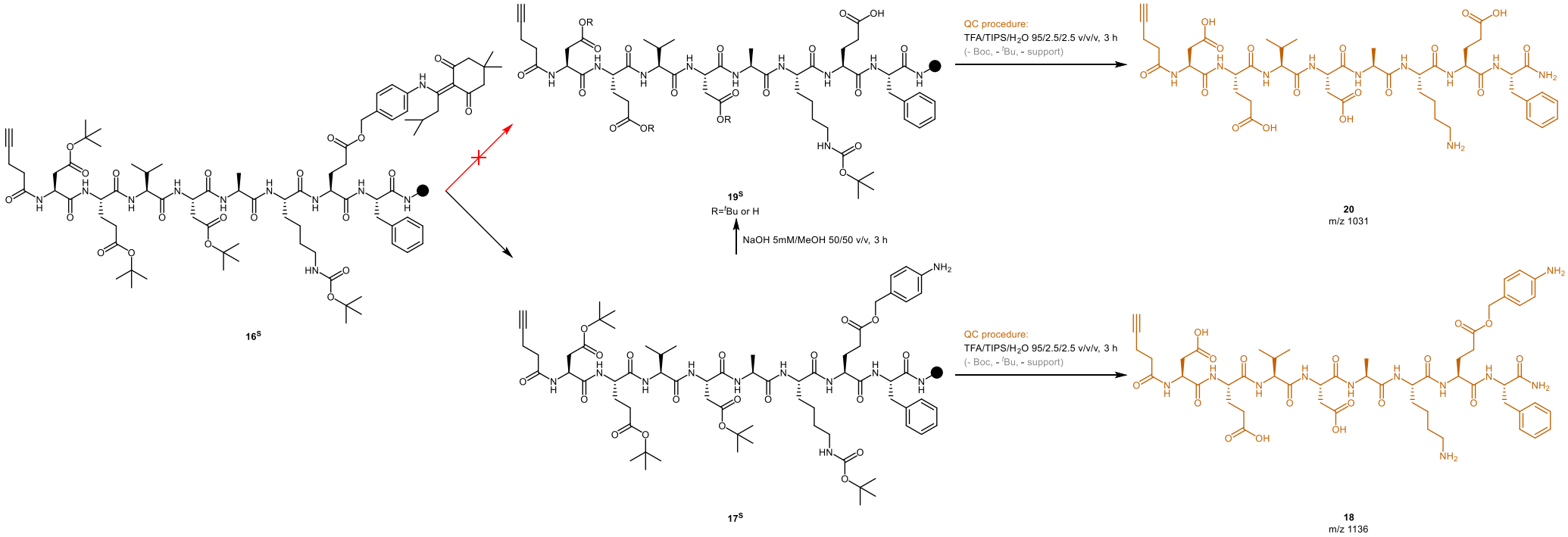


Figure 58 : Etape de déprotection de l'acide glutamique de ligation protégé par le groupement Dmab

Toutefois, cette optimisation des conditions de déprotection a eu, sur cette troisième stratégie de synthèse, un lourd impact doublement négatif. En effet, chaque condition testée a fait l'objet d'un prélèvement de contrôle, amputant la quantité de peptides supportés synthétisés disponibles pour les étapes suivantes.

Plus gravement, la saponification de l'ester benzylique **17^{S}**, protégeant le résidu acide glutamique de ligation, a pu, difficilement et rationnellement, être sélective en présence d'esters *tertio*-butyliques encombrés potentiellement stables.

Cette hypothèse de déprotection multiple des quatre esters présents sur **17^{S}** n'est, malheureusement pas vérifiable avec notre procédure de contrôle, employant des conditions acido-catalysées d'hydrolyse.

Par conséquent, l'étape suivante de pegylation supportée, sur le résidu glutamique de ligation a été compromise. En effet, deux options sont donc envisagées :

- Si les quatre fonctions acides carboxyliques de cette séquence octapeptidique sont déprotégées alors le risque de polypegylation est élevé. En effet, le couplage peptidique en condition supportée, engageant la fonction acide carboxylique du résidu de ligation glutamique et la fonction amine primaire du PEG, est réalisé en présence d'un excès d'amine.

  Cette hypothèse de polypegylation serait nuisible impactant structuralement la séquence de ciblage enzymatique de notre sonde-substrat.
- Si la saponification a été sélective du résidu glutamique protégé par le groupement Dmab alors l'étape de pegylation fonctionnaliserait sélectivement ce résidu de ligation, conformément à la stratégie de synthèse envisagée.

Aux vues de la quantité de peptide supporté **19^{S}** restante et limitée, nous avons pris la décision de progresser dans la synthèse sans couplage des groupements perméabilisants PEG.

L'octapeptide **20** a été isolé, par clivage du support solide (95% TFA) puis par purification semi-préparative en phase inverse, à hauteur de 21 mg (rendement non déterminé aux vues des nombreux prélèvements de contrôle réalisés lors de l'étape de déprotection du résidu acide glutamique de ligation).

La synthèse a été poursuivie avec les étapes de couplage séquentiels entre les synthons **20**, **BHQ3$_A$** et **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$**.

Le couplage peptidique clé, entre l'amine primaire du résidu lysine de **20** et l'acide carboxylique de **BHQ3$_A$**, a été réalisé dans les conditions de couplage peptidique précédemment explicitées et optimisées (Chapitre 2.4.1.). (Figure 59)

La plateforme **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$** a ensuite été clickée à l'intermédiaire peptidique **21** via une cycloaddition cupro-catalysée de Huisgen. Les conditions de catalyse au Cu^I ont été privilégiées après plusieurs échecs de couplage en conditions classiques ($CuSO_4$, ascorbate de sodium).[76,77]

L'optimisation de ce couplage a nécessité des quantités stœchiométriques équimolaires de CuI et de TBTA, un additif auxiliaire à la chélation du cuivre.

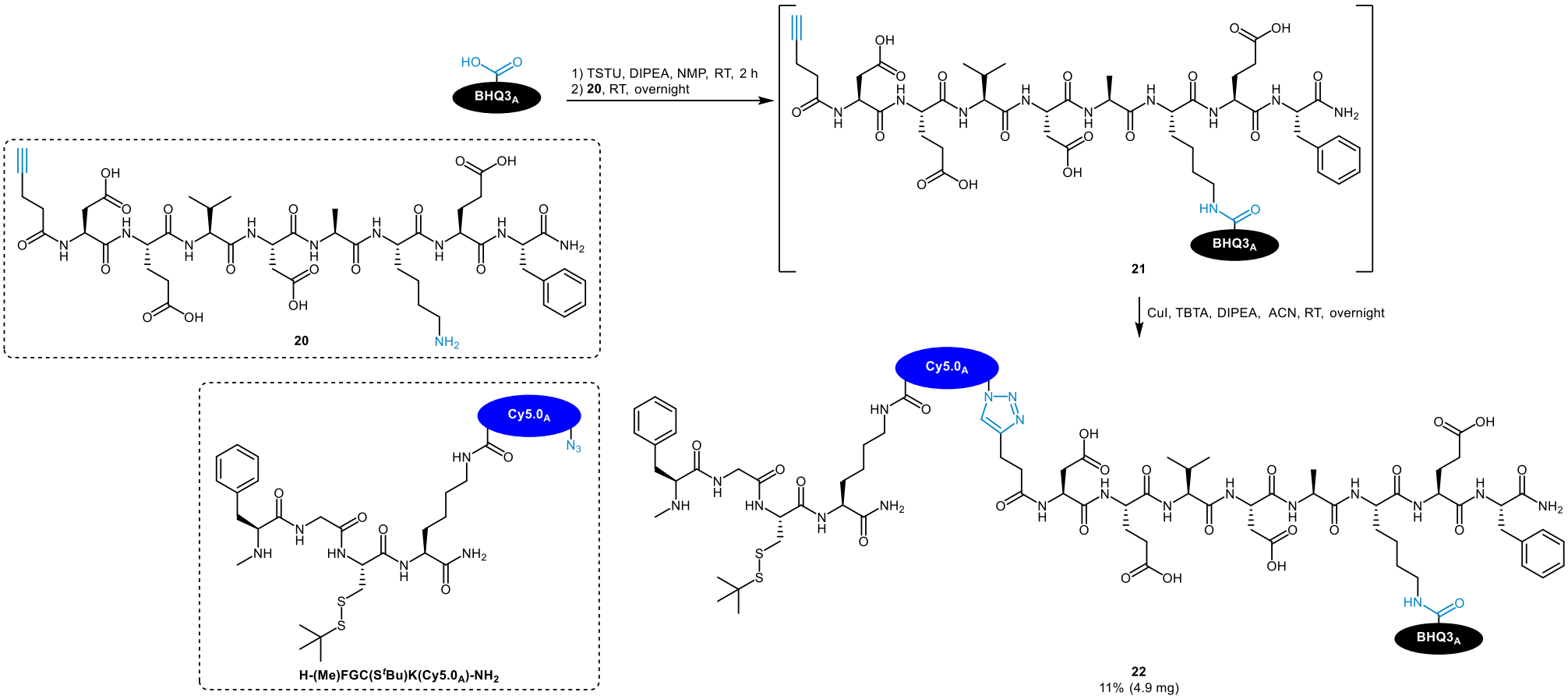


Figure 59 : Synthèse de **22**

Lors de la septième étape de cette troisième voie de synthèse, la déprotection du résidu cystéine de la séquence tripeptidique chélatante a été réalisée en présence de DTT. L'action de l'agent réducteur sur le pont disulfure a, dommageablement, dégradée partiellement le peptide **22**. En effet, la molécule détectée, à l'issue de cette étape de déprotection, présentait un profil UV limité à la signature spectroscopique de la Cy5.0, le quencheur n'étant plus présent sur la sonde ou (partiellement) dégradé. (Figure 60)

Ce résultat n'a pas pu être rationnalisé, sachant que des tests préalables de stabilité, mettant en présence le quencher et le DTT, avaient été réalisés. De plus, la quantité disponible de peptides s'est avérée insuffisante pour évaluer d'autres conditions de déprotection comme le TCEP par exemple.

Cette dégradation a interrompu prématurément la stratégie de synthèse de la sonde **P3**. (Tableau 4)

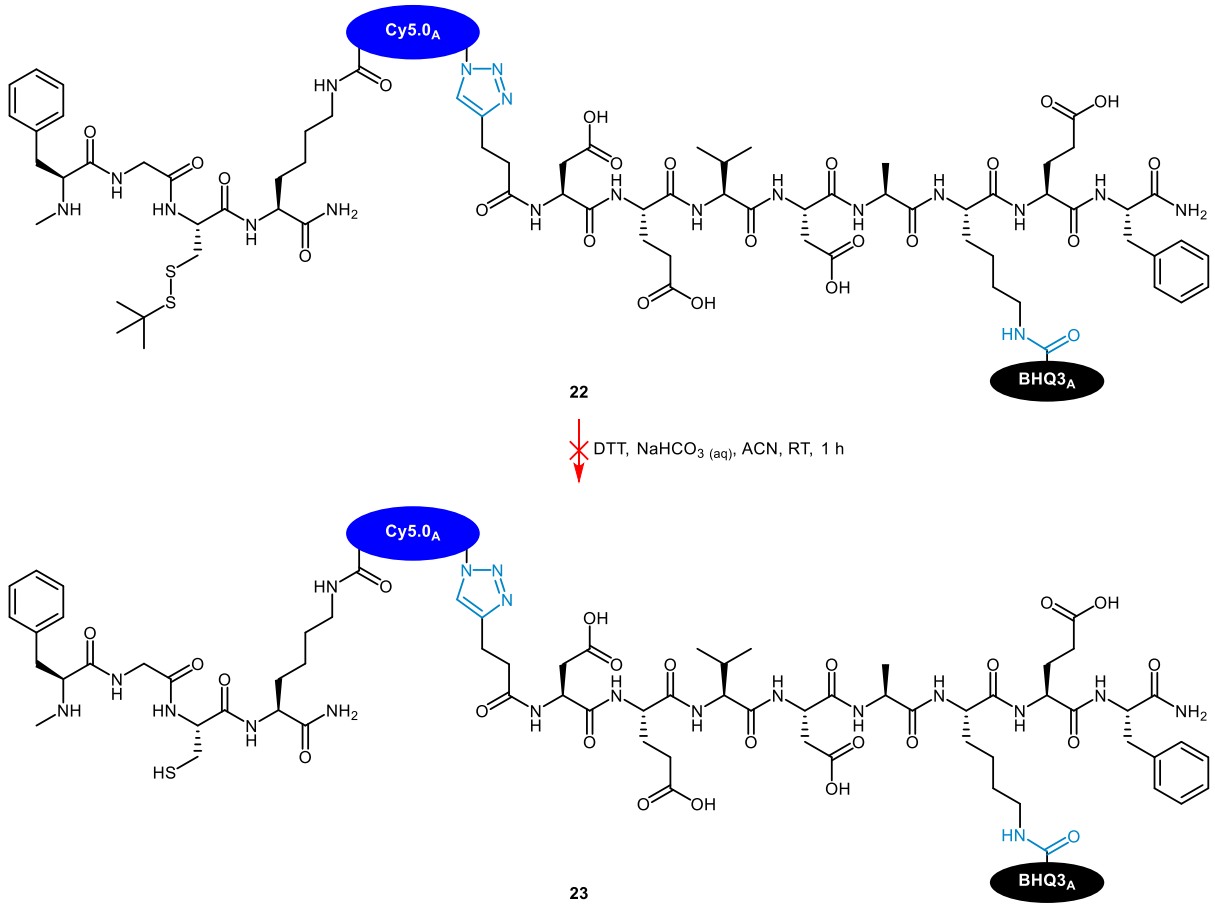


Figure 60 : Echec de l'étape de déprotection du résidu de chélation cystéine de **22**

Tableau 4 : Bilan des étapes de la stratégie de synthèse de la troisième génération de sonde-substrat

Étapes	**Descriptifs**	**Molécules obtenues**	**Contrôle qualité**	**Figures correspondantes**
1/8[S]	SPPS de **16[S]**	**16[S]**	peptide-fils de contrôle: **pentynoyl-DEVDAKE(ODmab)F-NH_2** m/z 1342[L]	Figure 57
2/8[S]	Déprotection supportée du résidu glutamique de ligation de **16[S]**	**19[S]**	peptide-fils de contrôle: **20** m/z 1031[L]	Figure 58
3/8[S]	Pégylation supportée	-	étape annulée	
4/8	Clivage du support solide et hydrolyse acido-catalysée des esters et du carbamate Boc	**20**	m/z 1031[H]	Figure 58
5/8	Couplage peptidique entre **BHQ3$_A$** et **20**	**21**	m/z 1560[H]	Figure 59
6/8	Cycloaddition cupro-catalysée entre **21** et **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH_2**	**22**	m/z 894[H]	
7/8	Déprotection en conditions réductrices du résidu cystéine de chélation de **22**	-	étapes annulées Figure 60	
8/8	Radiomarquages chaud et froid	-		

[S]étape supportée ; [H]détecté en spectroscopie de masse haute résolution (HRMS) ; [L]détecté en spectroscopie de masse basse résolution (LRMS)

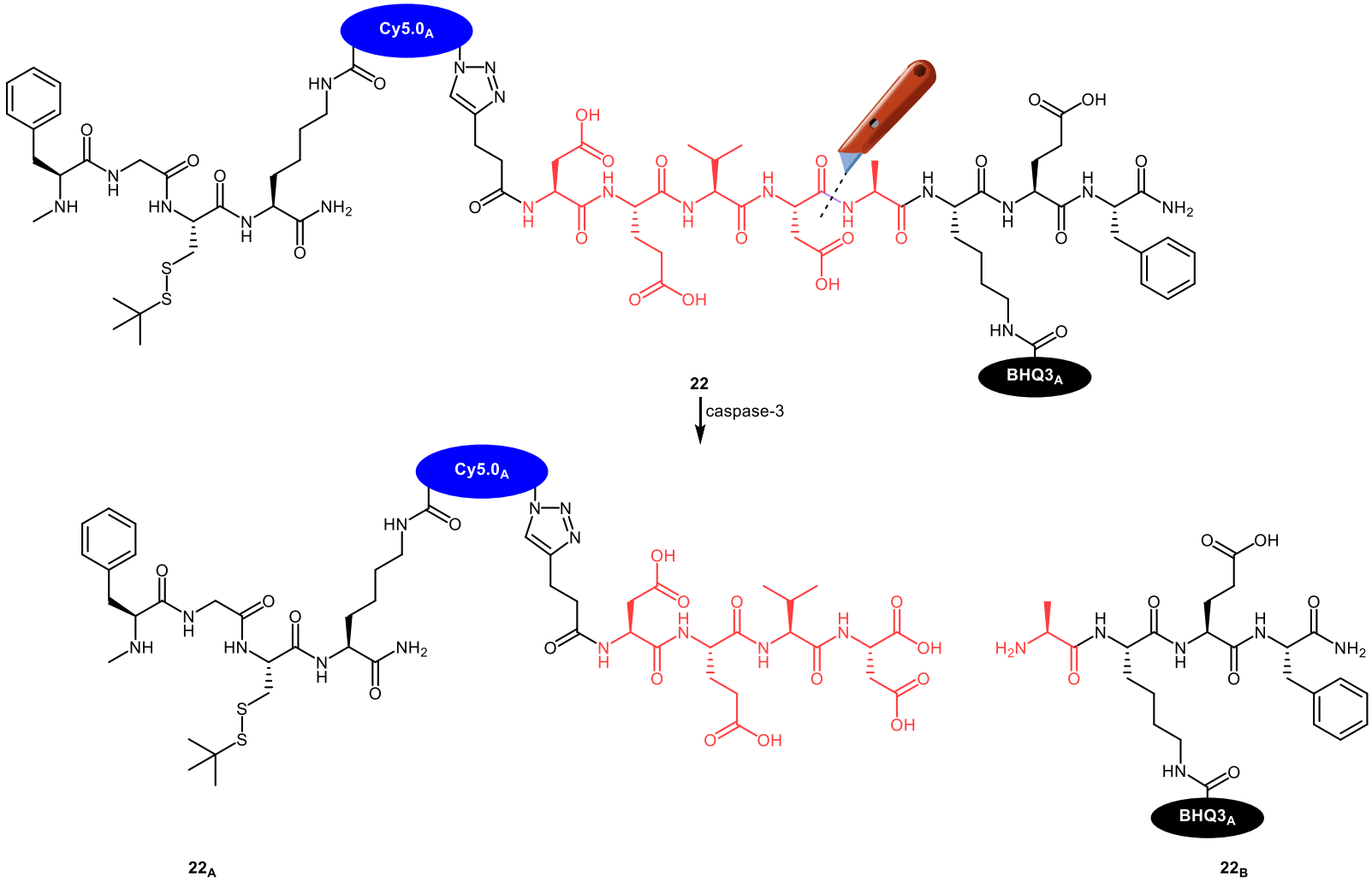


Figure 61 : Fragments moléculaires générés par protéolyse enzymatique de la caspase-3 sur **22**

3.6.4. VERS UNE VALIDATION BIOLOGIQUE *IN VITRO* ANTICIPEE DU PRECURSEUR 22

Le peptide **22** a été, préalablement à la synthèse inachevée de **P3**, testé *in vitro*. Ce test anticipé était préventif à tout obstacle synthétique pouvant intervenir lors de ces ultimes étapes de synthèse extrêmement délicates tant sur la quantité de produit engagé que sur la difficulté synthétique.

Ces expériences *in vitro* anticipées ont également eu pour objectif de mesurer l'impact de la complexification structurale apportée au fluorophore et au squelette peptidique support.

A l'instar de la sonde **P1**, **22** a été incubé en présence de caspase-3 recombinante humaine et un suivi temporel fluorogénique a été réalisé. Le profil cinétique de ce déclenchement est similaire à celui précédemment enregistré en incubant la sonde **P1** dans les mêmes conditions. (Figure 62)

De même, l'étude des propriétés émissives de **22** avant et après la cinétique, ainsi que l'efficacité de quenching évaluée à 98.1%, sont cohérents avec les résultats précédemment obtenus. (Figure 63)

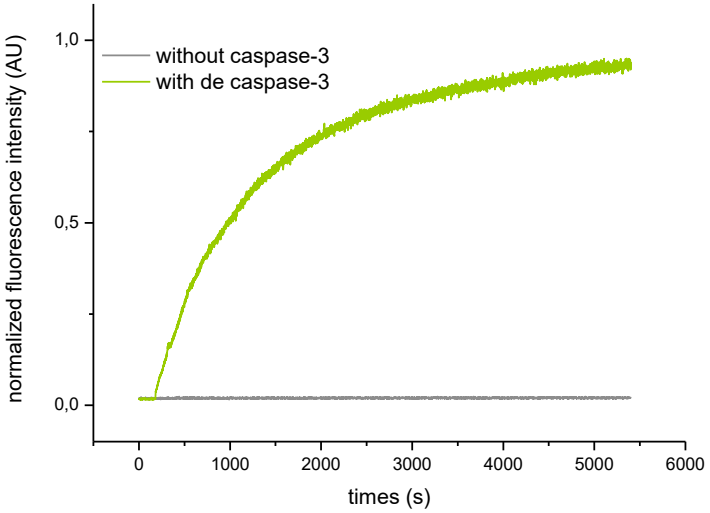


Figure 62 : Suivi cinétique de l'émission de fluorescence en fonction du temps de la sonde **22** (1 µM) en présence (1 UE) et en absence de caspase-3
Acquisition du signal à 37 °C dans le tampon enzymatique (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol) à λ_{Exc} = 595 nm et λ_{Em} = 665 nm

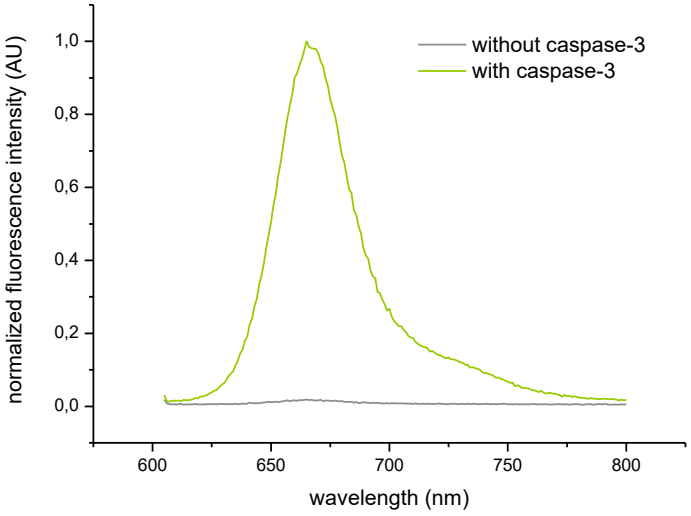


Figure 63 : Spectres d'émission de **22** acquis à λ_{exc} = 595 nm et à 37 °C avant et après le suivi cinétique de déclenchement

3.7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces trois générations successives ont été nécessaires à l'élaboration d'une stratégie viable pour la construction moléculaire de notre sonde-substrat bimodale cible. (Tableau 5)

Elles ont mis en exergue diverses difficultés inhérentes à la synthèse peptidique, notamment des stratégies de protection orthogonales.

Parmi les nombreuses problématiques abordées, la protection des résidus aspartiques et glutamiques, en tant que résidus de ciblage et de ligation, a été récurrente. La stratégie protectrice employant les Dmab s'est révélée stérile sur les acides aspartiques, avec la formation d'aspartimides, et sur les acides glutamiques, avec leur déprotection partielle dans les conditions décrites.

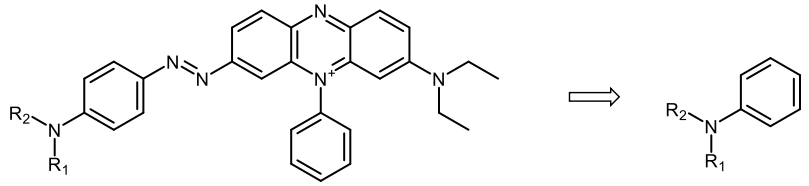
D'un point de vue enzymatique, des tests *in vitro* complémentaires permettraient d'apprécier la sélectivité des sondes-substrat pour la caspase-3, comparativement aux caspases concurrentes. En effet, la détermination des paramètres enzymatiques du couple enzyme/substrat (caspase-3/**P1-22**) et des déclenchements cinétiques incubant les caspases concurrentes dans les mêmes conditions finaliseraient la validation biologique *in vitro* de nos outils.

Parallèlement, l'extension de notre approche synthétique à la détection d'autres protéases peut facilement être envisagée. Il est toutefois capital de ne pas sous-estimer la séquence peptidique de ciblage sélectionnée car la présence de certains résidus comme les acides aspartiques ou glutamiques nécessitera une profonde révision de la stratégie de synthèse et une connaissance approfondie des différentes stratégies de protection impliquant les résidus problématiques.

Outre l'amélioration de la stratégie de synthèse peptidique, une seconde génération de quencher a été envisagée. A l'image du bipode fluorescent **Cy5.0$_A$**, des dérivés de BHQ3 présentant deux fonctions orthogonales de ligation ont été conçus. En effet, un second point de fonctionnalisation, introduit dès la synthèse de l'aniline associée, permettrait l'introduction de PEG, ayant fait défaut dans les synthèses des seconde et troisième générations. (Figure 64)

Cette stratégie a déjà été mise à profit avec succès au laboratoire sur des quencheurs azo-sulforhodamines et BHQ1.[67,68]

Les quenchers perméabilisants trouveraient diverses applications lors de la synthèse de sondes quenchées ayant une cible biologique intracellulaire.



R1=$(CH_2)_nCO_2H$; R2=$(CH_2)_nCOCH_2I$
R1=$(CH_2)_nCO_2H$; R2=$(CH_2)_nN_3$

Figure 64 : Rétrosynthèse envisagée pour des quenchers bifonctionnels

Tableau 5 : Bilan général des trois stratégies de synthèse mises en œuvre pour l'obtention de sondes-substrat bimodales spécifiques de la caspase-3

Génération de sonde	**Nombre d'étapes**	**Modalité optique**		**Modalité nucléaire**	**Points forts**	**Points faibles**
		Fluorophore	**Quencher**			
P1	6 étapes	**Cy5.0$_B$**	**BHQ3$_A$**	-	Synthèse finalisée et testée *in vitro*	-
P2	7 étapes	-	-	-	Identification de la cyclisation intramoléculaire de résidu aspartique protégé par le groupement Dmab	Formation de dérivé aspartimidique à partir de résidu aspartique inclus dans la séquence de ciblage enzymatique
P3	8 étapes	**H-(Me)FGC(S^{t}Bu) K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$**	**BHQ3$_A$**	**H-(Me)FGC(S^{t}Bu) K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$**	Tests *in vitro* anticipés	• Déprotection difficile du résidu glutamique de ligation • Sonde non-pégylée • Synthèse de **P3** non-finalisée

4. DEVELOPPEMENT DE DERIVES MARQUES D'INHIBITEUR DE TYROSINE KINASE COMME OUTILS THERANOSTIQUES PREDICTIFS D'EVALUATION DE LA REPONSE TUMORALE DETERMINANT L'ACCES AUX THERAPIES CIBLEES

4.1. L'IMPLICATION DES RECEPTEURS TRANSMEMBRANAIRES DANS LES VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE

La communication intercellulaire repose sur l'action de stimuli chimiques (ligands extracellulaires) induisant, *in fine*, une réponse cellulaire. Cette communication est essentielle pour maintenir une organisation cohérente et saine des cellules au sein d'un tissu donné.

La transduction du signal assure cette communication par la transmission et la diffusion, jusqu'au noyau, de l'information chimique portée par le ligand extracellulaire ; la réponse cellulaire se traduisant généralement par la modulation de l'expression de gènes cibles.

Les intermédiaires clés de la transduction du signal sont les récepteurs transmembranaires. Ancrés dans la membrane plasmique, ils sont à l'interface entre les milieux extra- et intra-cellulaires.

Parmi les trois familles de récepteurs transmembranaires impliqués dans la transduction du signal, les récepteurs à activité enzymatique présentent un domaine catalytique cytoplasmique intrinsèque ou recrutent une enzyme cytosolique.

Quel que soit le mode de couplage enzymatique (intrinsèque ou extrinsèque), l'activité catalytique est induite par la fixation du ligand au domaine de liaison extracellulaire du récepteur. En effet, l'interaction spécifique ligand/récepteur induit une modification structurale du récepteur, entrainant l'initiation de cascades de signalisation via l'activation de protéines intracellulaires clés.

Généralement, ces protéines impliquées dans les voies de signalisation sont des interrupteurs moléculaires, commutant d'un état inactif à actif par phosphorylation d'un résidu amino-acide clé. Ce groupement phosphate est prélevé de l'ATP (adénosine triphosphate) puis additionné sur la cible protéique par une kinase, générant ainsi le substrat phosphorylé clé et un équivalent d'ADP (adénosine diphosphate).

A l'image d'un système d'engrenage, une cascade de signalisation par phosphorylation active successivement chaque protéine impliquée dans cette voie, y compris les facteurs de transcription nécessaires à l'expression des gènes.

Le résidu amino-acide phosphorylé et le mode de couplage enzymatique associé distinguent les différentes familles de protéines kinases (tyrosine-, thréonine-, sérine-kinases couplées ou non aux récepteurs transmembranaires).

4.1.1. LES RECEPTEURS A TYROSINE KINASE

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (TKR) phosphorylent leurs substrats sur des résidus tyrosines après fixation de ligands extracellulaires.

Par exemple, l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), stimulé par l'EGF (Epidermal Growth Factor), est l'un des quatre récepteurs HER transmembranaires à tyrosine kinase. (Figure 65)

En l'absence de ce facteur de croissance, ces récepteurs sont sous forme de monomères inactifs.

L'interaction de l'EGF avec le domaine extracellulaire du récepteur monomérique entraîne une dimérisation activatrice du domaine catalytique et l'ouverture de la poche catalytique accueillant l'ATP.

L'activité enzymatique tyrosine kinase se traduit finalement par phosphorylation de résidus tyrosines présents sur le dimère lui-même (autophosphorylation initiatrice) puis sur ses différents substrats (phosphorylation effectrice).[78]

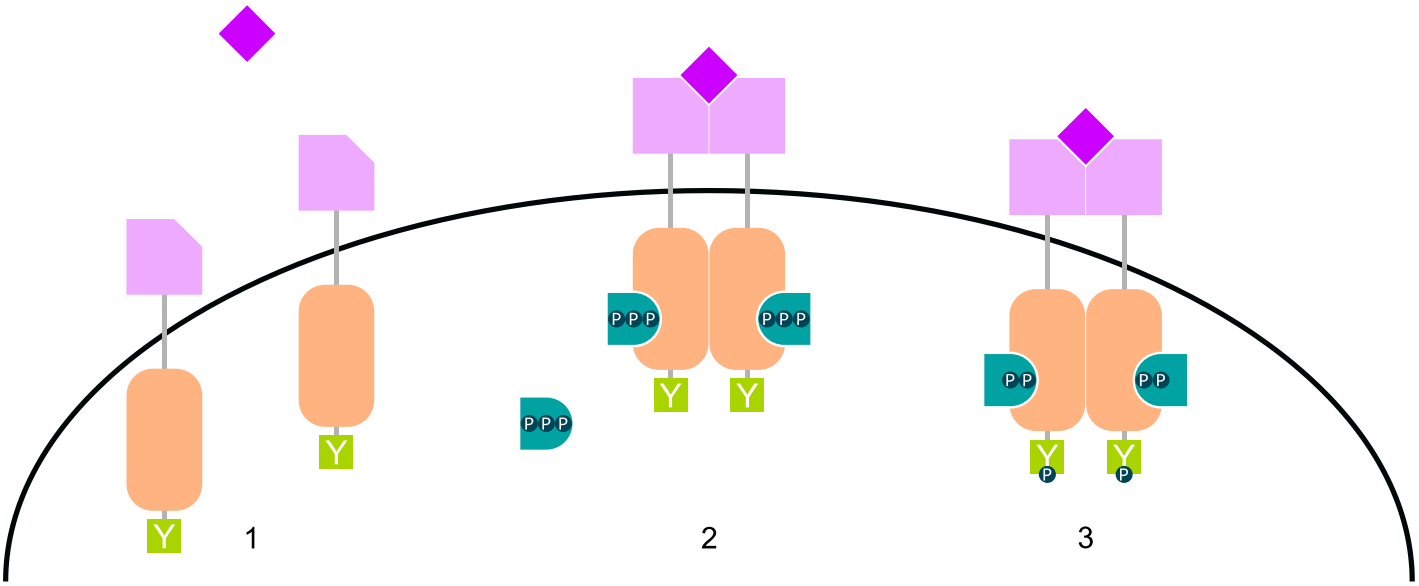


Figure 65 : Représentation schématique de l'activation catalytique de l'EGFR
1 : EGFR monomérique inactif ; 2 : fixation de l'EGF au domaine extracellulaire induisant la dimérisation de l'EGFR et la liaison de l'ATP au domaine catalytique ; 3 : autophosphorylation initiatrice activant le domaine catalytique

Les TKR jouent un rôle crucial dans les voies de signalisation impliquant la transmission et la diffusion des signaux contrôlant notamment la croissance, la prolifération, la migration, l'adhésion et la différenciation cellulaires.

4.1.2. Le role des TKR dans la carcinogenese et les strategies d'inhibition associees

Effecteurs déterminants de la carcinogénèse, les TKR sont généralement des proto-oncogènes. En effet, l'intensification de la croissance et la prolifération tumorales, la répression de l'apoptose, la promotion de l'angiogenèse et la diffusion métastasique sont les conséquences pathologiques d'une dérégulation intensifiée de l'activité des TKR.[46]

Récemment, l'inhibition de l'activité enzymatique des TKR a permis l'émergence d'une nouvelle forme de thérapie anticancéreuse dite ciblée, alternative aux stratégies curatives moins spécifiques présentant de lourds effets secondaires.

Deux stratégies d'inhibition ont été principalement développées : (Figure 66)

- L'action d'inhibiteurs compétitifs aux ligands extracellulaires endogènes verrouillant le site de fixation extracellulaire du TKR.

  Il s'agit généralement d'anticorps présentant le double avantage d'être plus affins que le ligand naturel pour le TKR et d'induire une réponse immunitaire antitumorale.[79]

  Par exemple, le cetuximab (erbitux) est un anticorps antinéoplasique exploité en immunothérapie et indiqué dans les traitements de carcinomes et cancer colorectal métastasique. (Chapitre 1)

- L'action d'inhibiteurs compétitifs de l'ATP inactivant le domaine catalytique du TKR. Sans source de groupement phosphate, l'autophosphorylation initiatrice n'a pas lieu, malgré la fixation du ligand extracellulaire et la dimérisation du TKR.

  Ces molécules, appelées inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI), diffusent à travers la membrane plasmique pour atteindre le domaine de liaison cytosolique de l'ATP.[80]

Ainsi, par occlusion de deux sites de liaison distincts, ces deux classes médicamenteuses interrompent la transduction du signal en amont (anticorps anti-EGFR) ou en aval (TKI) de la voie de signalisation médiée par les TKR, provoquant ainsi la réponse tumorale cytotoxique apoptotique thérapeutique.

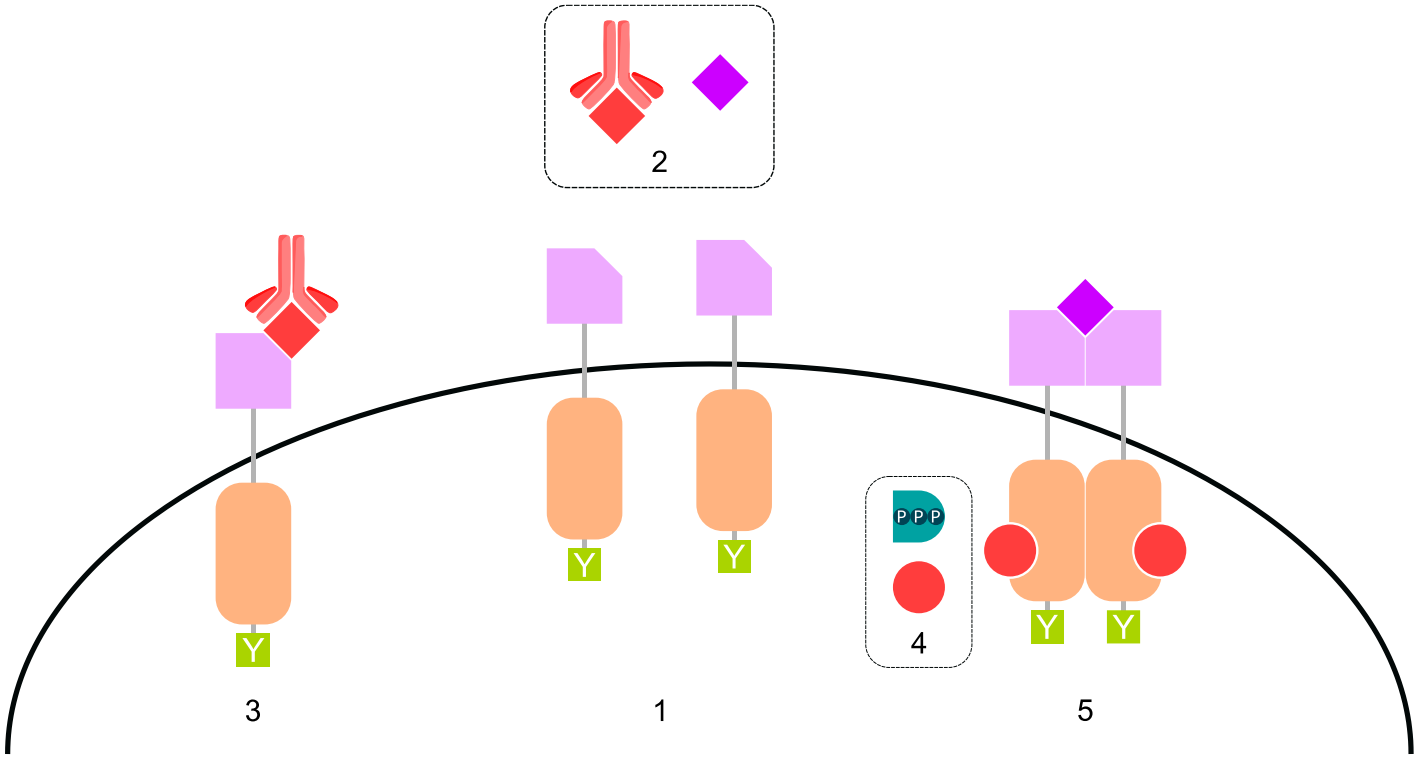


Figure 66 : Représentation schématique des deux stratégies d'inhibition de l'EGFR exploitées en thérapies ciblées
1 : EGFR monomérique inactif ; 2 : compétition entre l'EGF et l'anticorps ; 3 : inhibition de la transduction en amont ; 4 : compétition entre l'ATP et le TKI ; 5 : inhibition de la transduction en aval

4.2. Les inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR (TKI-EGFR) et leurs modalites d'indication

Les TKI sont des molécules antinéoplasiques remarquablement performantes, dont les chefs de file sont l'imatinib et l'erlotinib.

Plus précisément, l'erlotinib est un inhibiteur du domaine tyrosine kinase de l'EGFR basé sur le pharmacophore 4-anilino-quinazoline et indiqué principalement dans le traitement du cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (NSCLC : non-small cell lung cancer).[81] (Tableau 6)

Ce carcinome pulmonaire se caractérise par diverses altérations génétiques touchant la séquence codante de l'EGFR et/ou de l'EGF :

- Une surexpression de l'EGFR et/ou de l'EGF, observée dans la majorité des NSCLC, induit une augmentation pathologique de l'activité kinase.
- Une délétion sur l'exon 19 et la mutation L858R (leucine L substituée par une arginine R en position 858) sur l'exon 21 affectent le domaine catalytique kinase de l'EGFR.

Ces modifications génétiques ont pour conséquence l'activation du domaine catalytique affranchie de la fixation de ligand extracellulaire, conduisant à une activité kinase constitutive appelée mutation activatrice de l'EGFR.[82] (Figure 67)

L'activité kinase dérégulée (intensifiée ou constitutive) est un mécanisme oncogénique clé favorisant la prolifération excessive des cellules cancéreuses et leur diffusion métastasique.

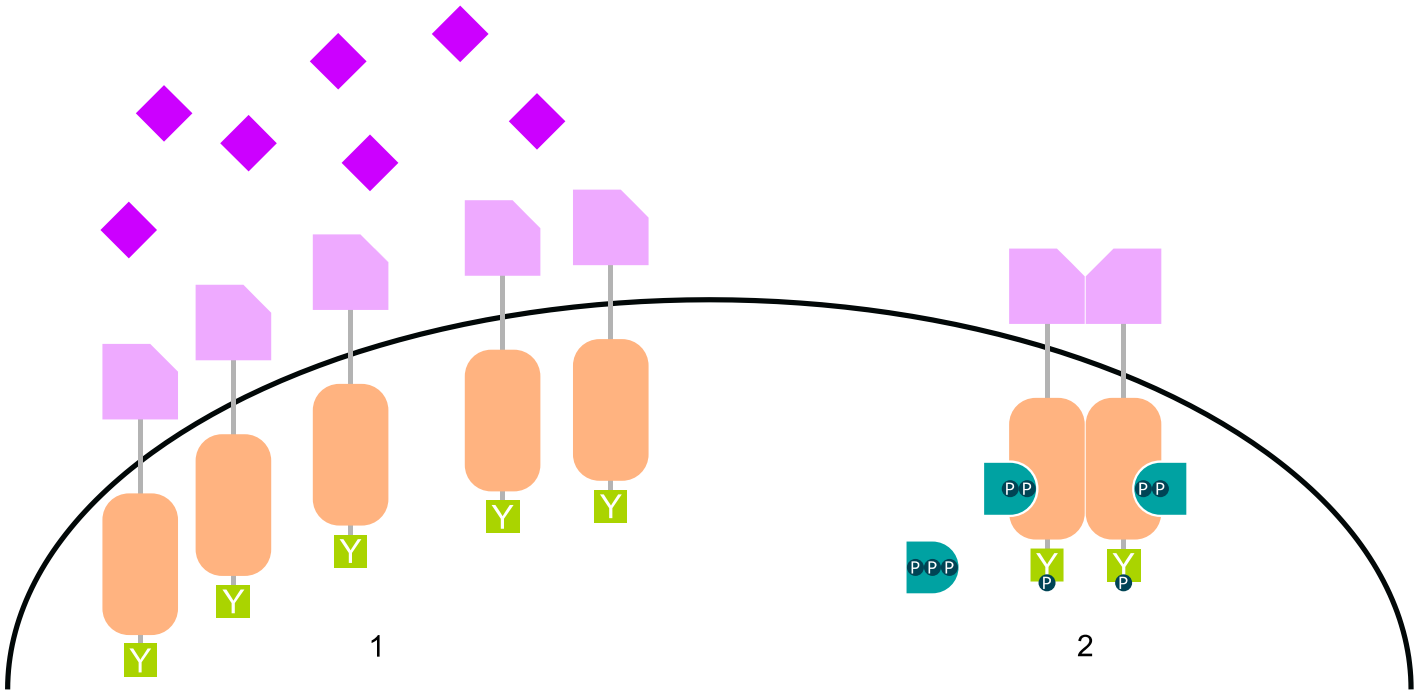


Figure 67 : Représentation schématique d'une activité kinase dérégulée caractérisant les cellules cancéreuses
1 : surexpression de l'EGF et EGFR ; 2 : mutation activatrice de l'EGFR caractérisée par l'autophosphorylation initiatrice activatrice du domaine catalytique affranchie de la stimulation par l'EGF

Des méthodes immunohistochimiques et de séquençage par amplification génétique permettent de déterminer le statut mutationnel de l'EGFR à partir d'un prélèvement biopsique. L'identification de la mutation impliquée et son niveau d'expression sont deux paramètres cruciaux dans la prise en charge du patient car ils conditionnent l'indication du TKI.

Ces mutations oncogénétiques sont des biomarqueurs nucléaires considérés comme des facteurs prédictifs de la sensibilité tumorale ainsi que de la réponse thérapeutique associée à une thérapie ciblée.

Par exemple, les mutations de type délétion exon 19 ou L858R sont des facteurs prédictifs forts de l'efficacité de l'erlotinib. Cette sensibilité des cellules cancéreuses est exploitée pour recruter les patients présentant ces mutations et pouvant ainsi bénéficier d'une thérapie ciblée et personnalisée impliquant les TKI-EGFR.

Néanmoins, malgré cet examen génétique guidant la première ligne de traitement, d'autres mutations, dites secondaires ou acquises, peuvent apparaitre au cours du traitement et induire une résistance des cellules cancéreuses au TKI initialement indiqué.

C'est le cas de la mutation T790M (thréonine T substituée par une méthionine M en position 790) sur l'exon 20, observée généralement en mécanisme de résistance aux TKI de première génération. Cette mutation induit une modification structurale de la poche catalytique réceptionnant l'ATP, défavorable à l'ancrage de l'erlotinib.[82,83] (Figure 68)

Des molécules de seconde et troisième génération sont indiquées en cas de résistance confirmée. Ces TKI sont des accepteurs de Michael formant un lien covalent avec des résidus nucléophiles de la poche catalytique et entrainant une inhibition irréversible du domaine catalytique. (Tableau 6)

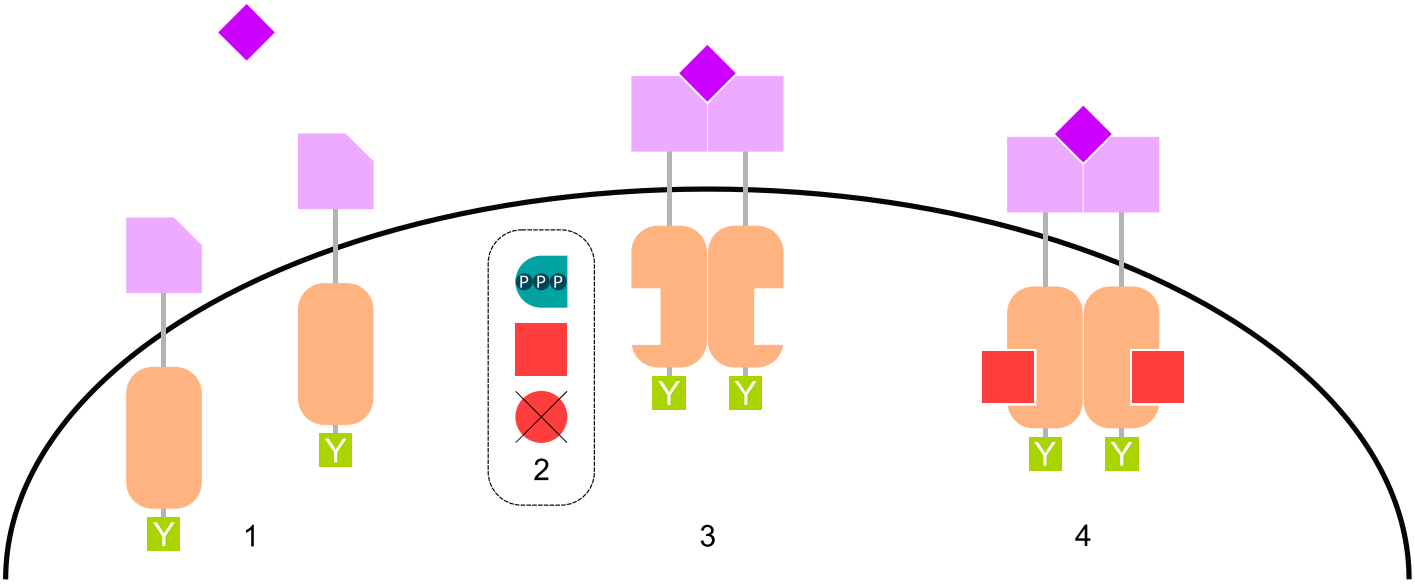


Figure 68 : Représentation schématique d'une résistance observée après indication de l'erlotinib en première ligne de traitement. 1 : EGFR monomérique inactif ; 2 : compétition entre l'ATP et le TKI de troisième génération (pas de fixation de l'erlotinib) ; 3 : modification structurale de la poche catalytique ; 4 : inhibition en aval par un TKI de troisième génération.

Les mécanismes de résistance sont inhérents à toute forme de thérapie entreprise.

La détermination du statut mutationnel de l'EGFR en début de prise en charge et son suivi au cours de l'oncogenèse et durant la phase curative sont des éléments capitaux pour le pronostic du patient.

La biopsie reste le support cellulaire privilégié pour l'intégration de ces données génétiques. Néanmoins, ce prélèvement invasif présente de nombreuses limitations :

- Un délai d'analyse et de concertation entre le prélèvement et le début du traitement.
- Une difficulté d'accès aux tumeurs selon l'organe touché
- Une analyse génétique ambiguë dans le cas de mutations rares non-identifiées ou complexes.
- Une différence du statut mutationnel entre des tumeurs primaires et métastasiques ou hétérogènes.

L'instabilité génomique des cellules cancéreuses, échappant aux systèmes de régulation, caractérise leur comportement incontrôlable et anarchique. Le développement d'outils diagnostiques, impliquant l'imagerie nucléaire et optique, contribue à une évaluation en temps réel des lésions tumorales, alternativement et complémentairement à la biopsie.

Tableau 6 : Principaux TKI-EGFR basés sur le pharmacophore 4-anilino-quinazoline

Générations	**TKI (nom commercial)**	**Structures moléculaires**	**Indications oncologiques**
1	Gefitinib (Iressa, ZD1839)		NSCLC présentant mutation activatrice de l'EGFR
1	Erlotinib (Tarceva, OSI-774, CP-358774)		• NSCLC présentant mutation activatrice de l'EGFR • Cancers du pancréas
2	Afatinib (Giotrif)		• NSCLC • Inhibiteur universel de la famille HER (EGFR, HER2, HER3, HER4)
3	Osimertinib, Mereletinib (Tagrisso, AZD9291)		• NSCLC présentant une mutation T790M (inhibition irréversible)
3	Lapatinib (Tyverb)		• Cancers du sein, associé à une immunothérapie complémentaire
3	Vandetanib (Caprelsa, ZD6474)		• Cancers médullaires de la thyroïde

4.3. L'EXPLOITATION D'ANALOGUES DE TKI (ERLOTINIB) MARQUES POUR L'IMAGERIE

4.3.1. L'EXPLOITATION D'ANALOGUES D'ERLOTINIB RADIOMARQUES POUR L'IMAGERIE NUCLEAIRE

Tout d'abord, l'imagerie nucléaire (TEP ou SPECT) pallie le caractère invasif de la biopsie.

Les dérivés de TKI radiomarqués permettent d'imager la tumeur *in vivo* en quantifiant en temps réel la biodistribution du radiotraceur. Plus précisément, l'accumulation du TKI radiomarqué au sein d'une cellule renseigne sur la présence et le niveau d'expression (c'est-à-dire le nombre de copies) du récepteur cible imagé. Dans ce cadre, l'étude de l'interaction ligand/récepteur (TKI radiomarqué/EGFR) peut être corrélé au statut mutationnel du récepteur et constituer un élément prédictif de l'efficacité du TKI froid apparenté.[84]

De plus, la biodistribution du radiotraceur à la cible (nécessitant le passage membranaire), la cinétique de liaison (affinité) et sa métabolisation sont également attentivement étudiés.

L'évaluation de ces composés repose sur une étude comparative de leur accumulation testée sur différentes lignées cellulaires cancéreuses hypersensibles, insensibles et résistantes à l'erlotinib. L'objectif est de discriminer les différents types cellulaires testés et de déterminer la présence les cellules sensibles à l'erlotinib parmi les échantillons cellulaires.

Plusieurs exemples d'analogues d'erlotinib radiomarqués, s'appuyant sur des stratégies de radiomarquage différentes, ont été développés et évalués. (Figure 69)

[^{11}C]erlotinib[85] est un des exemples les plus aboutis, tant pour sa conception que pour ses résultats. L'incorporation de ^{11}C par méthylation ne modifie pas la structure moléculaire du TKI, mimant parfaitement le comportement natif de l'erlotinib. Ce radiotraceur a été testé sur trois lignées cellulaires cancéreuses pulmonaires greffées sur des souris puis imagé par micro-PET. Les xénogreffes tumorales composées de cellules hypersensibles à l'erlotinib se distinguent par une accumulation importante du radiotraceur, comparativement aux autres lignées cellulaires testées. Une accumulation hépatique et rénale est observée sur les souris, due à la métabolisation puis l'excrétion du radiotraceur. Cette molécule a fait l'objet de la première évaluation clinique sur patients.[86]

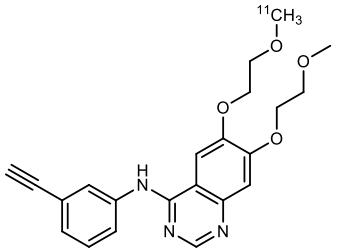


Figure 69 : Structure du radiotraceur [^{11}C]erlotinib[85]

Les stratégies de radiomarquage s'appuyant sur des structures coordinant des radionucléides, dont les temps de demi-vie sont généralement plus longs, ont également été publiées et sont prometteuses.
Par exemple, l'introduction d'un NOTA par fonctionnalisation de l'erlotinib pour la chélation du ^{68}Ga a été récemment décrit. Malgré une complexité structurale importante due à cette fonctionnalisation, ce dérivé d'erlotinib conserverait ses propriétés thérapeutiques cytotoxiques.[87] (Figure 70)

Bien que performants, ces radiotraceurs sont limités intrinsèquement par la résolution de l'imagerie nucléaire.

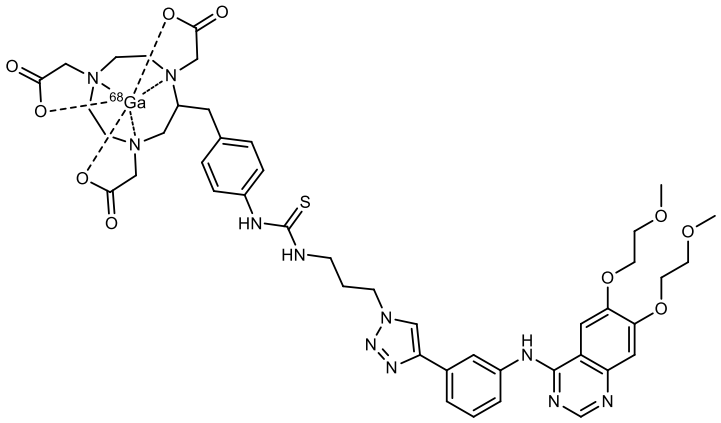


Figure 70 : Structure du radiotraceur ^{68}Ga-NOTA-Erlotinib[87]

4.3.2. L'EXPLOITATION D'ANALOGUES D'ERLOTINIB FLUORESCENTS POUR L'IMAGERIE OPTIQUE

4.3.2.1. APPROCHE INDIRECTE

A l'instar de l'imagerie nucléaire, l'imagerie optique est également exploitée pour discriminer des cellules cancéreuses résistantes et sensibles à l'erlotinib.

En 2017, une équipe de pneumologie du CHU de Rouen a développé une procédure permettant d'imager une réponse tumorale quantitative en temps réel, *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*.[88]

L'étude repose sur la comparaison de réponses tumorales parmi différentes lignées cellulaires humaines d'adénocarcinome pulmonaire xénogréffées sur souris et caractérisées par leur hypersensibilité, insensibilité ou résistance à l'erlotinib. (Figure 71)

L'évaluation de cette sensibilité tumorale repose sur la détection de la caspase-3 activée, caractérisant les cellules engagées dans le programme apoptotique. Cette réponse cytotoxique thérapeutique est induite par l'erlotinib et la réponse enzymatique associée est détectée par le NucView 488, un substrat profluorescent commercial spécifique de l'enzyme cible. (Chapitre 3.2.1.1.2.)

L'acquisition de la réponse fluorogénique *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* repose sur une technique d'endomicroscopie utilisée en chirurgie guidée par fluorescence (pCLE : probe-based Confocal Laser Endomicroscopy).

Les résultats de cette étude confirment le potentiel d'imager une réponse apoptotique thérapeutique *in vivo*.

Néanmoins, l'approche translationnelle de cette technique semble difficilement envisageable. En effet, la détection de la réponse thérapeutique reste tardive et indirecte, via la détection de la caspase-3. De plus, la sonde enzymatique utilisée est incompatible avec une utilisation clinique.

Par ailleurs, l'analyse *ex vivo* propose un outil performant afin de guider l'indication de l'erlotinib à partir d'un échantillon biopsique, avec une réponse plus rapide et plus fiable (dans le cas des mutations rares ou non-répertoriées) que les méthodes de séquençage.

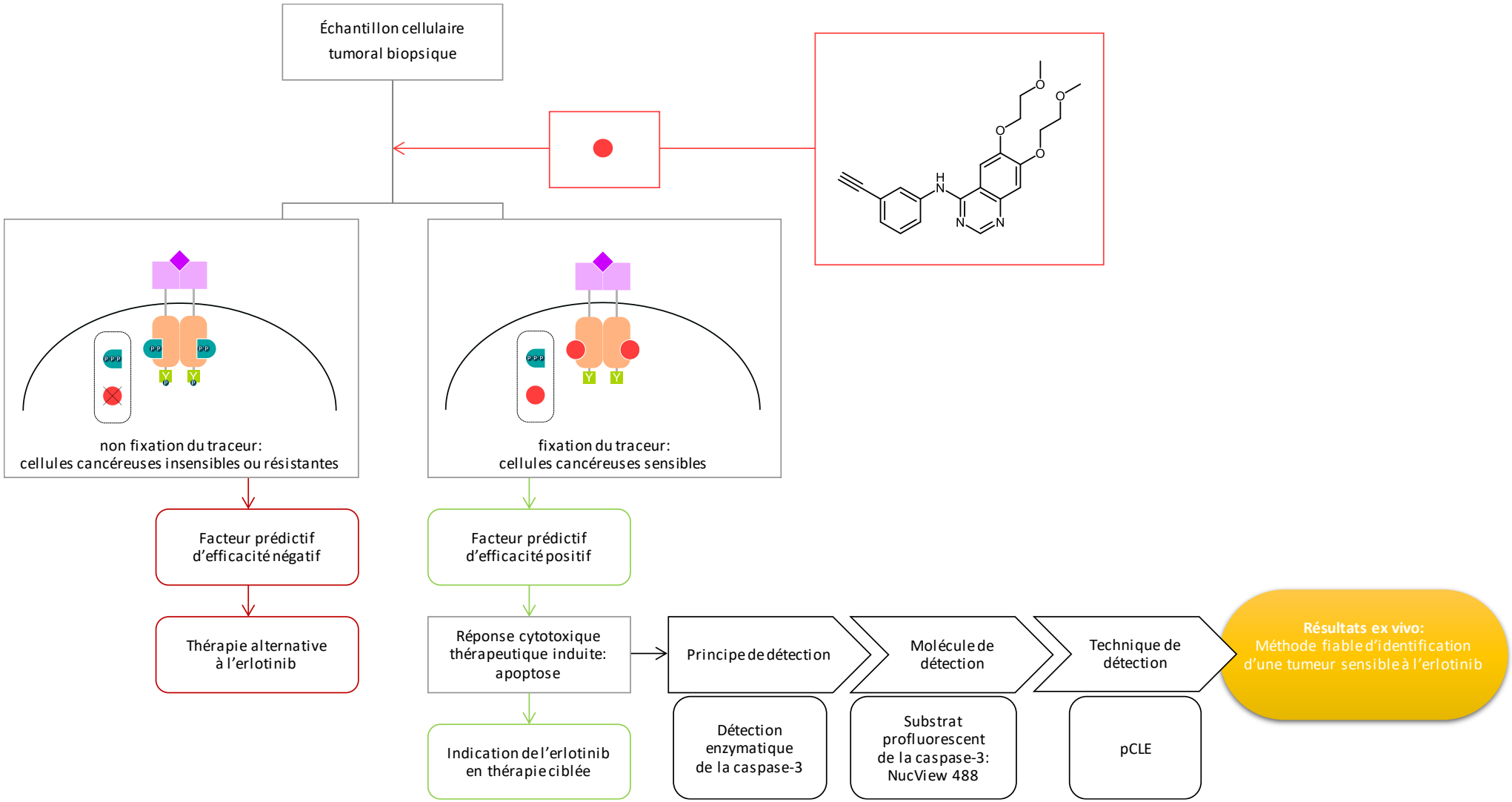


Figure 71 : Procédure de détermination indirecte de l'indication d'erlotinib en thérapie ciblée

4.3.2.2. APPROCHE DIRECTE

Une collaboration a ensuite été initiée avec l'équipe de pneumologie afin de concevoir et synthétiser des dérivés d'erlotinib fluorescents permettant d'imager directement une interaction ligand/récepteur (erlotinib fluorescent/EGFR), affranchie d'une détection enzymatique auxiliaire.

En 2019, l'évaluation d'un premier dérivé d'erlotinib couplé à une fluorescéine pré-fonctionnalisée est publiée. Sur des lignées cellulaires similaires à la précédente étude, ce traceur fluorescent permet de discriminer en temps réel les populations cellulaires sensibles à l'erlotinib *in vitro* et *ex vivo*.[89] (Figure 72)

De plus, l'encombrement stérique généré par la fonctionnalisation de l'erlotinib avec le fluorophore n'altère, ni l'interaction avec le récepteur cible, ni l'activité cytotoxique du TKI.

Les performances remarquables de ce traceur permettent d'envisager une exploitation théranostique de cette molécule. Néanmoins, le potentiel de ce TKI fluorescent ne s'étend pas à une application *in vivo*. En effet, les propriétés d'émission de la fluorescéine, limitées à l'imagerie de surface, restreignent son exploitation dans un contexte clinique.

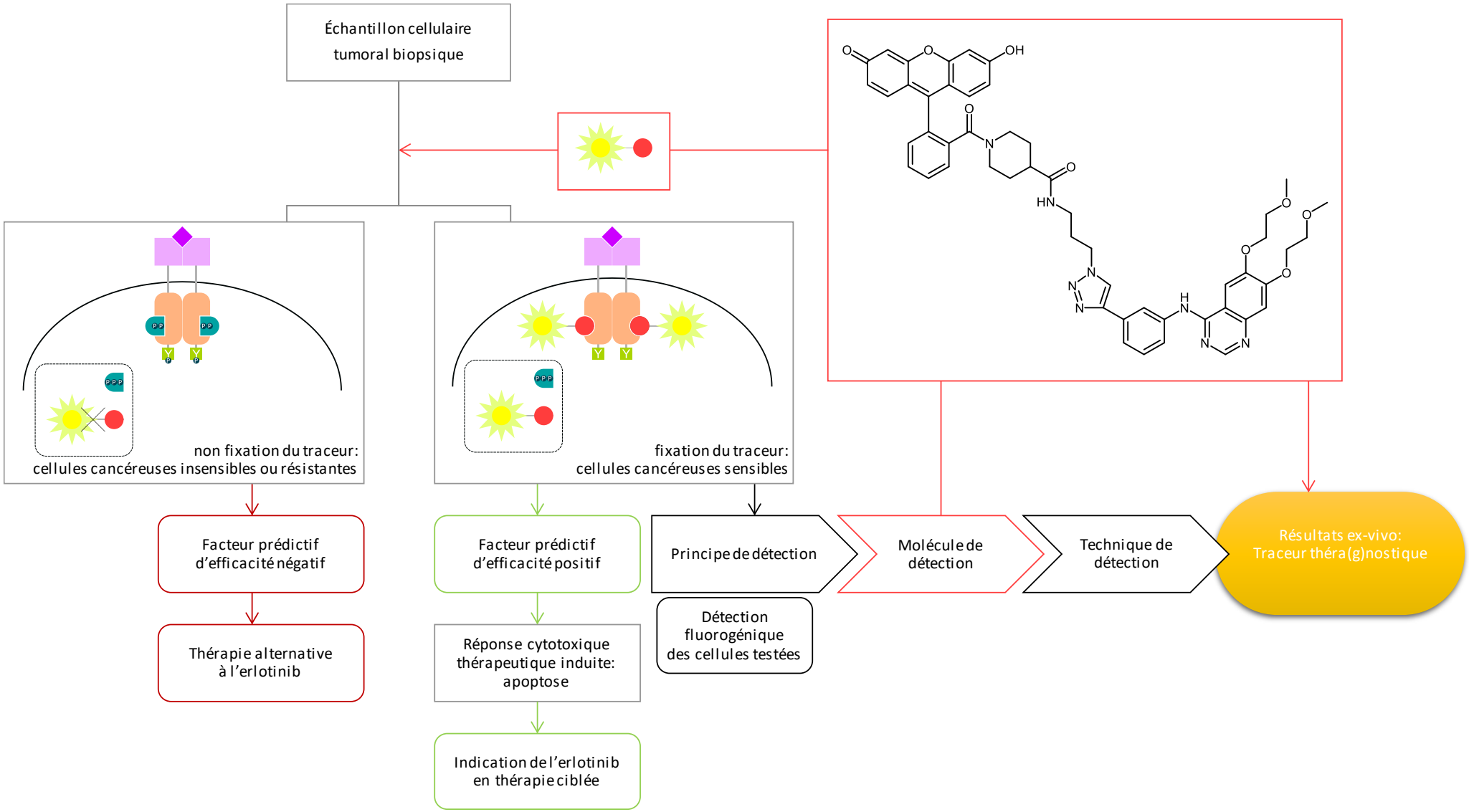


Figure 72 : Procédure de détermination directe de l'indication d'erlotinib à partir d'un dérivé fluorescent d'erlotinib émettant dans le vert

Ces récents résultats prometteurs nous ont amené à proposer à nos collaborateurs cliniciens une version améliorée du précédent traceur fluorescent.

Afin de permettre une exploitation *in vivo*, le fluorophore initial (fluorescéine) a été substitué par les Cy5.0 originales **Cy5.0$_A$** et **Cy5.0$_C$**. (Chapitre 2.2.2.)

Ces Cy5.0, dont les propriétés spectrales sont inclues dans la fenêtre de transparence biologique, sont clickables en une étape à l'erlotinib, sans dérivatisation des partenaires.

Cette approche convergente nous a permis de proposer une librairie de deux molécules, obtenues par CuAAC, dont les propriétés d'hydrosolubilité ont été modulées par la présence de la fonction acide carboxylique d'une part (**24**) et substituée, d'autre part, par deux fonctions sulfonates (**25**). (Figure 73)

En effet, ce paramètre est déterminant dans la conception de ce type de traceur. L'équilibre entre hydrophilie (pour une solubilité dans les milieux physiologiques aqueux) et lipophilie (pour diffuser à travers la membrane plasmique) est un paramètre récurrent à considérer.

Les dérivés d'erlotinib fluorescents **24** et **25** ont été synthétisés dans les conditions optimisées de la cycloaddition cupro-catalysée de Huisgen.

Ces deux molécules sont actuellement testées sur différentes lignées cellulaires hypersensibles, insensibles et résistantes à l'erlotinib. Elles feront également l'objet de tests préliminaires sur pièces opératoires issues d'exérèse.

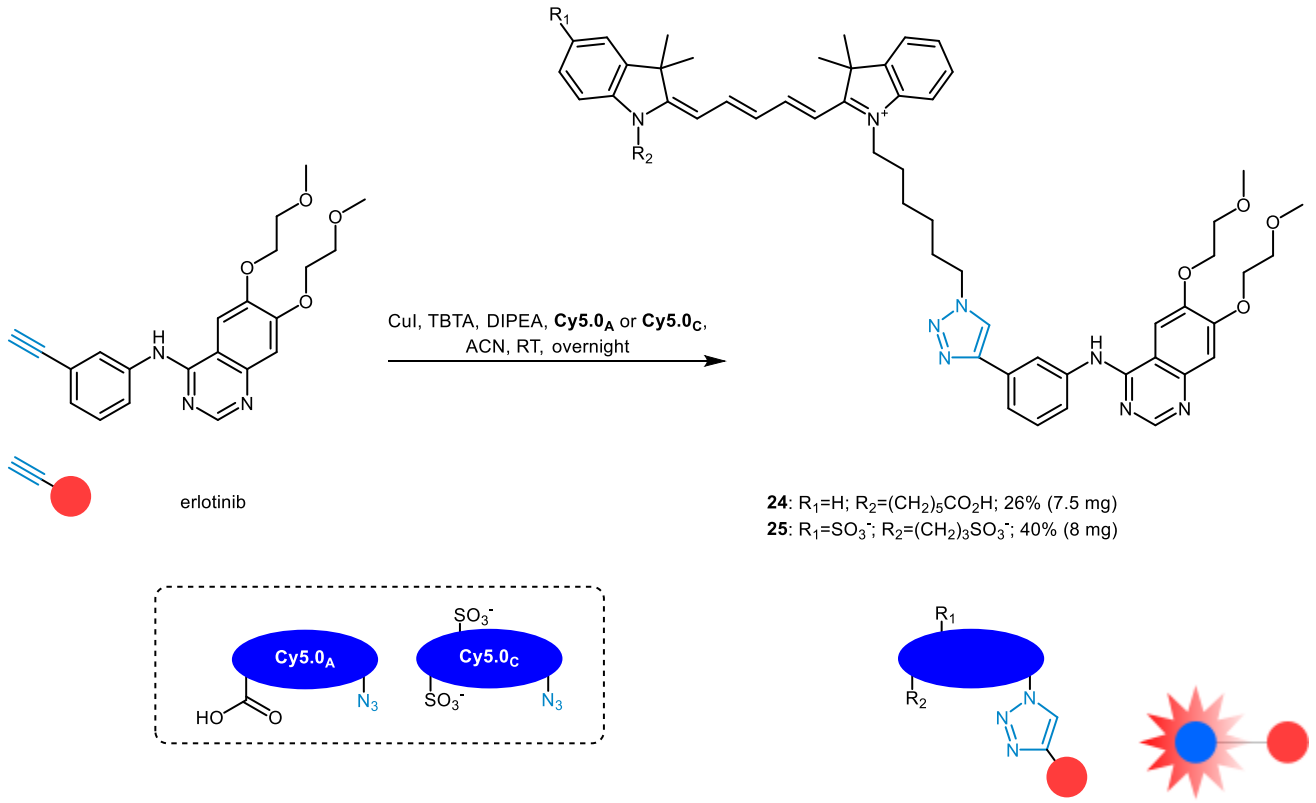


Figure 73 : Synthèses des dérivés d'erlotinib fluorescents **24** et **25**

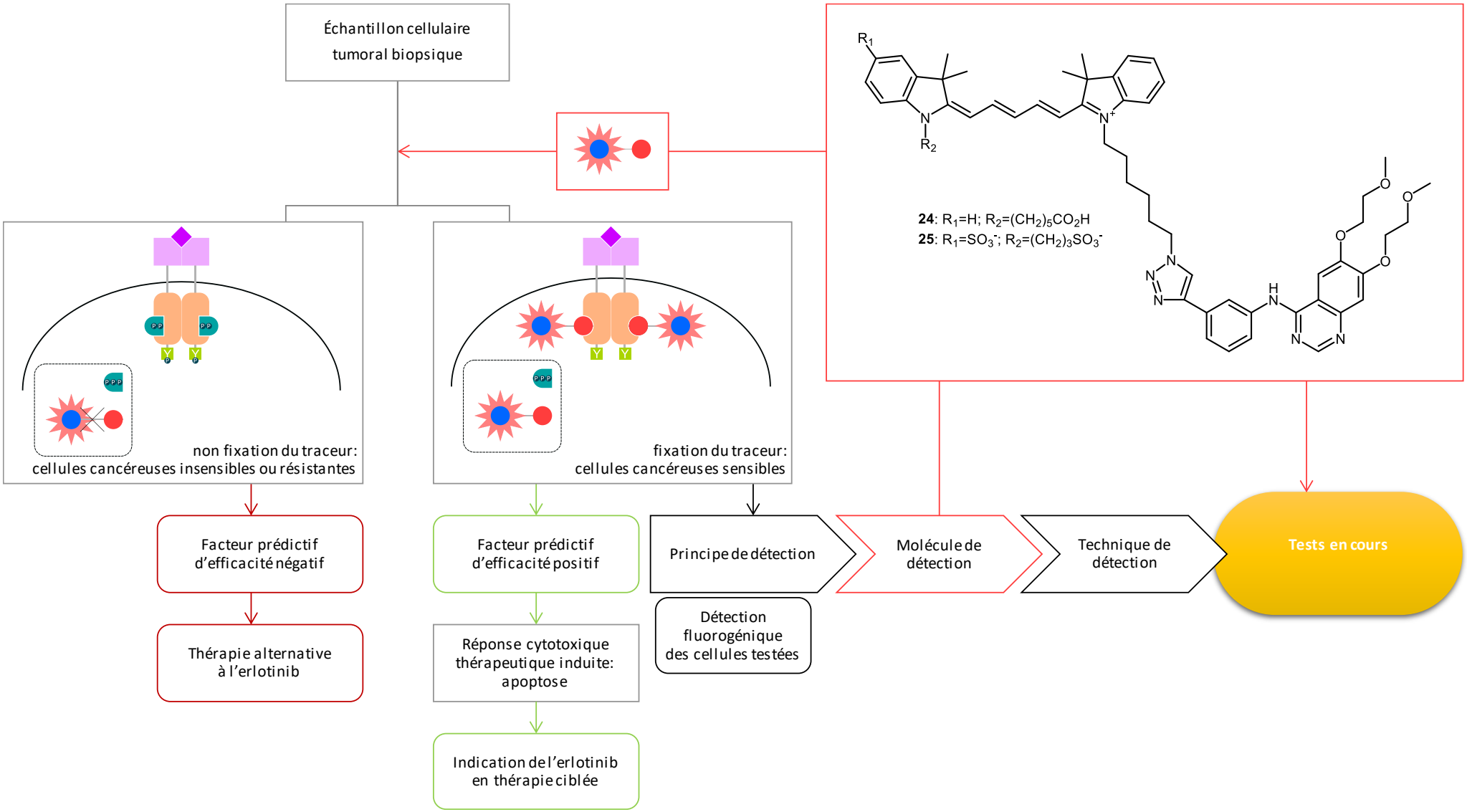


Figure 74 : Procédure de détermination directe envisagée pour tester les dérivés fluorescents d'erlotinib **24** et **25**

Les propriétés spectroscopiques de **24** et **25** ont été mesurées dans le DMSO et le PBS. (Tableau 7, Figure 75)

Le DMSO assure une solubilisation optimale des deux composés générant des rendements quantiques de fluorescence satisfaisants. Ceux-ci chutent drastiquement lorsque les mesures sont effectuées dans le PBS. La solubilité de ces composés dans le milieu aqueux salin, y compris la version bisulfonatée hydrosoluble **25**, semble médiocre, favorisant la formation d'agrégats.

Ces mesures photo-physiques ne sont pas nécessairement prédictives du comportement spectroscopique de ces molécules en milieux biologiques.

Composés	Solvant	λ_{MAX} Abs (nm)	λ_{MAX} Em (nm)	Déplacement de Stokes (nm)	Déplacement de Stokes (cm^{-1})	Φ_F[a]	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
24	DMSO	651	675	24	546	0.59	110 000	65 000
	PBS	645	668	23	534	0.17	43 000	7 300
25	DMSO	655	678	23	518	0.66	44 000	28 900
	PBS	644	667	23	535	0.15	28 000	4 200

Tableau 7 : Propriétés spectroscopiques de **24** et **25** déterminées à température ambiante

[a]rendement quantique de fluorescence relatif déterminé par rapport au Nile blue (Φ_F = 0.27 dans l'EtOH)[37]

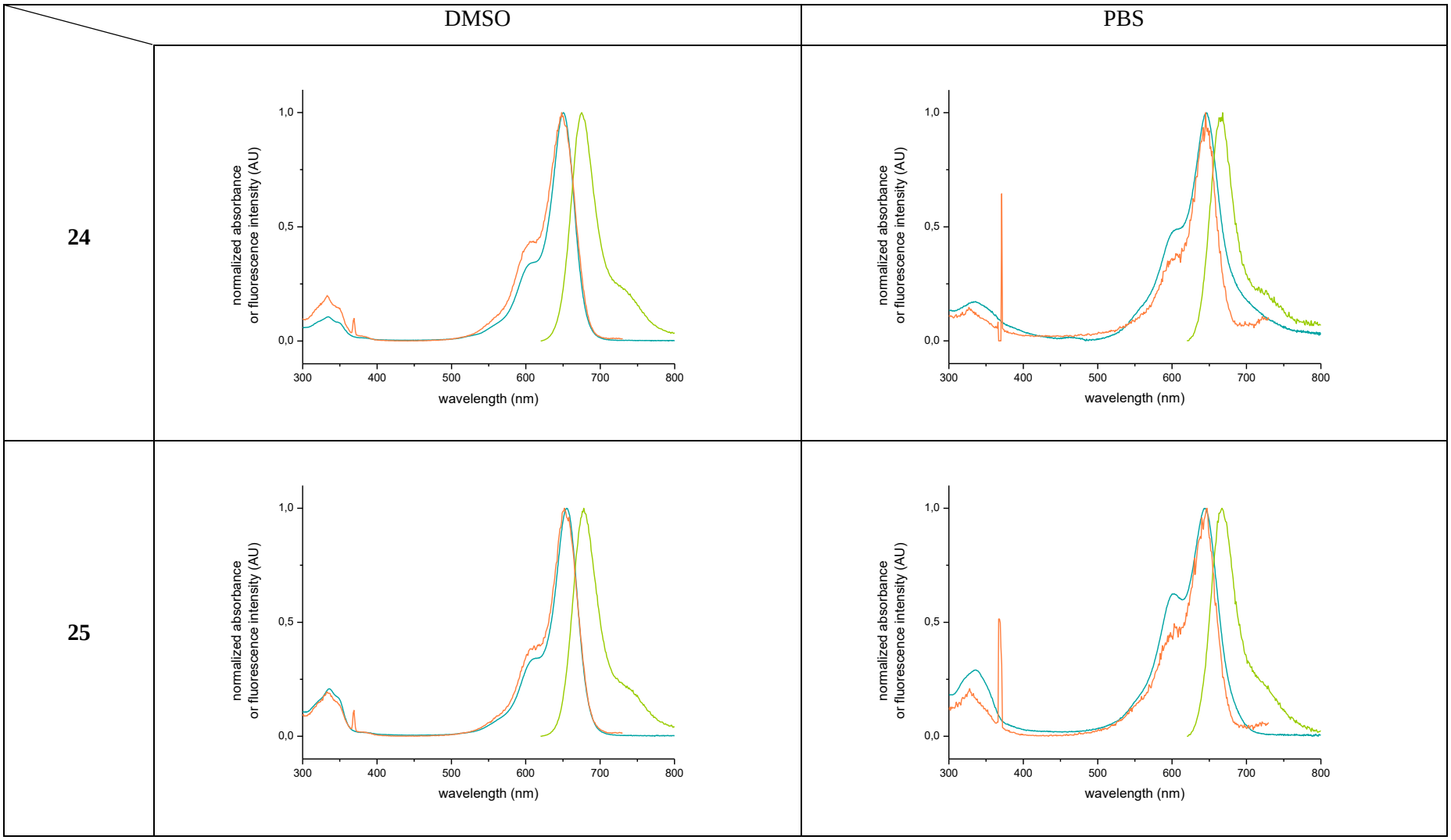


Figure 75 : Spectres d'absorption —, d'émission — (λ_{exc} = 610 nm) et d'excitation — (λ_{em} = 740 nm) normalisés des composés **24** et **25** dans le DMSO et le PBS à 25 °C

4.3.3. CONCEPTION ET SYNTHESE D'ANALOGUE D'ERLOTINIB BIMODAL RADIOACTIF ET FLUORESCENT POUR L'IMAGERIE BIMODALE NUCLEAIRE ET OPTIQUE

Dans un contexte d'imagerie bimodale diagnostique *in vivo*, notre plateforme radiomarquable clickable **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$** trouve, à nouveau, une application oncologique. Conçue comme une version bimodale améliorée de nos précédents traceurs fluorescents **24** et **25**, la sonde radiomarquable **26** a été synthétisée par couplage cupro-catalysé engageant l'erlotinib et **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$**. (Figure 77)

La déprotection du résidu cystéine est ensuite réalisée en présence de DTT en conditions basiques.

Constituant un des quatre points de chélation de notre cage N_3S, la fonction thiol libérée est très sensible à l'oxydation. En effet, la formation du dimère **27$_D$** via un pont disulfure est observée en proportion équimolaire dès 24 heures de stockage sous atmosphère inerte

Malgré des précautions de stockage en condition inerte et à basse température, cette dimérisation indésirable par oxydation présente l'inconvénient majeur de verrouiller un point de chélation essentiel. Cette étape de déprotection doit donc être réalisée immédiatement avant les marquages chaud et froid et les étapes de purification semi-préparative en phase inverse et de lyophilisation doivent être effectuées très rapidement.

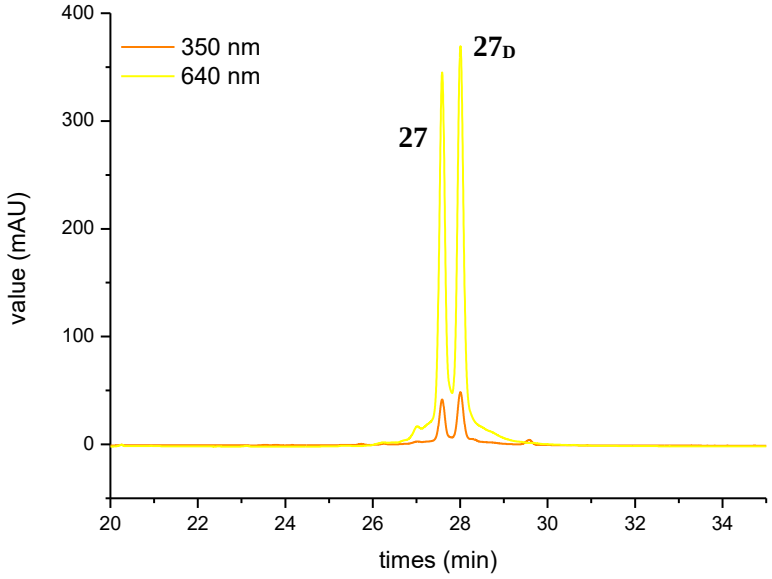


Figure 76 : Dimérisation de **27** observée 24 heures après déprotection du résidu de chélation cystéine (chromatogramme détecté à λ_{abs} = 350 nm et 640 nm)

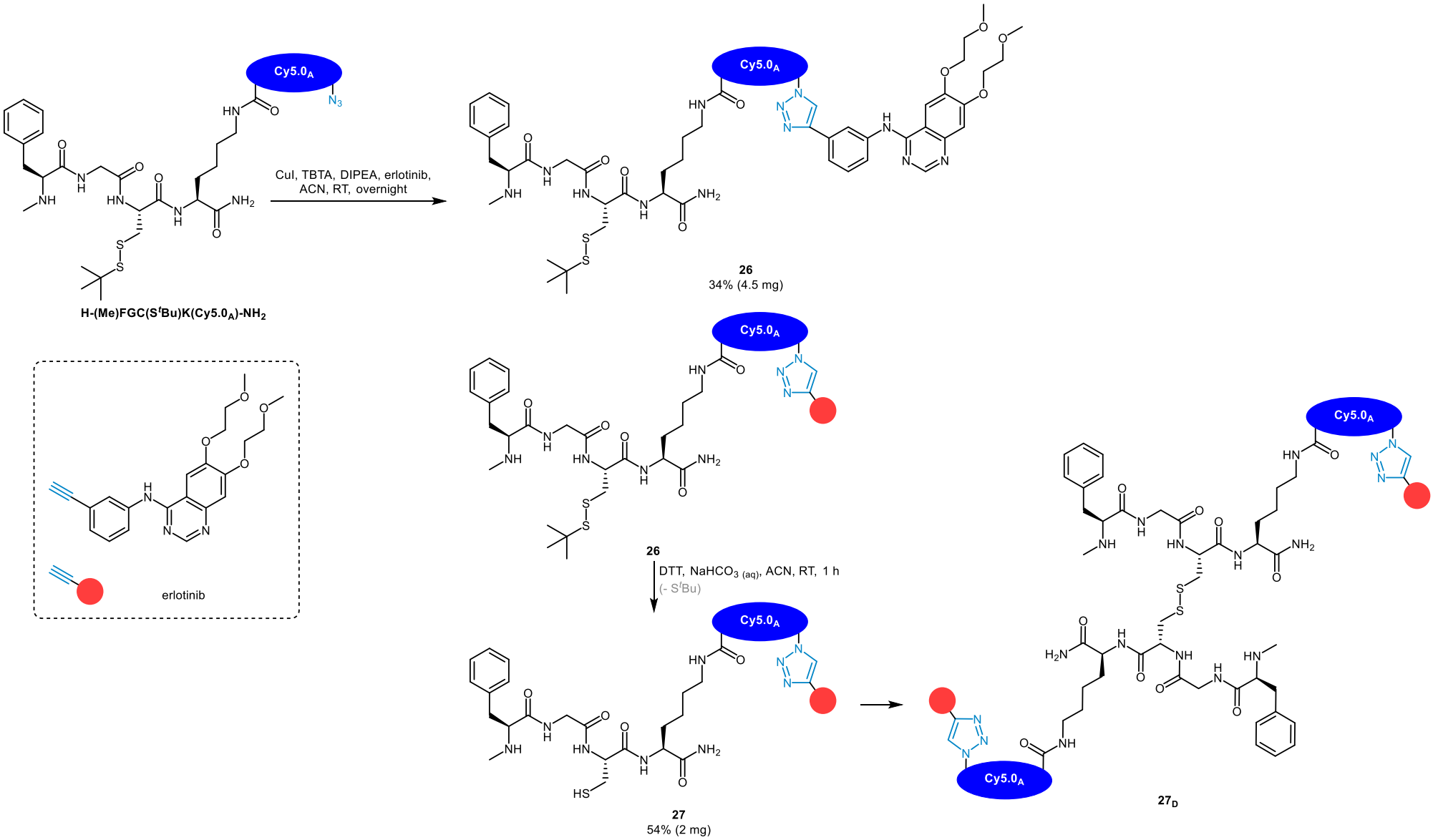


Figure 77 : Synthèse du dérivé d'erlotinib radiomarquable **27**

L'étape de radiomarquage finalise la synthèse de notre première sonde bimodale. (Figure 78)

La source de technétium est le pertechnetate de sodium ($^{99m}TcO_4Na$) qui est réduit de l'état d'oxydation +VII à +V (d2) en présence de $SnCl_2$. Le ^{99m}Tc réduit est alors stabilisé transitoirement par un chélateur faible dit primaire, le sodium tartrate. Le produit marqué cible est enfin obtenu par transchélation du tartrate de sodium au cœur N_3S peptidique. (Figure 79)

Expérimentalement, le précurseur radiomarquable **27**, le tartrate de sodium, le $SnCl_2$ et le tampon réactionnel sont injectés dans un réacteur. La source de Tc est ensuite ajoutée et le milieu réactionnel est incubé selon les normes de radioprotection. Le rendement radiochimique de marquage est enfin évalué en injectant le milieu réactionnel en RP-HPCL.

Une optimisation des conditions de marquage a été nécessaire afin d'obtenir le composé final **29**. (Tableau 8)

Dans un premier temps, le marquage a été testé à température ambiante puis à 100 °C. Dans ces conditions et malgré un temps de chauffage prolongé, la radiochélation de **27** n'a pas été observé.

Le pH du milieu réactionnel a ensuite été le second paramètre testé. En effet, $SnCl_2$, solubilisé dans une solution aqueuse de HCl 1M, acidifie drastiquement le milieu réactionnel. Le PBS a ainsi été testé pour tamponner le milieu réactionnel, sans succès.

Enfin, le pH a été augmenté selon une seconde stratégie de dilution de la solution mère contenant le réducteur. Ces conditions réactionnelles ont permis l'obtention de notre premier outil bimodal radiomarqué **29**, d'une pureté radiochimique de 85%.

Nos tests ont malheureusement été limités par la faible quantité de produit disponible et la formation rapide du dimère disulfuré.

Tableau 8 : Optimisation des conditions réactionnelles de marquage

Entrée	**Temperature (°C)**	**Temps (min)**	**Tampon réactionnel**	**Concentration de la solution de HCl solubilisant $SnCl_2$ (M)**	**pH**	**Produit radioactif détecté**
1	RT	10	eau	1	4	complexe technecié 1
2	RT	90	eau	1	4	$^{99m}TcO_4^-$
3	100	10	eau	1	4	$^{99m}TcO_4^-$
4	100	10	PBS	1	4	$^{99m}TcO_4^-$
5	100	10	eau	0.1	6	**29**

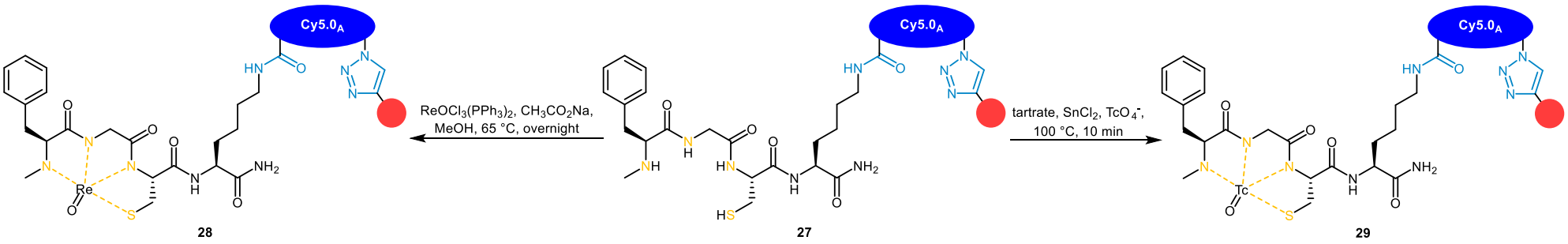


Figure 78 : Synthèse de la sonde bimodale téchnéciée **29** et son authentique froid rhénié **28**

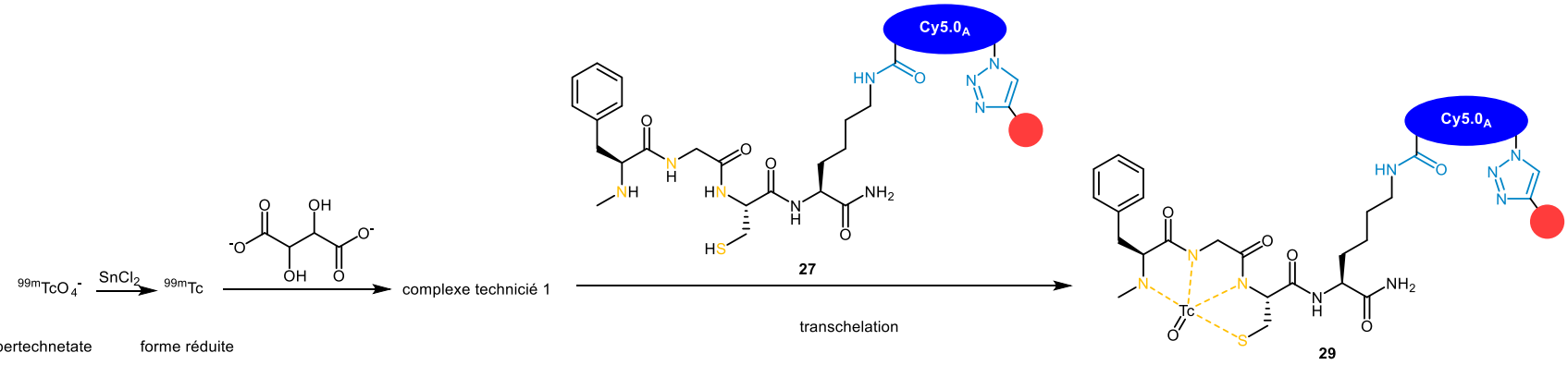


Figure 79 : Détail de l'étape de radiomarquage par chélation du ^{99m}Tc

Le dérivé d'erlotinib bimodal **29** est détecté par compteur γ couplé à la RP-HPLC. Il présente un temps de rétention de 30.5 min, dans les conditions d'élution, corrélé par une détection λ_{abs} = 640 nm. (Figure 80, Figure 81)

L'authentique froid rhénié **28** présente un temps de rétention similaire, confirmant la génération du complexe technécié.

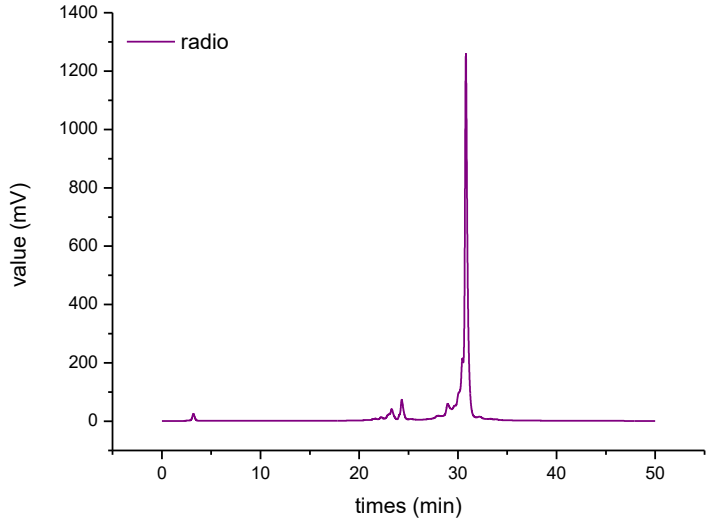


Figure 80 : Profil d'élution nucléaire de **29**

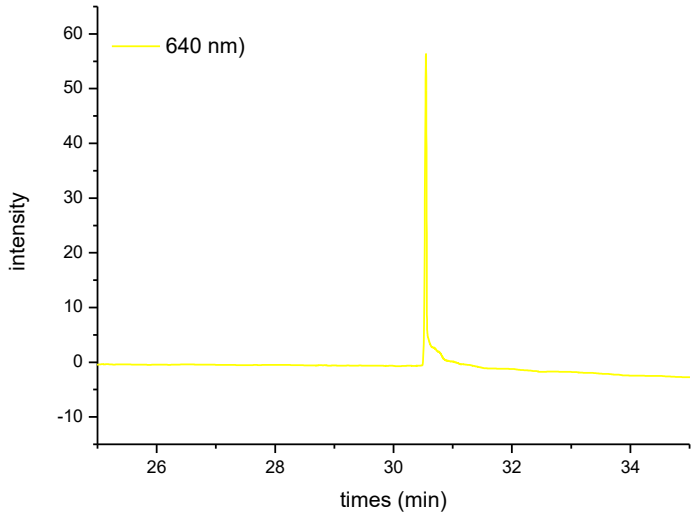


Figure 81 : Profil d'élution d'absorbance de **29** (λ_{abs} = 640 nm)

4.4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'indication initiale de l'erlotinib était privilégiée pour le traitement en seconde ligne du NSCLC localement avancé ou métastasique après échec d'une chimiothérapie en première ligne.[90] Actualisée en 2016, l'indication de l'erlotinib est encouragée en première ligne de traitement du NSCLC avec mutations activatrices de l'EGFR identifiées et confirmées. L'efficacité des TKI reste conditionnée par une meilleure sélection des patients présentant des facteurs prédictifs forts de sensibilité. Dans ce contexte et en collaboration avec des pneumologues développant une procédure de détermination basée sur l'analyse *ex-vivo* de cellules tumorales, trois nouveaux dérivés d'erlotinib fluorescents ont été synthétisés (**24**, **25** et **29**).

Le dernier traceur est bimodal et représente le premier exemple marqué exploitant notre plateforme bimodale clickable polyvalente **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$**. La pureté radiochimique de ce radiotraceur fluorescent permet d'envisager des tests cellulaires, mais reste insuffisante pour une expérimentation sur le petit animal.

La procédure de détermination du statut mutationnel de l'EGFR, initiant et conditionnant la thérapie ciblée, peut être étendue au cours du traitement afin de suivre l'efficacité thérapeutique de la molécule sélectionnée et de détecter rapidement l'apparition de mutations induisant une résistance au traitement.

Le développement d'outils multimodaux de suivi en temps réel de l'évolution de biomarqueurs oncogéniques trouvera une application oncologique dirigée vers des thérapies ciblées personnalisées et plus performantes. (Figure 82)

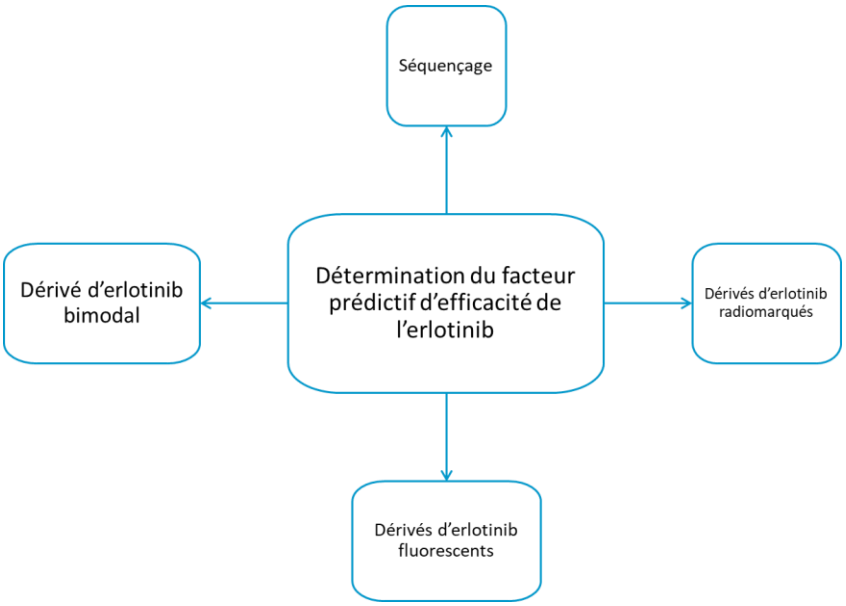


Figure 82 : Applications cliniques potentielles de nos dérivés d'erlotinib marqués alternativement et complémentairement à l'analyse génétique de l'échantillon biopsique

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES GENERALES

5.1. CONCLUSION GENERALE

Constituant les agents de contraste du futur, les outils moléculaires multimodaux se heurtent souvent, dès leur conception, aux difficultés synthétiques rencontrées par le chimiste.[91]

Dans le cadre de cette thèse, nous proposons une plateforme NIR-fluorescente, radiomarquable et clickable pour répondre à cette problématique en générant, en un minimum de deux étapes (radiomarquage compris), des sondes bimodales à façon.

Notre plateforme **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$**, accessible en deux étapes, à partir du bipode fluorescent lipophile **Cy5.0$_A$** et du tétrapeptide chélatant **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$**, obtenus respectivement en six et deux étapes.

La construction moléculaire de la plateforme s'appuie sur la formation d'une liaison amide entre ces deux partenaires et la formation d'un triazole avec l'élément moléculaire de ciblage, via une cycloaddition cupro-catalysée de Huisgen.

Afin de démontrer le caractère polyvalent de notre outil, deux cibles oncogéniques ont été sélectionnées. (Figure 83)

Dans le cadre de l'indication de thérapie ciblée, les dérivés marqués de TKI représentent des outils diagnostiques et thérapeutiques potentielles.

La fonction alcyne de l'erlotinib, initialement et structuralement présente au sein de son pharmacophore, a été avantageusement exploitée pour générer le premier exemple de sonde bimodale à partir de notre plateforme.

Ce projet s'est également inscrit dans le cadre d'une amélioration des outils de détection développés avec nos collaborateurs cliniciens, notamment en proposant des dérivés d'erlotinib fluorescents émettant dans le NIR.

Le développement de sondes bimodales détectant l'activité enzymatique de la caspase-3 a également été exploré selon une approche de sonde-substrat quenchée par FRET.

La massive complexité structurale de nos molécules a nécessité la mise en œuvre de plusieurs stratégies de synthèse et d'un solide savoir-faire. Nous nous sommes heurtés à de nombreuses difficultés synthétiques, inhérentes à la multifonctionnalisation de peptides, sans pouvoir finaliser la synthèse d'une sonde bimodale ciblant la caspase-3.

Par conséquent, les différentes problématiques abordées dans le cadre de ce projet nous confortent dans le développement d'outils bimodaux de taille raisonnable basés sur une stratégie de ligation bio-orthogonale.

Par ailleurs, la stratégie de protection du résidu de chélation cystéine doit être revue au vue de la sensibilité de la fonction thiol. La protection thermolabile, sous forme de thioester benzylique, permettrait d'effectuer les étapes de déprotection et de marquage *in situ* one pot.

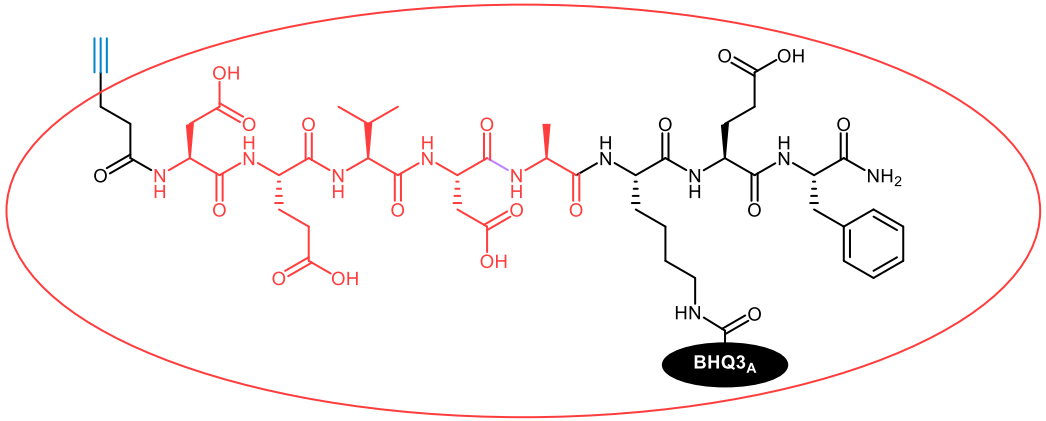
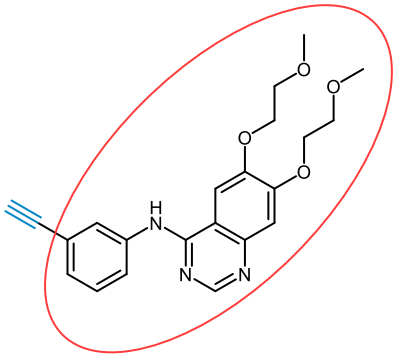
Ligands clickables		
	Séquence peptidique de ciblage enzymatique	Inhibiteur de tyrosine kinase cytotoxique
Cibles	Caspase-3	EGFR
Structures moléculaires des ligands clickés		
Composés	**21**	erlotinib
Applications	Détection de l'apoptose	Détection de l'EGFR
Projets	Chapitre 3	Chapitre 4

Figure 83 : Variation des éléments moléculaires de ciblage clickables à la plateforme bimodale

5.2. PERSPECTIVES

5.2.1. LA PLATEFORME BIMODALE CLICKABLE

De manière modulable et en fonction des applications envisagées, plusieurs modifications et améliorations synthétiques peuvent être effectuées :

- Les propriétés spectroscopiques et d'hydrosolubilisation peuvent être optimisées à partir de précurseurs benzoindoliques sulfonatés.
- Le radiomarquage par chélation peut être étendu à d'autres isotopes (avec adaptation de la structure chélatante si besoin) sans exclure le radiomarquage par lien covalent. Ainsi, les imageries SPECT et TEP peuvent être représentées.
- La ligation, entre la plateforme et l'élément moléculaire de ciblage, inclue les réactions bio-orthogonales SPAAC.[92]

5.2.2. LE BIPODE FLUORESCENT

Notre stratégie de bifonctionnalisation de la Cy5.0, impliquant les fonctions acide carboxylique et azoture, peut être améliorée avec l'introduction d'un troisième site de ligation, orthogonal aux deux fonctions initiales. Ce point de fonctionnalisation additionnel peut être introduit au sein d'un espaceur heptamethynique commercial chloré.

Associé ou non à la modalité nucléaire, ce tripode fluorescent représenterait un réactif hétérotrifonctionnel décorable à façon en fonction des applications envisagées.

5.2.3. LES ELEMENTS DE CIBLAGE CICKABLES

Parmi les nombreux éléments moléculaires de ciblage clickables, les anticorps constitueraient une cible extrêmement attractive.[92] Deux approches principales ont été envisagées :

- L'exploitation de l'amine primaire latérale d'un résidu lysine engagée dans un couplage peptidique avec la fonction acide carboxylique du bipode (ou tripode) fluorescent.
- L'exploitation de résidus amino-acides non-canoniques, incorporés synthétiquement dans la séquence de l'immunoglobuline, dont la fonction latérale de ligation est engagée dans un couplage bio-orthogonal.

5.2.4. APPROCHE THERANOSTIQUE

Nos projets s'inscrivent dans un cadre de diagnostic oncologique *in vivo* mais peuvent être envisagés dans un contexte thérapeutique.

Abordé lors du développement de dérivés d'erlotinib fluorescents, le caractère théranostique des sondes constituerait une progression exceptionnelle dans la prise en charge des cancers.

Les applications des modalités nucléaire et optique peuvent s'inscrire dans cette évolution car leurs champs d'applications cliniques s'étendent aux stratégies curatives via la radiothérapie ou la thérapie photo-dynamique.[93]

Finalement, le développement d'outils multimodaux doit s'appuyer sur les efforts conjoints des chémobiologistes et cliniciens. L'aspect translationnel de développement, trop souvent limité et limitant, constitue les futurs enjeux de ce domaine de recherche interdisciplinaire en pleine expansion.

(From bench to bed-side)

6. PARTIE EXPÉRIMENTALE

TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. The spots were visualized by illumination with UV lamp (254 and 365 nm) and/or staining with a phosphomolybdic acid or $KMnO_4$ solution. Flash-column chromatography purifications were performed on Geduran® Si 60 silica gel (40-63 µm) from Merck. All chemicals were used as received from commercial sources without further purification unless otherwise stated. All solvents were dried following standard procedures: CH_2Cl_2, CH_3CN, triethylamine: distillation over CaH_2; DMF, NMP, MeOH, EtOH and Xylene: dried over 3Å MS; THF: distillation over Na/benzophenone. Anhydrous DMF was obtained from Carlo Erba-SdS or Fisher Scientific and stored over 3Å molecular sieves. Peptide synthesis reagent-grade DIEA, NMP and piperidine were purchased from Iris Biotech GmbH. Triethylamine (TEA) was distilled over KOH and stored over KOH.

The HPLC gradient grade acetonitrile (CH_3CN) were obtained from VWR. Aq. buffers (phosphate buffered saline (PBS, 100 mM phosphate + 150 mM NaCl, pH 7.4), NaOAc, $NaHCO_3$, ...) and aq. mobile-phases for HPLC were prepared using water purified with a Milli-Q system (purified to 18.2 MW.cm).

^{1}H- and ^{13}C NMR spectra were recorded either on a Bruker DPX 300 spectrometer. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from the residual non - deuterated solvent signal. *J* values are expressed in Hz.

Analytical HPLC were performed on a Thermo Scientific Surveyor Plus and Ultimate 3000 instrument equipped with a PDA and γ detector. Semi-preparative HPLC were performed on a Thermo Scientific SPECTRASYSTEM liquid chromatography System (P4000) equipped with a UV-visible 2000 detector.

HRMS analyses were performed on a LCT Premier XE benchtop orthogonal acceleration time-of-flight (oa- TOF) mass spectrometer (Waters Micromass) equipped with an electrospray source and in the positive and negative modes (ESI+/-). ESI low resolution mass spectra were obtained either with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus.

UV-visible spectra were obtained on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer by using either a rectangular quartz cell (Varian, standard cell, Open Top, light path: 10 × 10 mm, chamber volume: 3.5 mL) or a quartz micro cell (Hellma, 108.002-QS, light path: 10 mm, volume chamber: 500 µL).

Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra/kinetic) were performed with a Varian Cary Eclipse spectrophotometer or Fluorolog Horiba with a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, light path: 10 × 4 mm, chamber volume: 1400 µL, Chamber volume 3.5 mL for all other studies) for quantum yield determination or an ultra-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 105.251-QS, light path: 3 × 3 mm, chamber volume: 45 µL) for

enzymatic assays, or a semi-micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, light path: 10 × 4 mm, chamber volume: 3.5 mL) for all other studies.

Emission spectra were recorded under the same conditions after excitation at the corresponding wavelength (excitation and emission filters: auto, excitation and emission slit = 5 nm). The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield: $\Phi_F(x) = (A_s/A_x)(F_x/F_s)(n_x/n_s)^2.\Phi_F(s)$

where A is the absorbance (in the range 0.01-0.1 A.U.), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively.

The following refractive index values were used: 1.333 for water, 1.362 for EtOH, 1.424 for CH_2Cl_2 1.478 for DMSO.

RP-HPLC systems:

System A: RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 µm, 21.2 x 250 mm) with ACN and 0.1% aq. TFA as eluents [0% ACN (10 min), followed by linear gradient from 0% to 100% (200 min) of ACN and followed 100% (30 min) of ACN] at a flow rate of 15 mL/min.

System B: RP-HPLC (Thermo Hypersyl GOLD C18 column, 5 µm, 2.1 x 100 mm) with ACN and 0.1% aq. trifluoroacetic acid as eluents [0% ACN (5 min) followed by linear gradient from 0% to 100% (40 min) of ACN] at a flow rate of 0.25 mL/min.

System C: RP-HPLC (Thermo Hypersyl GOLD C18 column, 1.9 µm, 2.1 x 50 mm) with ACN and 0.1% aq. formic acid as eluents [5% ACN (5 min) followed by linear gradient from 5% to 100% (8 min) of ACN] at a flow rate of 0.6 mL/min.

System D: RP-HPLC (Dionex Acclaim C18 column, 5 µm, 2.1 x 100 mm) with ACN and 0.1% aq. trifluoroacetic acid as eluents [0% ACN (5 min) followed by linear gradient from 0% to 100% (40 min) of ACN] at a flow rate of 0.25 mL/min.

Commercially available building blocks used without further purification:

6-bromohexanoic acid, 1-bromo-6-chlorohexane, sodium azide, sodium iodide, malonaldehyde bis(phenylimine) monohydrochloride, 1,3-propanesultone, 1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indol-1-ium iodide, Methylene Violet 3RAX, erlotinib, TBTA, CuI, TSTU, DIPEA.

2,3,3-trimethyl-3*H*-indole-5-sulfonate potassium[35], potassium 2,3,3-trimethyl-1-(3-sulfonatopropyl)-3*H*-indol-1-ium-5-sulfonate **5**[94], **Cy5.0$_B$**[95], 4-(methyl(phenyl)amino)butanoic acid **9**[96] were prepared following a reported procedure.

General procedures

General procedure 1 for SPPS:

Solid-Phase Peptide Syntheses were performed by an ABI 433A peptide synthesizer using standard Fmoc/tBu chemistry and supported by Rink Amide MBHA resin on a 0.25 mmol scale (1 mmol/g loading).

Commercially available Fmoc-protected amino-acids from natural L series (1 mmol, 4 eq.); coupling reagent HBTU (4 eq.), lyophilized HOBt (4 eq.) and distilled DIPEA (12 eq.); piperidine (4 eq.) as Fmoc removal were used in peptide-grade DMF or NMP.

General procedure 2 for release of supported peptides from resin (concomitant removal of ester acid-protecting groups and carbamate amine-protecting groups):

The peptidyl resin was treated with a solution of TFA/TIPS/H_2O (95/2.5/2.5 v/v/v) for 3 hours. The resin was removed by filtration and washed with TFA. The combined filtrates were concentrated and precipitated in cold Et_2O. The crude solid was isolated by centrifugation and purified by semi-preparative RP-HPLC (system A). Selected fractions were lyophilised to give the TFA salt of targeted peptide.

General procedure 3 for removal of S^{t}Bu thiol-protecting group:

Protected cysteinyl peptide (1 eq.) was dissolved in ACN and a solution of DTT (14 eq.) in aqueous solution of $NaHCO_3$ (0.1 M) was added. The reaction mixture was stirred at RT for 1 hour.

Deprotection was monitored by RP-HPLC before purification by semi-preparative RP-HPLC (system A). Selected fractions were lyophilised to give the TFA salt of free thiol peptide and immediately engaged in the next chelation step to avoid peptide dimerization by disulfide bridge formation.

General procedure 4 for peptide labeling with Cy5.0 or BHQ3 via *in situ* formation of NHS ester:

The carboxylic acid derivative (1 eq.) was dissolved in NMP. After addition of TSTU (1.1 eq.) and DIPEA (5 eq.), the reaction mixture was stirred at RT for 2 hours.

Formation of NHS active ester intermediate was monitored by RP-HPLC.

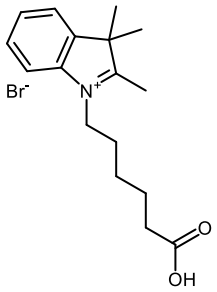
On completion, a solution of peptidyl amine derivative (1.2 eq.) in NMP was slowly dropped on the reaction mixture and stirred at RT overnight and protected from light. Formation of amide product was monitored by RP-HPLC before purification.

General procedure 5 for copper catalysed Huisgen cycloaddition:

CuI (1 eq.), TBTA (1 eq.), DIPEA (10 eq.) were dissolved in ACN. A solution of the alkyne derivative (1 eq.) in ACN was added and the reaction mixture was stirred at RT for 30 minutes.

A solution of the azide derivative (1 eq.) in ACN was added and the reaction mixture was stirred at RT overnight and protected from light. Formation of triazole product was monitored by RP-HPLC before purification by semi-preparative RP-HPLC (system A). Selected fractions were lyophilised to give the TFA salt of clicked product.

1-(5-carboxypentyl)-2,3,3-trimethyl-3*H*-indol-1-ium bromide **1**



1 was prepared from an adapted procedure[95]:

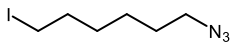
6-bromohexanoic acid (2 g, 10 mmol, 1 eq.) was added to a solution of distilled 2,3,3-trimethyl-3*H*-indole (1.6 g, 10 mmol, 1 eq.) in $MeNO_2$ (100 ml) and the resulting reaction mixture was stirred at 80 °C overnight.

The reaction mixture was then triturated with Et_2O and the precipitate was filtered, washed several times with Et_2O and dried in vacuo.

The precipitated pink powder (3.5 g, 10 mmol, quantitative yield) was used without further purification.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 8.09 – 7.93 (m, 1H), 7.93 – 7.79 (m, 1H), 7.70 – 7.54 (m, 2H), 4.46 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.85 (s, 3H), 2.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.85 (m, 2H), 1.54 (m, 8H), 1.50 – 1.35 (m, 2H).

1-azido-6-iodohexane **2**



2 was prepared from an adapted procedure[97]:

Sodium azide (1.63 g, 25 mmol, 1 eq.) was added to a solution of 1-bromo-6-chlorohexane (5 g, 25 mmol, 1 eq.) in DMF (100 ml) and the resulting reaction mixture was stirred at RT overnight. The reaction mixture was quenched by addition of water and extracted three times with Et_2O. The combined organic layers were washed twice with water, once with brine, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated.

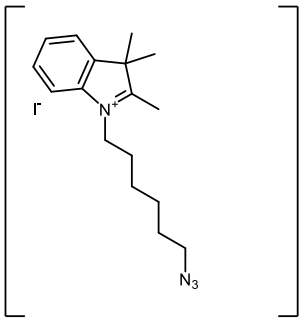
The crude residue was dissolved in acetone (100 ml) and sodium iodide (7.5 g, 50 mmol, 2 eq.) was added. The reaction mixture was stirred at reflux (56 °C) overnight. The reaction mixture was quenched by addition of water and extracted three times with Et_2O. The combined organic layers were washed twice with water, once with brine, dried over anhydrous $MgSO_4$, filtered and concentrated.

The oily crude product was purified by chromatography on silica gel using EtOAc/cyclohexane 10/90 to give **2** as a colourless oil (6 g, 25 mmol, quantitative yield over two steps).

^{1}H NMR (300 MHz, Chloroform-d) δ 3.27 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.19 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.90 – 1.77 (m, 2H), 1.68 – 1.56 (m, 2H), 1.48 – 1.36 (m, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-d) δ 51.3, 33.3, 30.0, 28.7, 25.7, 6.8.

1-(6-azidohexyl)-2,3,3-trimethyl-3*H*-indol-1-ium iodide **3**



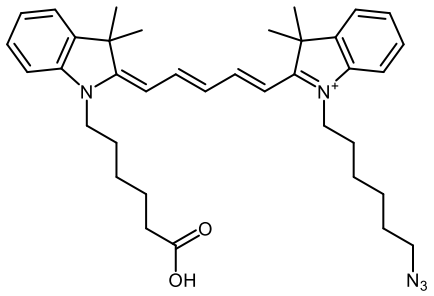
2 (318 mg, 1.26 mmol, 2 eq.) was added to a solution of distilled 2,3,3-trimethyl-3*H*-indole (100 mg, 0.63 mmol, 1 eq.) in dry ACN (1 ml) and the resulting reaction mixture was heated in a sealed tube at 150°C for 45 minutes under micro-waves irradiation.

Formation of indolium salt and consumption of TMI starting material were checked by ^{1}H NMR.

The reaction mixture was concentrated and immediately engaged in the Cy5.0 synthesis without further purification due to the poor stability of the product.

Micro-wave-assisted *N*-alkylation of aza-heterocycle using azide derivative is hazardous and explosions could take place during experiments. Indeed, large scale reactions must be avoided.

1-(6-azidohexyl)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(5-carboxypentyl)-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium **Cy5.0$_A$**



1 (476 mg, 1.3 mmol, 1 eq.) and malonaldehyde bis(phenylimine) monohydrochloride (418 mg, 1.6 mmol, 1.2 eq.) were dissolved in acetic anhydride (10 ml) and the resulting reaction mixture was heated at reflux (140 °C) for 2 hours.

Completion of the corresponding hemi-cyanine formation was monitored at λ_{abs} = 455 nm before concentration of the reaction mixture.

A solution of **3** (1.9 mmol, 1.4 eq.) in pyridine (12 ml) was slowly added to the concentrated crude hemi-cyanine and the reaction mixture was stirred at RT overnight and protected from light.

The reaction mixture turned from yellowish to intense blue and completion of cyanine formation was monitored by at λ_{abs} = 650 nm.

The reaction mixture was concentrated and the crude residue was dissolved in CH_2Cl_2 and precipitated in cyclohexane. The precipitate was decantated and separated from the supernatant.

The supernatant was concentrated, dissolved in CH_2Cl_2 and precipitated in cyclohexane several times.

The combined blue precipitates were dissolved in CH_2Cl_2 and successively washed with water and an aqueous HCl 0.1 M solution. The organic layer was dried over anhydrous $MgSO_4$, concentrated and purified by chromatography on silica gel using MeOH/CH_2Cl_2 (gradient from 0/100 to 20/80) affording **Cy5.0$_A$** as a blue solid (238 mg, 0.4 mmol, 31% yield).

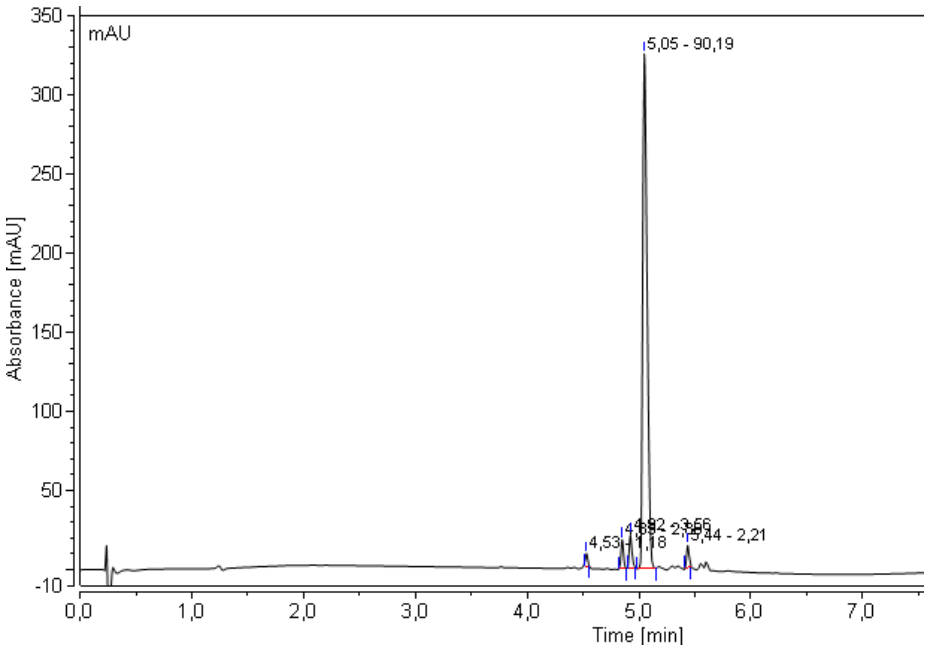
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$): δ = 8.34 (t, *J* = 13.0 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.38 (t, *J* = 9.0 Hz, 4H), 7.25 (dt, *J* = 8.0, 4.4 Hz, 2H), 6.59 (t, *J* = 12.3 Hz, 1H), 6.30 (dd, *J* = 13.8, 4.8 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H), 3.31 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H), 2.19 (m, 2H), 1.68 (s, 14H), 1.53 (m, 4H), 1.39 (m, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d$_6$): δ = 174.3, 172.6, 154.0, 142.0, 141.1, 128.4, 125.6, 124.7, 122.4, 111.1, 103.2, 50.5, 48.9, 43.3, 33.5, 28.1, 27.1, 26.8, 26.7, 25.8, 25.7, 25.6, 24.2.

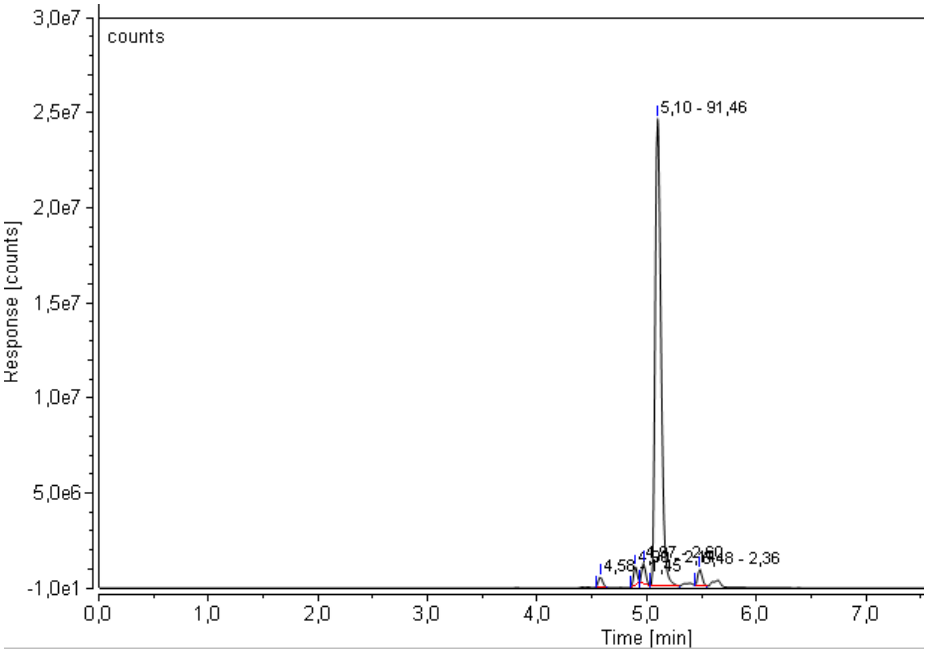
HRMS calculated for $C_{37}H_{48}N_5O_2$ $[M]^+$: 594.3808; found 594.3816

RP-HPLC (system C): t_r = 5 min (> 90% purity)

Absorption chromatogram of **Cy5.0$_A$** (λ_{abs} = 650 nm)

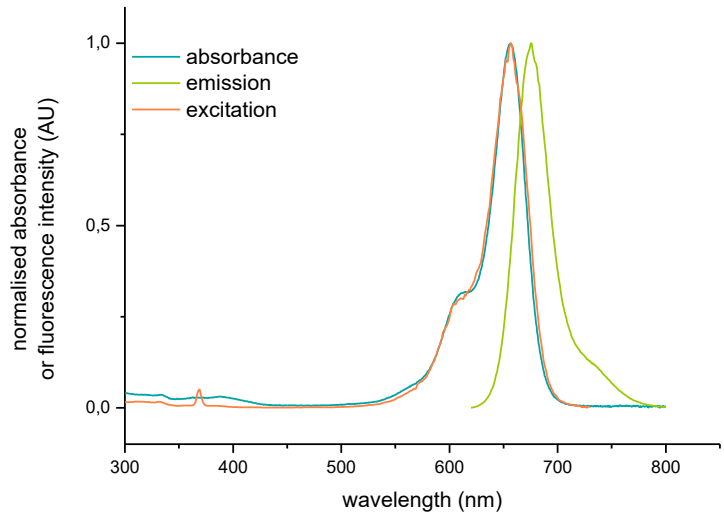


Emission chromatogram of **Cy5.0$_A$** (λ_{exc} = 610 nm and detected at λ_{em} = 665 nm)



Spectral properties:

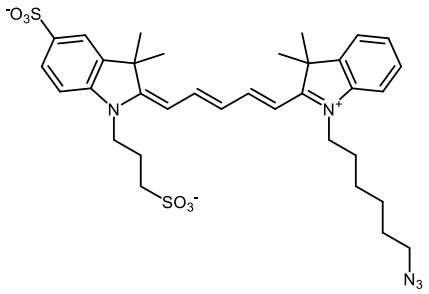
Normalized absorption, emission (λ_{exc} = 610 nm) and excitation (λ_{em} = 740 nm) spectra of **Cy5.0$_A$** in CH_2Cl_2 at 25 °C.



Compound	Solvent	λ_{MAX} Abs (nm)	λ_{MAX} Em (nm)	Stokes shift (nm)	Stokes shift (cm^{-1})	Φ_F[a]	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
Cy5.0$_A$	CH_2Cl_2	656	675	19	429	0.48	230 400	110 600

[a]using Nile Blue as standard (Φ_F = 0.27 in EtOH)[37]

(E)-2-((2E,4E)-5-(1-(6-azidohexyl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-2-yl)penta-2,4-dien-1-ylidene)-3,3-dimethyl-1-(3-sulfonatopropyl)indoline-5-sulfonate **Cy5.0$_C$**



5 (361 mg, 0.9 mmol, 1 eq.) and malonaldehyde bis(phenylimine) monohydrochloride (281 mg, 1.1 mmol, 1.2 eq.) were dissolved in acetic anhydride (10 ml) and the resulting reaction mixture was heated at reflux (140 °C) for 2 hours.

Completion of the corresponding hemicyanine formation was monitored at λ_{abs} = 455 nm before concentration of the reaction mixture.

A solution of **3** (1.3 mmol, 1.4 eq.) in dry pyridine (5 ml) was slowly added to the concentrated crude hemi-cyanine and the reaction mixture was stirred at RT overnight and protected from light.

The reaction mixture turned from yellowish to intense blue and completion of cyanine formation was monitored by at λ_{abs} = 650 nm.

The reaction mixture was concentrated and the crude residue was lyophilized and purified by semi-preparative RP-HPLC (system A). Selected fractions were lyophilised to give the TFA salt of sulfonated

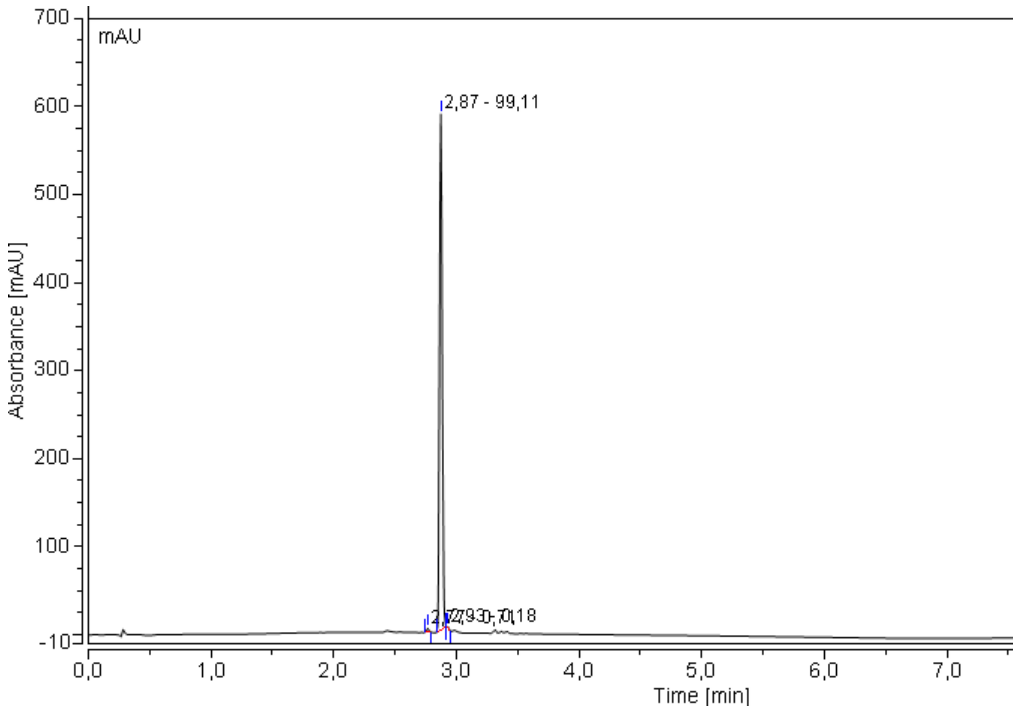
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$): δ 8.31 (t, *J* = 13.0 Hz, 2H), 7.84 (m, 2H), 7.67 (m, 2H), 7.61 (m, 1H), 7.39 (m, 2H), 6.61 (t, *J* = 13.0 Hz, 1H), 6.32 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H), 4.06 (m, 4H), 3.50 (under water peak, 2H), 2.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.72 (m, 14H), 1.55 (m, 6H), 1.33 (m, 2H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d$_6$): δ = 172.8, 158.2, 142.7, 141.7,141.3, 137.6, 136.2, 130.8, 128.2, 125.7 125.4, 124.4, 121.3, 113.6, 111.3, 104.2, 50.6, 50.2, 49.7, 32.6, 28.3, 27.5, 26.4, 25.9, 25.7, 23.4.

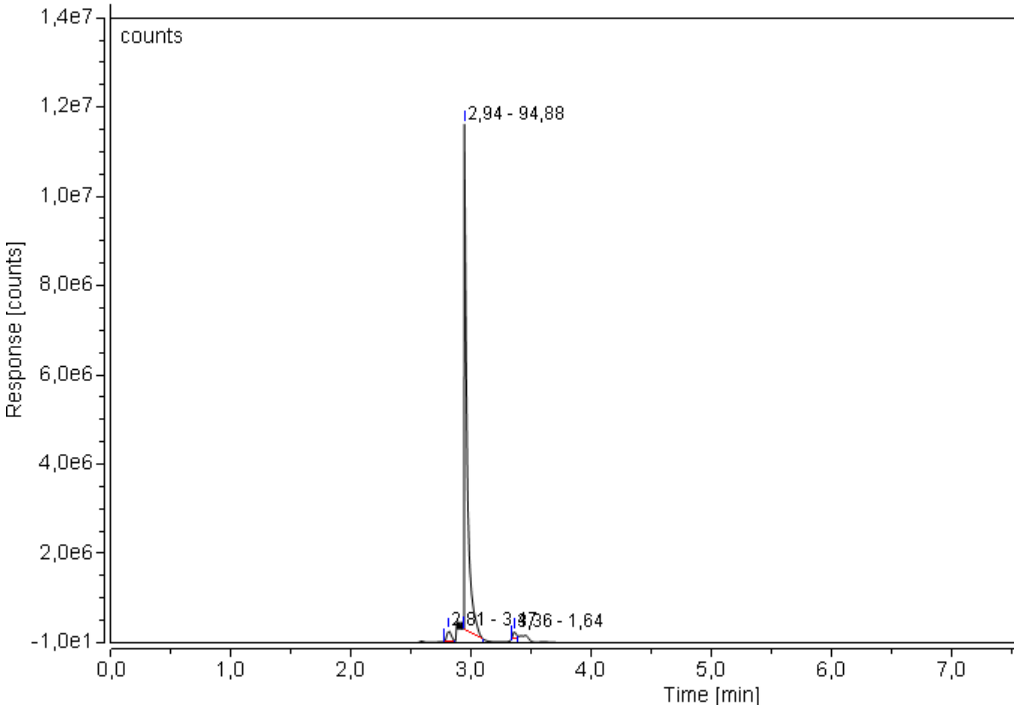
HRMS calculated for $C_{34}H_{42}N_5O_6S_2$ $[M]^-$: 680.2577; found 680.2576

RP-HPLC (system C): t_r = 2.9 min (> 99% purity)

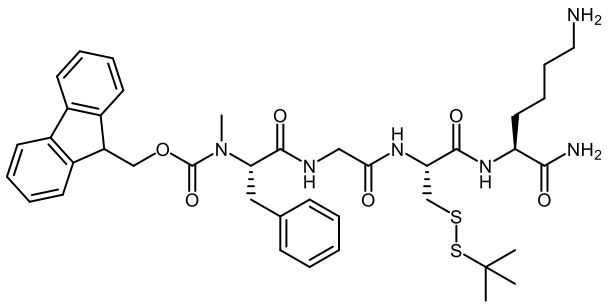
Absorption chromatogram of **Cy5.0$_C$** (λ_{abs} = 650 nm)



Emission chromatogram of **Cy5.0$_C$** (λ_{exc} = 610 nm and detected at λ_{em} = 665 nm)



Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$

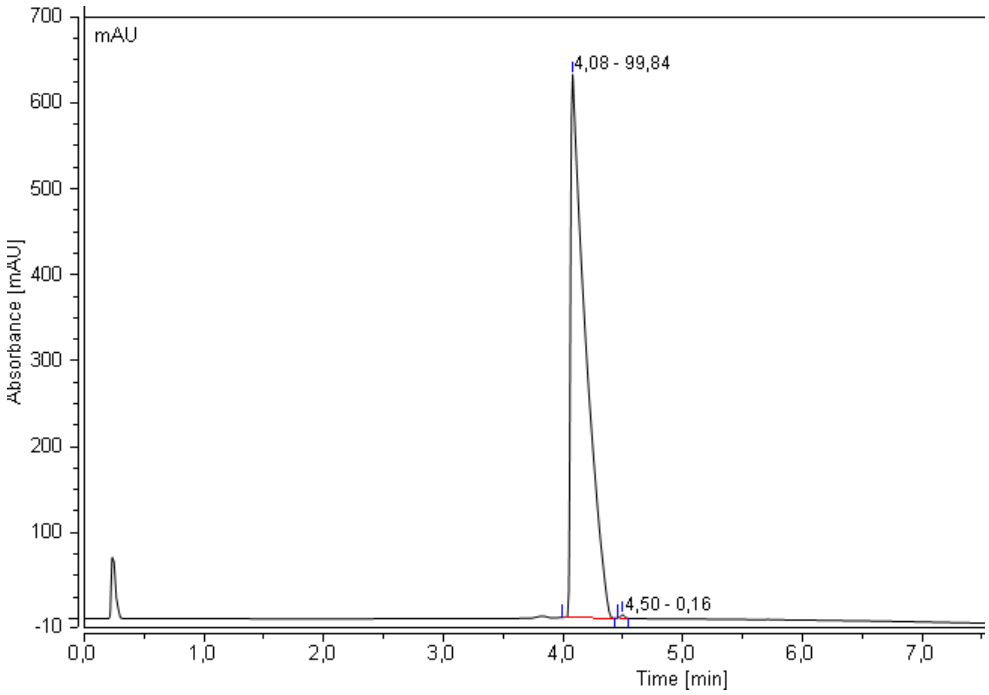


Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$ was prepared according to the general procedure 1 from Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Cys(S^{t}Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-*N*-Me-Phe-OH, followed by the general procedure 2 affording **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$** as a white solid (110 mg, 57% yield based on loading resin 1 mmol/g).

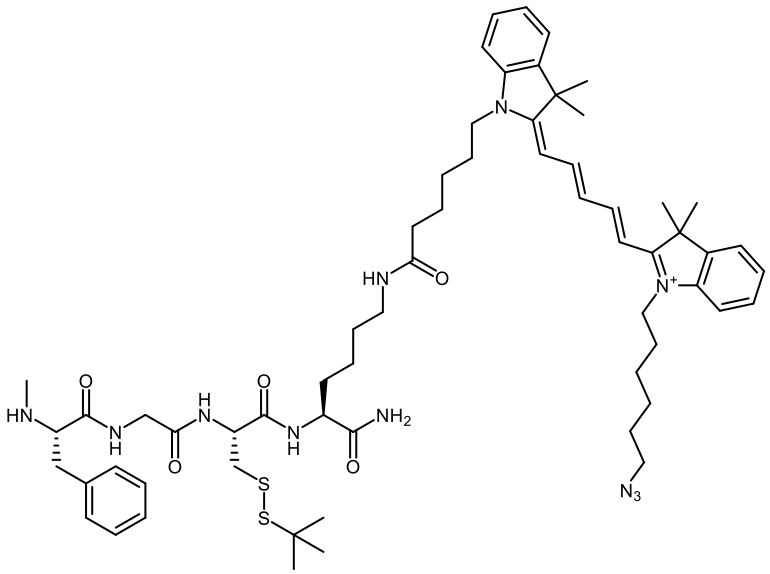
HRMS calculated for $C_{40}H_{52}N_6O_6S_2$ $[M+H]^+$: 777.3468; found 777.3472

RP-HPLC (system C): t_r = 4 min (> 99% purity)

Absorption chromatogram of **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$** (λ_{abs} = 254 nm)



H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$



H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$ was prepared according to the general procedure 4 from **Cy5.0$_A$** (19 mg, 32 µmol, 1 eq.), TSTU (11 mg, 35 µmol, 1.1 eq.), DIPEA (28 µl, 160 µmol, 5 eq.) in NMP (1 ml) and **Fmoc-(Me)FGC(S^{t}Bu)K-NH$_2$** (30 mg, 38 µmol, 1.2 eq.).

The coupling was monitored by RP-HPLC before purification by chromatography on silica gel using MeOH/DCM (gradient from 0/100 to 20/80).

The fluorescent Fmoc protected-tetrapeptide **7** was dissolved in DMF (1 ml). DBU (10 µl, 64 µmol, 2 eq.) and piperazine (5.5 mg, 64 µmol, 2 eq.) were added. The reaction mixture was stirred at RT for 5 minutes and Fmoc removal was monitored by RP-HPLC.

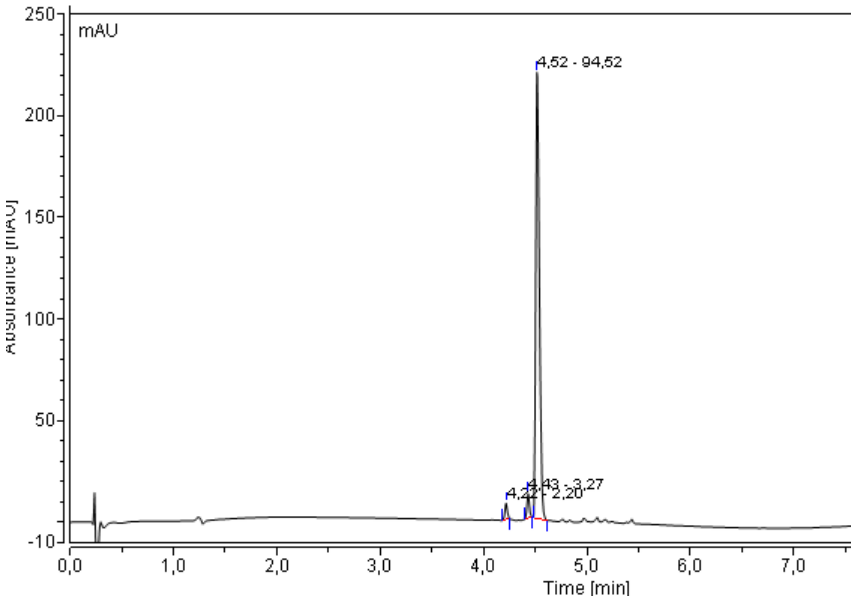
CH_2Cl_2 (5 ml) was added to the reaction mixture and washed three times with a saturated aqueous solution of NH_4Cl, three times with water, dried over anhydrous $MgSO_4$ and concentrated.

The crude product was purified by chromatography on silica gel using MeOH/ CH_2Cl_2 (gradient from 0/100 to 20/80) affording **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$** as blue solid (12 mg, 11 µmol, 34% yield over two steps).

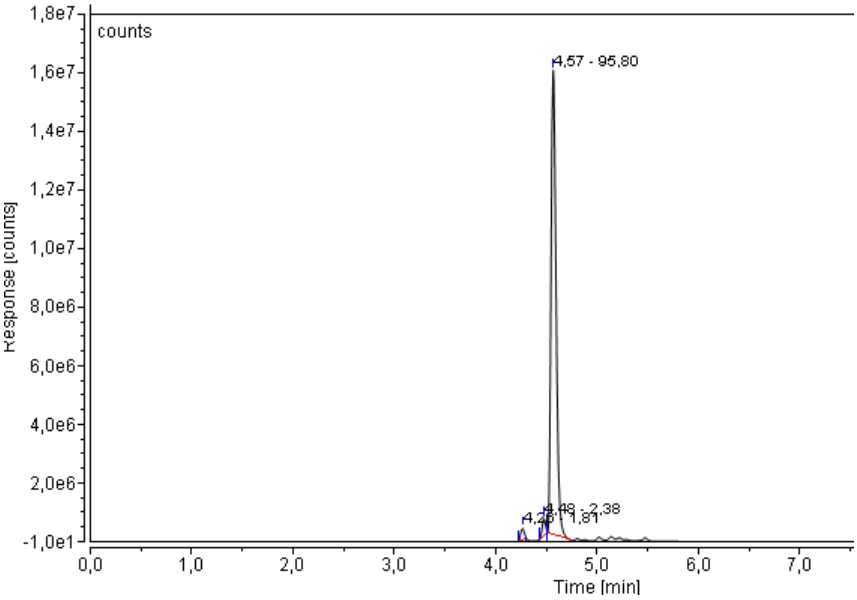
HRMS calculated for $C_{62}H_{88}N_{11}O_5S_2$ $[M]^+$: 1130.6411; found 1130.6427

RP-HPLC (system C): t_r = 4.5 min (95% purity)

Absorption chromatogram of **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$** (λ_{abs} = 650 nm)

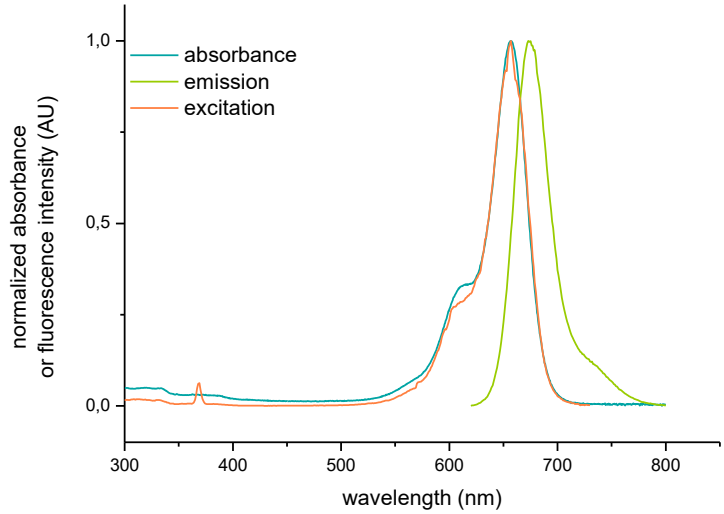


Emission chromatogram of **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$** (λ_{exc} = 610 nm and detected at λ_{em} = 665 nm)



Spectral properties:

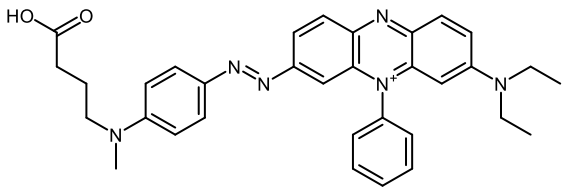
Normalized absorption, emission (λ_{exc} = 610 nm) and excitation (λ_{em} = 740 nm) spectra of **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$** in CH_2Cl_2 at 25 °C.



Compound	Solvent	λ_{MAX} Abs (nm)	λ_{MAX} Em (nm)	Stokes shift (nm)	Stokes shift (cm^{-1})	Φ_F[a]	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$	CH_2Cl_2	657	673	16	362	0.44	194 800	85 800

[a]using Nile Blue as standard (Φ_F = 0.27 in EtOH)[37]

(E)-3-((4-((3-carboxypropyl)(methyl)amino)phenyl)diazenyl)-7-(diethylamino)-5-phenylphenazin-5-ium
BHQ3$_A$



BHQ3$_A$ was prepared from an adapted procedure[68]:

Methylene Violet 3RAX (150 mg, 0.4 mmol, 1 eq.) was dissolved in dry ACN (5 ml) and the solution was stirred until complete solubilisation and cooling down to 0 °C.

Then, $NOBF_4$ (51 mg, 0.44 mmol, 1.1 eq.) was added and the reaction mixture was stirred at 0 °C during 1 h.

A solution of functionalized tertiary aniline **9** (92 mg, 0.48 mmol, 1.2 eq.) in dry ACN (2 ml) was slowly added and the reaction mixture was stirred at 0 °C overnight and protected from light.

Completion of the quencher formation was monitored at λ_{abs} = 650 nm before purification by chromatography on silica gel using methanol in DCM and 1% triethylamine as eluent (gradient of 0% to 20%) and semi-preparative RP-HPLC (system B) affording **BHQ3$_A$** as a blue solid (109 mg, 0.2 mmol, 50% yield).

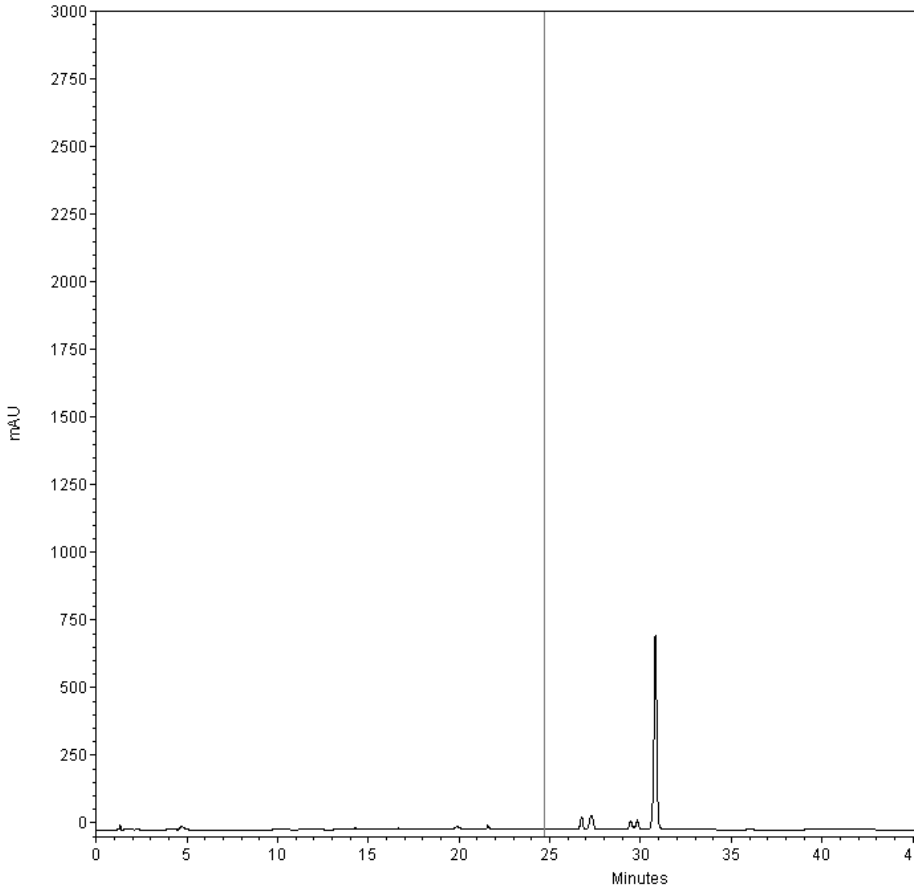
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d$_6$) δ 12.16 (s, 1H), 8.34 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.16 – 8.06 (m, 2H), 7.99 – 7.89 (m, 4H), 7.75 (dd, *J* = 6.5, 3.0 Hz, 2H), 7.69 (m, 3H), 7.15 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H), 3.55 – 3.42 (m, 2H), 3.34 (m, 4H), 3.06 (s, 3H), 2.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.84 – 1.71 (m, 2H), 1.28 (m, 6H).

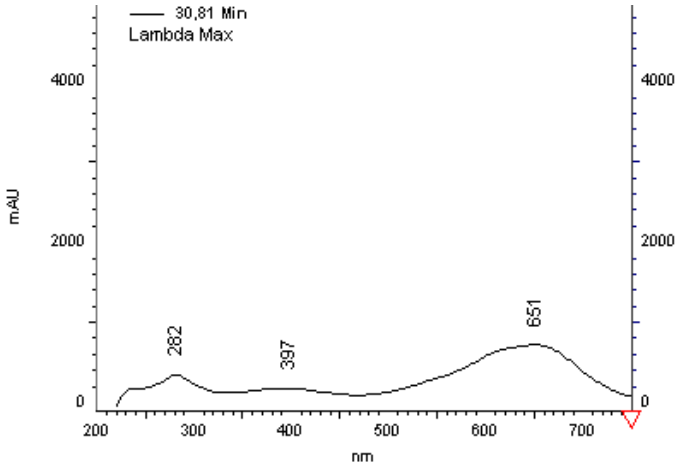
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d$_6$) δ 174.1, 167.0, 155.6, 154.6, 153.1, 143.75, 142.8, 138.8, 137.6, 135.6, 134.1, 133.6, 131.5, 128.6, 128.6, 127.6, 127.6, 119.8, 111.7, 110.7, 91.4, 67.4, 51.0, 46.4, 30.6, 29.7, 28.3, 23.2, 22.3, 21.9, 13.8, 10.

HRMS calculated for $C_{33}H_{35}N_6O_2$ $[M]^+$: 547.2821; found 547.2831

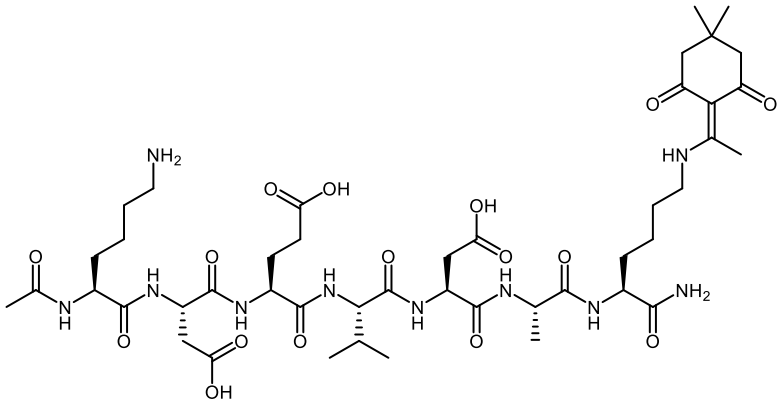
RP-HPLC (system B): t_r = 30.8 min (> 95% purity)

Absorption chromatogram of **BHQ3$_A$** (max plot mode) and corresponding absorption spectrum





Ac-KDEVDAK(Dde)-NH_2



Ac-KDEVDAK(Dde)-NH_2 was prepared according to the general procedure 1 from Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(O^{t}Bu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(O^{t}Bu)-OH, Fmoc-Asp(O^{t}Bu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, followed by the *N*-terminal acetylation using Ac_2O (236 µl, 2.5 mmol, 10 eq.), DIPEA (436 µl, 2.5 mmol, 10 eq.), DMAP (3.1 mg, 0.025 µmol, 0.1 eq.) in NMP (5 ml) for 2 hours.

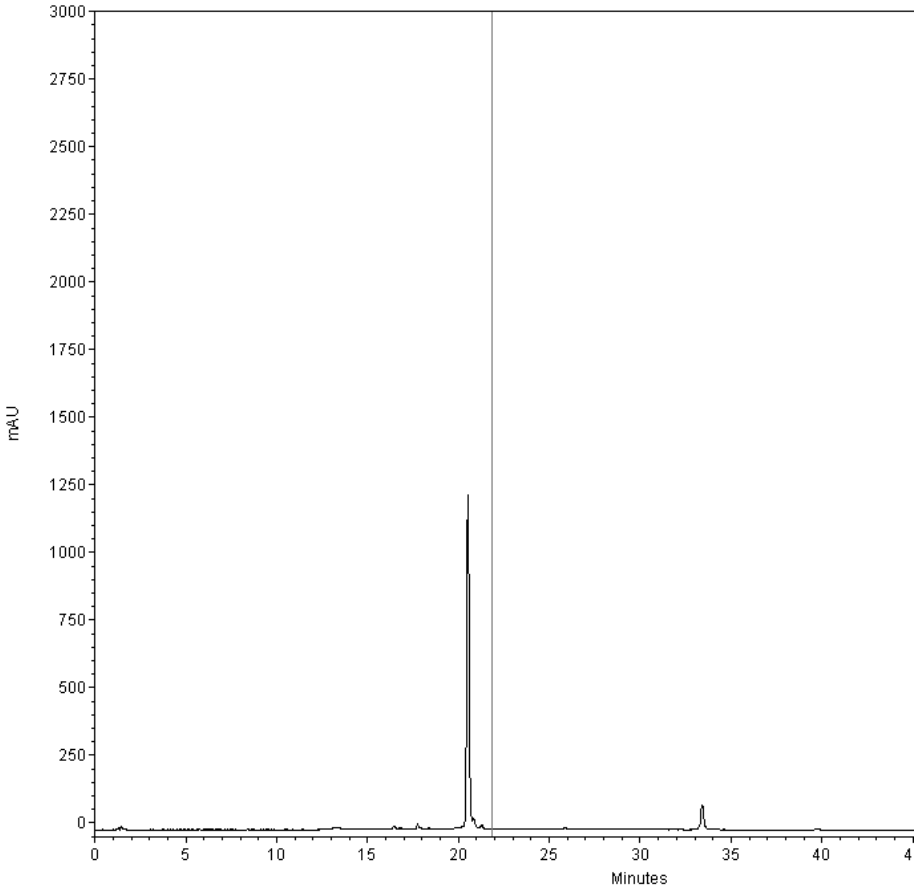
This supported step was monitored by the Kaiser ninhydrin test (negative after this treatment) and the resin was washed with NMP.

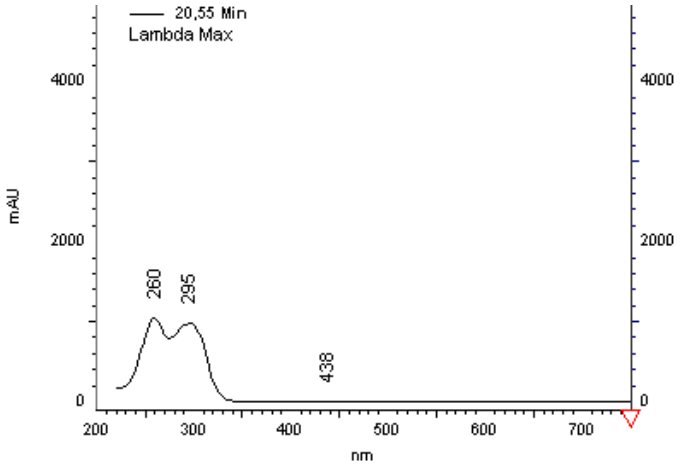
Finally, the general procedure 2 afforded **Ac-KDEVDAK(Dde)-NH_2** as a white solid (123 mg, 49% yield based on loading resin 1 mmol/g).

HRMS calculated for $C_{45}H_{72}N_{10}O_{16}$ $[M]^+$: 1008.5126; found 1008.5142

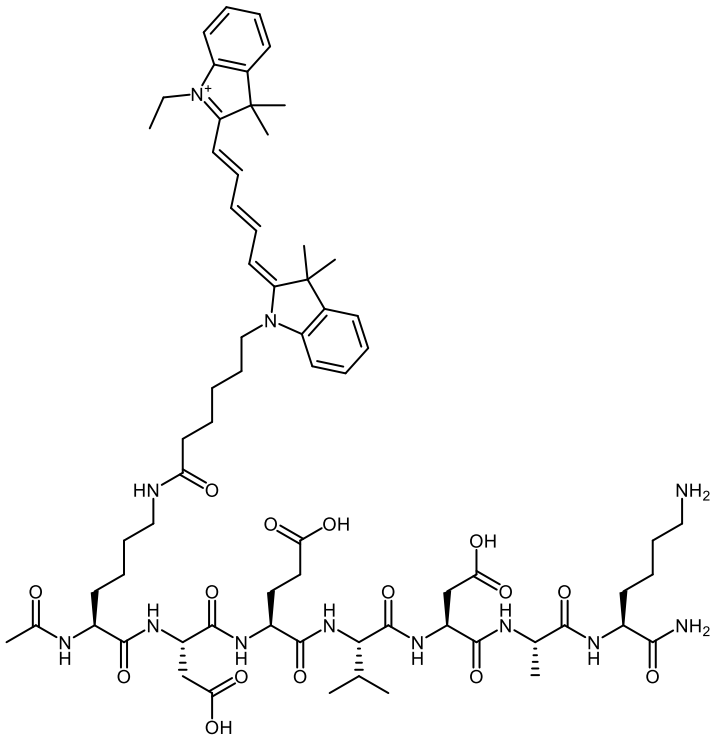
RP-HPLC (system B): t_r = 20.6 min (> 98% purity)

Absorption chromatogram of **Ac-KDEVDAK(Dde)-NH_2** (max plot mode) and corresponding absorption spectrum





Ac-K(Cy5.0$_B$)DEVDAK(Dde)-NH$_2$



Ac-K(Cy5.0$_B$)DEVDAK(Dde)-NH$_2$ was prepared according to the general procedure 4 from **Cy5.0$_B$** (4.1 mg, 8.2 µmol, 1 eq.), TSTU (2.7 mg, 9.1 µmol, 1.1 eq.), DIPEA (7.2 µl, 41.2 µmol, 5 eq.) in NMP (1 ml) and **Ac-KDEVDAK(Dde)-NH$_2$** (10 mg, 9.9 µmol, 1.2 eq.).

The coupling was monitored by RP-HPLC and **12** was precipitated in cold Et_2O. The crude solid was isolated by centrifugation and dissolved in DMF (500 µl).

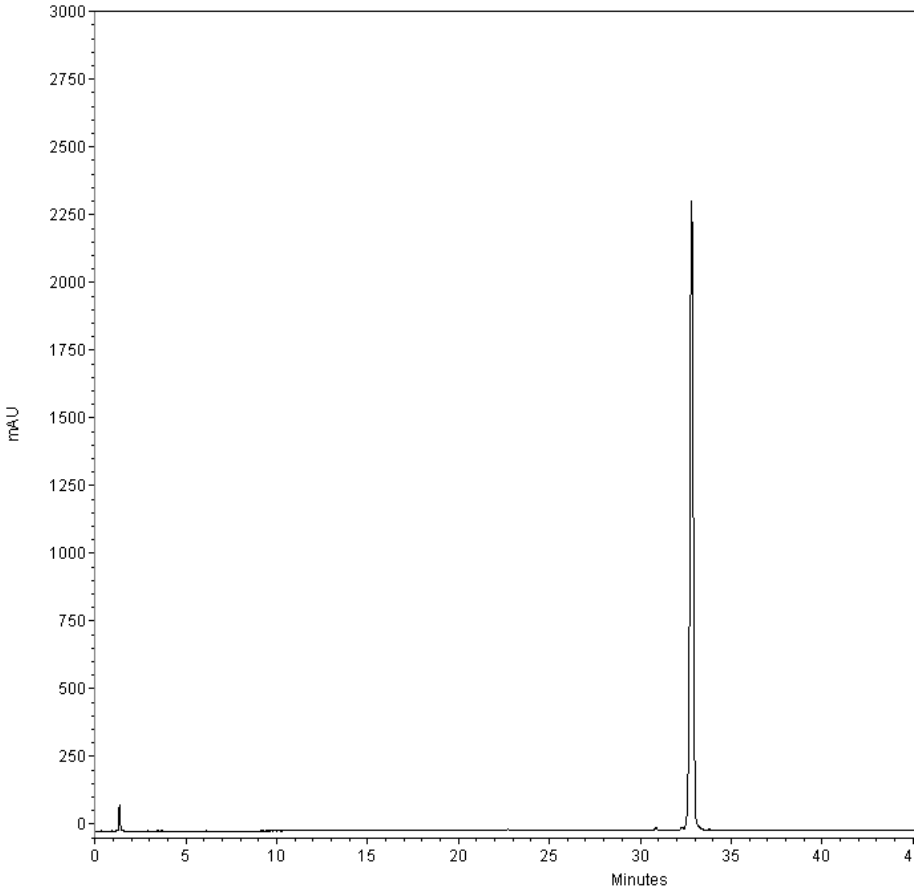
Hydroxylamine hydrochloride (2.9 mg, 41.2 µmol, 5 eq.) and imidazole (2.8 mg, 41.2 µmol, 5 eq.) were added. The reaction mixture was stirred at RT for 3 hours and Dde removal was monitored by RP-HPLC.

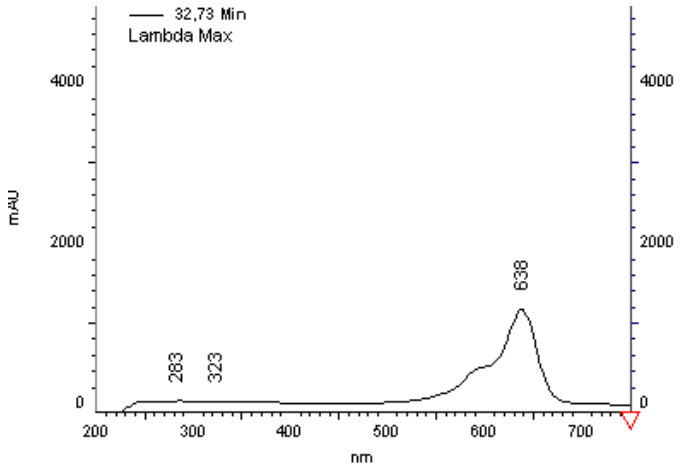
The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC (system A). Selected fractions were lyophilised to give the TFA salt of targeted peptide affording **Ac-K(Cy5.0$_B$)DEVDAK(Dde)-NH$_2$** as blue solid (5.2 mg, 3.9 µmol, 48% yield over two steps).

HRMS calculated for $C_{68}H_{99}N_{12}O_{15}$ $[M]^+$: 1323.7347; found 1323.7364

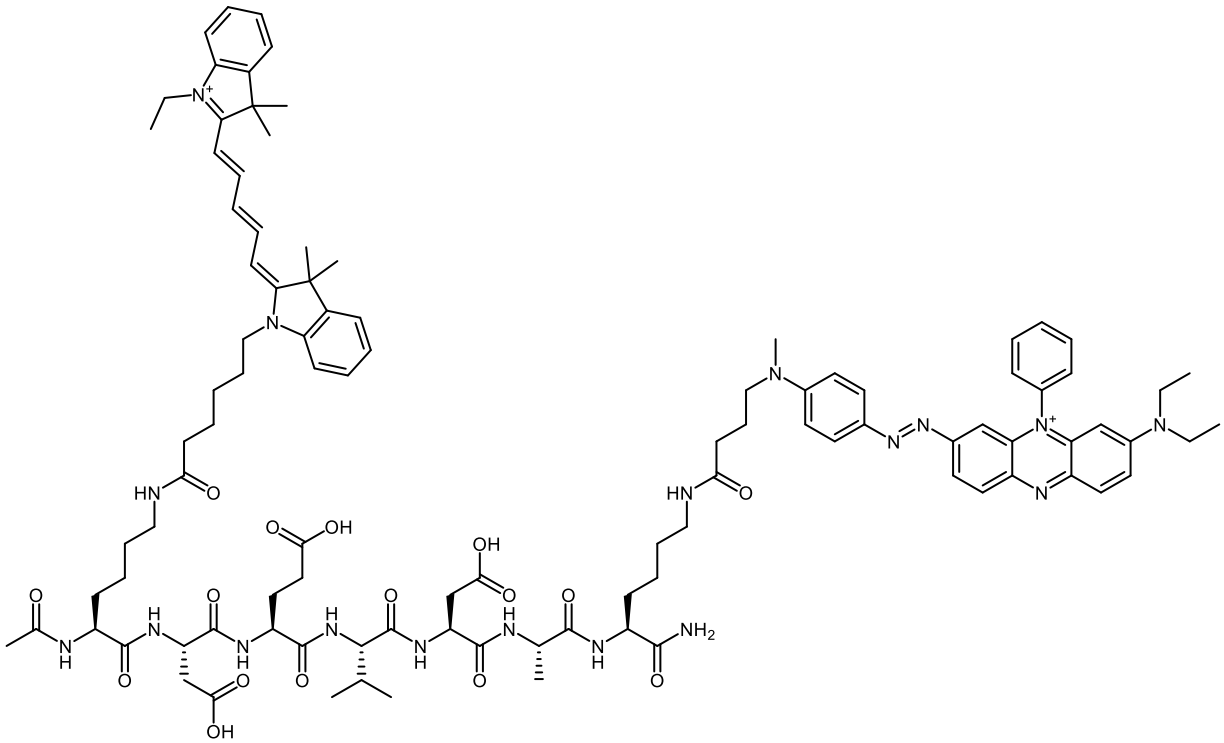
RP-HPLC (system B): t_r = 32.7 min (> 99% purity)

Absorption chromatogram of **Ac-K(Cy5.0$_B$)DEVDAK(Dde)-NH$_2$** (max plot mode) and corresponding absorption spectrum





Ac-K(Cy5.0$_B$)DEVDAK(BHQ3$_A$)-NH$_2$ **P1**



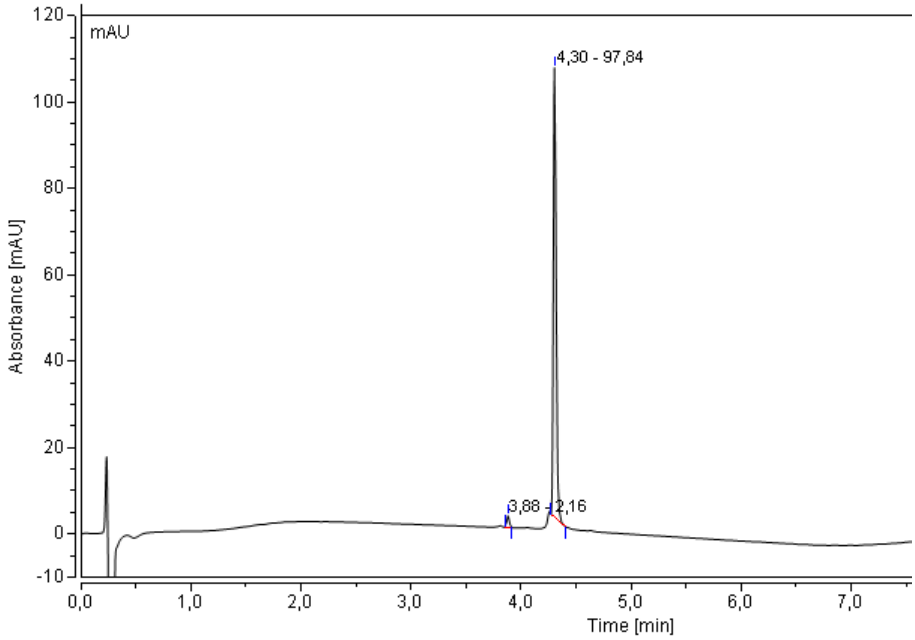
P1 was prepared according to the general procedure 4 from **BHQ3$_A$** (1.7 mg, 3.1 µmol, 1 eq.), TSTU (1 mg, 3.4 µmol, 1.1 eq.), DIPEA (2.7 µl, 15.5 µmol, 5 eq.) in NMP (150 µl) and **Ac-K(Cy5.0$_B$)DEVDAK(Dde)-NH$_2$** (5 mg, 3.8 µmol, 1.2 eq.).

The coupling was monitored by RP-HPLC before purification by semi-preparative RP-HPLC (system A). Selected fractions were lyophilised to give the TFA salt of targeted peptide affording **P1** as blue solid (1.5 mg, 0.8 µmol, 26% yield).

HRMS calculated for $C_{101}H_{129}Na_3N_{18}O_{16}$ $[MNa_3]^{2+}$: 959.4753; found 959.4764

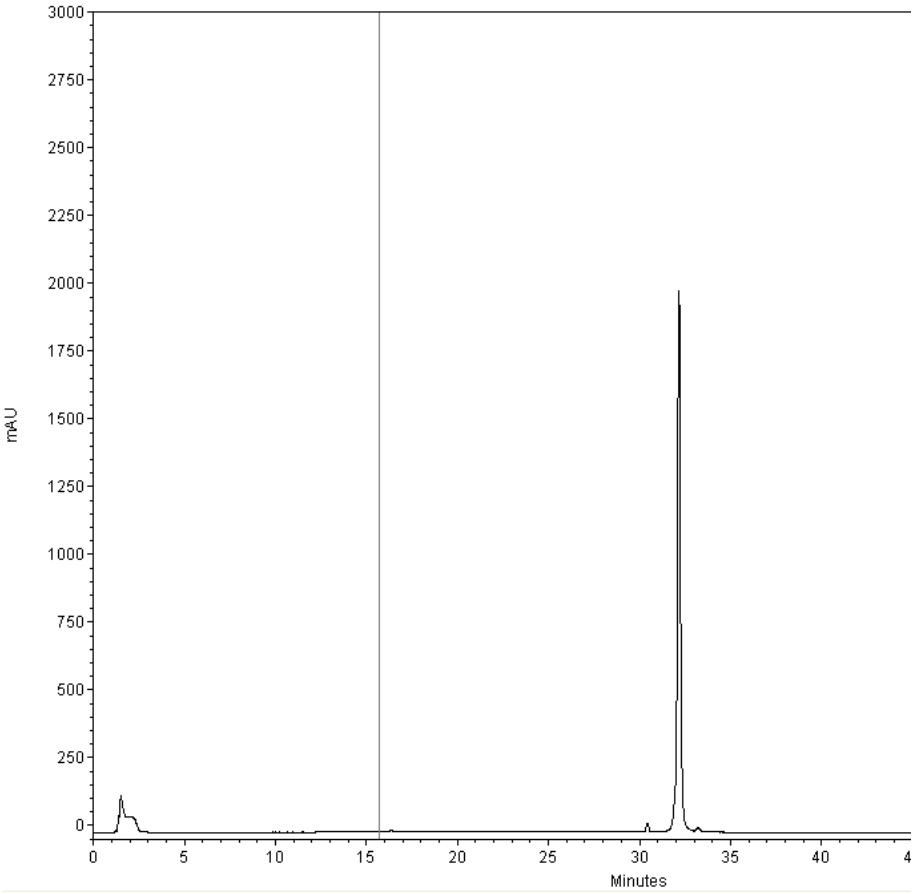
RP-HPLC (system C): t_r = 4.3 min (97% purity)

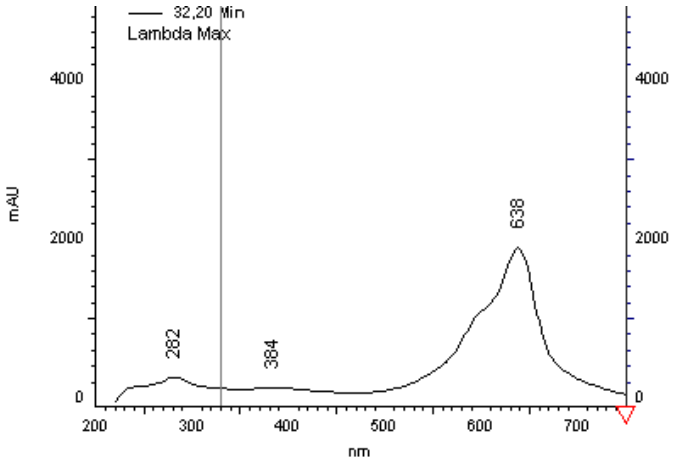
Absorption chromatogram of **P1** (λ_{abs} = 650 nm)



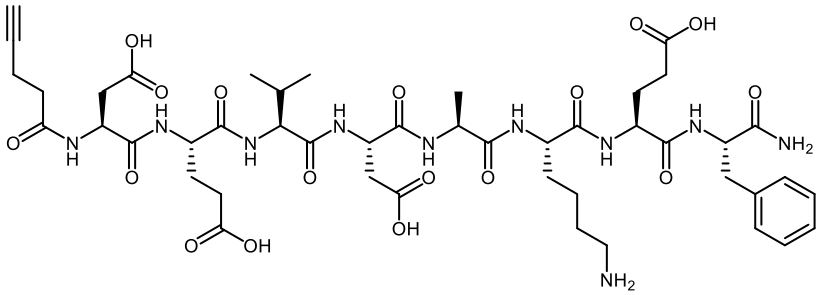
RP-HPLC (system B): t_r = 32.2 min (> 99% purity)

Absorption chromatogram of **P1** (max plot mode) and corresponding absorption spectrum





Pentynoyl-DEVDAKEF-NH_2 **20**



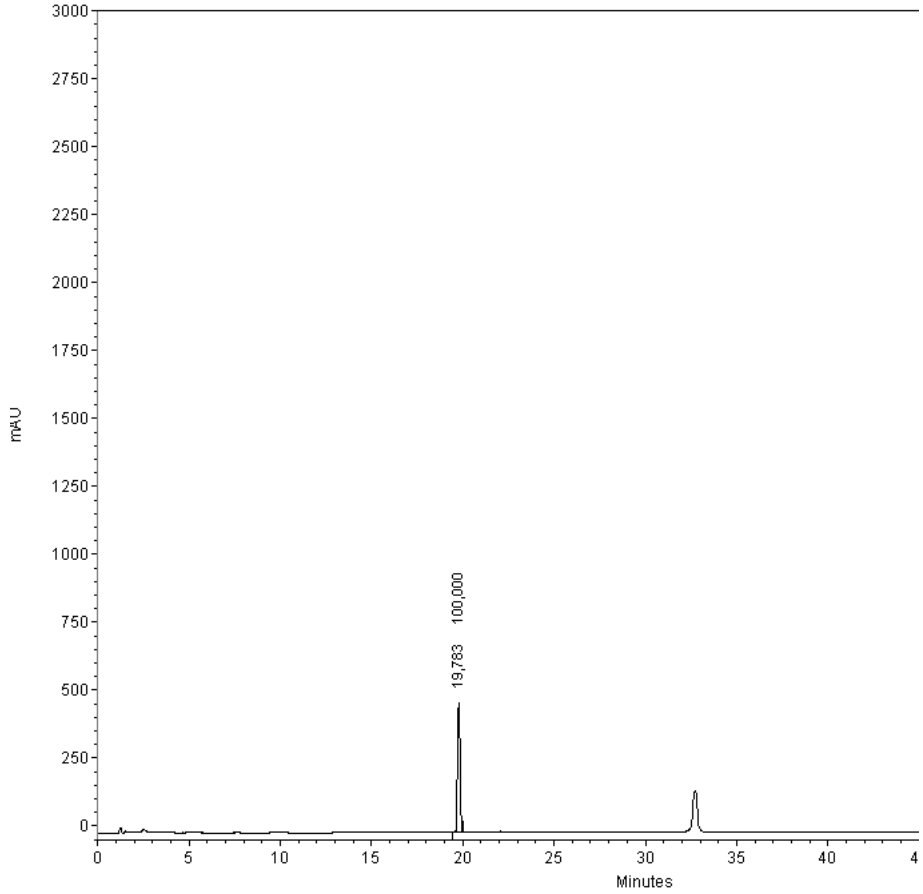
20 was prepared according to the general procedure 1 from Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(ODmab)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Asp(O^{t}Bu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Glu(O^{t}Bu)-OH, Fmoc-Asp(O^{t}Bu)-OH and 4-pentynoic acid.

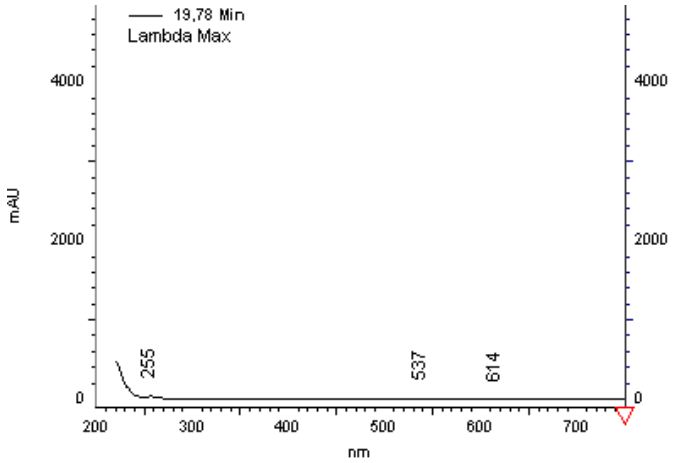
Dmab removal was carried out under basic conditions, followed by the general procedure 2 affording **20** as a white solid.

HRMS calculated for $C_{46}H_{67}N_{10}O_{17}$ $[M+H]^+$: 1031.4686; found 1031.4696

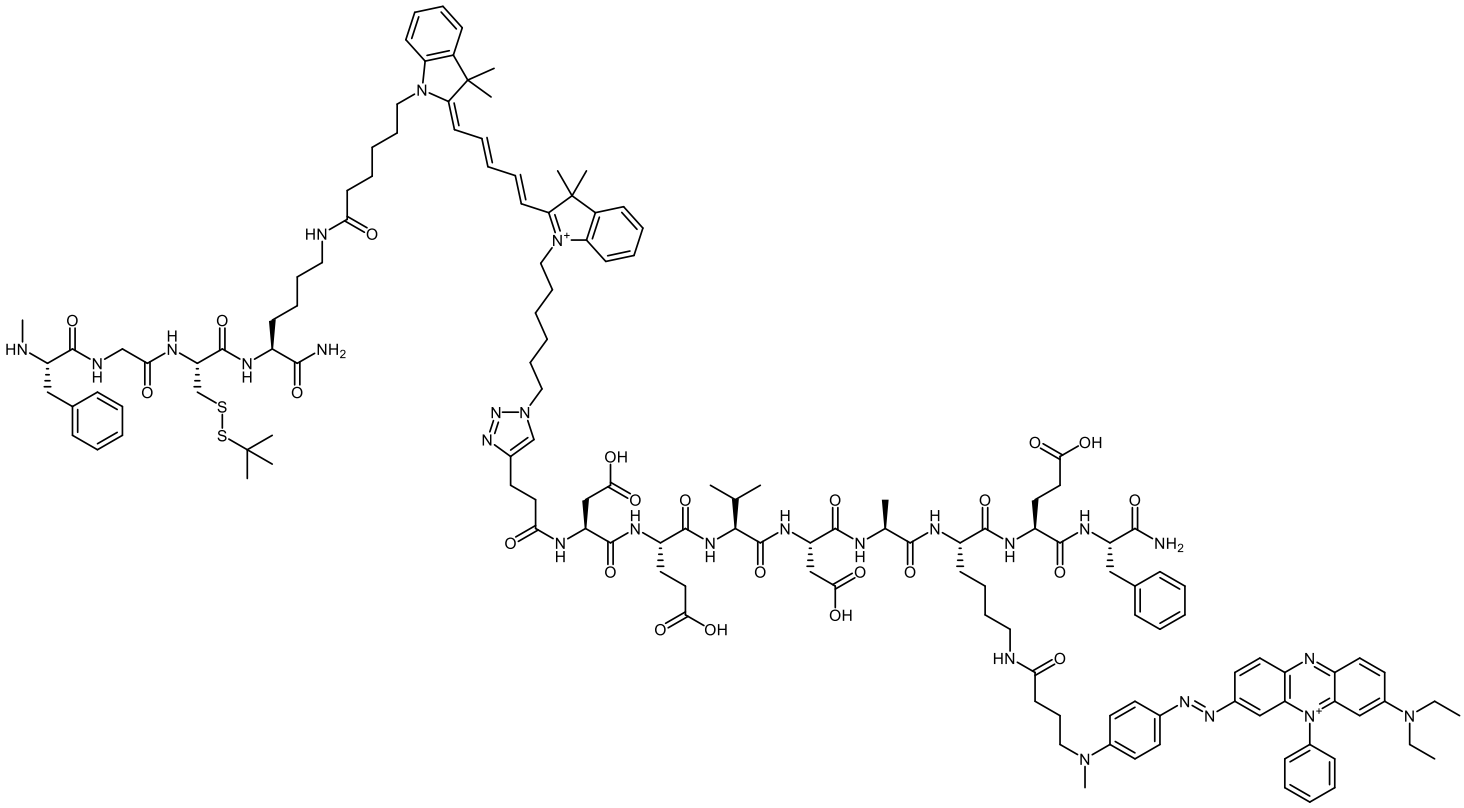
RP-HPLC (system B): t_r = 19.8 min (> 99% purity)

Absorption chromatogram of **20** (max plot mode) and corresponding absorption spectrum





H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$-21)-NH$_2$ **22**



21 was prepared according to the general procedure 4 from **BHQ3$_A$** (9.3 mg, 17 µmol, 1 eq.), TSTU (5.6 mg, 18.7 µmol, 1.1 eq.), DIPEA (15 µl, 85 µmol, 5 eq.) in NMP (150 µl) and **20** (21 mg, 20.4 µmol, 1.2 eq.).

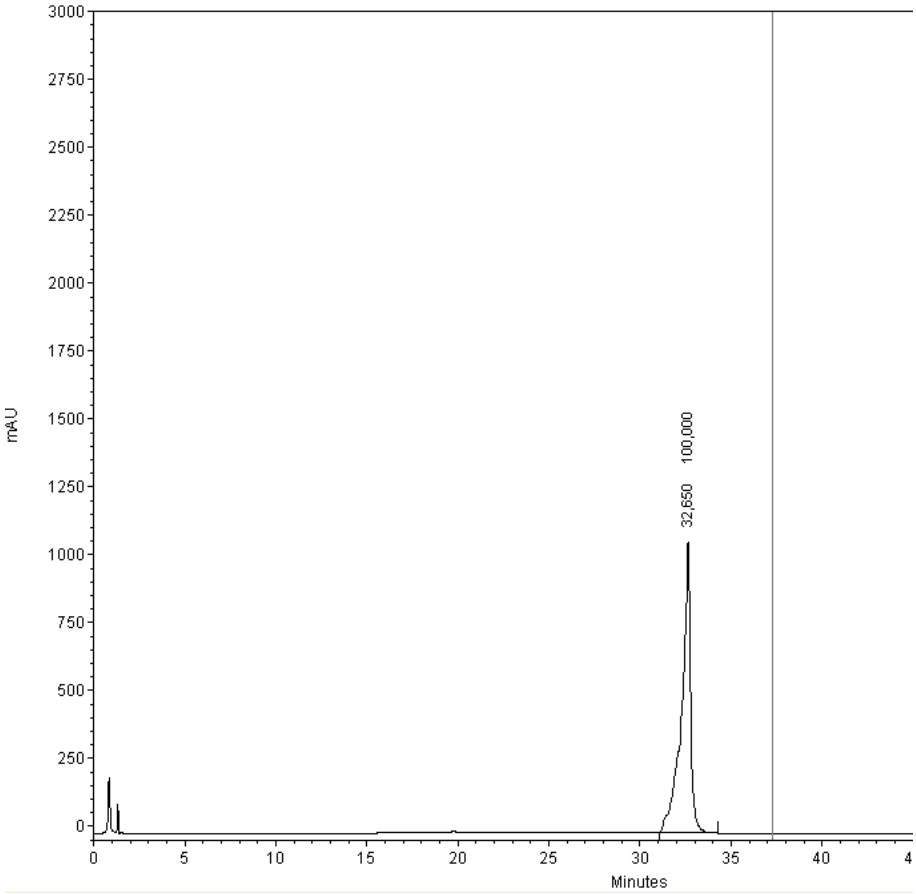
The coupling was monitored by RP-HPLC before purification by semi-preparative RP-HPLC (system A). Selected fractions were lyophilised to give the TFA salt of targeted peptide affording **21** as blue solid.

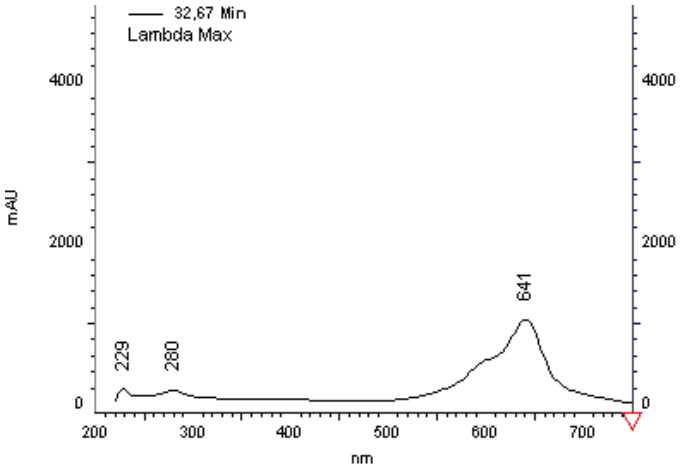
Then, **22** was prepared according to the general procedure 5 from CuI (3.2 mg, 17 µmol, 1 eq.), TBTA (9 mg, 29 µmol, 1 eq.), DIPEA (30 µl, 170 µmol, 10 eq.), **21** (17 µmol, 1 eq.) and **H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$)-NH$_2$** (20 mg, 17 µmol, 1 eq.) in dry ACN (2 ml) affording **22** as a blue solid (4.9 mg, 1.2 µmol, 11% yield over two steps).

HRMS calculated for $C_{141}H_{187}N_{27}O_{23}S_2$ $[M+H]^{3+}$: 894.0913; found 894.1052

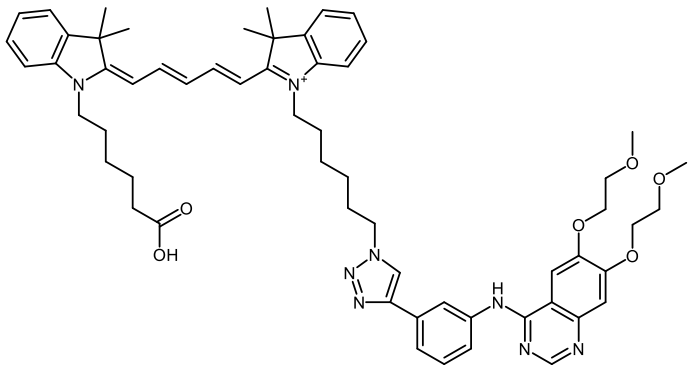
RP-HPLC (system B): t_r = 32.7 min (> 99% purity)

Absorption chromatogram of **22** (max plot mode) and corresponding absorption spectrum





2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-(4-(3-((6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-yl)amino)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-1-(3-sulfonatopropyl)-3H-indol-1-ium-5-sulfonate **24**

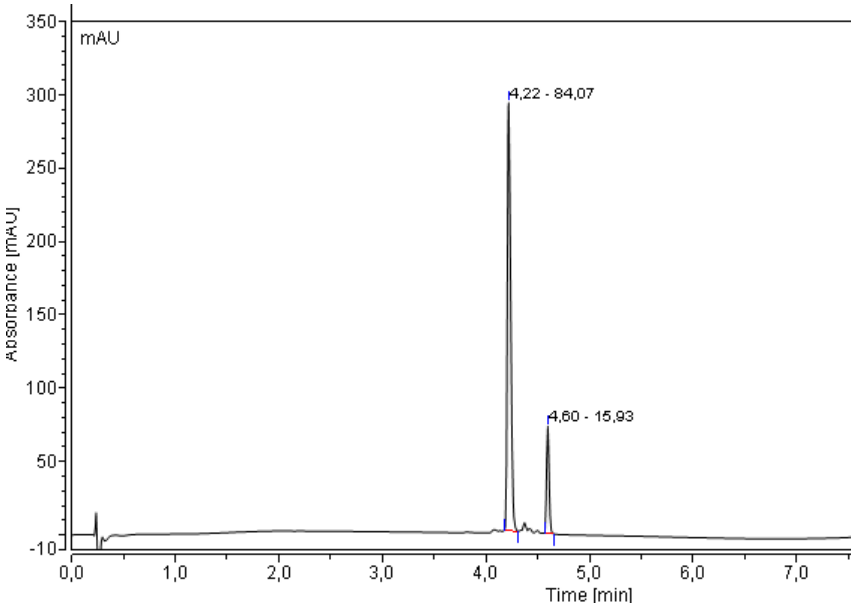


24 was prepared according to the general procedure 5 from CuI (5.5 mg, 29 µmol, 1 eq.), TBTA (15 mg, 29 µmol, 1 eq.), DIPEA (50 µl, 290 µmol, 10 eq.), erlotinib (11 mg, 29 µmol, 1 eq.) and **Cy5.0$_A$** (17 mg, 29 µmol, 1 eq.) in dry ACN (2 ml) affording **24** as a blue solid (7.5 mg, 7.6 µmol, 26% yield).

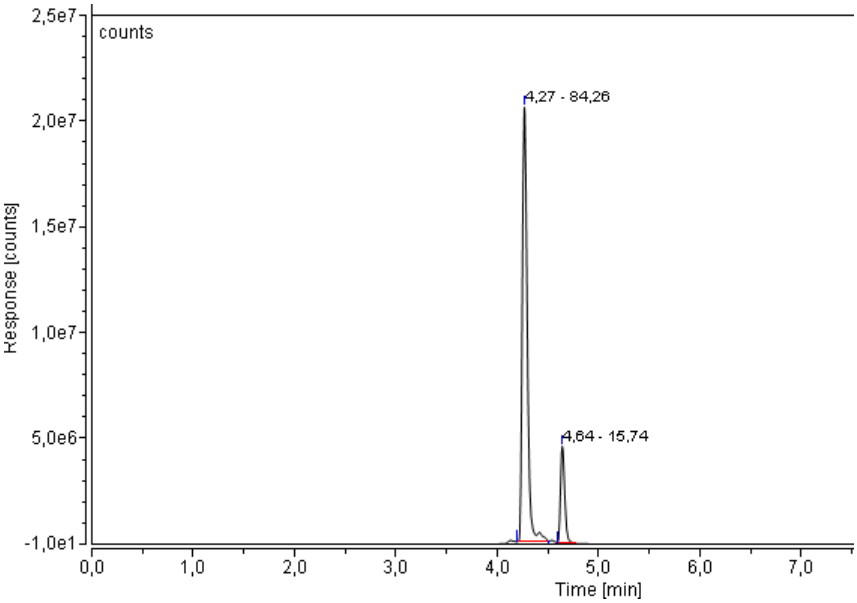
HRMS calculated for $C_{59}H_{71}N_8O_6$ $[M]^+$: 987.5497; found 987.5506

RP-HPLC (system C): t_r = 4.2 min (84% purity)

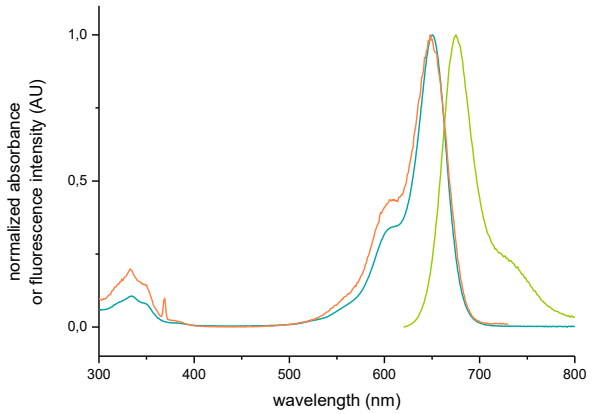
Absorption chromatogram of **24** (λ_{abs} = 650 nm)



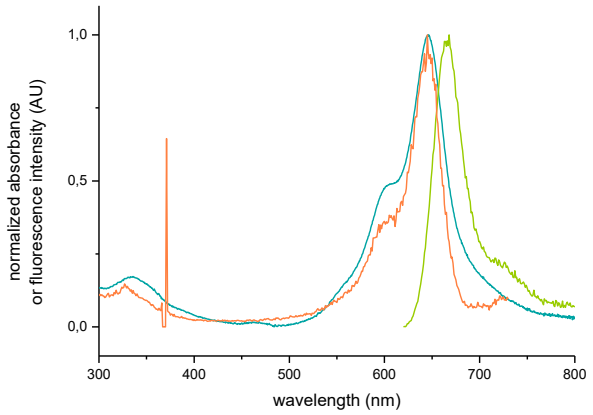
Emission chromatogram of **24** (λ_{exc} = 610 nm and detected at λ_{em} = 665 nm)



Spectral properties:



Normalized absorption — , emission — (λ_{exc} = 610 nm) and excitation — (λ_{em} = 740 nm) spectra of **24** in DMSO at 25 °C.

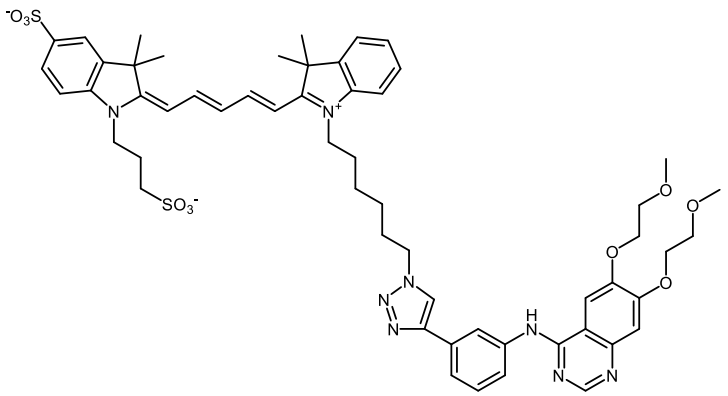


Normalized absorption — , emission — (λ_{exc} = 610 nm) and excitation — (λ_{em} = 740 nm) spectra of **24** in PBS at 25 °C.

Compound	Solvant	λ_{MAX} Abs (nm)	λ_{MAX} Em (nm)	Stokes shift (nm)	Stokes shift (cm^{-1})	Φ_F[a]	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
24	DMSO	651	675	24	546	0.59	110 000	65 000
	PBS	645	668	23	534	0.17	43 000	7 300

[a]using Nile Blue as standard (Φ_F = 0.27 in EtOH)[37]

2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-(4-(3-((6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-yl)amino)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)-3,3-dimethylindolin-2-ylidene)penta-1,3-dien-1-yl)-1-(5-carboxypentyl)-3,3-dimethyl-3*H*-indol-1-ium **25**

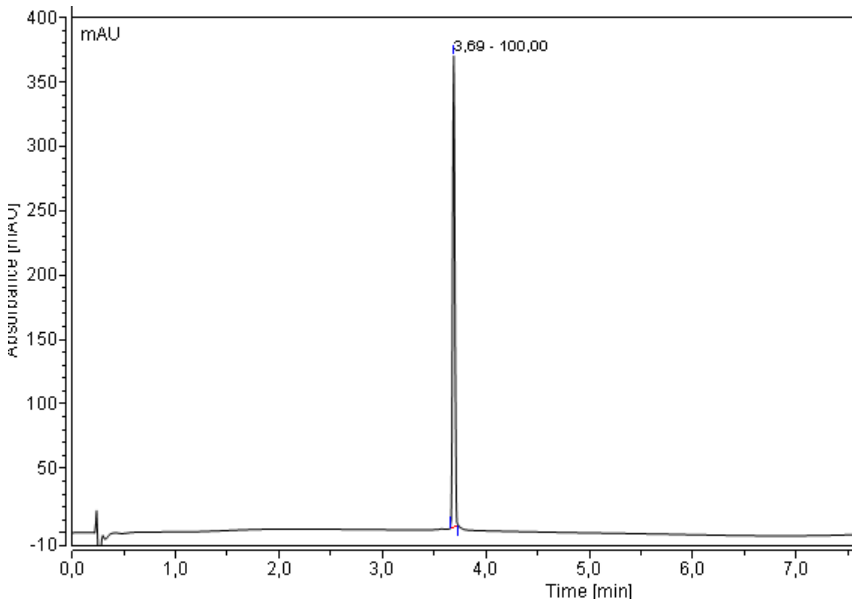


25 was prepared according to the general procedure 5 from CuI (3.6 mg, 19 µmol, 1 eq.), TBTA (10 mg, 19 µmol, 1 eq.), DIPEA (33 µl, 190 µmol, 10 eq.), erlotinib (7.5 mg, 19 µmol, 1 eq.) and **Cy5.0$_C$** (13 mg, 19 µmol, 1 eq.) in dry ACN (10 ml) affording **25** as a blue solid (8.1 mg, 7.5 µmol, 40%).

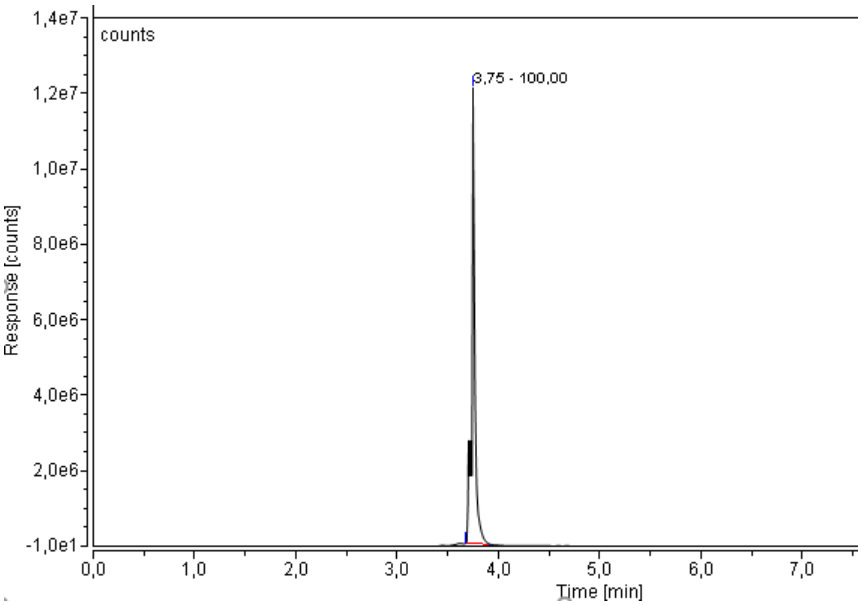
HRMS calculated for $C_{56}H_{65}N_8O_{10}S_2$ $[M+2H]^+$: 1075.4422 ; found 1075.4463

RP-HPLC (system C): t_r = 3.7 min (100% purity)

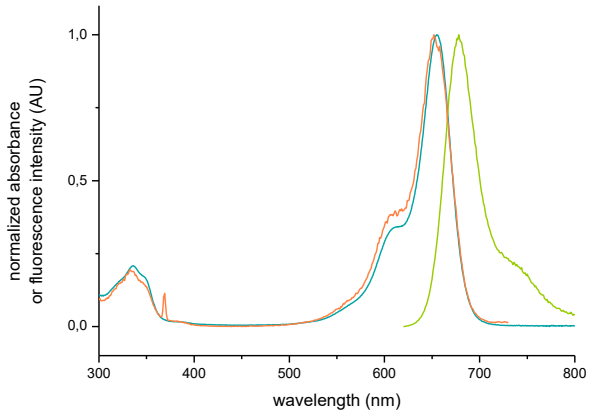
Absorption chromatogram of **25** (λ_{abs} = 650 nm)



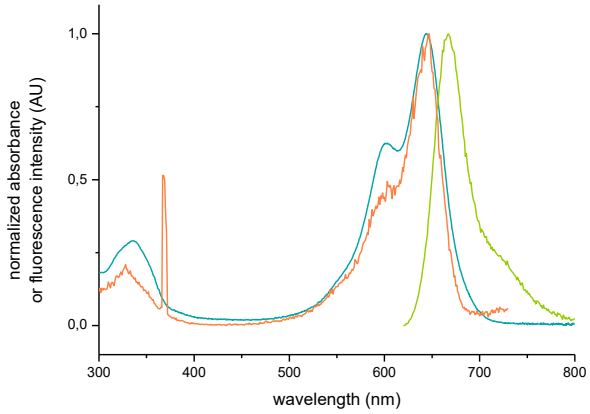
Emission chromatogram of **25** (λ_{exc} = 610 nm and detected at λ_{em} = 665 nm)



Spectral properties:



Normalized absorption — , emission — (λ_{exc} = 610 nm) and excitation — (λ_{em} = 740 nm) spectra of **25** in DMSO at 25 °C.

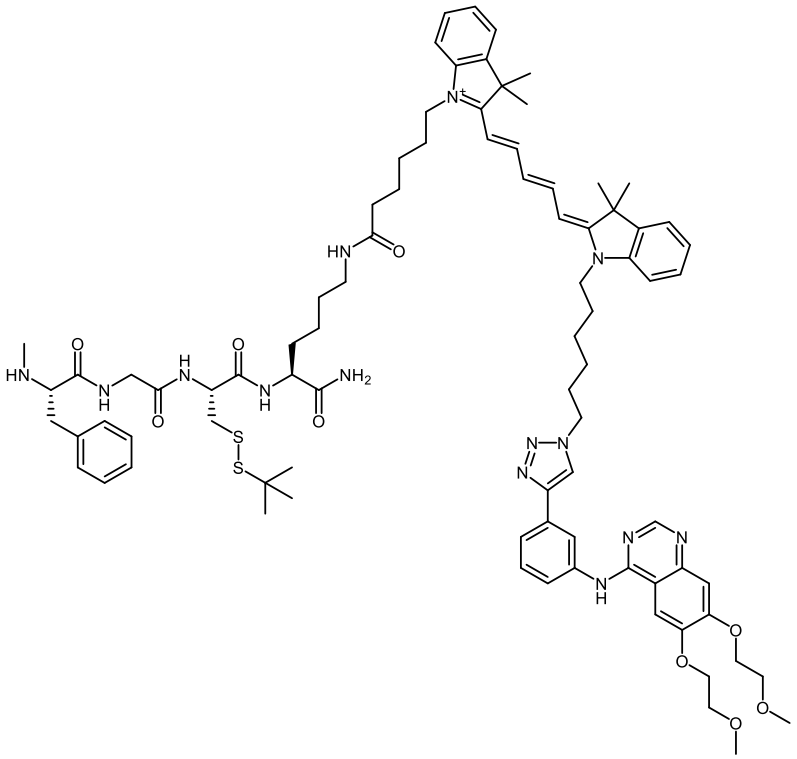


Normalized absorption — , emission — (λ_{exc} = 610 nm) and excitation — (λ_{em} = 740 nm) spectra of **25** in PBS at 25 °C.

Compound	Solvant	λ_{MAX} Abs (nm)	λ_{MAX} Em (nm)	Stokes shift (nm)	Stokes shift (cm^{-1})	Φ_F[a]	ε ($M^{-1}.cm^{-1}$)	B ($M^{-1}.cm^{-1}$)
25	DMSO	655	678	23	518	0.66	44 000	28 900
	PBS	644	667	23	535	0.15	28 000	4 200

[a]using Nile Blue as standard (Φ_F = 0.27 in EtOH)[37]

H-(Me)FGC(S^{t}Bu)K(Cy5.0$_A$-erlotinib)-NH$_2$ **26**

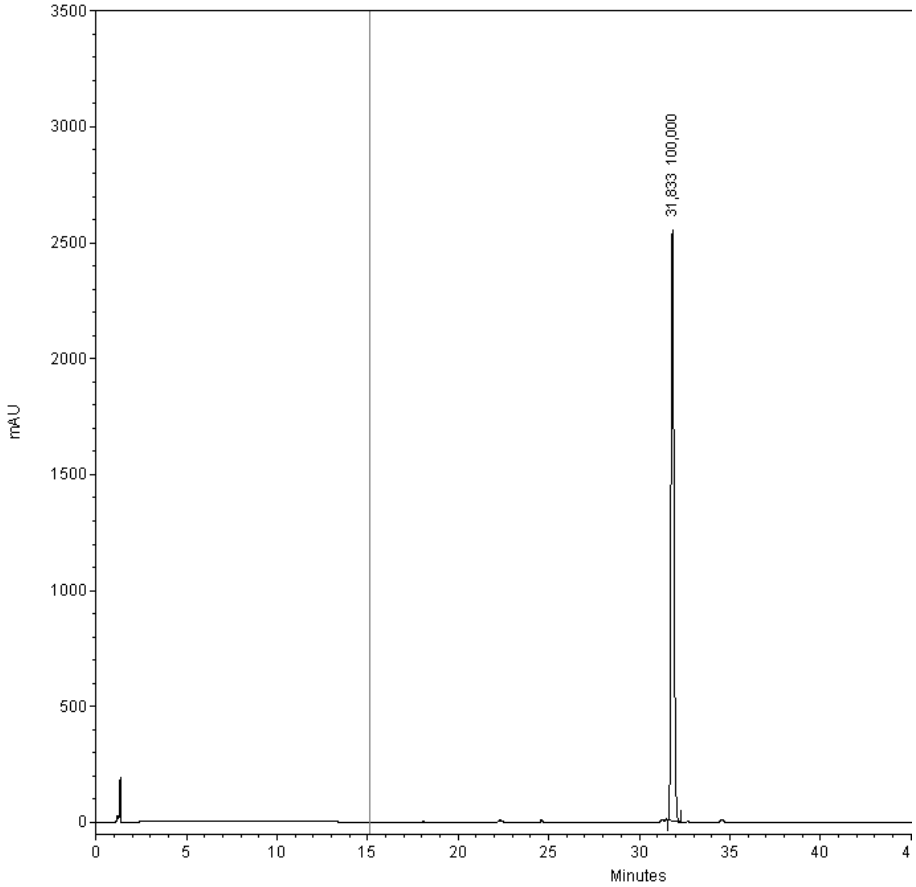


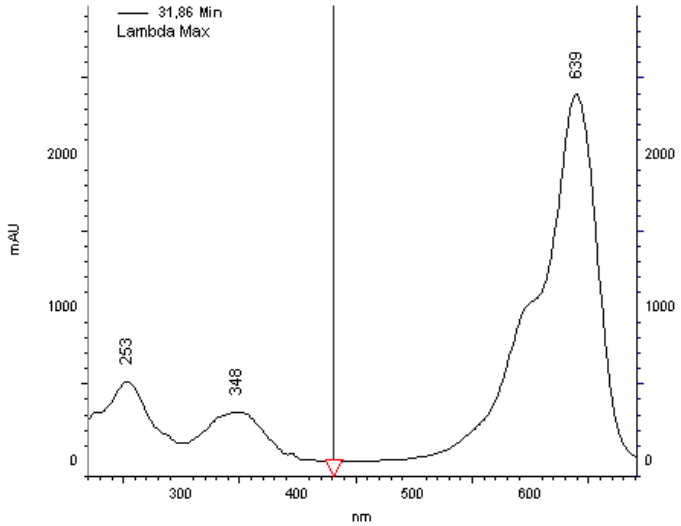
26 was prepared according to the general procedure 5 from CuI (1.7 mg, 9 µmol, 1 eq.), TBTA (4.7 mg, 9 µmol, 1 eq.), DIPEA (15 µl, 90 µmol, 10 eq.), erlotinib (3.5 mg, 9 µmol, 1 eq.) and MD130 (10 mg, 9 µmol, 1 eq.) in dry ACN (2 ml) affording **26** as a blue solid (4.5 mg, 3 µmol, 34%).

HRMS calculated for $C_{84}H_{111}N_{14}O_9S_2$ $[M]^+$: 1523.8100; found 1523.8141

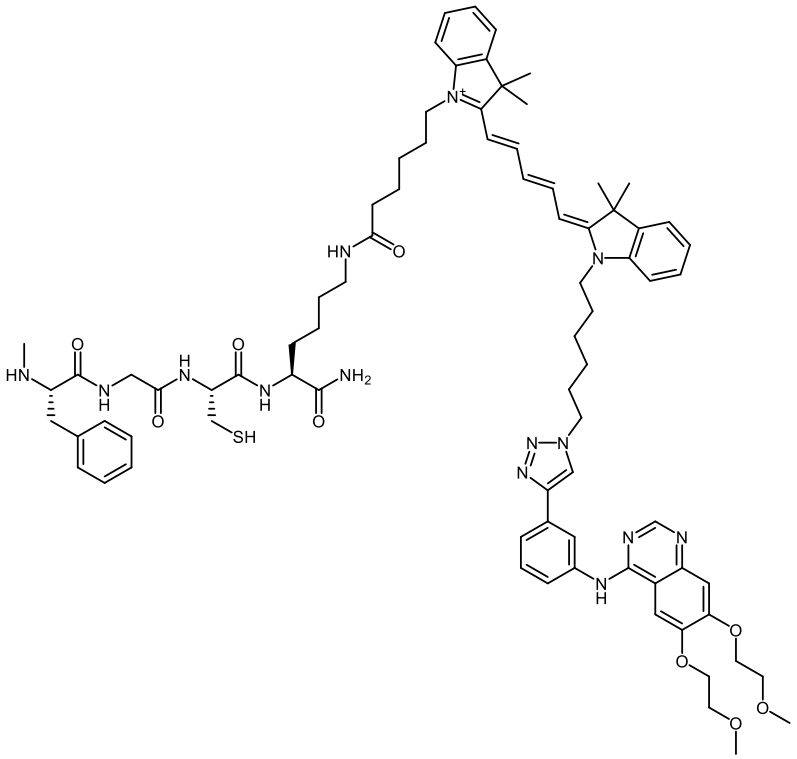
RP-HPLC (system B): t_r = 31.8 min (> 99% purity)

Absorption chromatogram of **26** (max plot mode) and corresponding absorption spectrum





H-(Me)FGCK(Cy5.0$_A$-erlotinib)-NH_2 **27**

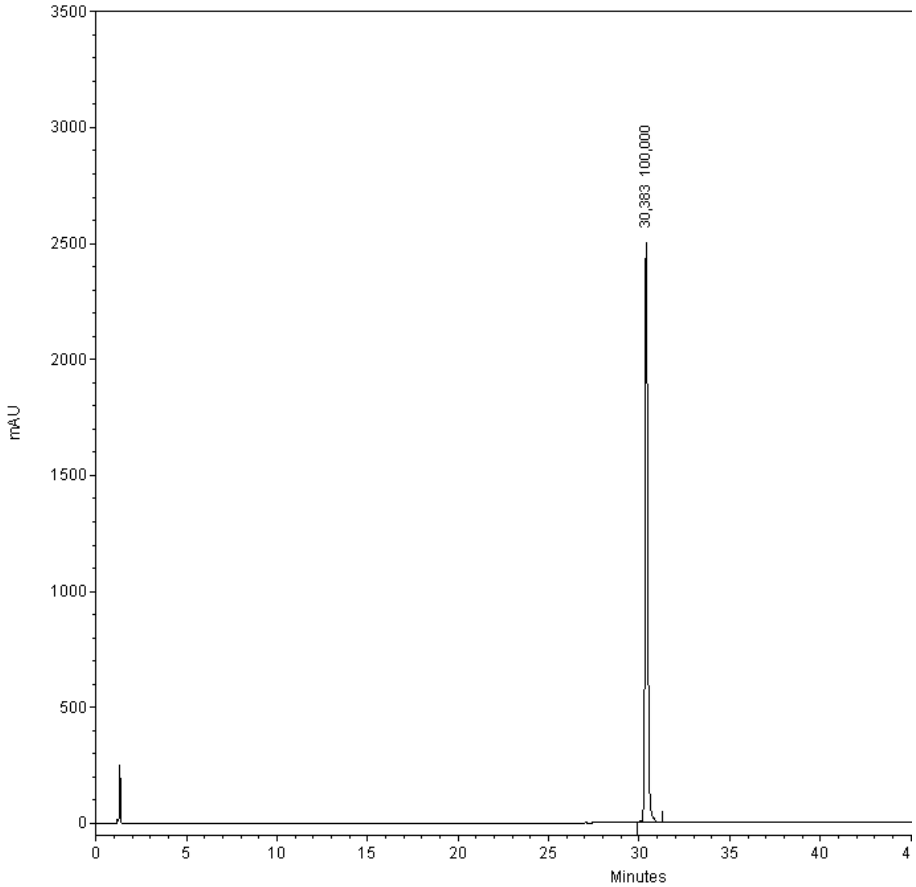


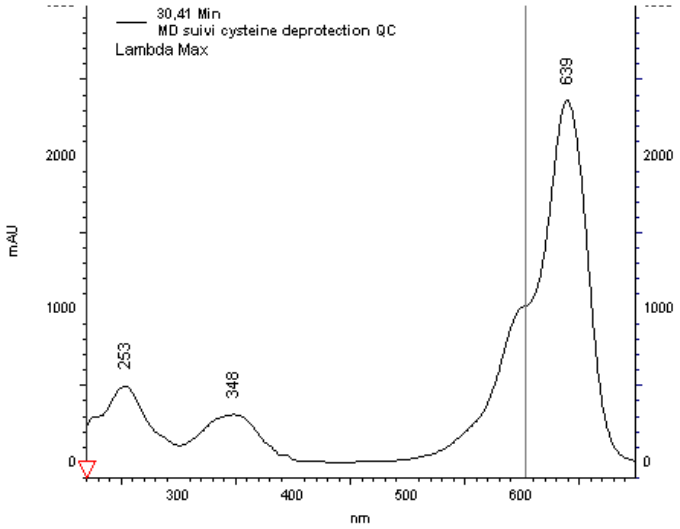
27 was prepared according to the general procedure 3 from **26** (4 mg, 2.6 µmol, 1 eq.), DTT (5.7 mg, 36.5 µmol, 14 eq.) in 300 µl of 0.1 M of aqueous solution of $NaHCO_3$ affording the radiolabelable precursor **27** as a blue solid (2 mg, 1.4 µmol, 54%).

HRMS calculated for $C_{80}H_{103}N_{14}O_9S$ $[M]^+$: 1435.7753; found 1435.7765

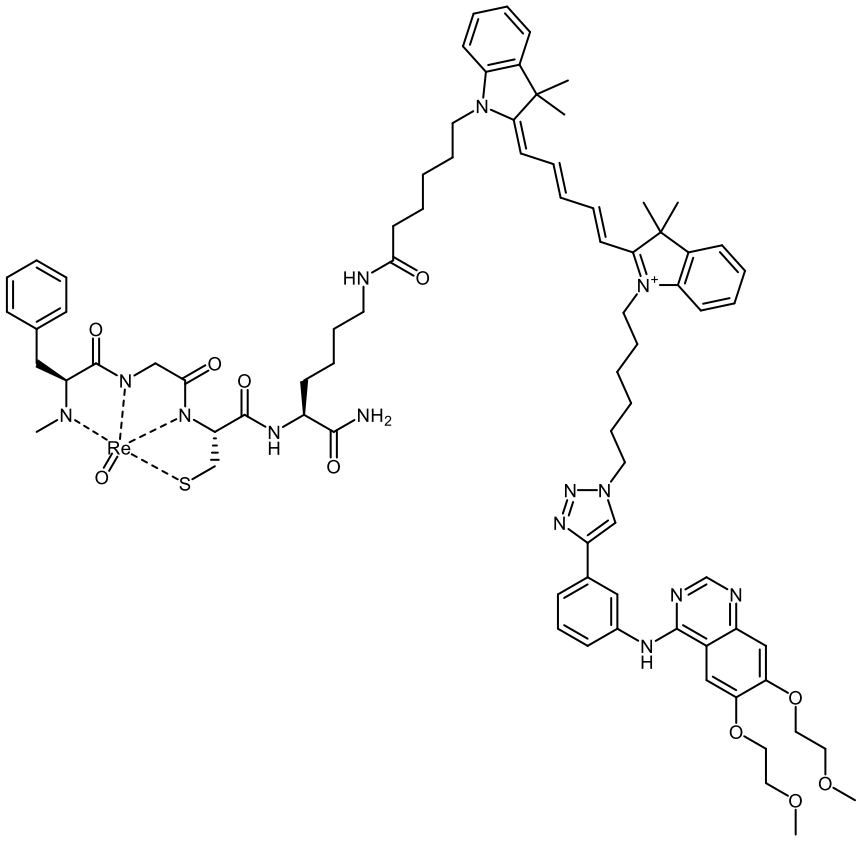
RP-HPLC (system B): t_r = 30.4 min (> 99% purity)

Absorption chromatogram of **27** (max plot mode) and corresponding absorption spectrum





28

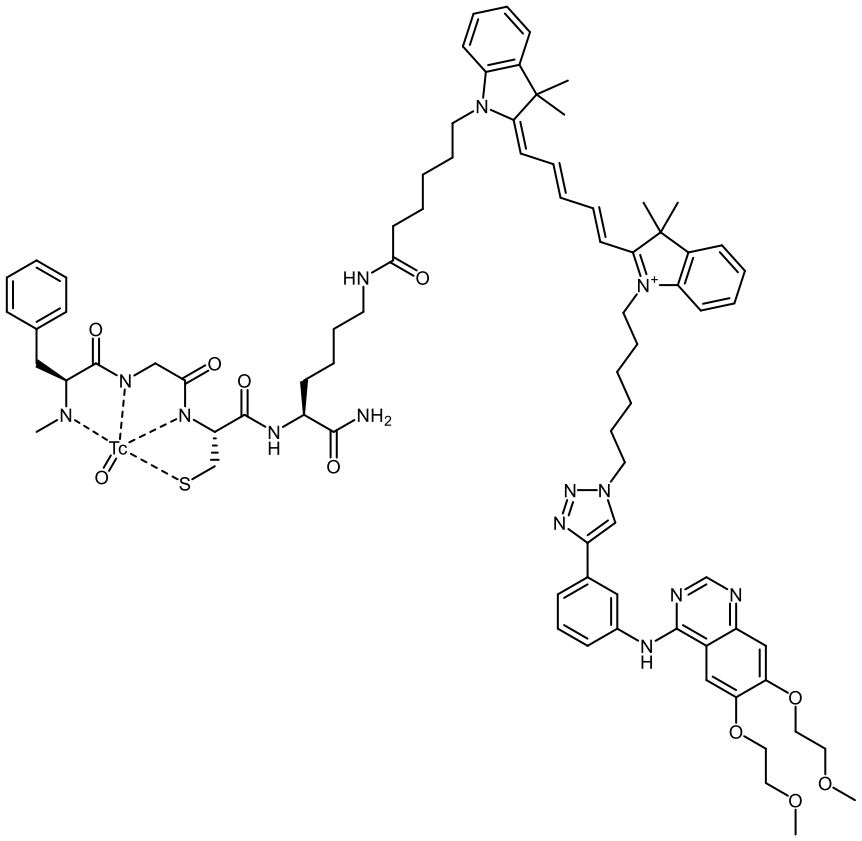


27 (1 mg, 0.7 µmol, 1 eq.), sodium acetate (0.9 mg, 1 µmol, 1.5 eq.), $ReOCl_3(PPh_3)_2$ (0.6 mg, 2.6 µmol, 1 eq.) were dissolved in MeOH (250 µl) and stirred at reflux (65 °C) overnight.

Formation of the complex was monitored by RP-HPLC before purification by semi-preparative RP-HPLC (system A). Selected fractions were lyophilised to give the TFA salt of cold reference **28**.

Not sufficient amount of this compound was obtained to determine an isolated yield.

29

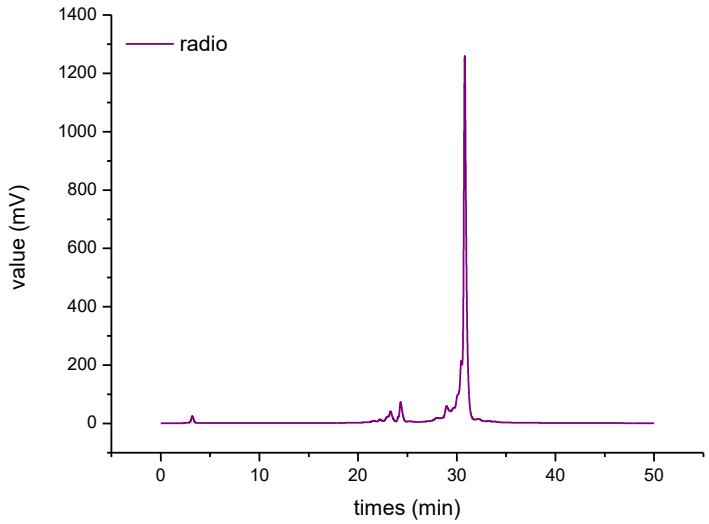


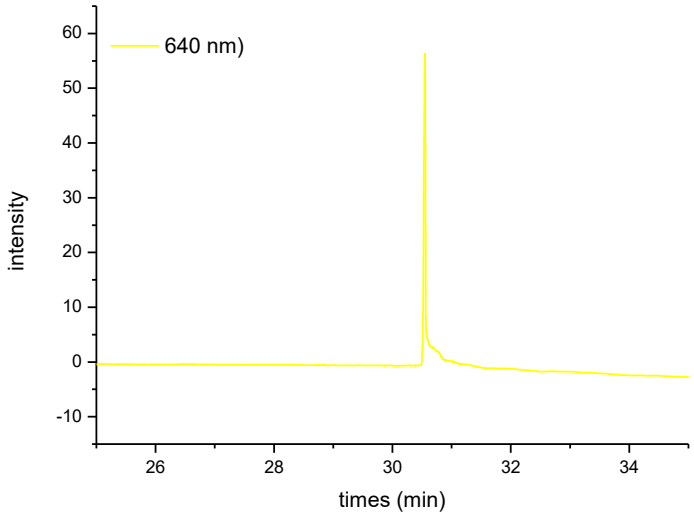
27 (10 µg), sodium tartrate solution (200 µl, 100 mg/ml), $SnCl_2$ solution in HCl 0.1M (20 µl, 1 mg/ml), $Na^{99m}TcO_4$ solution (20-30 mCi in 150 µl of saline) and water (1 ml) were added to a 10 ml Technevial. The reaction mixture was incubated at 100 °C for 10 min.

The ^{99m}Tc complex was monitored by RP-HPLC with radioactivity detector (system D).

RP-HPLC (system D): t_r = 3.7 min (100% purity)

Elution profil of **29**





(1) Weissleder, R.; Pittet, M. J. Imaging in the Era of Molecular Oncology. *Nature* **2008**, *452* (7187), 580–589. https://doi.org/10.1038/nature06917.

(2) James, M. L.; Gambhir, S. S. A Molecular Imaging Primer: Modalities, Imaging Agents, and Applications. *Physiol. Rev.* **2012**, *92* (2), 897–965. https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2010.

(3) Alam, I. S.; Arshad, M. A.; Nguyen, Q.-D.; Aboagye, E. O. Radiopharmaceuticals as Probes to Characterize Tumour Tissue. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2015**, *42* (4), 537–561. https://doi.org/10.1007/s00259-014-2984-3.

(4) Owens, E. A.; Henary, M.; El Fakhri, G.; Choi, H. S. Tissue-Specific Near-Infrared Fluorescence Imaging. *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49* (9), 1731–1740. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00239.

(5) Ballou, B.; Ernst, L. A.; Waggoner, A. S. Fluorescence Imaging of Tumors in Vivo. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12* (7), 795–805.

(6) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2620–2640. https://doi.org/10.1021/cr900263j.

(7) Mochida, A.; Ogata, F.; Nagaya, T.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Activatable Fluorescent Probes in Fluorescence-Guided Surgery: Practical Considerations. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26* (4), 925–930. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.002.

(8) Nagaya, T.; Nakamura, Y. A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Fluorescence-Guided Surgery. *Front. Oncol.* **2017**, *7* (314), 1–16. https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00314.

(9) Wang, C.; Wang, Z.; Zhao, T.; Li, Y.; Huang, G.; Sumer, B. D.; Gao, J. Optical Molecular Imaging for Tumor Detection and Image-Guided Surgery. *Biomaterials* **2018**, *157*, 62–75. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.002.

(10) Garland, M.; Yim, J. J.; Bogyo, M. A Bright Future for Precision Medicine: Advances in Fluorescent Chemical Probe Design and Their Clinical Application. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23* (1), 122–136. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.12.003.

(11) Gao, M.; Yu, F.; Lv, C.; Choo, J.; Chen, L. Fluorescent Chemical Probes for Accurate Tumor Diagnosis and Targeting Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (8), 2237–2271. https://doi.org/10.1039/C6CS00908E.

(12) Zinn, K. R.; Korb, M.; Samuel, S.; Warram, J. M.; Dion, D.; Killingsworth, C.; Fan, J.; Schoeb, T.; Strong, T. V.; Rosenthal, E. L. IND-Directed Safety and Biodistribution Study of Intravenously Injected Cetuximab-IRDye800 in Cynomolgus Macaques. *Mol. Imaging Biol.* **2015**, *17* (1), 49–57. https://doi.org/10.1007/s11307-014-0773-9.

(13) Rosenthal, E. L.; Warram, J. M.; de Boer, E.; Chung, T. K.; Korb, M. L.; Brandwein-Gensler, M.; Strong, T. V.; Schmalbach, C. E.; Morlandt, A. B.; Agarwal, G.; et al. Safety and Tumor Specificity of Cetuximab-IRDye800 for Surgical Navigation in Head and Neck Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21* (16), 3658–3666. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3284.

(14) Sanman, L. E.; Bogyo, M. Activity-Based Profiling of Proteases. *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83* (1), 249–273. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035352.

(15) Fujii, T.; Kamiya, M.; Urano, Y. *In Vivo* Imaging of Intraperitoneally Disseminated Tumors in Model Mice by Using Activatable Fluorescent Small-Molecular Probes for Activity of Cathepsins. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (10), 1838–1846. https://doi.org/10.1021/bc5003289.

(16) Yogo, T.; Umezawa, K.; Kamiya, M.; Hino, R.; Urano, Y. Development of an Activatable Fluorescent Probe for Prostate Cancer Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28* (8), 2069–2076. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00233.

(17) Urano, Y.; Sakabe, M.; Kosaka, N.; Ogawa, M.; Mitsunaga, M.; Asanuma, D.; Kamiya, M.; Young, M. R.; Nagano, T.; Choyke, P. L.; et al. Rapid Cancer Detection by Topically Spraying a -Glutamyltranspeptidase-Activated Fluorescent Probe. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3* (110), 1–10. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002823.

(18) Miyata, Y.; Ishizawa, T.; Kamiya, M.; Yamashita, S.; Hasegawa, K.; Ushiku, A.; Shibahara, J.; Fukayama, M.; Urano, Y.; Kokudo, N. Intraoperative Imaging of Hepatic Cancers Using γ-Glutamyltranspeptidase-Specific Fluorophore Enabling Real-Time Identification and Estimation of Recurrence. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03760-3.

(19) Kubo, H.; Hanaoka, K.; Kuriki, Y.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Kojima, R.; Kamiya, M.; Murayama, Y.; Otsuji, E.; Urano, Y. Rapid Detection of Metastatic Lymph Nodes of Colorectal Cancer with a Gamma-Glutamyl Transpeptidase-Activatable Fluorescence Probe. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 17781. https://doi.org/10.1038/s41598-018-36062-3.

(20) Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor–Acceptor Combinations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (28), 4562–4589. https://doi.org/10.1002/anie.200503873.

(21) Hu, H.-Y.; Gehrig, S.; Reither, G.; Subramanian, D.; Mall, M. A.; Plettenburg, O.; Schultz, C. FRET-Based and Other Fluorescent Proteinase Probes. *Biotechnol. J.* **2014**, *9* (2), 266–281. https://doi.org/10.1002/biot.201300201.

(22) Ofori, L. O.; Withana, N. P.; Prestwood, T. R.; Verdoes, M.; Brady, J. J.; Winslow, M. M.; Sorger, J.; Bogyo, M. Design of Protease Activated Optical Contrast Agents That Exploit a Latent Lysosomotropic Effect for Use in Fluorescence-Guided Surgery. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10* (9), 1977–1988. https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00205.

(23) Yim, J. J.; Tholen, M.; Klaassen, A.; Sorger, J.; Bogyo, M. Optimization of a Protease Activated Probe for Optical Surgical Navigation. *Mol. Pharm.* **2018**, *15* (3), 750–758. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00822.

(24) Achilefu, S. Introduction to Concepts and Strategies for Molecular Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2575–2578. https://doi.org/10.1021/cr1001113.

(25) Jennings, L. E.; Long, N. J. 'Two Is Better than One'—Probes for Dual-Modality Molecular Imaging. *Chem. Commun.* **2009**, No. 24, 3511–3524. https://doi.org/10.1039/b821903f.

(26) Thorp-Greenwood, F. L.; Coogan, M. P. Multimodal Radio- (PET/SPECT) and Fluorescence Imaging Agents Based on Metallo-Radioisotopes: Current Applications and Prospects for Development of New Agents. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (23), 6129–6143. https://doi.org/10.1039/c0dt01398f.

(27) Culver, J.; Akers, W.; Achilefu, S. Multimodality Molecular Imaging with Combined Optical and SPECT/PET Modalities. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (2), 169–172. https://doi.org/10.2967/jnumed.107.043331.

(28) Seibold, U.; Wängler, B.; Schirrmacher, R.; Wängler, C. Bimodal Imaging Probes for Combined PET and OI: Recent Developments and Future Directions for Hybrid Agent Development. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2014/153741.

(29) Paulus, A.; Desai, P.; Carney, B.; Carlucci, G.; Reiner, T.; Brand, C.; Weber, W. A. Development of a Clickable Bimodal Fluorescent/PET Probe for in Vivo Imaging. *EJNMMI Res.* **2015**, *5* (1). https://doi.org/10.1186/s13550-015-0120-4.

(30) Gai, Y.; Xiang, G.; Ma, X.; Hui, W.; Ouyang, Q.; Sun, L.; Ding, J.; Sheng, J.; Zeng, D. Universal Molecular Scaffold for Facile Construction of Multivalent and Multimodal Imaging Probes. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (3), 515–520. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00034.

(31) Meyer, J.-P.; Adumeau, P.; Lewis, J. S.; Zeglis, B. M. Click Chemistry and Radiochemistry: The First 10 Years. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27* (12), 2791–2807. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00561.

(32) Gorka, A. P.; Nani, R. R.; Schnermann, M. J. Cyanine Polyene Reactivity: Scope and Biomedical Applications. *Org Biomol Chem* **2015**, *13* (28), 7584–7598. https://doi.org/10.1039/C5OB00788G.

(33) Sun, W.; Guo, S.; Hu, C.; Fan, J.; Peng, X. Recent Development of Chemosensors Based on Cyanine Platforms. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (14), 7768–7817. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00001.

(34) Usama, S. M.; Thompson, T.; Burgess, K. Productive Manipulation of Cyanine Dye π-Networks. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *59*, 2–5. https://doi.org/10.1002/anie.201902956.

(35) Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Lewis, C. J.; Waggoner, A. S. Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconjug. Chem.* **1993**, *4* (2), 105–111. https://doi.org/10.1021/bc00020a001.

(36) Chipon, B.; Clavé, G.; Bouteiller, C.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Synthesis and Post-Synthetic Derivatization of a Cyanine-Based Amino Acid. Application to the Preparation of a Novel Water-Soluble NIR Dye. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (47), 8279–8284. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.09.100.

(37) Brouwer, A. M. Standards for Photoluminescence Quantum Yield Measurements in Solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83* (12), 2213–2228. https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31.

(38) Boros, E.; Packard, A. B. Radioactive Transition Metals for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **2019**, *119* (2), 870–901. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00281.

(39) Bartholomä, M.; Valliant, J.; Maresca, K. P.; Babich, J.; Zubieta, J. Single Amino Acid Chelates (SAAC): A Strategy for the Design of Technetium and Rhenium Radiopharmaceuticals. *Chem Commun* **2009**, No. 5, 493–512. https://doi.org/10.1039/B814903H.
(40) Ahlgren, S.; Andersson, K.; Tolmachev, V. Kit Formulation for 99mTc-Labeling of Recombinant Anti-HER2 Affibody Molecules with a C-Terminally Engineered Cysteine. *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37* (5), 539–546. https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.02.009.
(41) Bohn, P.; Mouchard, F.; Rouvet, J.; de Boisgrollier, A.-C.; Vera, P. 99mTc-(Me)FGCDEVD, a Potential Tracer for Apoptosis Detection. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (5), 1375–1378. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.088.
(42) Bannwarth, W.; Knorr, R. Formation of Carboxamides with N,N,N′,N′-Tetramethyl (Succinimido) Uronium Tetrafluoroborate in Aqueous / Organic Solvent Systems. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32* (9), 1157–1160. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)92032-X.
(43) Ralhan, K.; KrishnaKumar, V. G.; Gupta, S. Piperazine and DBU: A Safer Alternative for Rapid and Efficient Fmoc Deprotection in Solid Phase Peptide Synthesis. *RSC Adv.* **2015**, *5* (126), 104417–104425. https://doi.org/10.1039/C5RA23441G.
(44) Kerr, J. F. R.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **1972**, *26* (4), 239–257. https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33.
(45) Denault, J.-B.; Salvesen, G. S. Caspases: Keys in the Ignition of Cell Death. *Chem. Rev.* **2002**, *102* (12), 4489–4500. https://doi.org/10.1021/cr010183n.
(46) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.
(47) Smith, B. A.; Smith, B. D. Biomarkers and Molecular Probes for Cell Death Imaging and Targeted Therapeutics. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (10), 1989–2006. https://doi.org/10.1021/bc3003309.
(48) Thornberry, N. A. Caspases: Enemies Within. *Science* **1998**, *281* (5381), 1312–1316. https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1312.
(49) Edgington, L. E.; Verdoes, M.; Bogyo, M. Functional Imaging of Proteases: Recent Advances in the Design and Application of Substrate-Based and Activity-Based Probes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15* (6), 798–805. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.10.012.
(50) Edgington-Mitchell, L. E.; Bogyo, M. Detection of Active Caspases During Apoptosis Using Fluorescent Activity-Based Probes. In *Programmed Cell Death*; Puthalakath, H., Hawkins, C. J., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2016; Vol. 1419, pp 27–39. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3581-9_3.
(51) Edgington, L. E.; Berger, A. B.; Blum, G.; Albrow, V. E.; Paulick, M. G.; Lineberry, N.; Bogyo, M. Noninvasive Optical Imaging of Apoptosis by Caspase-Targeted Activity-Based Probes. *Nat. Med.* **2009**, *15* (8), 967–973. https://doi.org/10.1038/nm.1938.
(52) Shaulov-Rotem, Y.; Merquiol, E.; Weiss-Sadan, T.; Moshel, O.; Salpeter, S.; Shabat, D.; Kaschani, F.; Kaiser, M.; Blum, G. A Novel Quenched Fluorescent Activity-Based Probe Reveals Caspase-3 Activity in the Endoplasmic Reticulum during Apoptosis. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (2), 1322–1337. https://doi.org/10.1039/C5SC03207E.
(53) Bullok, K.; Piwnica-Worms, D. Synthesis and Characterization of a Small, Membrane-Permeant, Caspase-Activatable Far-Red Fluorescent Peptide for Imaging Apoptosis. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (17), 5404–5407. https://doi.org/10.1021/jm050008p.
(54) Bullok, K. E.; Maxwell, D.; Kesarwala, A. H.; Gammon, S.; Prior, J. L.; Snow, M.; Stanley, S.; Piwnica-Worms, D. Biochemical and *in Vivo* Characterization of a Small, Membrane-Permeant, Caspase-Activatable Far-Red Fluorescent Peptide for Imaging Apoptosis [†]. *Biochemistry* **2007**, *46* (13), 4055–4065. https://doi.org/10.1021/bi061959n.
(55) Maxwell, D.; Chang, Q.; Zhang, X.; Barnett, E. M.; Piwnica-Worms, D. An Improved Cell-Penetrating, Caspase-Activatable, Near-Infrared Fluorescent Peptide for Apoptosis Imaging. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (4), 702–709. https://doi.org/10.1021/bc800516n.
(56) Debunne, M.; Portal, C.; Delest, B.; Brakenhielm, E.; Lallemand, F.; Henry, J.-P.; Ligeret, H.; Noack, P.; Massonneau, M.; Romieu, A.; et al. *In Vitro* and *Ex Vivo* Evaluation of Smart Infra-Red Fluorescent Caspase-3 Probes for Molecular Imaging of Cardiovascular Apoptosis. *Int. J. Mol. Imaging* **2011**, *2011*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2011/413290.
(57) Jolivel, V.; Arthaud, S.; Botia, B.; Portal, C.; Delest, B.; Clavé, G.; Leprince, J.; Romieu, A.; Renard, P.-Y.; Touzani, O.; et al. Biochemical Characterization of a Caspase-3 Far-Red Fluorescent Probe for Non-Invasive

Optical Imaging of Neuronal Apoptosis. *J. Mol. Neurosci.* **2014**, *54* (3), 451–462. https://doi.org/10.1007/s12031-014-0325-4.

(58) Su, H.; Chen, G.; Gangadharmath, U.; Gomez, L. F.; Liang, Q.; Mu, F.; Mocharla, V. P.; Szardenings, A. K.; Walsh, J. C.; Xia, C.-F.; et al. Evaluation of [18F]-CP18 as a PET Imaging Tracer for Apoptosis. *Mol. Imaging Biol.* **2013**, *15* (6), 739–747. https://doi.org/10.1007/s11307-013-0644-9.

(59) Xia, C.-F.; Chen, G.; Gangadharmath, U.; Gomez, L. F.; Liang, Q.; Mu, F.; Mocharla, V. P.; Su, H.; Szardenings, A. K.; Walsh, J. C.; et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of the Caspase-3 Substrate-Based Radiotracer [18F]-CP18 for PET Imaging of Apoptosis in Tumors. *Mol. Imaging Biol.* **2013**, *15* (6), 748–757. https://doi.org/10.1007/s11307-013-0646-7.

(60) Blankenberg, F. G.; Norfray, J. F. Multimodality Molecular Imaging of Apoptosis in Oncology. *Am. J. Roentgenol.* **2011**, *197* (2), 308–317. https://doi.org/10.2214/AJR.11.6953.

(61) Xiong, C.; Lu, W.; Zhang, R.; Tian, M.; Gelovani, W. T. J.; Li, C. Cell-Permeable 99mTc(CO3)-Labeled Fluorogenic Caspase 3 Substrate for Dual- Modality Detection of Apoptosis. *15*, 8979–8984.

(62) Lee, H.; Akers, W. J.; Cheney, P. P.; Edwards, W. B.; Liang, K.; Culver, J. P.; Achilefu, S. Complementary Optical and Nuclear Imaging of Caspase-3 Activity Using Combined Activatable and Radio-Labeled Multimodality Molecular Probe. *J. Biomed. Opt.* **2009**, *14* (4), 0405071–0405073. https://doi.org/10.1117/1.3207156.

(63) Mackay, M.; P?rez-L?pez, A. M.; Bradley, M.; Lilienkampf, A. Eliminating Caspase-7 and Cathepsin B Cross-Reactivity on Fluorogenic Caspase-3 Substrates. *Mol BioSyst* **2016**, *12* (3), 693–696. https://doi.org/10.1039/C5MB00730E.

(64) Vickers, C. J.; González-Páez, G. E.; Wolan, D. W. Selective Detection and Inhibition of Active Caspase-3 in Cells with Optimized Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (34), 12869–12876. https://doi.org/10.1021/ja406399r.

(65) Vickers, C. J.; González-Páez, G. E.; Wolan, D. W. Discovery of a Highly Selective Caspase-3 Substrate for Imaging Live Cells. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (10), 2199–2203. https://doi.org/10.1021/cb500586p.

(66) Jouanno, L.-A.; Chevalier, A.; Sekkat, N.; Perzo, N.; Castel, H.; Romieu, A.; Lange, N.; Sabot, C.; Renard, P.-Y. Kondrat'eva Ligation: Diels–Alder-Based Irreversible Reaction for Bioconjugation. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (21), 10353–10366. https://doi.org/10.1021/jo501972m.

(67) Chevalier, A.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Azo-Based Fluorogenic Probes for Biosensing and Bioimaging: Recent Advances and Upcoming Challenges. *Chem. - Asian J.* **2017**, *12* (16), 2008–2028. https://doi.org/10.1002/asia.201700682.

(68) Chevalier, A.; Massif, C.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Bioconjugatable Azo-Based Dark-Quencher Dyes: Synthesis and Application to Protease-Activatable Far-Red Fluorescent Probes. *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19* (5), 1686–1699. https://doi.org/10.1002/chem.201203427.

(69) Pisoni, D. S.; Todeschini, L.; Borges, A. C. A.; Petzhold, C. L.; Rodembusch, F. S.; Campo, L. F. Symmetrical and Asymmetrical Cyanine Dyes. Synthesis, Spectral Properties, and BSA Association Study. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (12), 5511–5520. https://doi.org/10.1021/jo500657s.

(70) Linder, K. E.; Metcalfe, E.; Nanjappan, P.; Arunachalam, T.; Ramos, K.; Skedzielewski, T. M.; Marinelli, E. R.; Tweedle, M. F.; Nunn, A. D.; Swenson, R. E. Synthesis, In Vitro Evaluation, and In Vivo Metabolism of Fluor/Quencher Compounds Containing IRDye 800CW and Black Hole Quencher-3 (BHQ-3). *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (7), 1287–1297. https://doi.org/10.1021/bc100457s.

(71) Chan, W. C.; Bycroft, B. W.; Evans, D. J.; White, P. D. A Novel 4-Aminobenzyl Ester-Based Carboxy-Protecting Group for Synthesis of Atypical Peptides by Fmoc-But Solid-Phase Chemistry. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, *21*, 2209–2210. https://doi.org/10.1039/c39950002209.

(72) Conroy, T.; Jolliffe, K. A.; Payne, R. J. Efficient Use of the Dmab Protecting Group: Applications for the Solid-Phase Synthesis of N-Linked Glycopeptides. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (11), 2255–2258. https://doi.org/10.1039/b821051a.

(73) Raibaut, L.; Drobecq, H.; Melnyk, O. Selectively Activatable Latent Thiol and Selenolesters Simplify the Access to Cyclic or Branched Peptide Scaffolds. *Org. Lett.* **2015**, *17* (14), 3636–3639. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b01817.

(74) Ruczyński, J.; Lewandowska, B.; Mucha, P.; Rekowski, P. Problem of Aspartimide Formation in Fmoc-Based Solid-Phase Peptide Synthesis Using Dmab Group to Protect Side Chain of Aspartic Acid. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14* (3), 335–341. https://doi.org/10.1002/psc.941.

(75) Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455–2504.
(76) Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (38), 6974–6998. https://doi.org/10.1002/anie.200900942.
(77) Presolski, S. I.; Hong, V. P.; Finn, M. G. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. In *Current Protocols in Chemical Biology*; Arkin, A. P., Mahal, L., Romesberg, F., Shah, K., Shamu, C., Thomas, C., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; p ch110148. https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch110148.
(78) Mortlock, A.; Foote, K.; Kettle, J.; Aquila, B. Kinase Inhibitors in Cancer. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2014. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.11033-9.
(79) Peters, S.; Betticher, D. C. Rôle de l'EGFR dans le cancer pulmonaire non à petites cellules. *Rev. Médicale Suisse* **2009**, *5*, 1096–1100.
(80) Vardanyan, R.; Hruby, V. Antineoplastic Agents. In *Synthesis of Best-Seller Drugs*; Elsevier, 2016; pp 495–547. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411492-0.00028-6.
(81) Dowell, J.; Minna, J. D.; Kirkpatrick, P. Erlotinib Hydrochloride. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (1), 13–14. https://doi.org/10.1038/nrd1612.
(82) Cortot, A. Rôle du récepteur à l'EGF dans la survenue et le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules – EGFR plays a key-role in the pathogenesis and treatment of non-small-cell lung cancer. **2007**, 7.
(83) Dansin, E.; Ferté, C. Indications des inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR dans le cancer bronchique non à petites cellules : pratiques actuelles et perspectives. 8.
(84) Slobbe, P.; Poot, A. J.; Windhorst, A. D.; van Dongen, G. A. M. S. PET Imaging with Small-Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors: TKI-PET. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (21–22), 1175–1187. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.06.016.
(85) Memon, A. A.; Jakobsen, S.; Dagnaes-Hansen, F.; Sorensen, B. S.; Keiding, S.; Nexo, E. Positron Emission Tomography (PET) Imaging with [11C]-Labeled Erlotinib: A Micro-PET Study on Mice with Lung Tumor Xenografts. *Cancer Res.* **2009**, *69* (3), 873–878. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3118.
(86) Bahce, I.; Smit, E. F.; Lubberink, M.; van der Veldt, A. A. M.; Yaqub, M.; Windhorst, A. D.; Schuit, R. C.; Thunnissen, E.; Heideman, D. A. M.; Postmus, P. E.; et al. Development of [11C]Erlotinib Positron Emission Tomography for In Vivo Evaluation of EGF Receptor Mutational Status. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19* (1), 183–193. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0289.
(87) Jain, A.; Kameswaran, M.; Pandey, U.; Prabhash, K.; Sarma, H. D.; Dash, A. 68 Ga Labeled Erlotinib: A Novel PET Probe for Imaging EGFR over-Expressing Tumors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (19), 4552–4557. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.065.
(88) Guisier, F.; Bohn, P.; Patout, M.; Piton, N.; Farah, I.; Vera, P.; Thiberville, L.; Salaün, M. In- and Ex-Vivo Molecular Imaging of Apoptosis to Assess Sensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer to EGFR Inhibitors Using Probe-Based Confocal Laser Endomicroscopy. *PLOS ONE* **2017**, *12* (7), e0180576. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180576.
(89) Patout, M.; Guisier, F.; Brune, X.; Bohn, P.; Romieu, A.; Sarafan-Vasseur, N.; Sesboüé, R.; Renard, P.-Y.; Thiberville, L.; Salaün, M. Real-Time Molecular Optical Micro-Imaging of EGFR Mutations Using a Fluorescent Erlotinib Based Tracer. *BMC Pulm. Med.* **2019**, *19* (3), 1–9. https://doi.org/10.1186/s12890-018-0760-z.
(90) Merlin, J. L. Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie – Tyrosine kinase inhibitors in oncology. 14.
(91) Ahn, S. H.; Boros, E. Nuclear and Optical Bimodal Imaging Probes Using Sequential Assembly: A Perspective. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2018**, *33* (8), 308–315. https://doi.org/10.1089/cbr.2018.2499.
(92) Canovas, C.; Moreau, M.; Vrigneaud, J.-M.; Bellaye, P.-S.; Collin, B.; Denat, F.; Goncalves, V. Modular Assembly of Multimodal Imaging Agents through an Inverse Electron Demand Diels–Alder Reaction. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (3), 888–897. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00017.
(93) Shi, C.; Wu, J. B.; Pan, D. Review on Near-Infrared Heptamethine Cyanine Dyes as Theranostic Agents for Tumor Imaging, Targeting, and Photodynamic Therapy. *J. Biomed. Opt.* **2016**, *21* (5), 0509011–05090111. https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.5.050901.
(94) Richard, J.-A.; Massonneau, M.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. 7-Hydroxycoumarin−Hemicyanine Hybrids: A New Class of Far-Red Emitting Fluorogenic Dyes. *Org. Lett.* **2008**, *10* (19), 4175–4178. https://doi.org/10.1021/ol801582w.

(95) Kvach, M. V.; Ustinov, A. V.; Stepanova, I. A.; Malakhov, A. D.; Skorobogatyi, M. V.; Shmanai, V. V.; Korshun, V. A. A Convenient Synthesis of Cyanine Dyes: Reagents for the Labeling of Biomolecules. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008* (12), 2107–2117. https://doi.org/10.1002/ejoc.200701190.

(96) Murray, J.; Nowak, D.; Pukenas, L.; Azhar, R.; Guillorit, M.; Wälti, C.; Critchley, K.; Johnson, S.; Bon, R. S. Solid Phase Synthesis of Functionalised SAM-Forming Alkanethiol–Oligoethyleneglycols. *J Mater Chem B* **2014**, *2* (24), 3741–3744. https://doi.org/10.1039/C4TB00573B.

(97) Yao, L.; Smith, B. T.; Aubé, J. Base-Promoted Reactions of Bridged Ketones and 1,3- and 1,4-Haloalkyl Azides: Competitive Alkylation vs Azidation Reactions of Ketone Enolates. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (5), 1720–1722. https://doi.org/10.1021/jo0356098.

Résumé

La qualité du diagnostic oncologique, déterminant la thérapie et le pronostic du patient, repose sur différentes techniques d'imagerie ou modalités, associées à des molécules de contraste afin de générer une image représentative de la situation tumorale et analysable par le praticien.

L'imagerie moléculaire, incluant l'imagerie optique de fluorescence et l'imagerie nucléaire, est couramment utilisée pour la prise en charge oncologique des patients.

Récemment, une classe hybride de molécules de contraste appelée MOMIA (MOnomolecular Multimodal Imaging Agent) a émergé, associant plusieurs modalités au sein d'une structure moléculaire unique. Cette combinaison performante cumule les forces de chacune des modalités combinées en palliant leur limitation respective.

Dans ce cadre, ces travaux de thèse portent sur le développement et l'exploitation d'une plateforme polyvalente bimodale (fluorescente et radioactive) composée d'un synthon peptidique, radiomarquable par chélation du ^{99m}Tc, couplé à fluorophore présentant des propriétés spectroscopiques d'émission dans le proche infra-rouge, gamme spectrale privilégiée pour l'imagerie *in vivo*. Cette plateforme est finalement clickable à toute (bio)molécule d'intérêt, générant à façon des sondes bimodales en une étape de couplage.

L'exploitation de cette plateforme bimodale clickable a été explorée dans le contexte du diagnostic oncologique *via* deux cibles enzymatiques principales : la caspase-3 et les tyrosine-kinases.

Les étapes de conception, synthèse, optimisation, développement et validation biologique préliminaire *in vitro* de la plateforme et des sondes dérivées bimodales sont présentés.

Mots clés : imagerie moléculaire, multimodalité, fluorescence, SPECT, caspase-3, erlotinib

Abstract

Oncologic healthcare and remission prognosis rely on a reliable and accurate diagnosis. Molecular imaging, including optical and nuclear imaging, is currently used for the management cancer therapy.

Recently, a new class of bio-imaging agent called MOMIA (MOnomolecular Multimodal Imaging Agent) emerged by combining the synergistic strengths of several modalities on the same molecular structure.

We envisioned to merge optical and nuclear imaging in order to develop a molecular tool offering a non-invasive, highly resolutive and sensitive detection.

Our approach relies on a universal bimodal clickable scaffold with a selected targeting ligand. Two distinct enzymatic targets have been explored in the oncologic context: caspase-3 as a key component in an apoptotic program and tyrosine kinase inhibitors involved in lung cancer therapy.

These multimodal sensors have a promising potential in translational clinical applications.

Key words: molecular imaging, multimodality, fluorescence, SPECT, caspase-3, erlotinib