



**HAL**  
open science

# Synthèse par chimie click de molécules associant photosensibilisateurs et peptides de ciblage pour une utilisation en thérapie photodynamique anticancéreuse

Marie-Camille Briqueler

► **To cite this version:**

Marie-Camille Briqueler. Synthèse par chimie click de molécules associant photosensibilisateurs et peptides de ciblage pour une utilisation en thérapie photodynamique anticancéreuse. Sciences pharmaceutiques. 2010. hal-01739112

**HAL Id: hal-01739112**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01739112>**

Submitted on 20 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I  
2010

FACULTE DE PHARMACIE



**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le 30 juin 2010 pour obtenir le

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

par **Marie-Camille Briqueler**

Née le 11 août 1986 à Belfort

Directeur de thèse : Monsieur Régis Vanderesse, Chargé de Recherche CNRS (HDR),  
Nancy

Co-directeur : Mr Samir Acherar, Maître de Conférences UHP, Nancy I

**SYNTHESE PAR CHIMIE CLICK DE MOLECULES  
ASSOCIANT PHOTOSENSIBILISATEURS ET PEPTIDES  
DE CIBLAGE POUR UNE UTILISATION EN  
THERAPIE PHOTODYNAMIQUE ANTICANCEREUSE**

**Membres du jury**

Président : Monsieur Jean-Louis Merlin, Professeur, Nancy

Juges : Monsieur Régis Vanderesse, Chargé de Recherche CNRS (HDR), Nancy  
Madame Muriel Barberi-Heyob, Chargée de Recherche CAV (HDR), Nancy  
Madame Céline Frochot, Chargée de Recherche CNRS (HDR), Nancy

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,  
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES,  
CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES  
A LEUR AUTEUR ».

**UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1**

**FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année universitaire 2009-2010**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Bertrand RIHN

**Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Mobilité ERASMUS et Communication**

Francine KEDZIEREWICZ

**Hygiène Sécurité**

Laurent DIEZ

<b>Responsable de la filière Officine :</b>	Francine PAULUS
<b>Responsables de la filière Industrie :</b>	Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
<b>Responsable du Collège d'Enseignement : Pharmaceutique Hospitalier</b>	Jean-Michel SIMON

**DOYEN HONORAIRE**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON  
Marie-Madeleine GALTEAU  
Gérard SIEST  
Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY  
Thérèse GIRARD

**MAITRES DE CONFERENCES  
HONORAIRES**

Gérald CATAU  
Jocelyne COLLOMB  
Bernard DANGIEN  
Marie-Claude FUZELLIER  
Françoise HINZELIN  
Marie-Andrée IMBS  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Jean-Louis MONAL

Maurice HOFFMANN  
Michel JACQUE  
Lucien LALLOZ  
Pierre LECTARD  
Vincent LOPPINET  
Marcel MIRJOLET  
François MORTIER  
Maurice PIERFITTE  
Janine SCHWARTZBROD  
Louis SCHWARTZBROD  
Dominique NOTTER  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANT HONORAIRE**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

## ENSEIGNANTS

### PROFESSEURS

Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	Biochimie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Patrick MENU	Physiologie
Jean-Louis MERLIN	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, législation pharmaceutique

### MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	Chimie Physique
Cédric BOURA	Physiologie
Jean-Claude CHEVIN	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT	Chimie analytique
Joël COULON	Biochimie
Sébastien DADE	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	Hématologie - Génie Biologique
Adel FAIZ	Biophysique-acoustique
Luc FERRARI	Toxicologie

Stéphane GIBAUD	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	Chimie organique
Frédéric JORAND	Santé et environnement
Olivier JOUBERT	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	Hématologie biologique
Christophe MERLIN	Microbiologie environnementale et
moléculaire	
Blandine MOREAU	Pharmacognosie
Maxime MOURER	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS	Informatique
Christine PERDIAKIS	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	Pharmacologie
Virginie PICHON	Biophysique
Anne SAPIN	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY	Santé publique
Gabriel TROCKLE	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIUO	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	Pharmacie galénique

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER	Sémiologie
--------------------	------------

**PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	Anglais
--------------------	---------

**Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois**

**(Pharmacie - Odontologie)**

Anne-Pascale PARRET	Directeur
---------------------	-----------

## **SERMENT DES APOTHICAIRES**

**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**



## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (Directeur Pr. Alain Durand, UMR CNRS-INPL 7568)) à l'ENSIC (INPL), Nancy, sous la direction de **Monsieur le Docteur Samir Acherar**, Maître de Conférences UHP, Nancy I.

***Monsieur le Docteur Régis Vanderesse**, un très grand merci pour votre accueil chaleureux au LCPM et le temps que vous m'avez consacré au cours de ce travail. Je remercie également tous les membres du LCPM pour leur chaleureux accueil.*

***Monsieur le Professeur Jean-Louis Merlin**, je vous adresse mes sincères remerciements pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail en tant que Président du jury. Je vous prie de croire en ma haute considération.*

***Monsieur le Docteur Samir Acherar**, je te remercie pour ton encadrement tout au long de cette thèse et ta grande disponibilité ainsi que tes qualités humaines et scientifiques.*

***Monsieur le Docteur Ludovic Colombeau**, je te remercie de tout cœur pour ton aide, ta grande disponibilité et ta patience au cours de ce travail. J'ai beaucoup apprécié tes compétences scientifiques et la clarté de tes explications.*

***Madame le Docteur Muriel Barberi-Heyob, Madame le Docteur Céline Frochot**, je vous adresse tous mes remerciements pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon travail en tant que membre du jury.*

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>5</b>
<b>CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Le cancer</b> .....	<b>7</b>
1.1. Origine cellulaire des cancers .....	7
1.1.1. Définition .....	7
1.1.2. Etapes de développement d'un cancer .....	7
1.2. Epidémiologie du cancer.....	9
1.3. Principe des différentes thérapeutiques anticancéreuses .....	11
1.3.1. La chirurgie.....	11
1.3.2. La radiothérapie .....	12
1.3.3. La chimiothérapie cytotoxique .....	12
1.3.4. L'hormonothérapie .....	13
1.3.5. L'immunothérapie.....	14
<b>2. La thérapie photodynamique</b> .....	<b>15</b>
2.1. Historique de la PDT .....	15
2.2. Principe de la PDT.....	17
2.2.1. Principe général.....	17
2.2.2. Mécanisme photophysique.....	18
2.2.3. Mécanisme de l'éradication tumorale après PDT .....	20
2.3. Les PS utilisés en PDT.....	22
2.3.1. Les PS de première génération .....	22
2.3.2. Les PS de seconde génération.....	25
2.3.3. Les PS de troisième génération.....	31
2.4. Applications de la thérapie photodynamique.....	36
2.4.1. Indications de la PDT.....	36
2.4.2. Place de la PDT dans le traitement du cancer .....	36
<b>3. L'angiogenèse tumorale</b> .....	<b>37</b>
3.1. Généralités.....	37
3.2. Mécanisme de l'angiogenèse .....	37
3.3. Les VEGF .....	38
3.3.1. Structure et isoformes du VEGF-A.....	39
3.3.2. Rôle des VEGF.....	39
3.3.3. Rôle des récepteurs et conséquences de leur inactivation .....	40
<b>CHAPITRE II : SYNTHESE PAR CHIMIE CLICK DE MOLECULES ASSOCIANT PS ET PEPTIDES DE CIBLAGE</b> .....	<b>42</b>
<b>1. Présentation du laboratoire et de ses partenaires</b> .....	<b>42</b>
1.1. Le LCPM .....	42
1.2. LE LRGP .....	43
1.3. Le CRAN .....	43

<b>2. Présentation du projet</b> .....	<b>44</b>
2.1. Introduction.....	44
2.2. Objectifs.....	44
2.3. La chimie click.....	45
2.3.1. Réaction nucléophile d'ouverture de cycle.....	46
2.3.2. Réaction de cycloaddition.....	46
<b>3. Activité de l'équipe PDT depuis 2003</b> .....	<b>46</b>
<b>4. Réalisation du projet</b> .....	<b>49</b>
4.1. Introduction.....	49
4.2. Démarche adoptée.....	49
4.3. Schéma synthétique.....	51
4.3.1. Synthèse du support fonctionnalisé par un azide.....	51
4.3.2. Synthèse du peptide.....	54
4.3.3. Synthèse du PS.....	57
4.3.4. Préparation des blocs support peptides.....	58
4.3.5. Préparation des blocs support PS.....	60
4.3.6. « Click » finale.....	62
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>64</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>66</b>
<b>ANNEXE</b> .....	<b>73</b>
<b>CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>75</b>
<b>1. General</b> .....	<b>75</b>
<b>2. Synthesis</b> .....	<b>76</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ahx	Acide aminohexanoïque
Ala (A)	Alanine
ALA	Acide 5-aminolévulinique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
Arg (R)	Arginine
Asp (D)	Aspartate
Boc	ter-Butyloxycarbonyle
BPD	Benzoporphyrine dérivée
BPD-MA	Dérivé monoacide de la benzoporphyrine dérivée
CAV	Centre Alexis Vautrin
ClAlPcS	Chloroaluminium phtalocyanine sulfonée
cm	Centimètres
CRAN	Centre de Recherche en Automatique de Nancy
DCC	Dicyclohexyle carbodiimide
DCI	1,1'-carbonyldiimidazole
DCM	Dichlorométhane
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DEG	Diéthylène glycol
$\delta$	Déplacement chimique
DHE	Ether de dihématoporphyrine
DIPEA	N,N-Diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
dTMP	désoxythymidine monophosphate
dUMP	désoxyuridine monophosphate
EGF	Endothelial Growth Factor
EGFR	Récepteur à l'EGF
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
ENSIC	Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques

eq.	Equivalent
ErbB (HER)	Human Epidermal growth factor Receptor
EtOAc	Acétate d'éthyle
F(ab') <sub>2</sub>	Portion d'immunoglobuline G issue de la digestion par la pepsine. Elle est constituée de deux fragments Fab et correspond à deux chaînes légères et deux morceaux de chaînes lourdes, ceux-ci étant liés par des ponts dissulfures.
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
Fmoc-Arg(Pbf)	Fmoc-N-Oméga-(2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-arginine
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GLUT	Transporteurs de glucose
GP	Groupe protecteur
GSOB	Groupe Synthèse Organique et Biosystèmes
GPMS	Groupe Polymères et Matériaux de Spécialité
HBTU	Hexafluorophosphate de 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
HDL	High Density Lipoprotein
HDR	Habilitation à Diriger des Recherches
Hp	Hématoporphyrine
HpD	Hématoporphyrine Dérivée
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IDL	Intervalle Drogue-Lumière
Ig	Immunoglobuline
Ig-like	Immunoglobuline like
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukine
IPS	Ingénierie Pour la Santé
IR	Infrarouge
<i>J</i>	Constante de couplage
KDR	Kinase insert Domain-containing Receptor
$\lambda$	Longueur d'onde

LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LCPM	Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire
LDL	Low Density Lipoprotein
Leu (L)	Leucine
LH-RH	Luteinising Hormone-Releasing Hormone
LRGP	Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
LTCD4	Lymphocyte T (cluster de différenciation 4)
LTCD8	Lymphocyte T (cluster de différenciation 8)
Lys (K)	Lysine
M	Moles par litre
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
mL	Millilitres
mmol	Millimoles
mol	Moles
MMP	Matrix Metallo Proteinase
mp	Melting point
MPA	acide (6-(4-hydroxy-6-méthoxy-7-méthyl-3-oxo-5-phthalanyl)-4-méthyl-4-hexénoïque
MsCl	Chlorure de mésyle
<i>m</i> -THPC	Isomère méta de la méso-tétrahydroxyphénylchlorine
<i>m</i> -THPP	Isomère méta de la méso-tétrahydroxyphénylporphyrine
<i>m/z</i>	Ratio masse sur charge
nm	Nanomètre
<i>o</i> -THPP	Isomère ortho de la méso-tétrahydroxyphénylporphyrine
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
NMP	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone
NRP	Neuropiline
Pbf	2,2,4,6,7-Pentaméthyl-dihydro-benzofuran-5-sulfonyl
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDT	Photodynamic Therapy
PE	Petroleum Ether
PlGF	Placental Growth Factor
Pp	Protoporphyrine
Pro (P)	Proline

PS	Photosensibilisateur
PTSH	Para-toluènesulfonylhydrazide
R <sub>f</sub>	Rétention frontale
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Espèces oxygénées réactives
RP-HPLC	Chromatographie liquide haute performance sur phase inverse
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
S <sub>N</sub> 2	Substitution nucléophile d'ordre 2
SnET2	Etiopurpurine d'étain
T <sub>amb</sub>	Température ambiante
<i>t</i> Bu	Tertiobutyle
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
Thr (T)	Thréonine
TIS	Triéthylsilane
TK	Tyrosine Kinase
TLC	Thin-layer chromatography
TPC	5-(4-carboxyphényl)-10,15,20- triphényl-chlorine
TPP	5-(4-carboxyphényl)-10,15,20- triphénylporphyrine
Trp (W)	Tryptophane
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Récepteur au Vascular Endothelial Growth Factor
VTP	Vascular Targeted Photodynamic therapy
v/v/v	Proportions volumiques dans un mélange de trois liquides

## INTRODUCTION

Je termine cette année mes études qui ont débuté à la faculté de pharmacie de Nancy, durant 5 ans, puis se sont poursuivies à l'école nationale supérieure des industries chimiques (ENSIC) durant 2 ans. Je suis actuellement en stage de fin d'études, stage à l'issue duquel j'obtiendrai le double diplôme « pharmacien – ingénieur ». Ce travail a été réalisé dans le cadre de mon projet de fin d'études à l'ENSIC. Touchant à la fois au domaine de la synthèse chimique et au domaine de la thérapeutique, ce sujet s'intègre bien dans mon cursus et m'a paru s'adapter tout à fait à la réalisation de ma thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Les travaux de synthèse débutés en mai 2010 sont poursuivis depuis septembre par le Docteur Ludovic Colombeau.

La thérapie photodynamique (PDT) est préconisée dans le traitement de certaines maladies dermatologiques, ophtalmologiques et en oncologie. Son principe est basé sur l'association de l'oxygène, de la lumière et d'un photosensibilisateur (PS) non toxique à l'obscurité. Les PS actuellement disponibles en clinique sont dotés d'une relativement faible sélectivité pour le tissu à traiter.

En PDT anticancéreuse, la destruction tumorale résulte, soit directement de réactions de photo-oxydation induites au sein de la cellule néoplasique, soit indirectement par une altération de la vascularisation entraînant une hypoxie tumorale. Les dommages vasculaires induits sont considérés comme étant un phénomène majeur, contribuant largement à l'efficacité du traitement. Cet effet anti-vasculaire de la PDT peut être potentialisé en élaborant des PS adressés se localisant préférentiellement au niveau du compartiment vasculaire tumoral. Ce nouveau mode de traitement photodynamique est appelé « Vascular Targeted Photodynamic therapy » (VTP).

Au sein du LCPM, dans l'objectif de favoriser l'effet anti-vasculaire de la PDT, la stratégie développée consiste à coupler le PS à un peptide reconnu par un récepteur impliqué dans la néovascularisation tumorale et surexprimé majoritairement par les cellules endothéliales angiogéniques. Le ciblage choisi implique le récepteur de type 2 au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et son co-récepteur la neuropiline 1 (NRP1).

Un PS couplé à un peptide (ATWLPPR) ciblant la NRP1, co-récepteur du VEGF<sub>165</sub>, a été synthétisé par des équipes de recherche de l'ENSIC (LCPM, DCPR). Au niveau moléculaire, le peptide se fixe sur la NRP1. Récemment, un pentapeptide, le TKPRR a montré de meilleurs résultats *in vitro* et *in vivo*.



Des améliorations doivent être apportées à cette stratégie pour réduire les phénomènes non spécifiques résultant d'une part, du caractère hydrophobe et agrégé du conjugué rendu moins affiné pour sa cible et d'autre part, d'une capture importante par le système réticulo-endothélial aboutissant à une dégradation du peptide.

Une solution pour améliorer la spécificité et l'efficacité de la PDT est d'utiliser une plateforme multifonctionnelle, permettant le couplage de PS et de peptides d'adressage. Pour ce faire, la chimie click est envisagée. Cette chimie originale nous permettra de coupler les PS et les peptides, mais également de jouer sur le nombre de chacune des entités.

L'objectif de ce projet est ainsi d'élaborer des molécules associant un à trois PS à un à trois peptides d'adressage afin d'augmenter la sélectivité de l'agent PS et la phototoxicité vis-à-vis des cellules tumorales. Neuf molécules différentes seront donc synthétisées. Les bras PS et peptides seront greffés sur des molécules support. Des bras espaceurs permettront de jouer sur la balance hydrophile/hydrophobe.

Ce manuscrit comprend dans un premier chapitre une synthèse bibliographique, divisée en trois sous-chapitres : nous définirons tout d'abord le cancer et présenterons les données épidémiologiques et les traitements existants. Le second sous-chapitre sera consacré à la PDT et décrira son principe, ses applications ainsi que les différents PS utilisés. Enfin nous développerons le mécanisme de l'angiogenèse tumorale, cible de la VTP.

Le second chapitre sera consacré à la réalisation du projet. Après avoir présenté le LCPM et ses différents partenaires, ainsi que la synthèse des résultats obtenus par le laboratoire sur ce sujet, nous décrirons la démarche adoptée pour la synthèse des différentes molécules ainsi que les résultats obtenus à ce jour.

# CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Le cancer

### 1.1. Origine cellulaire des cancers

#### 1.1.1. Définition

Le cancer est une tumeur maligne formée par la prolifération désordonnée des cellules d'un tissu ou d'un organe. Chaque cancer a un mode propre d'évolution selon le tissu d'origine, la localisation, le type histologique. On emploie le terme « carcinome » quand le tissu d'origine est épithélial ou glandulaire, et de « sarcome » quand le tissu d'origine est conjonctif.

#### 1.1.2. Etapes de développement d'un cancer

Le développement d'un cancer peut être décrit en trois étapes :

##### **Etape 1 : L'apparition du foyer cancéreux initial**

Trois étapes conduisent à l'apparition du foyer cancéreux :

*L'initiation cancéreuse* correspond à l'apparition de la première cellule transformée, sous l'influence d'agents carcinogènes qui peuvent être physiques, chimiques ou biologiques.

*La promotion* : Les agents carcinogènes sont des promoteurs qui miment les facteurs de croissance : la cellule initiée acquiert la capacité de proliférer indéfiniment.

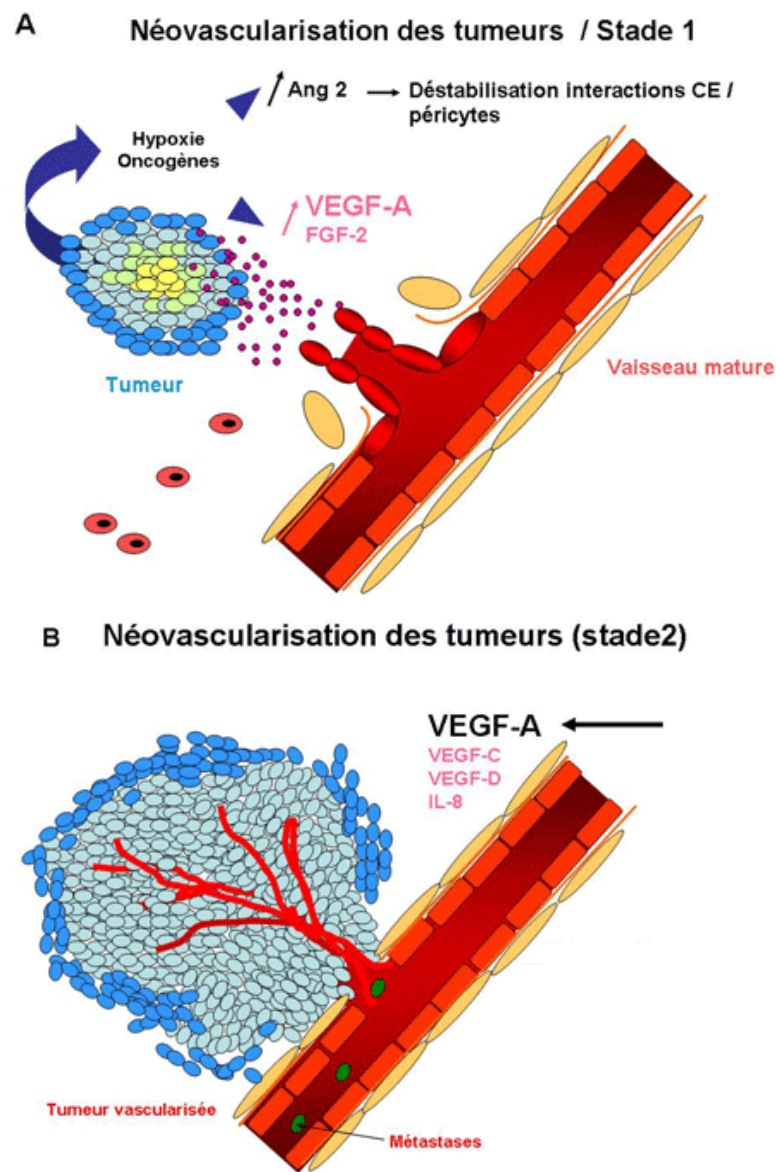
*La progression* : A cette étape, un phénotype tumoral émerge et les contrôles tissulaires disparaissent progressivement. Les cellules acquièrent des facteurs d'agressivité supplémentaires. Un clone cellulaire tumoral s'individualise.

##### **Etape 2 : La formation d'une tumeur maligne**

Une tumeur maligne est constituée par les cellules tumorales et le tissu hôte ayant réagi au voisinage de ces cellules.

Les cellules cancéreuses prolifèrent. Il se forme un réseau capillaire imparfait tumoral qui assure l'oxygénation, la nutrition et l'élimination des déchets de la tumeur : ce phénomène est appelé néo-angiogenèse (Figure 1). La tumeur en formation induit une réaction inflammatoire, liée à la prolifération massive et au relargage par les cellules

tumorales de différentes substances, et une réaction immunitaire liée à la présence d'antigènes non reconnus par l'organisme à la surface des cellules tumorales.



- A)** *Sous l'action de facteurs oncogéniques et métaboliques, la tumeur sécrète de l'angiopoïétine 2 qui déstructure les vaisseaux sanguins et du VEGF qui attire et fait croître les cellules endothéliales vers la tumeur.*
- B)** *La néovascularisation tumorale permet l'apport d'oxygène et de nutriments favorisant la croissance tumorale et la diffusion métastatique. Encart : image en microscopie électronique des vaisseaux sanguins tumoraux.*

**Figure 1 : Initiation de l'angiogenèse**

### **Etape 3 : Invasion et dissémination cancéreuse**

Au départ, l'invasion est locale : le cancer se développe *in situ*. Les cellules prolifèrent vers l'intérieur du tissu sans franchissement de la membrane basale. Puis la sécrétion d'enzymes protéolytiques entraîne la destruction de la membrane basale et l'invasion des autres tissus.

Le processus de métastase survient par décrochement de quelques cellules cancéreuses du foyer primaire, qui conduisent à la formation de foyers tumoraux secondaires. La dissémination a lieu par voie sanguine ou lymphatique (Figure 2). Elle peut survenir à tout stade de développement de la tumeur.

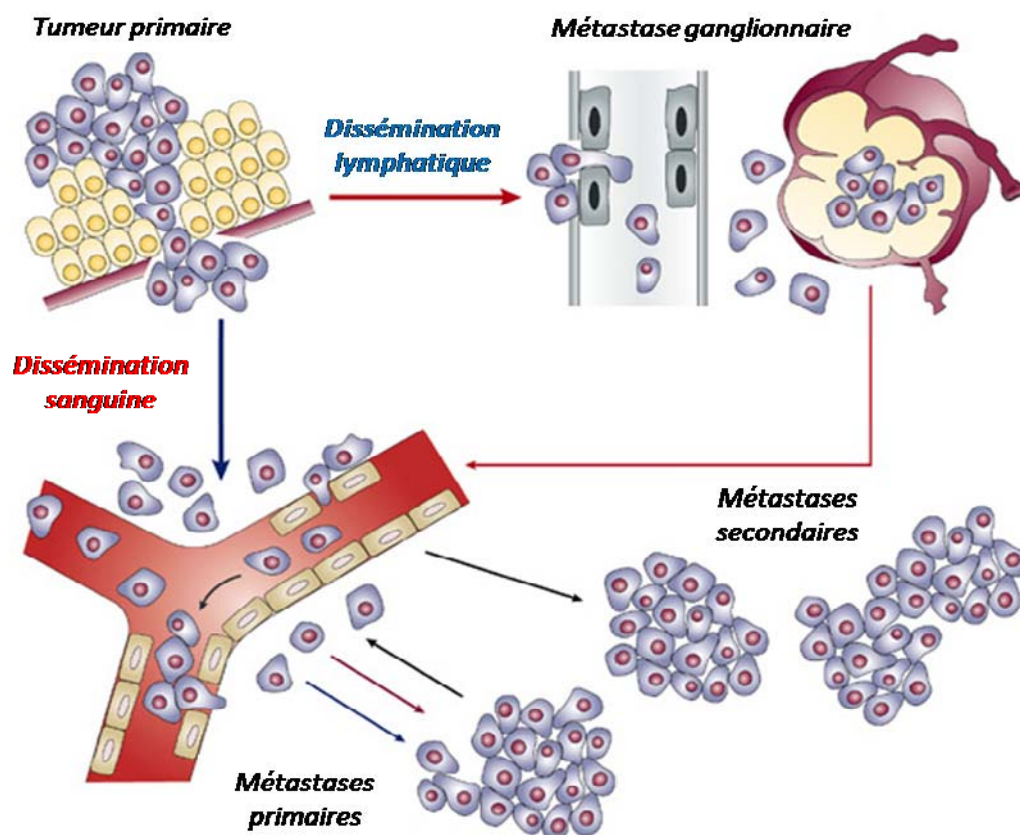


Figure 2 : La dissémination cancéreuse<sup>[1]</sup>

## **1.2. Epidémiologie du cancer**

Le nombre de nouveaux cas de cancer en 2008 en France a été estimé à près de 350.000 pour les deux sexes confondus (320.000 en 2005), 205.000 chez les hommes (59%) et 145.000 chez les femmes (41%). Les trois cancers les plus fréquents chez l'homme sont le cancer de la prostate (entre 66.000 et 83.000 nouveaux cas selon les scénarios), le cancer du poumon (24.000 nouveaux cas), et le cancer du côlon-rectum

(20.000 nouveaux cas). Chez la femme, les trois cancers les plus fréquents sont le cancer du sein avec 50.000 nouveaux cas, le cancer du côlon-rectum avec 18.000 nouveaux cas et le cancer du poumon avec 8.000 nouveaux cas. Les cancers les plus fréquents chez les enfants sont les leucémies, majoritairement des leucémies aiguës lymphoblastiques. [2]

Entre 1980 et 2005, le nombre de nouveaux cas de cancer a presque doublé chez l'homme (augmentation de 93%) et a progressé de 84% chez la femme.[3]

L'analyse des données fournies par les registres de cancer et les analyses collectives coordonnées ces dernières années par différents organismes (Inserm, Académie de Médecine)[4-6] permettent d'expliquer en partie ces chiffres.

Entre 1980 et 2005, 25% de l'augmentation du nombre de cas est due à l'augmentation de la population et 20% à son vieillissement (le risque de cancer augmentant avec l'âge).[7,8] L'augmentation du risque de cancer (mesuré par le taux d'incidence standardisé) n'intervient en fait que pour un peu plus de la moitié dans l'augmentation du nombre de cas (52% chez l'homme et 55% chez la femme). Cette augmentation du taux d'incidence entre 1980 et 2005 est ainsi moins importante que celle du nombre de cas, soit +35% chez l'homme et +43% chez la femme.

Le nombre de décès par cancer en 2005 a été estimé à 146.000, traduisant une augmentation de 13% depuis 1980. Cette augmentation du nombre de décès par cancer n'est liée qu'aux changements démographiques (augmentation et vieillissement de la population française), et le risque de mortalité par cancer a en fait diminué de 22% (Figure 3).

	<b>Incidence</b>	<b>Taux d'incidence</b>	<b>Mortalité</b>	<b>Taux de mortalité</b>
<b>Population</b>	<b>+ 89%</b>	<b>+ 39%</b>	<b>+ 13%</b>	<b>- 22%</b>
Homme	+ 93%	+ 43%	+ 13%	- 25%
Femme	+ 84%	+ 35%	+ 13%	- 20%

**Figure 3 : Évolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2005**

Ainsi, on observe une augmentation de l'incidence et une baisse de la mortalité au cours du temps. Cette divergence s'explique en particulier par le fait que l'incidence des cancers les plus agressifs (cancer de l'œsophage, de l'estomac et des voies aérodigestives supérieures) chute ces dernières années, tandis que les cancers de pronostic plus favorable (cancers du sein et de la prostate) sont en augmentation.

Considérant l'ensemble des localisations cancéreuses dont l'incidence augmente, chez la femme, la moitié des cas supplémentaires sont représentés par des cancers du sein, et chez l'homme environ 70% des cas supplémentaires sont représentés par des cancers de la prostate : ces deux cancers ont fait l'objet d'un dépistage croissant ces 25 dernières années, d'où une évolution inverse de leur incidence et de leur mortalité. Ainsi, ces résultats confirment qu'à côté des évolutions démographiques, les modifications des pratiques médicales et en particulier l'extension du dépistage, jouent un rôle important dans l'augmentation du nombre de cas de cancers en France.

Cependant, l'hypothèse que les modifications de l'environnement soient responsables en partie de cette augmentation doit faire l'objet d'un effort de recherche portant à la fois sur l'existence et la nature de la cause et sur la mesure de l'exposition des populations à des cancérigènes avérés ou probables.

### **1.3. Principe des différentes thérapeutiques anticancéreuses**

Différentes formes de traitement peuvent détruire les cellules cancéreuses. Le cancer est presque toujours traité par chirurgie, radiothérapie ou chimiothérapie. Les médecins associent souvent plusieurs de ces traitements pour tenter d'obtenir les meilleurs résultats.

#### *1.3.1. La chirurgie*

Depuis une dizaine d'années, la chirurgie est devenue un traitement pluridisciplinaire associant la chimiothérapie, la radiothérapie ou l'hormonothérapie après intervention.

La chirurgie a pour but de retirer la tumeur. Généralement, il est nécessaire de retirer la totalité de l'organe atteint : mastectomie pour le sein, lobectomie ou pneumonectomie pour le poumon, colectomie pour le gros intestin, néphrectomie pour le rein, hystérectomie pour l'utérus... Dans des cas plus rares, lorsque la tumeur est petite et bien circonscrite, il est possible de la retirer : il s'agit alors d'une tumorectomie. C'est en particulier le cas dans de petits cancers du sein. La chirurgie est alors obligatoirement complétée d'une radiothérapie post-opératoire.

### *1.3.2. La radiothérapie*

La radiothérapie vise à détruire la tumeur par des rayons. 60 à 70% des patients atteints d'un cancer bénéficient de la radiothérapie, le plus souvent en association avec la chirurgie ou la chimiothérapie. Il existe différents types de radiothérapie :

La **téléradiothérapie** consiste à irradier la tumeur à distance. Elle peut faire appel à des hautes énergies (photons ou électrons) grâce à l'utilisation d'une « bombe » au Cobalt (cobaltothérapie) ou d'un accélérateur de particules, ou à de basses énergies par l'emploi d'électrons (électronthérapie). Les hautes énergies visent à irradier les tumeurs profondes tandis que les énergies plus faibles irradient les tumeurs superficielles, notamment celles atteignant la peau ou situées en dessous.

La **curiethérapie** consiste à introduire des sources radioactives au contact ou à l'intérieur de la tumeur. Le plus souvent on utilise des fils d'Iridium ( $^{192}\text{Ir}$ ) qu'on introduit dans la tumeur ou le lit tumoral, après avoir retiré chirurgicalement la tumeur. La curiethérapie est donc un véritable acte chirurgical après lequel le malade est isolé dans une chambre protégée par une chape de plomb, pour éviter tout contact extérieur. A la fin du traitement, les sources radioactives sont retirées par le radiothérapeute. Toute curiethérapie nécessite une hospitalisation d'environ 5 jours. La curiethérapie n'est utilisée que dans quelques cas, et pour des cancers très localisés : cancer du col de l'utérus, certains cancers du corps de l'utérus, certains cancers du sein.

La **radiothérapie métabolique** utilise une source radioactive injectable ( $^{131}\text{I}$  dans le traitement du cancer de la thyroïde).

### *1.3.3. La chimiothérapie cytotoxique*

Il s'agit d'un traitement général, diffusé dans tout l'organisme. Les médicaments cytotoxiques agissent sur la reproduction et la division des cellules, entraînant leur mort. Leur cytotoxicité les fait s'attaquer à toutes les cellules de l'organisme en cours de division et provoque donc de nombreux effets secondaires au traitement. Ces médicaments sont administrés le plus souvent en perfusion intraveineuse, plus rarement par voie intramusculaire ou par voie orale. Les perfusions sont généralement de courte durée (une demi-heure à 2h par jour), mais elles peuvent dans certains cas être administrées en continu, grâce à l'utilisation de pompes portables. Lorsque l'état général de la personne le permet, les séances de chimiothérapie sont administrées en ambulatoire. L'administration se fait par cycles dont le rythme varie selon les protocoles: il peut être de 3 à 4 jours de suite toutes les 3 à 4 semaines, ou 1 jour toutes

les semaines, ou encore 2 jours toutes les 2 semaines. L'intervalle libre entre les chimiothérapies permet une récupération des tissus sains.

Certains médicaments sont associés dans le but d'obtenir des combinaisons synergiques, permettant d'agir sur plusieurs étapes du cycle cellulaire en même temps et ainsi d'obtenir le maximum de destruction des cellules cancéreuses. Un examen clinique et biologique du patient est nécessaire avant chaque cure.

La chimiothérapie s'envisage pour 4 actions thérapeutiques :

- **curative** (cancer du testicule, leucémies et tumeurs d'enfants, maladies de Hodgkin, choriocarcinome placentaire),
- **adjuvante** (après le stade appelé "phase locale" correspondant au début de l'invasion tumorale, elle fait donc suite à un traitement locorégional),
- **néo-adjuvante** (avant la "phase locale"),
- **palliative**

Le choix entre les différents protocoles dépend de la nature de la tumeur, de sa localisation, de l'atteinte ou non d'autres organes et des résultats des examens complémentaires.

Actuellement, de nouveaux traitements expérimentaux font l'objet d'études afin de diminuer les effets secondaires et de traiter plus efficacement certains types de cancers : l'hormonothérapie, l'immunothérapie et la thérapie photodynamique en font partie.

#### *1.3.4. L'hormonothérapie*

Certains cancers, dits hormono-dépendants ou hormono-sensibles, se développent sous l'action d'une hormone. L'hormonothérapie a pour objectif d'inhiber la sécrétion des hormones pour bloquer le développement des cellules malignes.

Elle peut agir à différents niveaux :

- *l'hypophyse*, glande qui sécrète des hormones gérant de nombreuses fonctions corporelles, et stimulant d'autres glandes endocrines : certains médicaments comme les analogues de la LH-RH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) inhibent la sécrétion des hormones sexuelles et sont utilisés dans le cancer du sein et de la prostate.
- *l'organe qui sécrète l'hormone*
  - en procédant à son ablation : en retirant les ovaires, on peut traiter certains cancers du sein. Cette méthode est rarement pratiquée,



- par un traitement médicamenteux : inhibition de la production d'œstrogènes par action sur la glande surrénale.
- *la tumeur* : les anti-androgènes et anti-œstrogènes bloquent l'action des hormones sur la tumeur. Ils sont utilisés dans certains cancers du sein.

### 1.3.5. L'immunothérapie

L'immunothérapie stimule les défenses normales de l'organisme afin que celui-ci lutte contre la tumeur maligne et la détruisse. Elle prend une place de plus en plus importante à côté des thérapeutiques classiques que constituent la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

Notre système immunitaire possède des armes de destruction des cellules cancéreuses, mais celles-ci ne sont pas mobilisées du fait d'une part du caractère peu immunogène des tumeurs, et d'autre part d'un système immunitaire qui peut être affaibli. Pour améliorer le fonctionnement du système immunitaire, il faut donc agir sur l'un ou l'autre de ces deux aspects. Les différentes modalités de l'immunothérapie sont :

- *l'immunothérapie non spécifique*, qui conduit à une augmentation de l'activité globale du système immunitaire. On utilise notamment des cytokines, par exemple l'interféron alpha, qui stimule la prolifération des cellules immunitaires.
- *l'immunothérapie spécifique ou vaccination thérapeutique* :  
 Cette stratégie consiste à prélever, puis à mettre en culture les cellules tumorales ou les cellules immunitaires du malade. Un gène est ensuite introduit dans ces cellules, avec pour objectif de les rendre plus immunogènes lorsqu'il s'agit de cellules tumorales, ou de les stimuler pour les rendre plus agressives vis-à-vis de la tumeur lorsqu'il s'agit de cellules immunitaires. Les cellules sont ensuite réinjectées dans le sang du malade. La vaccination thérapeutique est à distinguer de la vaccination préventive, qui a pour objectif de prévenir l'apparition d'une maladie chez un sujet sain.<sup>[9,10]</sup>

## 2. La thérapie photodynamique

La PDT est une méthode curative qui implique l'excitation par la lumière d'un agent PS en présence de dioxygène. Cette molécule produit alors des espèces chimiques oxydantes qui seront toxiques pour les cellules. La PDT est utilisable dans différents types de cancers épithéliaux, tels que le cancer de la peau, du poumon, de l'œsophage, de la vessie, de l'estomac, du col de l'utérus. Bien qu'elle ne soit encore qu'un traitement de recherche clinique, cette méthode, efficace et peu traumatisante suscite un engouement croissant dans le monde scientifique et médical.

### 2.1. Historique de la PDT

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis l'Antiquité. Les Egyptiens l'utilisaient déjà combinée à des substances naturelles pour traiter des maladies de peau, telles que le vitiligo.

Le concept de photosensibilisation apparaît en 1898 quand Oscar Raab décrit pour la première fois le phénomène phototoxique : l'association d'un colorant (l'acridine, Figure 4) et de lumière (les deux éléments pris séparément n'ayant pas d'action) entraîne la mort d'organismes vivants : les paramécies.

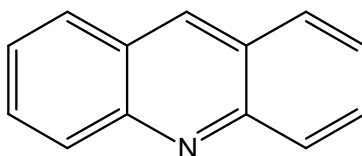
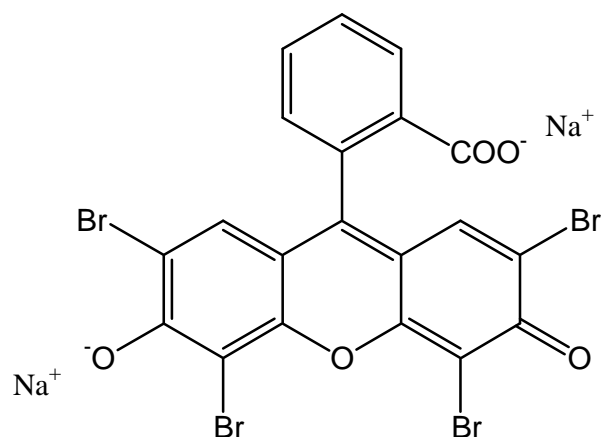


Figure 4 : L'acridine

Les médecins allemands Tappeiner et Jesionek ont introduit, en 1903, le concept de thérapie photodynamique en traitant un sujet atteint d'un cancer de la peau par l'action combinée de l'éosine (Figure 5) et de la lumière solaire.<sup>[11]</sup> En 1904, Tappeiner suppose que l'oxygène est essentiel pour le processus et introduit le terme « d'action photodynamique ».



**Figure 5 : L'éosine**

Dix ans plus tard, Meyer-Betz démontre l'action photosensibilisatrice de l'hématoporphyrine (Hp) (Figure 9) en s'injectant 200 mg de ce composé : il constate que les effets toxiques ne se développent qu'après exposition à la lumière solaire.<sup>[12]</sup>

C'est le français Policard, en 1924, qui attribue à l'accumulation de porphyrines endogènes dans les cellules cancéreuses la fluorescence rouge des tumeurs observée sous lumière ultraviolette.<sup>[13]</sup> En 1948, Figge et Weiland proposent d'exploiter la phototoxicité de l'Hp pour traiter les tumeurs cancéreuses épithéliales.<sup>[14]</sup> Cependant, le manque de sélectivité du PS pour les tissus cancéreux inflige de graves lésions aux tissus sains environnants.<sup>[15]</sup> En vue d'atténuer les effets secondaires de la PDT, Lipson *et al.* ont pratiqué sur l'Hp commerciale un traitement acide suivi d'une hydrolyse alcaline, obtenant ainsi l'« hématoporphyrine dérivée » (ou HpD)<sup>[16]</sup> (Figure 10).

Dix ans après sa mise au point, l'HpD a contribué au véritable essor de la PDT, grâce aux travaux de Dougherty. En premier lieu, il éradique totalement des tumeurs cutanées chez la souris par l'action de l'HpD et de la lumière rouge d'une lampe à arc à Xénon.<sup>[17]</sup> Puis il publie les résultats des premiers essais cliniques en 1978.<sup>[18]</sup> Toujours pionnier dans ce domaine, il remplacera par la suite la lampe à arc par le laser qui permet d'irradier sélectivement la zone à traiter. Entre 1983 et 1985, il identifie les fractions actives de l'HpD conférant les propriétés photosensibilisantes au mélange initial (l'éther et l'ester de dihématoporphyrine). A la même période, Weishaupt montre que la phototoxicité de ce nouvel agent est due à la production intracellulaire d'oxygène singulet après absorption de l'énergie photonique.<sup>[19]</sup>

En 1996, une fraction enrichie en composés les plus actifs de l'HpD est commercialisée sous l'appellation Photofrin®.

## 2.2. Principe de la PDT

### 2.2.1. Principe général

Le principe de la PDT est représenté sur la Figure 6. Suite à l'injection, généralement par voie intraveineuse du PS, celui-ci va peu à peu s'accumuler préférentiellement dans les tissus tumoraux. Un délai de quelques heures est requis pour que l'agent intègre les cellules cancéreuses. Les raisons de l'accumulation des porphyrines dans les tumeurs ne sont pas entièrement élucidées car ce processus est complexe et fait intervenir différents facteurs, qui dépendent eux-mêmes du type de tumeur, de sa taille, de sa microvascularisation. Au cours de ces dernières années, des travaux ont souligné le rôle des lipoprotéines de basse densité (LDL) dans cette accumulation sélective.<sup>[20]</sup> Les LDL sont, avec les lipoprotéines de haute densité (HDL), les principaux transporteurs sanguins des porphyrines. Il a ainsi été montré que les cellules cancéreuses expriment plus de récepteurs spécifiques des LDL que les cellules normales.<sup>[21]</sup> De plus, des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont confirmé le rôle important du récepteur spécifique des LDL dans la capture cellulaire des porphyrines.<sup>[22]</sup>

Les zones tumorales sont alors irradiées par une lumière rouge. La longueur d'onde est choisie de façon à favoriser au maximum la pénétration de la lumière dans les tissus, et de façon à se placer à un pic d'absorption du PS.

L'irradiation aboutit, après une succession de processus photochimiques, à la nécrose ou à l'apoptose des cellules tumorales. Un temps court après l'injection du PS favorise la destruction de la néovascularisation (effet vasculaire). Un temps long, correspondant au maximum de fixation du PS dans les tissus pathologiques ou au ratio maximal entre tissus pathologiques et tissus sains, favorise la destruction des cellules néoplasiques (effet cellulaire).<sup>[23]</sup>

L'irradiation entraîne également l'émission d'une fluorescence, utile pour un diagnostic topographique des tumeurs.

Les sources de lumière sont des lasers, des diodes laser ou des lampes filtrées. La lumière est amenée par une fibre optique ; elle est distribuée par un diffuseur qui permet une illumination homogène du site à traiter.

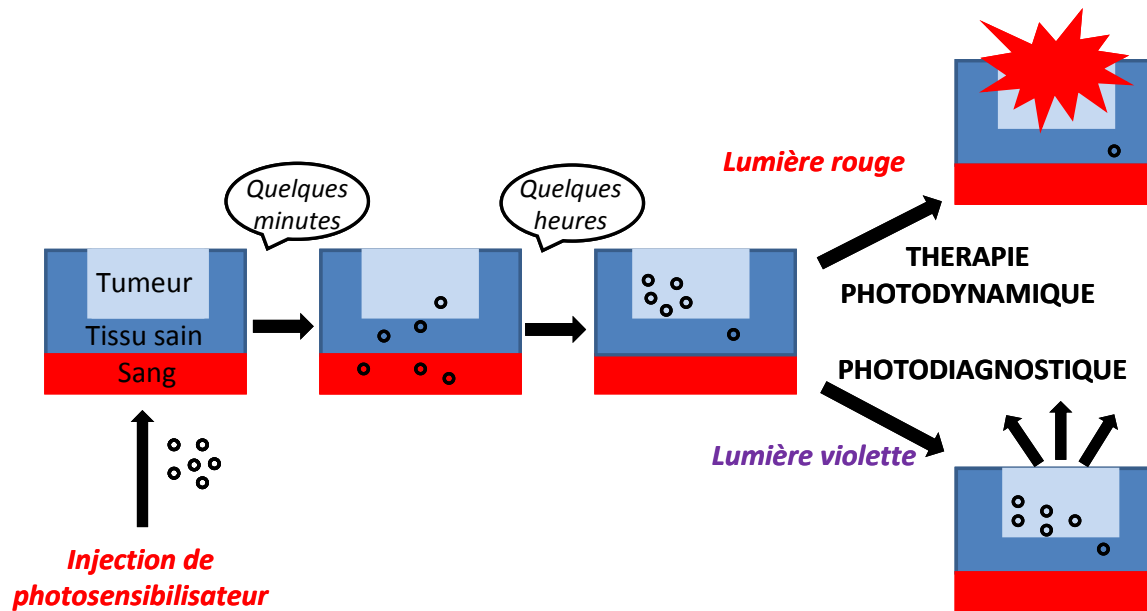


Figure 6 : Principe de la PDT

### 2.2.2. Mécanisme photophysique

Le PS absorbe un photon, et se trouve alors dans un état excité. Le retour à l'état fondamental peut se faire selon différentes voies. Deux d'entre elles sont la conversion interne de l'énergie photonique en chaleur et l'émission de fluorescence. Il est intéressant que le PS ait un rendement quantique de fluorescence relativement élevé. En effet, cette propriété d'émission de fluorescence des PS peut être mise à profit pour la détection et l'imagerie des tumeurs. Cependant, pour être un PS potentiel, la molécule doit pouvoir stocker l'énergie plus longtemps (de l'ordre de la milli à la microseconde). Cette situation est possible lorsque l'électron change d'état de spin, donnant lieu à une situation transitoire appelée conversion inter-système. Ce dernier mécanisme conduit à la formation du PS à l'état triplet. Il peut alors retourner à l'état fondamental (phénomène de phosphorescence) où il sera de nouveau disponible pour l'absorption d'un photon ou transférer son énergie aux molécules environnantes et notamment à l'oxygène.<sup>[24]</sup> (Figure 7)

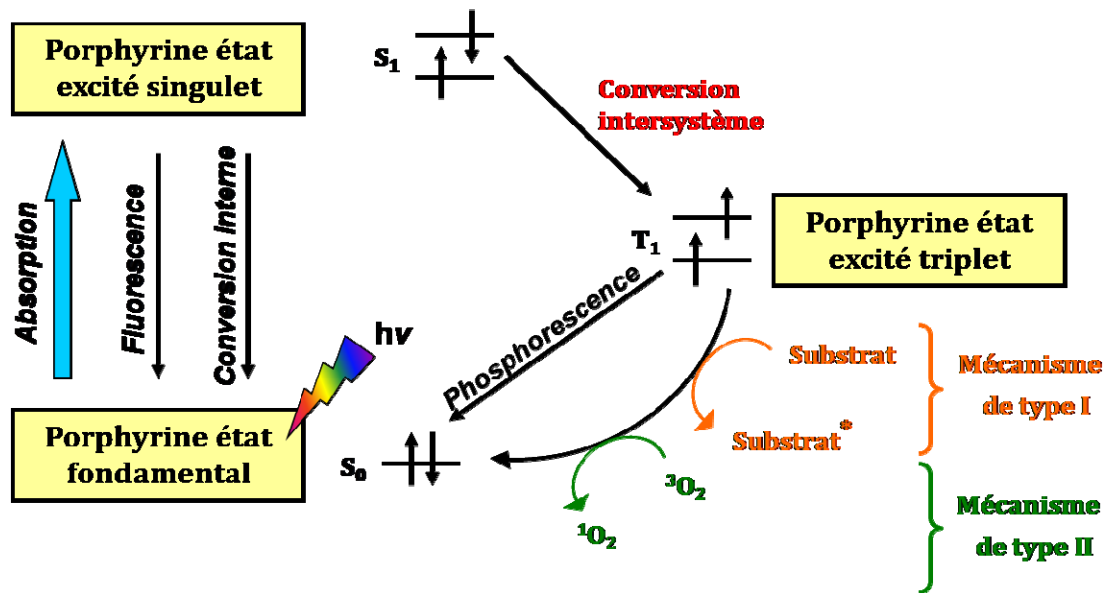
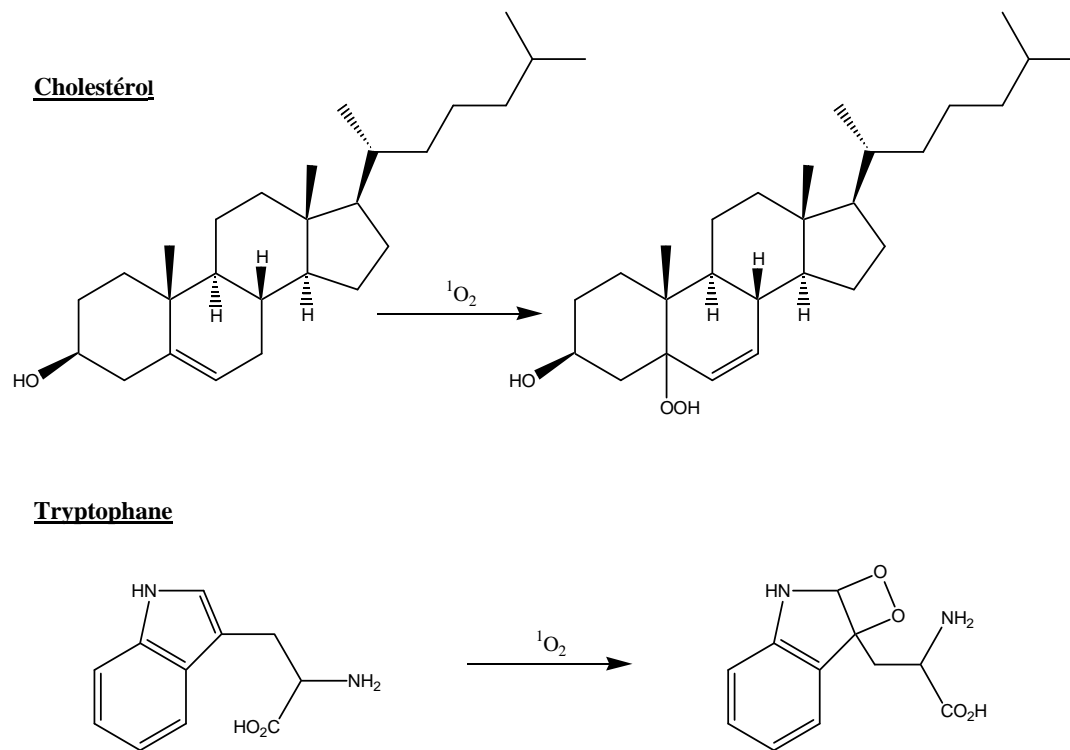


Figure 7 : Mécanisme photochimique de la PDT

L'interaction avec les molécules avoisinantes peut se faire selon deux mécanismes :

- *Le mécanisme de type I* : Il correspond à un transfert d'électrons du PS vers des substrats biologiques, qui entraîne la formation de radicaux libres intermédiaires. Ces radicaux réagissent avec l'oxygène pour former des espèces oxygénées réactives (ROS) :  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$  et peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), toxiques pour les cellules.<sup>[25]</sup>
- *Le mécanisme de type II* : La majorité des molécules utilisées en PDT agissent par ce mécanisme. Il correspond à un transfert de l'énergie d'excitation vers l'oxygène moléculaire à l'état fondamental (état triplet) pour produire de l'oxygène singulet, qui est une forme excitée de l'oxygène. L'oxygène singulet peut réagir avec pratiquement toutes les biomolécules présentant une liaison  $\Pi$  : les acides aminés (principalement tryptophane, histidine, méthionine), les phospholipides, le cholestérol, certaines bases nucléiques (guanine).<sup>[26]</sup> La Figure 8 représente l'oxydation du cholestérol et la cyclisation du tryptophane après réaction avec l'oxygène singulet. Cependant son rayon d'action se limite à son site de formation car sa durée de vie est très courte (de l'ordre de la nanoseconde).<sup>[27]</sup> Il est responsable de l'altération structurale de protéines membranaires, la peroxydation de lipides insaturés, l'altération de l'ADN. L'ensemble de ces processus entraîne la mort cellulaire.



**Figure 8 : Exemple d'oxydation et de cyclisation de molécules après réaction avec l'oxygène singulet**

### 2.2.3. Mécanisme de l'éradication tumorale après PDT

Trois mécanismes d'éradication tumorale sont décrits :

- un effet direct de destruction des cellules tumorales,
- un effet indirect dû à une réaction immunitaire et inflammatoire de l'hôte,
- un effet indirect par destruction de la vascularisation tumorale, privant la tumeur de nutriments et dioxygène et conduisant ainsi à la destruction tumorale.

#### 2.2.3.1. Effet direct

Les dommages cellulaires produits par les PS se traduisent par deux effets principaux : la nécrose et l'apoptose. Le type de mort cellulaire est influencé par de nombreux facteurs dont la concentration, les propriétés physico-chimiques, la localisation subcellulaire du PS, la concentration en oxygène, l'intensité de la lumière, le type cellulaire.<sup>[28]</sup>

La nécrose est une mort non programmée et accidentelle causée par des dommages physiques ou chimiques sévères. Elle se traduit par un gonflement du cytoplasme, une destruction des organites et une altération de la membrane cytoplasmique, qui conduit à la libération d'enzymes cytoplasmiques et lysosomales. Ces enzymes provoquent une réaction inflammatoire dans le milieu environnant la cellule.

L'*apoptose* est une mort programmée. Elle correspond à l'élimination normale des cellules, en équilibre avec la prolifération cellulaire. Le « suicide cellulaire » est activé pour éliminer sélectivement des cellules devenues indésirables, telles que des cellules lésées, des cellules reconnues comme étrangères ou des cellules tumorales. Au cours de l'*apoptose*, les constituants cellulaires sont dégradés à l'intérieur de la cellule, sans rupture de la membrane cytoplasmique. Il n'y a donc pas de réaction inflammatoire autour de la cellule apoptotique et celle-ci est rapidement dégradée.

De récentes études ont mis en évidence un autre type de mort cellulaire programmée après une PDT, l'autophagie. Cette autodigestion est réalisée par des enzymes lysosomales qui dégradent la plupart des macromolécules biologiques.<sup>[29]</sup>

### **2.2.3.2. Effet indirect**

#### **a. Réaction immunitaire et inflammatoire**

Suite à la nécrose cellulaire, des médiateurs de l'inflammation sont déversés massivement dans le milieu extracellulaire.<sup>[30]</sup> On observe après PDT, une augmentation des taux circulants d'interleukine 1-bêta (IL-1b), d'IL-6, de MIP 1 et 2 (Macrophage Inflammatory Protein) et de G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor).<sup>[31]</sup> Les signaux inflammatoires post-PDT initient une invasion de neutrophiles, mastocytes, monocytes et macrophages.<sup>[32]</sup> Les macrophages sont capables de phagocyter les débris cellulaires et servent également de cellules présentatrices d'antigènes.

Les épitopes présentés en surface des macrophages peuvent être reconnus par des lymphocytes T CD4+ (LTCD4+). Ces lymphocytes ainsi activés activent à leur tour des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (LTCD8) qui peuvent détruire spécifiquement les cellules porteuses de ces épitopes. La réponse immunitaire systémique qui s'ensuit peut alors induire la destruction des cellules tumorales restantes ou la prévention de métastases, par développement d'une réponse immunologique à mémoire.<sup>[33]</sup>

#### **b. Effet antivasculaire**

Des dommages vasculaires dus à la PDT contribuent à l'éradication tumorale.

L'altération des cellules endothéliales a pour conséquences :

- des lésions des vaisseaux irriguant la tumeur,
- une vasoconstriction, une fuite de macromolécules depuis les vaisseaux, une adhésion de leucocytes et la formation de thrombi par l'activation plaquettaire et la libération de thromboxane.<sup>[34, 35]</sup>



Ces évènements conduisent à une destruction tumorale par collapsus vasculaire, arrêt du flux sanguin ou hémorragie.<sup>[36]</sup>

### 2.3. Les PS utilisés en PDT

Les molécules utilisées en PDT des cancers sont essentiellement des PS tétrapyrroliques. A partir de ces molécules, ont pu être définis les critères que doivent remplir un agent thérapeutique adapté, ce qui a donné naissance à une seconde génération de PS. Ces molécules de synthèse sont actuellement utilisées en clinique. Les recherches s'orientent maintenant sur leur combinaison avec des groupements de vectorisation afin d'augmenter la spécificité des PS et de diminuer ainsi les effets secondaires.

#### 2.3.1. Les PS de première génération

Les PS de première génération regroupent l'Hp qui est obtenue à partir du sang soumis à des conditions acides, et ses dérivés que sont l'HpD et le Photofrin<sup>®</sup>.

##### a. L'hématoporphyrine dérivée (HpD)

L'Hp est isolée à partir de l'hémoglobine traitée en milieu acide. C'est un produit aisément obtenu mais il ne présente pas de réelle sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses (Figure 9).

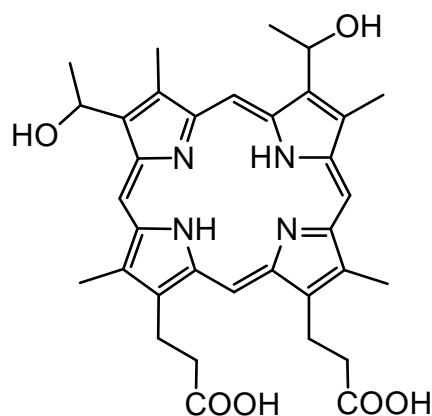
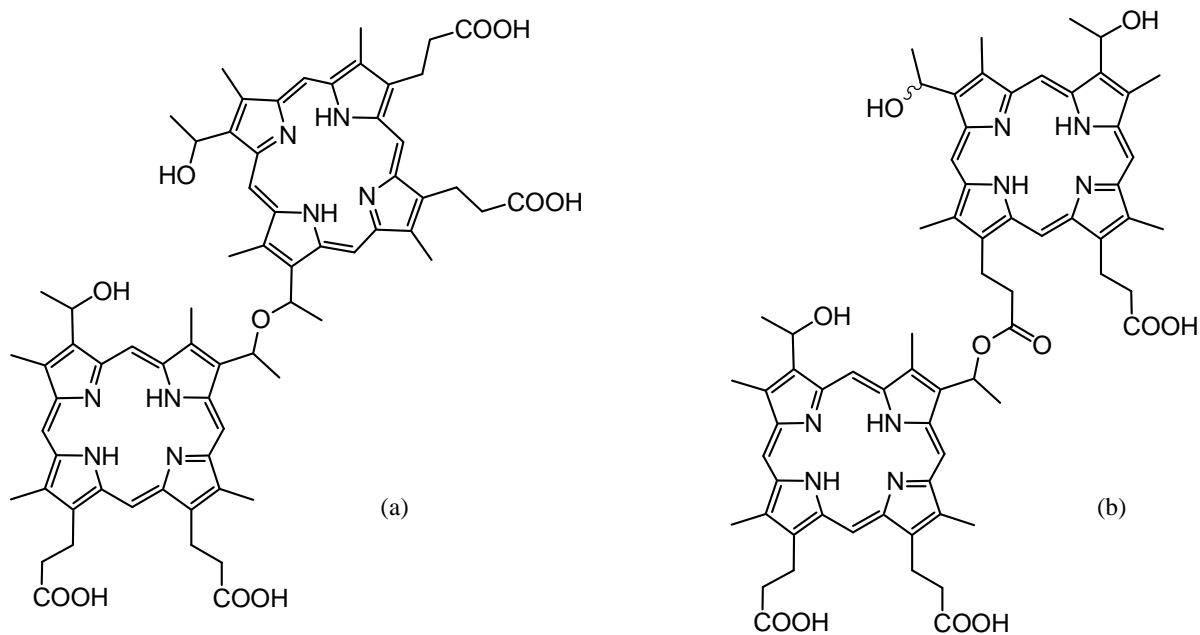


Figure 9 : Structure de l'hématoporphyrine

L'HpD est obtenue par acétylation du dihydrochlorhydrate d'hématoporphyrine suivie de la neutralisation du produit de la réaction par la soude. Il s'agit d'un mélange complexe de diverses porphyrines : l'analyse par HPLC a montré la présence de plusieurs monomères parmi lesquels l'Hp (20%), l'hydroxy-éthyl-vinyl-deutéro-porphyrine (20 à 30%), la protoporphyrine IX (3 à 5%), et 50% de molécules

correspondant à un mélange d'oligomères sous formes d'éther et/ou d'esters d'hématoporphyrines (Figure 10). Les monomères semblent avoir une activité anti-tumorale réduite<sup>[37]</sup>.



(a) Ether de dihématoporphyrine (DHE)

(b) Ester de dihématoporphyrine

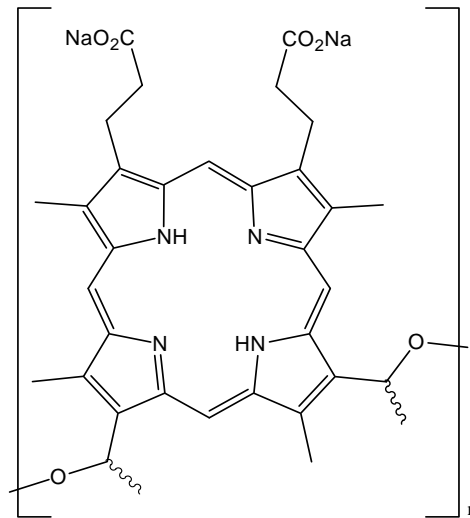
**Figure 10 : L'hématoporphyrine dérivée (HpD)**

## b. Le Photofrin<sup>®</sup>

Le Photofrin<sup>®</sup> (Figure 11), obtenu par purification partielle de l'HpD, correspond à un mélange enrichi en oligomères porphyriniques. Il est constitué à 80-90% de DHE.<sup>[38]</sup> Seuls les dimères et trimères d'Hp, formés par des ponts éthers, constituent la fraction active du Photofrin<sup>®</sup>. Ces premiers agents ont une bonne phototoxicité. Cependant, il s'agit de mélanges complexes mal définis, d'où certains problèmes :

- La reproductibilité de la préparation d'un échantillon est mauvaise.<sup>[39]</sup>
- Après injection, ils s'accumulent dans l'épiderme et s'éliminent lentement (3 à 6 semaines), d'où une photosensibilité cutanée des patients. Le maintien en chambre noire, le port de vêtements de protection et de lunettes pendant 4 à 8 semaines après le traitement permettent d'éviter les photoréactions telles que les brûlures solaires.<sup>[40]</sup>
- Leur faible sélectivité pour les cellules malignes entraîne un risque de lésion des tissus avoisinants et nécessite une application lumineuse extrêmement précise.

- Ils ne présentent qu'une faible absorption à 630 nm. Leur utilisation se limite donc au traitement de tumeurs épithéliales superficielles : le Photofrin® a une AMM pour le traitement des cancers des bronches et de l'œsophage.



**Figure 11 : Le Photofrin® (n=1-9)**

A partir de ces observations, les caractéristiques d'un PS idéal ont été définies. Celui-ci doit :

- Etre de structure chimique parfaitement définie et être synthétisé de façon reproductible. Cette synthèse doit être transposable à grande échelle.
- Se concentrer spécifiquement dans les cellules tumorales et être éliminé le plus rapidement possible des tissus sains pour ne pas générer d'effets secondaires.
- Absorber des lumières de longueur d'onde plus élevée afin d'obtenir un traitement lumineux efficace pour des tumeurs plus profondes.
- Etre stable vis-à-vis des enzymes circulantes et de la lumière d'irradiation afin d'atteindre les cellules cancéreuses intact et ne pas être dégradé trop rapidement lors de l'illumination.
- Avoir une forte réactivité photochimique à l'état triplet afin de produire efficacement de l'oxygène singulet. De plus, il ne doit pas s'agréger dans le milieu cellulaire car ce phénomène entraîne une forte diminution du rendement de formation d'oxygène singulet.

### 2.3.2. Les PS de seconde génération

La mise au point de PS de seconde génération s'est donc révélée indispensable. Ceux-ci présentent de nombreux avantages par rapport aux molécules précédentes. En effet, ils sont activés avec une lumière de longueur d'onde comprise entre 600 et 800 nm, permettant une augmentation de la profondeur de pénétration de la lumière dans le tissu. Ce sont des composés purs. Enfin, ils sont rapidement éliminés par les tissus, limitant ainsi la période de photosensibilisation cutanée.

Cette seconde génération de PS comprend plusieurs familles de molécules telles que les porphyrines (*o*-THPP), les précurseurs de porphyrines endogènes (5-ALA), les chlorines (Foscan®), les purpurines (Purlytin™), les texaphyrines (Xcytrin™, Lutrin™).

#### a. L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) – Lévulan®

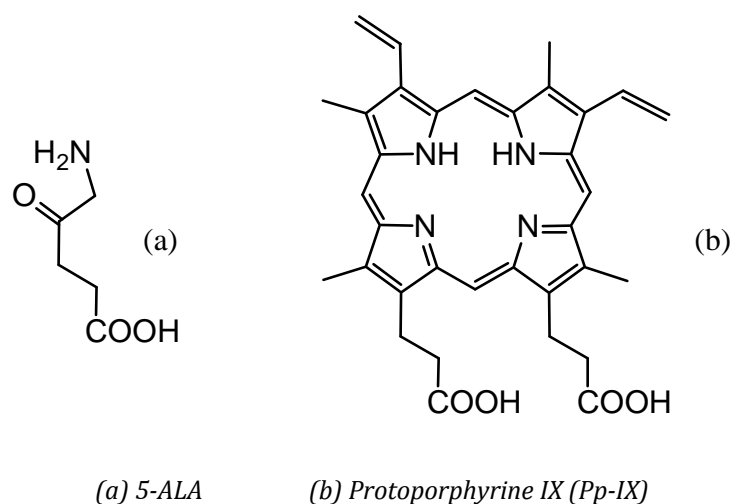


Figure 12 : Structures du 5-ALA et de la protoporphyrine IX (Pp-IX)

Le 5-ALA (Figure 12) est présent naturellement dans l'organisme. Il est impliqué dans la biosynthèse de l'hème (Figure 13) : il est le précurseur de la protoporphyrine IX (Pp-IX) (Figure 12), qui est le PS utilisé dans ce traitement par PDT. Dans la cellule, la biosynthèse de l'hème est régulée très finement : lorsque la concentration en hème est suffisante, celle-ci exerce un rétrocontrôle négatif par inhibition de l'ALA-synthétase. L'administration de 5-ALA exogène court-circuite ce système de régulation: les fortes concentrations intracellulaires de 5-ALA sont rapidement diminuées par conversion en Pp-IX. La ferrochélatase ne peut pas assurer aussi rapidement la synthèse de l'hème, ce qui conduit à l'accumulation délétère de Pp-IX dans la cellule.

Le 5-ALA, commercialisé sous l'appellation Lévulan® (AMM en France en 2000) est principalement utilisé en dermatologie, en application locale suivie d'une irradiation

avec une lumière de longueur d'onde  $\lambda = 635 \text{ nm}$ , en traitement des maladies de la peau telles que le psoriasis ou des kératoses actiniques (lésions cancéreuses de la peau).<sup>[41]</sup>

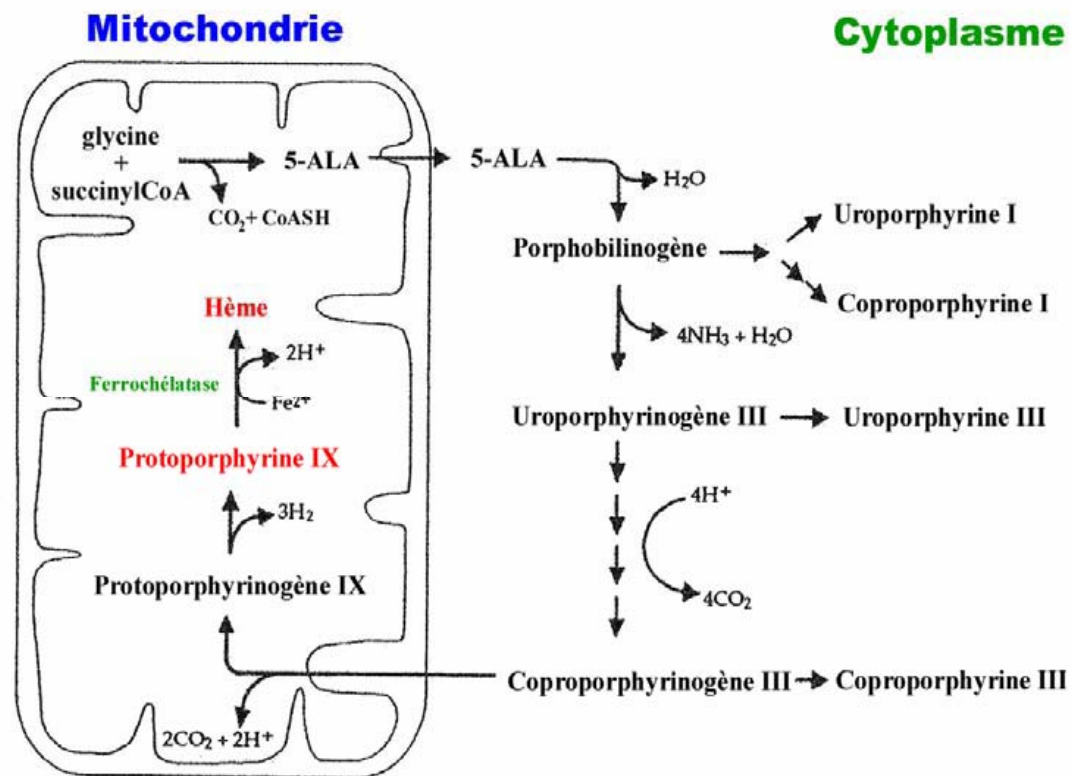


Figure 13 : Schéma représentant la biosynthèse de l'hème

### b. La méso-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC) – Foscan®

La *m*-THPC, également appelée témoporfine, disponible en France depuis 2002 sous le nom de Foscan® (Figure 14) est la molécule la plus active, en PDT, d'une série d'analogues *méso*-tétrahydroxyphénylchlorines et porphyrines.

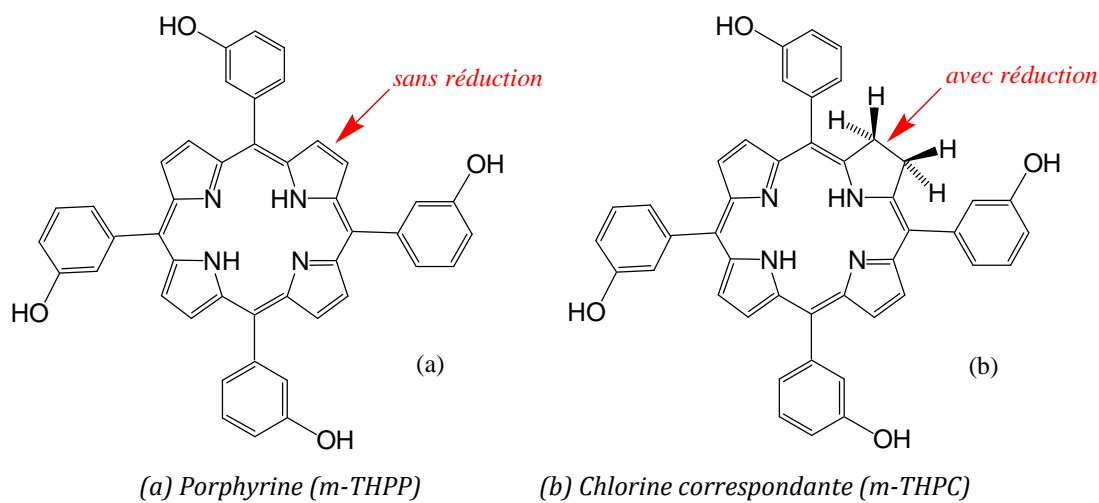


Figure 14 : *m*-THPC (Foscan®)

En comparaison avec son analogue porphyrinique (*m*-THPP, Figure 14), le Foscan® absorbe plus fortement la lumière rouge et possède une durée de vie à l'état triplet plus longue que le Photofrin® [42], qui permet la production de plus grandes quantités d'espèces réactives oxygénées.

La *m*-THPC présente deux bandes principales d'absorption. L'une se situe vers 415 nm et l'autre à 650 nm vers le rouge. L'existence de bandes intermédiaires et notamment d'une bande à 514 nm présente un intérêt en clinique : en effet, l'utilisation d'une irradiation vers 514 nm, ne pénétrant pas profondément dans les tissus, permet l'activation de la *m*-THPC tout en préservant l'organe à traiter. La *m*-THPC présente de nombreux avantages :

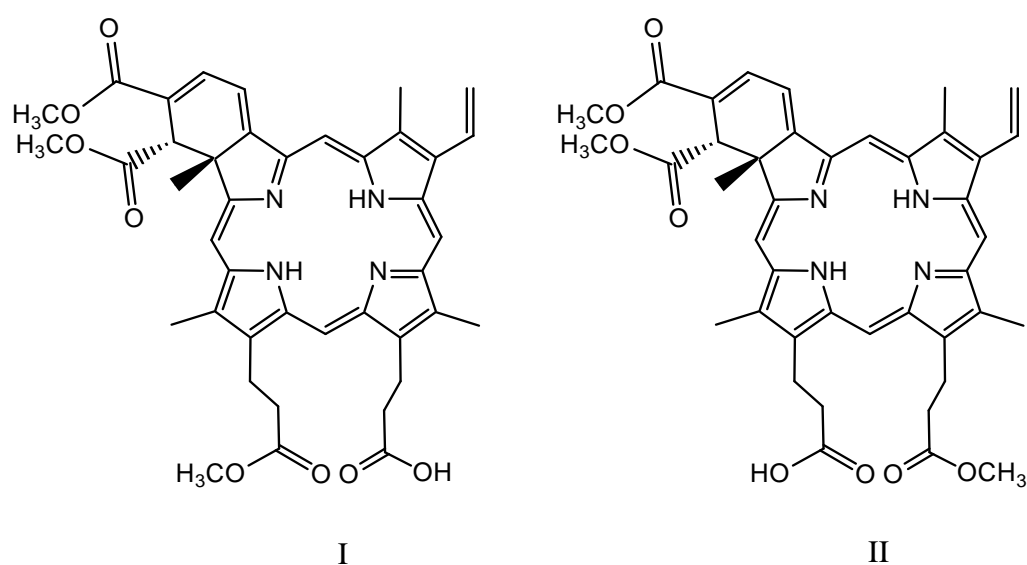
- une grande pureté,
- un fort coefficient d'absorption dans le rouge,
- une photocytotoxicité élevée,
- un rendement quantique important en oxygène singulet,
- l'induction d'une nécrose tumorale à des doses pour lesquelles les porphyrines seraient inefficaces, ce qui permet d'utiliser des quantités plus faibles et donc de réduire les risques de photosensibilisation suite à son administration.

Cependant, ce PS reste peu sélectif vis-à-vis des cellules cancéreuses : l'éclairage de la cible doit être réalisé avec la plus grande précision afin d'épargner les tissus sains avoisinants.

Le Foscan® est indiqué dans le traitement palliatif des carcinomes épidermoïdes avancés de la tête et du cou après échec des traitements antérieurs et chez les patients qui ne peuvent pas être traités par radiothérapie, chirurgie ou chimiothérapie systémique.

### **c. Le dérivé monoacide de la benzoporphyrine (BPD-MA) : Vertéporfine – Visudyne®**

Les benzoporphyrines dérivées (BPD) ont été synthétisées à partir de la Pp-IX.[43] Les études sur plusieurs analogues de BPD ont montré que le dérivé monoacide avec un cycle benzénique attaché (BPD-MA) est le plus photoactif.



**Figure 15 : Structure de la BPD-MA : Vertéporfine - Visudyne®**

La Visudyne® (Figure 15) est une chlorine hydrophobe chimiquement stable, présentant une bande d'absorption à 690 nm. Elle s'accumule rapidement dans les tissus tumoraux, permettant une irradiation au bout de 30 à 150 minutes. Elle est rapidement éliminée, la photosensibilité cutanée ne dure donc que quelques jours.

Elle est principalement utilisée pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).<sup>[44,45]</sup> Cette maladie affectant la rétine et pouvant conduire à la cécité, atteint 1 à 2% des 50-60 ans et jusqu'à 20% des personnes âgées de plus de 80 ans. Dans la forme la plus grave, la prolifération de vaisseaux sanguins anormaux, appelés néovaisseaux sous la rétine altère la vision centrale.

La BPD-MA agit en détruisant sélectivement les cellules épithéliales de ces néovaisseaux. Pour les patients atteints de la forme la plus grave de DMLA, la Visudyne® diminue de moitié le risque de perte de la vision sur une période de deux ans. L'effet est notable pendant au moins trois ou quatre ans. Le traitement fonctionne également dans des formes moins graves de DMLA et dans le cas de la myopie pathologique, avec des résultats moins significatifs cependant. Seule une petite partie des patients souffrent de réactions secondaires.

La Visudyne® est administrée sous forme de liposomes, qui jouent le rôle de vecteurs et permettent de protéger le PS contre les mécanismes enzymatiques de dégradation. Ce vecteur permet également de créer des complexes avec d'autres structures lipophiles telles que les LDL présentes dans le sérum. La présence de nombreux récepteurs aux LDL au niveau des néovaisseaux pourrait expliquer la sélectivité de la Visudyne® pour les cellules constituant ces vaisseaux.

#### d. L'étiopurpurine d'étain (SnET2) – Purlytin™

L'étiopurpurine d'étain (SnET2) portant le nom commercial Purlytin™ (Figure 16) est une chlorine comportant un atome d'étain au centre de la structure. Elle présente une bande d'absorption aux alentours de 650 nm.

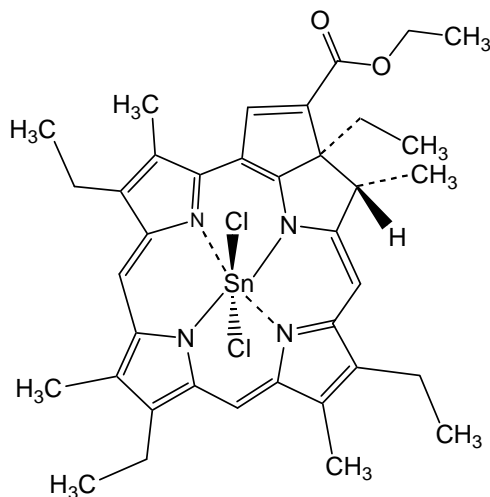
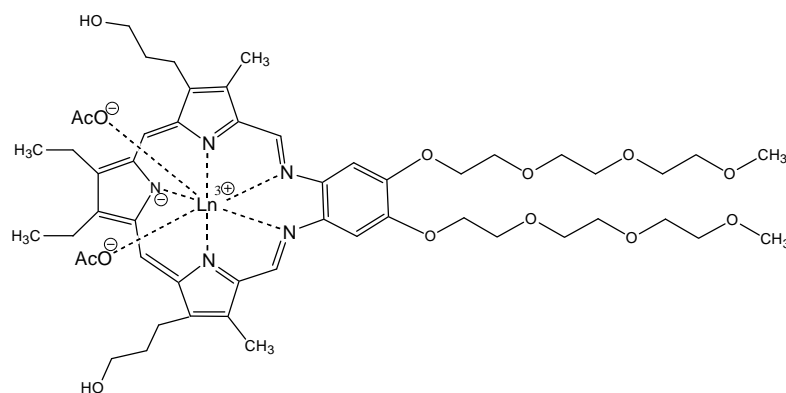


Figure 16 : Structure de l'étiopurpurine d'étain (Purlytin™)

Elle peut provoquer une photoréaction pendant 7 à 14 jours.<sup>[46]</sup> La PDT induite par cette molécule affecte les mitochondries et provoque rapidement une réponse apoptotique.<sup>[47]</sup> Elle a été évaluée pour le traitement du cancer métastatique du sein, le cancer de la prostate et est en cours d'évaluation pour la photothérapie de la DMLA.

#### e. La téxaphyrine de lutétium – Lutrin™, la téxaphyrine de gadolinium-Xcytrin™, le bactériophéophorbide - Tookad®

Les téxaphyrines sont des composés tripyrroliques et possèdent cinq azotes internes. Ces molécules peuvent être complexées avec de nombreux métaux, et notamment les lanthanides.



(a) Téxaphyrine de Gadolinium (Ln = Gd)

(b) Téxaphyrine de Lutétium (Ln = Lu)

Figure 17 : Le Xcytrin™ et le Lutrin™



Ces métallotexaphyrines présentent une forte bande d'absorption entre 730 et 770 nm, permettant une bonne pénétration lumineuse à travers les tissus. De plus, l'état triplet relativement long de ces composés permet une production efficace d'oxygène singulet.<sup>[48]</sup> L'irradiation peut être effectuée trois heures après l'injection et leur élimination rapide assure une photosensibilité réduite du patient.

L'Xcytrin™, dérivé du Gadolinium (III) est en cours de développement dans le traitement des tumeurs métastatiques du cerveau et des glioblastomes; le Lutrin™, dérivé du Lutétium (III) est préconisé dans les cancers récurrents du poumon (Figure 17).

Le Tookad® est un autre photosensibilisateur métallé lipophile, très efficace et stable, dérivé de la bactériochlorophylle<sup>[49]</sup>. Son absorption maximale se situe à 760 nm, ce qui permet son excitation à une grande profondeur dans les tissus (jusqu'à 2 cm). Il est actuellement en essais cliniques de phase III pour le traitement du cancer de la prostate.

#### f. La mono-L-aspartylchlorine e6 – Npe6

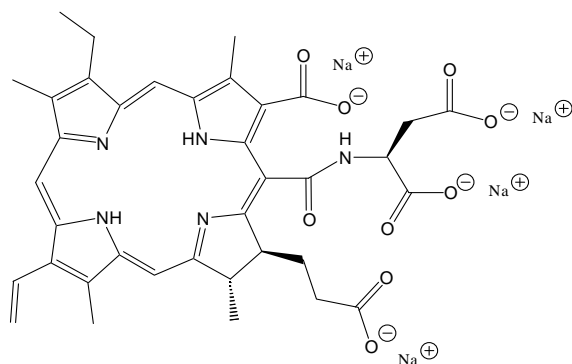


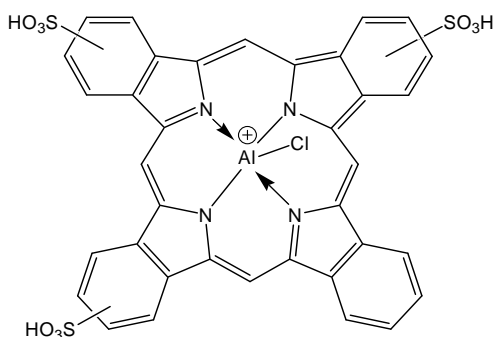
Figure 18 : La Npe6

La Npe6 (Figure 18) possède deux bandes d'absorption principales, à 400 nm et 664 nm. Elle entraîne une faible photosensibilité de la peau. Elle est éliminée rapidement des tissus, l'irradiation doit donc être réalisée dans les quatre heures suivant l'injection.<sup>[50]</sup> Utilisée à faible dose, la Npe6 peut induire la régression provisoire des tumeurs. A forte dose, la régression est prolongée mais la sélectivité vis-à-vis des tissus néoplasiques est diminuée.<sup>[51]</sup> Elle est étudiée pour le traitement de l'adénocarcinome du sein, les carcinomes basocellulaires et squameux. Elle est en cours d'essais afin de détruire les néovascularisations de la rétine. Les résultats préliminaires montrent que la Npe6 détruit efficacement les vaisseaux choroïdiens en produisant peu de dommages à la rétine.

## g. Les phtalocyanines

Les phtalocyanines présentent un maximum d'absorption à 765 nm.<sup>[52]</sup> Les phtalocyanines sont d'excellents candidats pour la PDT car présentent de nombreux avantages :

- elles présentent une faible toxicité à l'obscurité,
- elles sont éliminées rapidement,
- elles présentent une bonne sélectivité vis à vis des cellules tumorales.



**Figure 19 : Structure de la chloroaluminium phtalocyanine sulfonée (ClAlPcS)**

L'activité des PS dépend de leur localisation cellulaire en fonction de leur caractère hydrophile ou lipophile.<sup>[53]</sup> Elles peuvent être chélatées avec de nombreux ions métalliques tels que l'Aluminium ou le Zinc, ce qui augmente leur phototoxicité. La plus connue des phtalocyanines est la chloroaluminium phtalocyanine sulfonée (ClAlPcS, Figure 19) qui est soluble dans l'eau et possède une durée de rétention élevée dans les cellules tumorales. Les études avec ces molécules ont uniquement été menées *in vitro* et *in vivo* sur l'animal.<sup>[54]</sup> Cette molécule entraîne des dommages vasculaires au niveau de la tumeur.

### 2.3.3. Les PS de troisième génération

L'élaboration de PS de troisième génération a pour objectif d'améliorer la sélectivité de ces molécules vis-à-vis du tissu cancéreux.

Le ciblage des cellules tumorales est amélioré grâce à la conjugaison des PS avec des molécules ayant une forte affinité pour des marqueurs spécifiques des cellules tumorales. Cet adressage permet de modifier la pharmacocinétique et la biodistribution des PS afin de cibler plus spécifiquement les cellules cancéreuses.<sup>[55]</sup> L'effet obtenu est une efficacité plus grande de la PDT et une phototoxicité pour les cellules saines diminuée.<sup>[56]</sup> Différents exemples de cibles moléculaires sont présentés ci-dessous :

### - **Antigènes membranaires**

L'utilisation d'un PS conjugué à un anticorps ciblant spécifiquement le tissu tumoral est appelée photoimmunothérapie. Des études ont montré que l'utilisation de tels anticorps améliorerait l'efficacité et la sélectivité de la PDT.

Le greffage direct d'anticorps monoclonaux aux PS est facilement réalisable mais peut diminuer l'affinité et la spécificité de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène.<sup>[57]</sup> L'utilisation de bras espaceurs permet d'augmenter la flexibilité et de réduire l'encombrement stérique.

Il est possible de diminuer la taille du PS conjugué en ne greffant que le fragment F(ab')<sub>2</sub> de l'anticorps. Ceci permet de résoudre les problèmes de diffusion et d'élimination de la molécule.<sup>[58]</sup>

### - **Récepteurs de facteurs de croissance**

L'EGF (Endothelial Growth Factor) fait partie d'une famille de facteurs de croissance impliqués dans le développement et le fonctionnement normal de différents organes. L'action de ces facteurs est médiée par une famille de quatre récepteurs transmembranaires ubiquitaires EGFR: ErbB1 (HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) et ErbB4 (HER4). Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase qui sont surexprimés dans de nombreux types de cancers. Un anticorps anti-EGFR a été couplé à la chlorine e6 pour cibler des cellules tumorales surexprimant l'EGFR. L'étude a été réalisée chez le hamster sur un modèle de carcinome de joue. Ces travaux ont montré que cette stratégie permettait de diagnostiquer la zone tumorale et d'améliorer la réponse à la PDT des cellules surexprimant l'EGFR.<sup>[60]</sup> La *m*-THPC a été couplée à deux anticorps, l'un internalisable et l'autre non pour cibler un carcinome spino-cellulaire de la tête et du cou. Le conjugué possédant l'anticorps internalisable était le plus photocytotoxique.<sup>[59-61]</sup>

### - **Récepteurs aux LDL**

Les récepteurs aux LDL sont impliqués dans le transport de molécules physiologiques telles que le cholestérol par une voie d'endocytose récepteur-dépendante. Ces récepteurs sont exprimés sur différents types cellulaires, notamment dans le foie et la surrénale. Leur expression est élevée dans les cellules cancéreuses. Il a été démontré que les récepteurs aux LDL jouent un rôle important dans l'acheminement intracellulaire des PS hydrophobes.<sup>[62]</sup> De nombreuses études consistent à modifier les

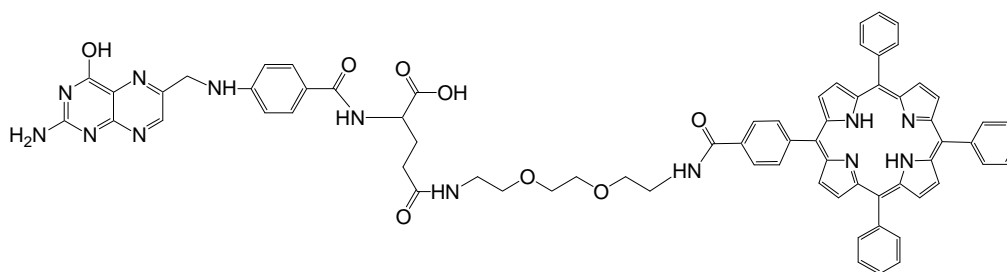
PS pour augmenter leur internalisation active *via* ces récepteurs.<sup>[63]</sup> Une stratégie simple vise à conjuguer un PS aux LDL. L'incorporation dépend de la nature du PS, de la nature chimique de la conjugaison et du type de cellules ciblées. Des études ont montré que lorsque l'Hp est couplée aux LDL, son incorporation est augmentée d'un facteur 5 dans des cellules surexprimant les récepteurs aux LDL.<sup>[64]</sup> L'incorporation de la Npe6 conjuguée est 4 fois plus importante en comparaison à la forme libre.<sup>[65]</sup>

#### - **Récepteurs de la transferrine**

Les récepteurs de la transferrine sont situés à la surface de toutes les cellules de l'organisme. Ils permettent le passage transmembranaire du Fer lié à la transferrine. Les cellules en prolifération ont besoin d'un flux continu en Fer d'où une surexpression de ces récepteurs à la surface de certaines cellules tumorales.<sup>[66]</sup> Le couplage de la Npe6 à la transferrine a multiplié par 10 la phototoxicité *in vitro* par rapport à la Npe6 seule pour des cellules d'adénocarcinome mammaire.<sup>[67]</sup>

#### - **Récepteurs à l'acide folique**

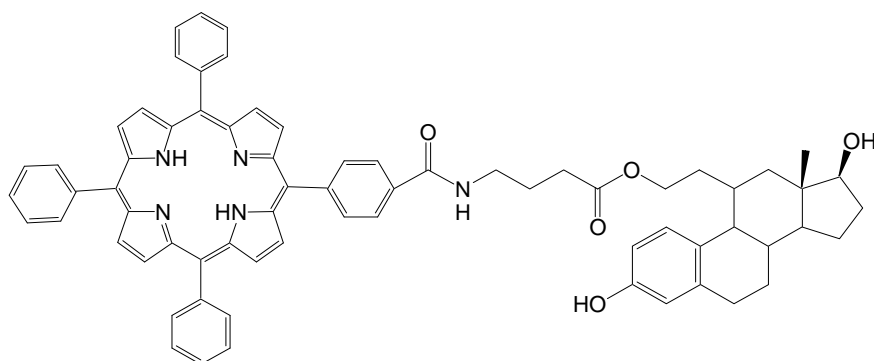
L'acide folique est impliqué dans la réplication de l'ADN en permettant la transformation de la désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP). Il est consommé en grande quantité par les cellules en prolifération. Les récepteurs de l'acide folique sont surexprimés à la surface des cellules épithéliales tumorales dans de nombreux cancers (cerveau, gonades, poumons...). Le complexe 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique (Figure 20) possède une forte activité photodynamique et une forte affinité *in vitro* pour ses récepteurs.<sup>[68,69]</sup>



**Figure 20 : Complexe 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique**

#### - **Récepteurs de l'œstrogène**

La Figure 21 représente une molécule associant porphyrine et œstradiol.



**Figure 21 : Le conjugué œstradiol-porphyrine**

Cette molécule est reconnue spécifiquement par les récepteurs de l'œstrogène, surexprimés par les cellules tumorales dans certains cancers (sein, ovaire, cerveau).<sup>[70]</sup> L'activité photodynamique reste encore faible et d'autres types de PS (de type chlorine) sont à l'étude.

- ***Transporteurs de glucose et lectines***

Les transporteurs de glucose (GLUT) sont des glycoprotéines transmembranaires qui permettent l'incorporation du glucose dans les cellules. Les cellules cancéreuses ont un besoin important en énergie, d'où une surexpression de ces récepteurs à leur surface. Les membranes cellulaires contiennent des récepteurs lectines qui reconnaissent spécifiquement les résidus glycosidiques. Ces récepteurs sont spécifiques d'un sucre: par exemple, le récepteur lectine DC-SIGN est spécifique du mannose.

Il a été démontré que le motif 2-aminoglucosamide améliorerait la pénétration cellulaire et l'activité photodynamique de la tétraphénylporphyrine.<sup>[71]</sup>

Plusieurs paramètres sont responsables de cette augmentation de l'incorporation : la liaison à ces récepteurs, mais également la modification de la balance hydrophile-hydrophobe qui influe le taux d'incorporation intracellulaire, les modes d'agrégation et la localisation cellulaire.<sup>[72]</sup>

- **« *Photodynamic molecular beacon* »**

Cette stratégie consiste à coupler un PS, *via* un peptide substrat de protéases surexprimées dans les cellules cancéreuses, à un quencher d'oxygène singulet. Ce quencher empêche la production d'oxygène singulet. Le PS est inactif lorsqu'il reste conjugué au quencher. Une fois que le PS a atteint les cellules cancéreuses, le peptide substrat est clivé et le quencher est relâché. L'activité photodynamique du PS est alors possible uniquement dans un environnement de cellules tumorales.<sup>[73]</sup>

### - Les porphyrines conjuguées à des motifs polyaminés

Les polyamines sont des constituants naturels présents dans toutes les cellules eucaryotes et procaryotes.<sup>[74]</sup> Ces molécules sont essentielles pour la vie et la division cellulaire. Elles sont impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire.<sup>[75]</sup> Le métabolisme des polyamines est accru dans les cellules cancéreuses et son inhibition s'accompagne systématiquement *in vitro* d'un arrêt de croissance de ces dernières. Ce métabolisme a donc été considéré comme une cible privilégiée pour la conception de médicaments à visée anti-tumorale (Figure 22). Des porphyrines porteuses de motifs spermine ont été synthétisées afin de viser la métabolisation de ces polyamines.<sup>[76]</sup> Ces composés sont actuellement en cours d'évaluation.

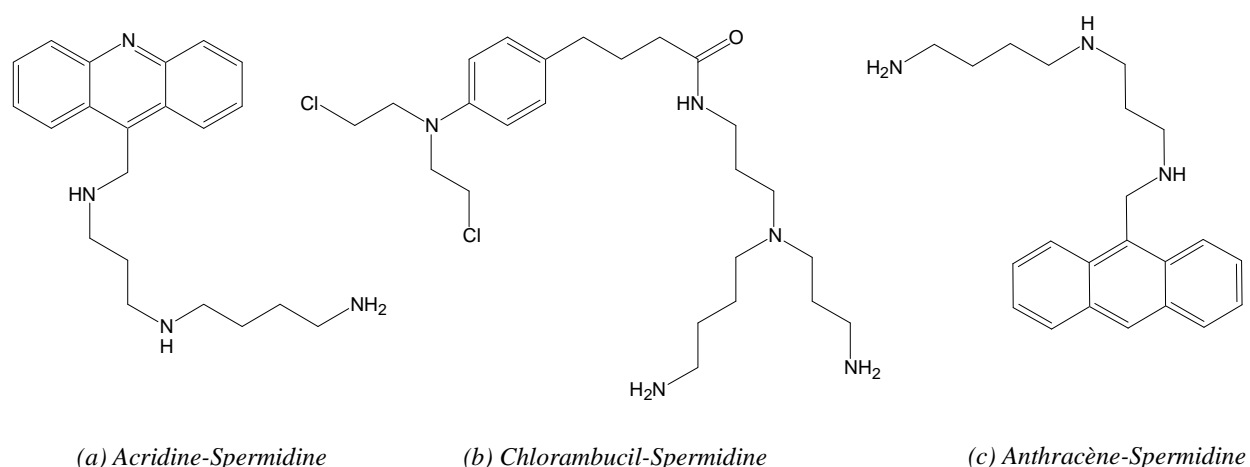


Figure 22 : Exemples de structures actives conjuguées à des polyamines

### - Les porphyrines peptidiques

Les porphyrines peuvent être couplées à des séquences peptidiques plus ou moins longues suivant la stratégie adoptée.<sup>[77]</sup>

L'intérêt des peptides pour des utilisations en PDT est dû à leur petite taille, qui permet une bonne diffusion des PS conjugués dans les tissus, et leur facilité de synthèse. Cependant, un des inconvénients majeurs liés à l'utilisation des peptides repose sur leur manque de stabilité *in vitro* et *in vivo*, pouvant compromettre la stratégie de ciblage. En effet, le plasma contient des peptidases (ou protéases), qui dégradent les chaînes peptidiques.

Ces porphyrines peptidiques ont une application en VTP.<sup>[78-86]</sup> Cette stratégie vise à cibler les cellules endothéliales vasculaires afin de détruire la néovascularisation et ainsi d'induire une asphyxie des vaisseaux nourriciers de la tumeur. Elle sera développée dans la seconde partie de cette thèse.

## 2.4. Applications de la thérapie photodynamique

### 2.4.1. Indications de la PDT

Le Photofrin® et le Foscan® ont une AMM pour le traitement palliatif du cancer de l'œsophage et des bronches.

Des essais sont réalisés dans le traitement curatif des lésions superficielles de l'œsophage (dysplasie sévère du Barrett) et des voies aéro-digestives supérieures (Foscan®), de la vessie (hexylester d'ALA, hypéricine), de la peau (ALA), du sein (Npe6, Purlytin™), de la prostate (Purlytin™, Tookad®), du poumon (Lutrin™), du cerveau (Xcytrin™). D'autres indications se développent, telles que le traitement du mésothéliome pleural, des carcinomes du nasopharynx ou des cancers de l'oropharynx, en adjuvant de la chirurgie pour ces derniers. Dans les domaines non cancérologiques, on retiendra surtout le traitement de la DMLA (Visudyne®). Des traitements fondés sur ce principe, destinés à lutter contre les maladies cardio-vasculaires, le SIDA, les rejets de greffes et les leucémies sont en cours d'études.<sup>[87]</sup>

### 2.4.2. Place de la PDT dans le traitement du cancer

Depuis la fin des années 1970, aux Etats-Unis, au Japon et en Europe, plusieurs milliers de patients ont été traités par la PDT. Les résultats obtenus ont été très encourageants sur une large variété de tumeurs, tels que le cancer de la peau, du poumon, de l'estomac, de l'œsophage et de la vessie. Les expériences cliniques montrent que le traitement est peu traumatisant et peu agressif.

Le principe de la PDT est réellement séduisant, mais son application pratique se heurte à de nombreuses difficultés. En effet, les différentes réactions responsables de la destruction tumorale sont encore mal connues. Les paramètres de ces réactions (concentration et répartition du PS, température, pH, oxygénation du tissu tumoral) sont difficilement accessibles alors que leur détermination est essentielle pour une optimisation du traitement thérapeutique. De plus, la source lumineuse et les médicaments ont un coût élevé qui restreignent l'utilisation de la PDT.

Un renouveau apparaît grâce à l'apport de nouvelles technologies, notamment au niveau des sources de lumières laser, plus accessibles sur le plan financier et technique, ainsi que par le développement de nouvelles molécules plus sélectives et plus rapidement éliminées de l'organisme. Les études cliniques sur l'Homme qui se multiplient actuellement sont en phase I, II et III. La PDT a donc un avenir certain et n'en est qu'à ses débuts.

## 3. L'angiogenèse tumorale

### 3.1. Généralités

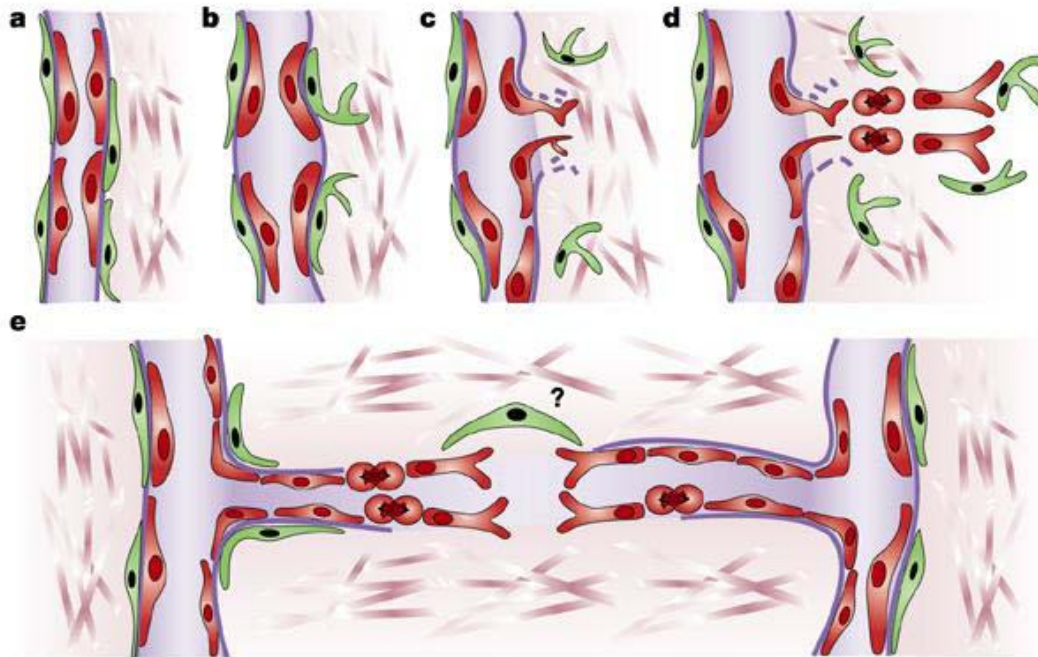
Une cellule ne peut survivre à plus de quelques dixièmes de millimètres d'un vaisseau sanguin, en particulier les cellules tumorales qui ont des besoins importants en oxygène et en énergie. Toute tumeur a donc besoin, pour se développer au-delà du millimètre cube, de détourner ou de fabriquer de nouveaux vaisseaux. Dans les années 70, Juda Folkman, un chirurgien du Children's Hospital de Boston observa que toute tumeur d'une taille supérieure à 1-2 mm<sup>3</sup> développait son propre réseau vasculaire. C'est le phénomène d'angiogenèse, qui est un mécanisme de néovascularisation prenant naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant. Elle est particulièrement importante et indispensable au cours de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, la croissance de l'endomètre au cours du cycle menstruel, l'implantation du placenta, la cicatrisation des plaies. La néo-angiogenèse peut être pathologique lors de phénomènes inflammatoires, tels que les rétinopathies diabétiques, la DMLA, l'arthrite rhumatoïde et dans la croissance des tumeurs et le développement des métastases.<sup>[88]</sup>

### 3.2. Mécanisme de l'angiogenèse

Le mécanisme angiogénique est initié par la survenue d'une rupture de l'équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques dans l'environnement tumoral, en faveur des facteurs pro-angiogéniques. Cet événement est appelé switch angiogénique, et correspond au passage de la phase dormante ou avasculaire à la phase vasculaire.<sup>[89]</sup> Les cellules tumorales sécrètent des facteurs pro-angiogéniques qui enclenchent la néo-angiogenèse sous l'effet de multiples stimuli : manque d'oxygène (hypoxie), de glucose, baisse de pH, inflammation, stress oxydatif. Certains, comme le VEGF, activent les cellules endothéliales jusqu'ici au repos; d'autres, comme les enzymes spécifiques MMP (Matrix Métallo Proteinases), dégradent la matrice dans laquelle baignent les cellules, facilitant la progression des nouveaux capillaires. Ces cellules endothéliales formant les nouveaux capillaires apportent oxygène et nutriments aux cellules de la tumeur, qui se développent. Les néo-réseaux veineux et lymphatique évacuent les déchets, mais aussi les cellules cancéreuses qui peuvent former ailleurs des métastases. Contrairement aux vaisseaux normaux, les nouveaux capillaires tumoraux



sont désorganisés, dilatés et perméables ; les péricytes, qui stabilisent les vaisseaux matures, sont moins nombreux. La Figure 24 schématise ce mécanisme.



La Figure **a** présente un vaisseau normal. En **b**, détachement des péricytes (cellules bordant les vaisseaux). En **c**, rupture de la membrane basale (rôle des protéases). En **d**, migration et prolifération des cellules endothéliales. En **e**, différenciation des cellules endothéliales et formation de tubes.

**Figure 23 : Mécanisme de l'angiogenèse<sup>[91]</sup>**

Forkman formula le concept novateur de médicaments « anti-angiogéniques ». Il émit l'hypothèse qu'en entravant la formation de ces nouveaux vaisseaux, on affamerait la tumeur et on empêcherait les cellules tumorales d'emprunter le réseau sanguin pour aller fonder des cancers secondaires (métastases) dans d'autres organes.

### 3.3. Les VEGF

Les VEGF sont des facteurs de croissance appartenant à une famille de dimères de glycoprotéines qui ont en commun un domaine d'homologie. Ils jouent un rôle important dans la physiologie et la pathologie du système vasculaire, incluant la vasculogénèse, l'hématopoïèse, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse.<sup>[90]</sup> Cette famille comprend le VEGF-A (qui correspond au VEGF proprement dit), les VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le facteur de croissance placentaire PlGF (Placenta Growth Factor). L'effet des VEGF se fait par l'intermédiaire de trois récepteurs tyrosine kinase (TK) : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Les VEGF ne se lient pas spécifiquement à un type de récepteurs. En effet, VEGFR-1 lie VEGF-A, -B et PlGF-1,-2, VEGFR-2 lie VEGF-A, -C et -D tandis que

VEGFR-3 lie VEGF-C et -D. D'autres récepteurs de la famille du VEGF, dépourvus d'activité TK, ont été identifiés. Il s'agit des NRP, qui sont considérées comme jouant un rôle de co-récepteurs des VEGF.<sup>[91,92]</sup>

### 3.3.1. Structure et isoformes du VEGF-A

Il existe quatre isoformes principales possédant respectivement 121, 165, 189 et 206 acides aminés (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub>). Le VEGF<sub>165</sub> est la forme prédominante. D'autres isoformes ont été décrites : le VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>183</sub> et VEGF<sub>162</sub> et un variant du VEGF<sub>165</sub> a récemment été identifié (VEGF<sub>165b</sub>).

### 3.3.2. Rôle des VEGF

Des études expérimentales *in vivo* ont démontré la nécessité de VEGF-A dans le développement physiologique de l'organisme, son inactivation conduisant à une mort embryonnaire chez la souris.<sup>[93]</sup> De même, son importance dans l'induction angiogénique lors de la croissance tumorale a été mise en évidence.<sup>[94]</sup> Le VEGF est un facteur mitogène spécifique des cellules endothéliales. Il intervient dans la sécrétion et l'activation des protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Il agit comme un facteur de survie des cellules endothéliales en inhibant l'apoptose. Il est essentiel à la mobilisation des précurseurs de la moelle osseuse et des cellules endothéliales, il induit leur prolifération, stimule leur migration. Il augmente la perméabilité vasculaire, inhibe la différenciation des cellules dendritiques, induit le facteur tissulaire et la migration des monocytes.<sup>[95,96]</sup>

VEGF-B participe au recrutement de cellules inflammatoires dans un modèle d'arthrite, au développement de la conduction cardiaque, mais n'est pas nécessaire à l'angiogenèse embryonnaire.<sup>[97-99]</sup>

A partir d'expériences sur la souris, il a été démontré que PlGF-2 agit sur l'activation des cellules endothéliales, le recrutement des cellules musculaire lisse et le recrutement des cellules inflammatoires à partir de la moelle osseuse.<sup>[100,101]</sup> PlGF est nécessaire à l'augmentation de la perméabilité induite par VEGF-A.<sup>[102]</sup>

VEGF-C et VEGF-D sont deux membres de la famille des VEGF impliqués dans la lymphangiogenèse en plus d'un possible rôle dans l'angiogenèse.<sup>[103]</sup>

### 3.3.3. Rôle des récepteurs et conséquences de leur inactivation

#### 3.3.3.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs VEGFR-1, 2, 3 à activité TK possèdent un domaine extracellulaire impliqué dans la reconnaissance et la fixation du ligand et sont composés de sept domaines à immunoglobuline (Ig-like), une région transmembranaire unique et un domaine intracytoplasmique à activité TK. Après la dimérisation suite à la stimulation par le ligand, il y a autophosphorylation des récepteurs. Les VEGFR sont exprimés à un faible niveau dans beaucoup de tissus adultes mais leur niveau d'expression dans les cellules endothéliales est augmenté pendant le développement ainsi que dans des pathologies où l'angiogenèse joue un rôle important.

Le VEGFR-1 est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-A, VEGF-B et PlGF. Il est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires, mais aussi par des cellules non endothéliales, comme les macrophages et les monocytes<sup>[104-106]</sup> et les cellules souches hématopoïétiques.<sup>[107]</sup> Le VEGFR-1 est impliqué dans la migration des cellules endothéliales,<sup>[108]</sup> des monocytes et macrophages, ainsi que dans le recrutement des cellules souches hématopoïétiques.<sup>[107]</sup> L'inactivation du gène codant pour VEGFR-1 induit un surnombre de cellules endothéliales ayant comme conséquence une altération de la vasculogenèse.<sup>[109,110]</sup>

Le VEGFR-2 est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, ainsi que par d'autres types cellulaires, tels que les mégacaryocytes, les cellules souches hématopoïétiques<sup>[111]</sup> et les cellules musculaires lisses.<sup>[112,113]</sup> Il est indispensable au cours du développement embryonnaire.<sup>[114]</sup> Des études ont démontré son rôle dans la lymphangiogenèse.<sup>[115,116]</sup> Des données *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'importance de l'activation par VEGF-A, de VEGFR-2 dans les cellules endothéliales en ce qui concerne l'induction spécifique de gènes, la migration, la prolifération, la perméabilité vasculaire, ainsi que dans l'angiogenèse.<sup>[117]</sup> L'inactivation du gène codant pour VEGFR-2 chez la souris affecte la vasculogenèse.<sup>[114]</sup>

Le VEGFR-3 est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D ; c'est le principal récepteur impliqué dans la lymphangiogenèse. La différenciation des cellules endothéliales, ainsi que la vasculogenèse, ne sont pas affectées par l'absence de VEGFR-3.

### **3.3.3.2. Les neuropilines**

Les NRP1 et NRP2 sont des récepteurs transmembranaires capables de se lier aux VEGF pour réguler l'angiogenèse. Les travaux démontrant le rôle de ces récepteurs dans la progression tumorale et le développement d'une néo-angiogenèse se multiplient.

NRP1 fixe le VEGF-B, le VEGF-E et le PlGF, NRP2 fixe le VEGF<sub>145</sub> et le VEGF-C.

NRP1 fonctionne comme un co-récepteur du VEGFR-2 qui augmente la fixation du VEGF<sub>165</sub> à son récepteur principal le VEGFR-2, ce qui induit une augmentation de la migration des cellules endothéliales. NRP1 module également l'augmentation de perméabilité vasculaire induite par le VEGF.

L'expression des NRP est différente selon les cellules. Les cellules endothéliales vasculaires expriment les deux formes de NRP, les cellules endothéliales lymphatiques n'expriment que NRP2 et les cellules épidermales NRP1. De même les cellules tumorales expriment NRP1, NRP2 ou les deux formes. Les carcinomes (prostate, sein, vessie, rein, colon, pancréas, ovaire et poumon) expriment NRP1 alors que les tumeurs neuronales et les mélanomes expriment NRP2.

Ainsi le couple NRP/VEGF joue un rôle important dans la néo-angiogenèse.<sup>[118]</sup>

## **CHAPITRE II : SYNTHÈSE PAR CHIMIE CLICK DE MOLECULES ASSOCIANT PS ET PEPTIDES DE CIBLAGE**

### **1. Présentation du laboratoire et de ses partenaires**

Ce projet, initié par le laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM) se situe à l'interface Chimie-Photophysique-Biologie-Médecine. Les équipes sont complémentaires et travaillent déjà ensemble. Le sous-chapitre suivant présente le LCPM et ses différents collaborateurs.

#### **1.1. Le LCPM**

Le laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM) (Dr. Alain Durand, UMR 7568 CNRS-INPL (ENSIC)) au sein duquel travaillent le Docteur Régis Vanderesse et le Docteur Samir Acherar, s'intéresse à l'étude des phénomènes physiques, chimiques et biologiques régis par les structures des molécules et par les interactions moléculaires. Ses activités consistent à élaborer des produits ou matériaux ayant des propriétés prédéfinies en utilisant une approche raisonnée des synthèses. Deux domaines sont particulièrement explorés : celui des molécules, macromolécules et polymères en interaction avec un environnement biologique, et celui des matériaux à propriétés spécifiques (réactivité, perméabilité, transfert, organisation aux interfaces...).

Le laboratoire est divisé en deux groupes : le groupe Synthèse organique et Biosystèmes (GSOB), au sein duquel j'ai effectué mon stage et le groupe Polymères et Matériaux de Spécialité (GPMS).

L'activité du GSOB s'appuie sur une double compétence à la fois en synthèse organique et en analyse structurale de petites et grandes molécules. Le groupe s'attache à la synthèse rationnelle en phase liquide et sur support solide de peptides et de pseudopeptides capables d'induire des propriétés structurales et biologiques recherchées. L'utilisation des méthodes spectroscopiques dans le dessein d'analyse structurale y est particulièrement développée.

Le groupe s'intéresse également au fonctionnement de protéines, peptides et/ou pseudopeptides pour une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires d'intérêt biologique. Le but est de définir des critères moléculaires et structuraux pouvant conduire à la conception de molécules aux propriétés biologiques contrôlées.

Ces études reposent essentiellement sur des techniques de RMN multidimensionnelle associées à des calculs de modélisation moléculaire.

Le groupe collabore avec des biologistes et enzymologistes dans le cadre de projets nationaux ayant pour objectif une meilleure connaissance de diverses maladies.

L'activité du GPMS concerne la conception et l'élaboration de polymères et matériaux originaux possédant des fonctions particulières. Les travaux de recherche reposent sur l'analyse des relations existant entre la structure des macromolécules et leurs propriétés, quelles que soient les fonctions visées.

## 1.2. Le LRGP

Le Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP, UPR 3349) au sein duquel travaille le Docteur Céline Frochot est une unité propre du CNRS et fait partie de l'Institut des Sciences de l'Ingénieur et des Systèmes (INSIS) du CNRS. Le LRGP est issu de la fusion de 4 laboratoires :

- Le Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (UPR CNRS 6811, directeur Michel Sardin).
- Le Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR UMR CNRS-INPL 7630, directeur Gabriel Wild).
- Le Laboratoire de Thermodynamique des Milieux Polyphasés (EA INPL 3099, directeur Roland Solimando).
- Le Centre de Génie Chimique des Milieux Rhéologiquement Complexes (EA INPL 1743, directeur Lionel Choplin).

Le directeur du LRGP est Gabriel Wild. L'objectif principal de ce nouveau laboratoire en Sciences de l'ingénieur consiste à aborder l'étude des procédés dans leur complexité, en alliant les compétences en génie chimique, en thermodynamique, et en chimie physique avec une approche multi-échelle en temps et en espace, allant des processus élémentaires au dimensionnement des réacteurs et à la simulation et la commande des procédés.

## 1.3. Le CRAN

Le laboratoire CRAN (Centre de Recherche en Automatique de Nancy) (UMR 7039 CNRS Nancy Université), sur le site du Centre Alexis Vautrin (CAV) est composé de biologistes, d'instrumentistes, de traiteurs de signaux et d'images, de radiophysiciens et

de médecins. Le groupe thématique Ingénierie Pour la Santé (IPS) auquel appartient le Docteur Muriel Barberi-Heyob a pour vocation de proposer des solutions à des problèmes biomédicaux. En exploitant les phénomènes d'interactions entre la lumière et les tissus, des indices diagnostiques du cancer en phase précoce peuvent être extraits et des stratégies thérapeutiques établies. Muriel Barberi-Heyob coordonne l'axe «Adressage de molécules photo-activables » au sein du CRAN. Une partie des travaux consiste à cibler l'endothélium vasculaire tumoral pour favoriser l'effet anti-vasculaire de la PDT.

## 2. Présentation du projet

### 2.1. Introduction

Malgré les aspects attractifs de la PDT, un très faible nombre de PS sont actuellement disponibles en clinique. Le développement de nouveaux médicaments pour la PDT est indispensable à son essor.

La stratégie anticancéreuse récente s'oriente vers l'élaboration de molécules «hybrides» composées d'un principe actif photo-activable associé à un module de reconnaissance. La conjugaison d'un PS avec des modules d'adressage (sucres, ligands, peptides) ayant une affinité particulière pour des récepteurs membranaires surexprimés à la surface des cellules tumorales induit une augmentation de son incorporation cellulaire et de sa sélectivité, et donc de son activité photodynamique (voir paragraphe 2.3.3.).

Des études de plus en plus nombreuses montrent le rôle prépondérant de l'effet vasculaire dans l'éradication tumorale par PDT dénommé VTP. Cette stratégie vise à cibler les cellules endothéliales vasculaires afin de détruire la néovascularisation et ainsi d'induire une asphyxie de la tumeur. C'est cette stratégie qui est développée activement à Nancy.

### 2.2. Objectifs

Un PS couplé à un peptide (ATWLPPR) ciblant la NRP1, co-récepteur du VEGF<sub>165</sub>, a été synthétisé par les équipes de l'ENSIC (LCPM, DCPR). Une amélioration de l'incorporation intracellulaire et une meilleure activité photodynamique du PS conjugué avec ce peptide ont été démontrées sur des cellules endothéliales surexprimant NRP1. Chez des souris porteuses de gliome malin humain, l'agent photosensibilisant couplé

s'accumule dans les cellules endothéliales tumorales et induit, après traitement, un retard de croissance tumorale statistiquement significatif.<sup>[80-86]</sup>

Néanmoins, des améliorations peuvent être apportées à cette stratégie pour améliorer la spécificité. Le manque de spécificité résulte d'une part, du caractère hydrophobe et agrégé du conjugué rendu moins affin pour sa cible et d'autre part, d'une capture importante par le système réticulo-endothélial aboutissant à une dégradation du peptide. Une solution pour pallier ces facteurs limitants et améliorer la spécificité de l'agent photosensibilisant est d'utiliser une plate-forme multifonctionnelle, permettant le couplage de PS et de peptides d'adressage. Pour réaliser ce couplage, la chimie click sera utilisée. Cette chimie originale permettra de coupler les PS et les peptides, mais également de jouer sur le nombre de chacune des entités. Les bras espaceurs seront judicieusement choisis pour avoir une balance hydrophile/hydrophobe adéquate.

### 2.3. La chimie click

Dans la recherche thérapeutique actuelle, la pharmacomodulation constitue une part importante du travail de synthèse de nouveaux agents actifs pour un *screening* plus exhaustif. Il est donc devenu indispensable de développer de nouvelles méthodologies permettant d'accéder rapidement à une grande diversité de composés. De cette idée, a émergé le concept, proposé par Sharpless,<sup>[119]</sup> de la chimie click pour générer des structures originales. Ce concept est basé sur l'utilisation de réactions rapides et efficaces entre différents "blocs" donnant accès à des variations quasi illimitées dans l'architecture moléculaire. Une réaction peut être considérée comme « click » si elle répond aux critères suivants :

- Modularité
- Stéréosélectivité
- Insensibilité à l'oxygène et à l'eau
- Pas de groupements protecteurs
- Pas de purification chromatographique
- Pureté et rendement élevés

La chimie click permet donc de développer un ensemble de réactions puissantes, reproductibles, sélectives et modulables. Les principales réactions click consistent à former des liaisons carbone-hétéroatome énergétiquement très favorables.<sup>[120]</sup> Les sous-unités réactives sont fusionnées grâce à des réactions de substitutions nucléophiles et électrophiles, des réactions d'ouverture de cycles, des cycloadditions telles que celle



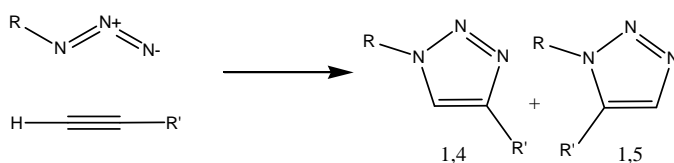
de Huisgen modifiée utilisant une catalyse au cuivre ou de Diels-Alder, des additions sur des liaisons insaturées, la chimie des composés carbonylés, etc... Deux types de réaction sont particulièrement utilisés : les réactions nucléophiles d'ouverture de cycle et les cycloadditions 1,3-dipolaires.

### 2.3.1. Réaction nucléophile d'ouverture de cycle

Les réactions nucléophiles d'ouverture d'époxydes, d'aziridines, d'ions episulfonium ou d'ions aziridinium permettent d'obtenir un grand nombre de composés. Les époxydes et aziridines sont les substrats les plus communément utilisés. La régiosélectivité de ces réactions peut être contrôlée, par exemple par le solvant (dans le cas de l'ouverture d'un oxirane) ou par le substrat (dans le cas de l'ouverture d'une aziridine).<sup>[121]</sup>

### 2.3.2. Réaction de cycloaddition

Les cycloadditions 1,3-dipolaires (Figure 25) permettent d'obtenir de façon rapide, reproductible et quantitative une grande variété d'hétérocycles à cinq atomes. La plus connue des réactions de Huisgen a lieu entre un alcyne terminal et un azide générant des triazoles régioisomères en 1,4 et 1,5.



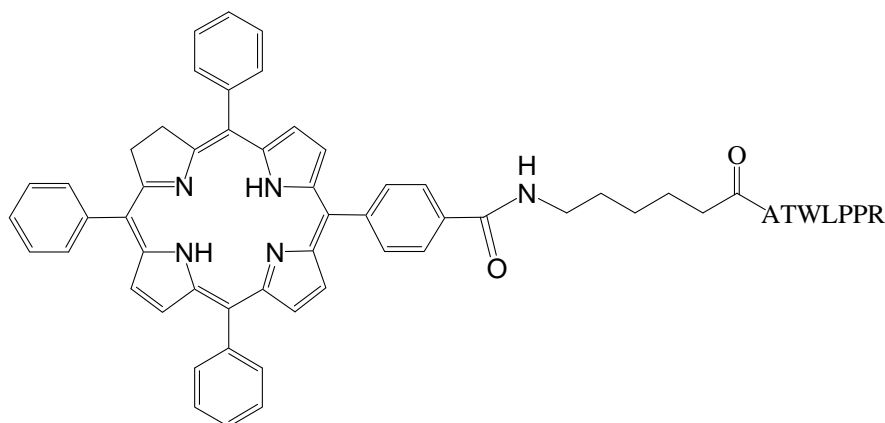
**Figure 24 : Cycloadditions 1,3-dipolaire de Huisgen**

La découverte, en 2002, des catalyseurs au cuivre de degré d'oxydation (I) a permis une réaction régiosélective qui génère exclusivement le composé isomère 1,4 et diminue considérablement les temps et les températures de réaction. Les azides primaires, secondaires, tertiaires ou aromatiques en présence d'une large gamme d'alcyne et peu d'équivalent de catalyseur donnent l'isomère 1,4 avec un bon rendement. De plus, bien que l'azide et l'alcyne soient très réactifs l'un vis-à-vis de l'autre, individuellement, ils sont pratiquement inertes vis-à-vis d'autres fonctions dans le cas de la chimie click.

## 3. Activité de l'équipe PDT depuis 2003

La stratégie retenue implique le récepteur de type 2 au VEGF et son co-récepteur la NRP1. Le LCPM s'intéresse depuis 2003 à l'étude d'une chlorure couplée au peptide

H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (ATWLPPR) *via* un bras aminohexanoïque (Ahx)(Figure 26). ATWLPPR a été identifié initialement comme spécifique du VEGFR-2 mais reconnaissant en fait la NRP1.<sup>[80-86]</sup>



**Figure 25 : Chlorine couplée à l'heptapeptide ATWLPPR *via* le bras espaceur Ahx : TPC-Ahx-ATWLPPR**

La première partie de la stratégie adoptée avait consisté en la synthèse, la purification puis la caractérisation chimique et photophysique du PS conjugué. La molécule était constituée d'un PS, la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20- triphényl-chlorine, noté TPC, conjuguée à ATWLPPR par l'intermédiaire d'un bras espaceur Ahx permettant d'individualiser les deux parties. Un composé pur à plus de 95% a été élaboré par les techniques classiques de synthèse sur support solide, identifié chimiquement et purifié par HPLC en phase inverse. TPC-Ahx-ATWLPPR présentait des propriétés photophysiques similaires à TPC.

L'étude *in vitro* de ce composé, sur des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC), qui expriment VEGFR-2 et NRP1 apporte les résultats suivants :

- L'incorporation du conjugué dans les HUVEC a été améliorée d'un facteur pouvant aller jusqu'à 25 par rapport à la chlorine non conjuguée.
- Cette incorporation est diminuée de moitié en présence d'un fort excès de ATWLPPR seulement dans le cas du conjugué, ce qui corrobore l'hypothèse d'une incorporation médiée par les récepteurs au VEGF.
- Il a été démontré qu'ATWLPPR se fixe sur VEGFR-2, NRP1. L'activité photodynamique a été améliorée d'un facteur 10 par rapport à la chlorine non conjuguée dans les mêmes conditions. Néanmoins, l'affinité du peptide pour NRP1 diminue suite au couplage avec le PS. L'affinité pourrait être améliorée en augmentant le ratio peptide/PS.

- Grâce à la microscopie confocale, les lysosomes ont été identifiés comme étant le site de localisation préférentielle de TPC-Ahx-ATWLPPR.

Suite aux résultats prometteurs obtenus *in vitro*, l'étude *in vivo* de TPC-Ahx-ATWLPPR a été initiée sur un modèle de gliome malin, xénogreffé chez la souris nude. Sur ce modèle, une angiogenèse tumorale consécutive a été préalablement mise en évidence par le suivi de la densité vasculaire, du taux de VEGF diffusible et de la pression partielle en oxygène.<sup>[122,123]</sup>

Les résultats de pharmacocinétique plasmatique et tumorale, après injection de TPC-Ahx-ATWLPPR par voie intraveineuse. (2,8 mg/kg), ont démontré que le PS conjugué s'accumulait dans la tumeur à des taux importants, comparé aux valeurs présentées dans la littérature. Le PS conjugué se concentre dans la tumeur à des taux bien supérieurs à ceux retrouvés dans la peau et permet une accumulation sélective dans les cellules endothéliales de la tumeur *in vivo* comparé au PS seul.<sup>[82]</sup>

L'effet anti-vasculaire du conjugué a été caractérisé par une diminution du flux sanguin tumoral de 50% environ durant le traitement, une perte de l'intégrité du marquage des cellules endothéliales à partir de 2 h post-PDT. Dès 4 h post-traitement, des microhémorragies, des stases vasculaires et des thromboses lumenales ont été observées. *In vivo*, l'efficacité photodynamique avec le PS conjugué a induit un retard de croissance tumorale statistiquement significatif comparé au PS non couplé.

L'utilisation de petits peptides couplés à des PS afin d'améliorer la sélectivité vis-à-vis des tissus cancéreux présente de nombreux avantages (petite taille, facilité de synthèse, affinité pour leur récepteur, capacité d'internalisation) mais leur principal défaut réside dans un manque de stabilité potentiel. TPC-Ahx-ATWLPPR s'est révélé stable dans le plasma humain et le plasma de souris *in vitro* à 37°C, pendant 48 h. *In vivo*, aucune dégradation n'est observée dans le plasma pendant 4 h, puis la séquence peptidique se dégrade progressivement, aboutissant à la formation du composé TPC-Ahx-A. Comme cela a été mis en évidence *in vitro*, cette dégradation enzymatique résulte majoritairement des peptidases lysosomales.<sup>[81]</sup> Une solution est d'inclure dans la molécule des liaisons pseudo-peptidiques judicieusement choisies afin d'éviter les coupures enzymatiques, ou bien de coupler d'autres peptides. Une étude a montré que le pseudopeptide conjugué possédant la liaison réduite entre l'alanine et la thréonine (A $\psi$  [CH<sub>2</sub>NH]TWLPPR) est stable dans le plasma 4 h après injection par voie intraveineuse contrairement au peptide ATWLPPR, qui subit une dégradation de la partie peptidique entre l'alanine et la thréonine dès 2 h après injection par voie intraveineuse<sup>[124]</sup>.

Un nouveau peptide a été synthétisé : le TKPRR (H-Thr-Lys-Pro-Arg-Arg-OH). Ce pentapeptide a montré de meilleurs résultats *in vivo* et *in vitro* que ceux obtenus avec ATWLPPR. D'autre part, afin de rendre le conjugué plus hydrophile, évitant ainsi le phénomène d'agrégation qui diminue l'affinité de la molécule pour sa cible, il est possible de jouer sur le type et le nombre de bras espaceurs.

## 4. Réalisation du projet

### 4.1. Introduction

L'objectif de ce projet est d'élaborer des molécules associant un à trois PS à un à trois peptides d'adressage afin d'augmenter la sélectivité de l'agent PS vis-à-vis des cellules tumorales. Neuf molécules différentes seront donc synthétisées. Les bras PS et peptides seront greffés sur des molécules support. Des bras espaceurs permettront de jouer sur la balance hydrophile/hydrophobe. La Figure 27 présente la molécule type à obtenir.

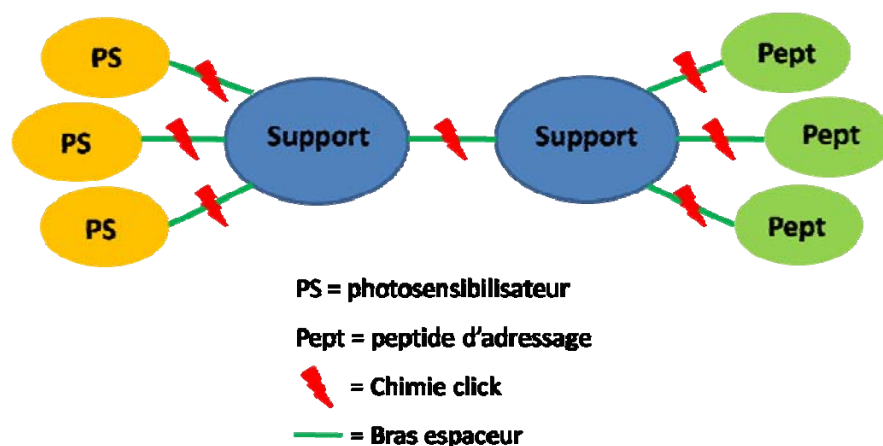


Figure 26 : Molécule type à trois bras PS et trois bras peptides

Ce travail a été réalisé dans le cadre de mon projet de fin d'études à l'ENSIC, de mai 2009 à avril 2010. Les travaux de synthèse sont réalisés depuis septembre 2010 par le Docteur Ludovic Colombeau.

### 4.2. Démarche adoptée

Notre objectif dans cette étude est l'obtention rapide de ces molécules afin de réaliser les tests *in vitro* et *in vivo* dans des délais les plus courts possibles. La recherche de rendements élevés n'est pas prioritaire car les tests nécessitent des quantités peu importantes de molécules. L'utilisation de la chimie organique « classique » nécessiterait un plan de synthèse pour chacune des neuf molécules, ce qui impliquerait une multitude

de réactions. L'utilisation de la chimie click est ici plus pertinente, car elle permettra de synthétiser un support commun possédant une extrémité propargyle. Sur cette extrémité, pourront être greffés un à trois peptides ou PS ayant une extrémité alcynes. Ces différents supports peptides et PS seront ensuite combinés par chimie click pour obtenir les neuf molécules souhaitées. Cette démarche est décrite de manière simplifiée à l'aide d'un schéma rétrosynthétique (Figure 28).

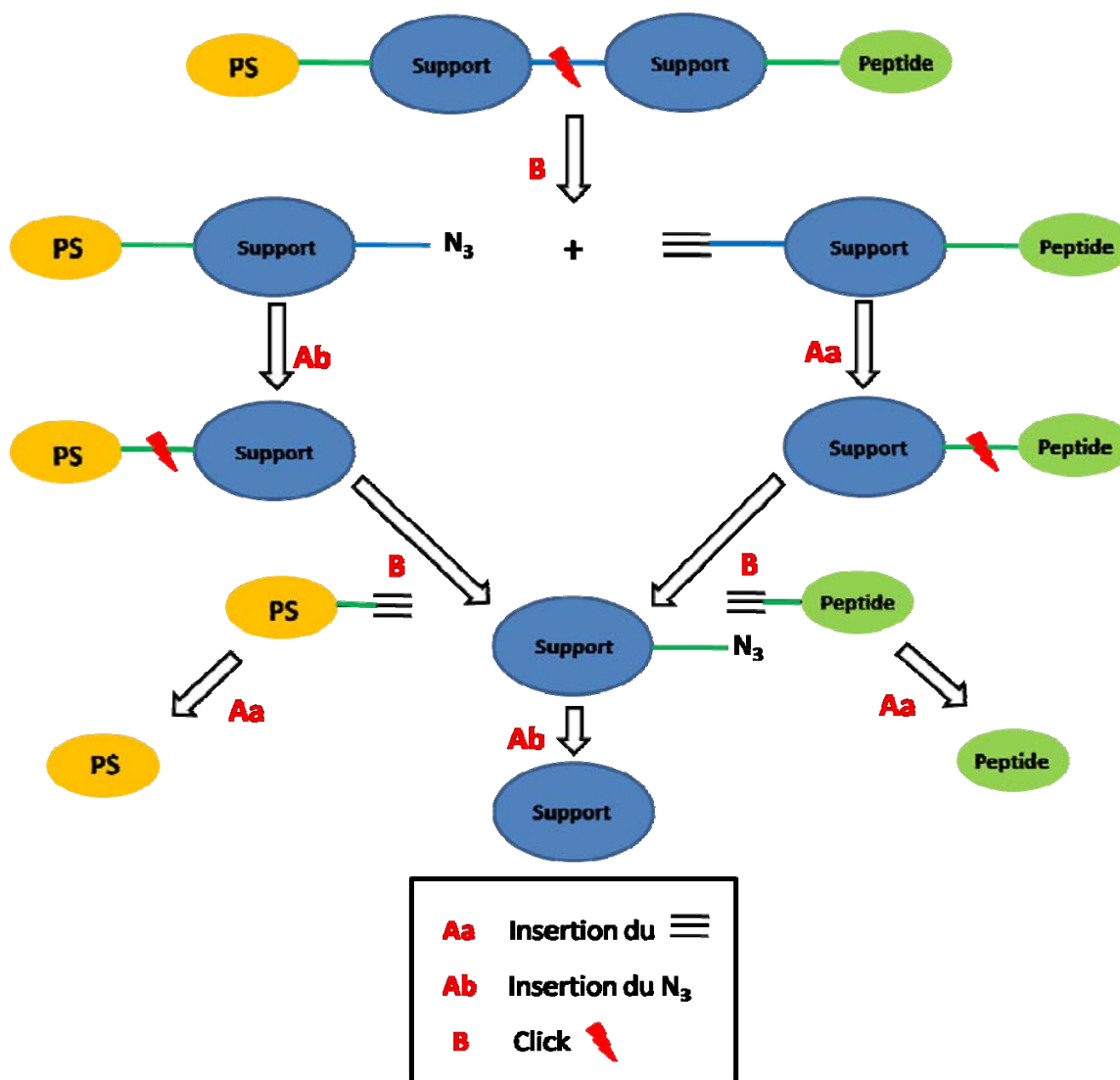


Figure 27 : Rétrosynthèse simplifiée d'une molécule associant 1 bras peptide à 1 bras PS

La rétrosynthèse présentée ici permet l'obtention d'une molécule à 1 bras PS et 1 bras peptide. La même stratégie est utilisée pour la synthèse des molécules à 2 et 3 bras PS et peptides. La molécule finale possédant 1 bras PS et 1 bras peptide pourrait être obtenue par chimie click (cycloaddition) entre deux supports, l'un greffé PS ayant une extrémité azide et l'autre greffé peptide ayant une extrémité propargyle.

Ces deux entités support-PS et support-peptide (avant fonctionnalisation par un azide ou propargyle) seraient synthétisées par chimie click entre 1 bras PS ou peptide possédant une extrémité propargyle et un support commun ayant une extrémité azide. Enfin ce support possédant la fonction azide serait préparé en quelques étapes à partir de produits commerciaux.

### 4.3. Schéma synthétique

Les différentes étapes de la synthèse sont présentées dans ce paragraphe.

#### 4.3.1. Synthèse du support fonctionnalisé par un azide



Il est nécessaire de synthétiser trois supports fonctionnalisés par 1, 2 ou 3 azides en fonction du nombre de bras à greffer par chimie click. Ces différents supports sont obtenus à partir des produits de départ commerciaux suivants :

- Pour le support 1 bras : le 4-hydroxybenzoate de méthyle
- Pour le support 2 bras : le 3,5-dihydroxybenzoate de méthyle
- Pour le support 3 bras : le 3,4,5-trihydroxybenzoate de méthyle

Leurs formules développées sont données dans le tableau 1.

4-hydroxybenzoate de méthyle <b>1a</b>	3,5-dihydroxybenzoate de méthyle <b>1b</b>	3,5,7-trihydroxybenzoate de méthyle <b>1c</b>

Tableau 1 : Formules développées des produits de départ

La fonctionnalisation des produits commerciaux est réalisée par réaction  $S_N2$  avec une petite chaîne polyéthylène glycol à extrémité azide (diéthylène glycol- $N_3$  ou DEG- $N_3$ ). L'ajout de cette chaîne DEG a pour objectif d'augmenter l'hydrosolubilité de la molécule finale.

### Synthèse du MsO-DEG- $N_3$

Sa synthèse comporte deux étapes : la mésylation du diéthylène glycol,<sup>[125]</sup> puis la substitution nucléophile d'un groupement mésyl par une fonction azide.<sup>[126]</sup> (Figure 29)

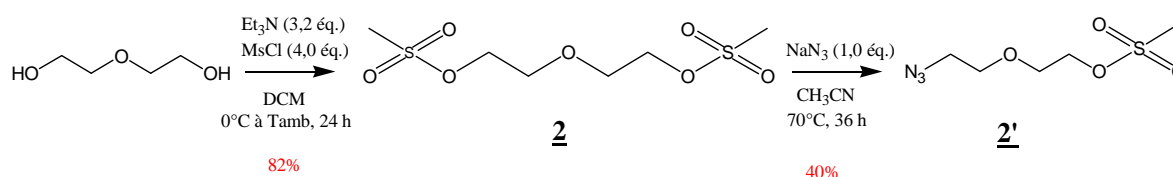


Figure 28 : Synthèse du MsO-DEG- $N_3$  2'

La deuxième étape a un rendement de 40% et entraîne la formation d'un produit secondaire : le bis-(2-(azidoéthoxy)éthyl)éther 2'' (Figure 30) :

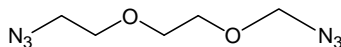


Figure 29 : Bis-(2-(azidoéthoxy)éthyl)éther 2''

Cette molécule sera réutilisée dans la suite de la synthèse (voir paragraphe 4.3.5.)

### Synthèse des supports greffés avec les bras DEG- $N_3$

La molécule 2' réagit avec les molécules 1a à 1c par une réaction  $S_N2$ . Cette synthèse a déjà été réalisée sur le « di et tri OH » 1b et 1c<sup>[127]</sup> et est ici appliquée également au support « mono OH » 1a.

La fonction ester des différents supports doit être saponifiée afin de permettre le greffage d'un bras à extrémité azide (côté PS) ou propargyle (côté peptide) nécessaires pour la « click » finale. Cette réaction a tout intérêt à être réalisée avant le greffage des bras PS sur les supports. En effet, les PS étant dégradés à la lumière, toutes les réactions devront être réalisées dans l'obscurité à partir du moment où ils seront attachés à leur support. Afin de retarder le recours à ces conditions expérimentales contraignantes, la saponification est donc réalisée à ce stade.

La Figure 31 représente la synthèse du support à 3 bras :

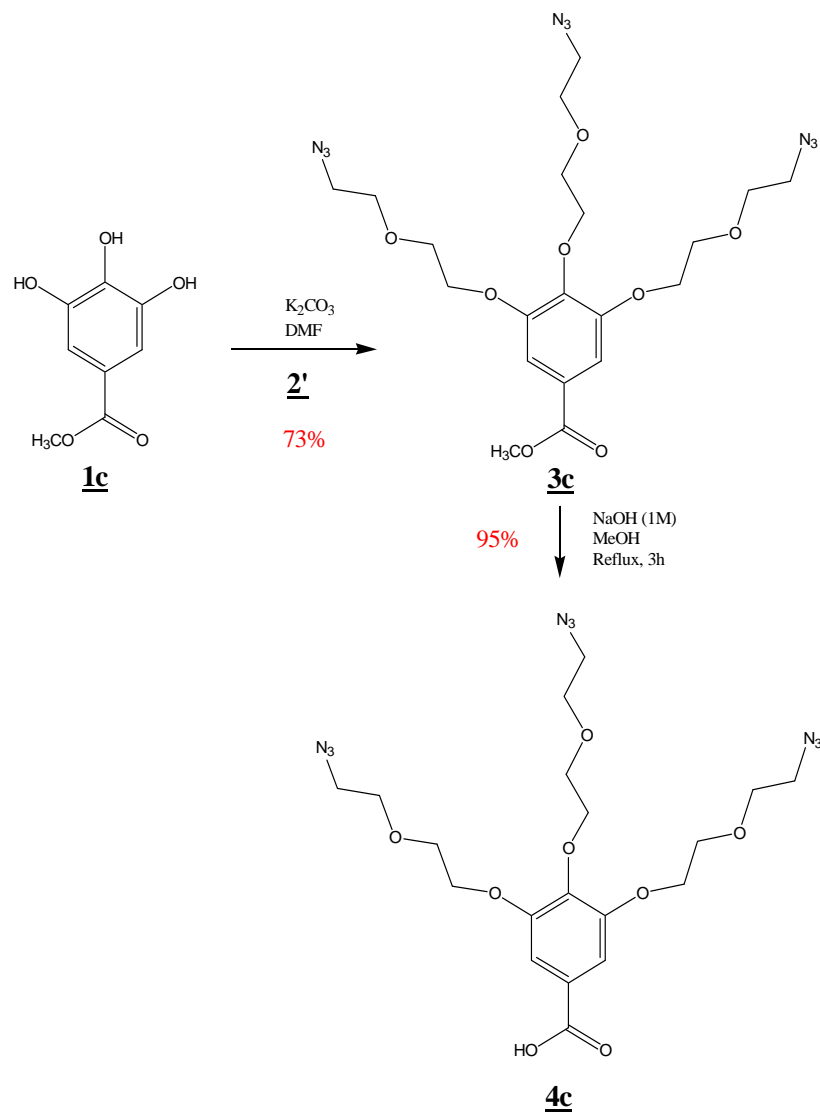
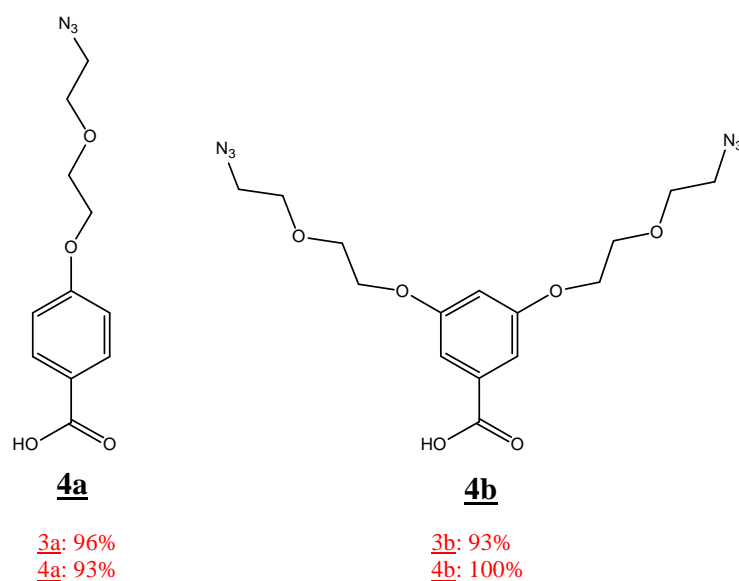


Figure 30 : Synthèse du support greffé avec 3 bras DEG-N<sub>3</sub>

Par la même stratégie, les deux autres supports ainsi obtenus sont présentés ci-dessous (Figure 32) :

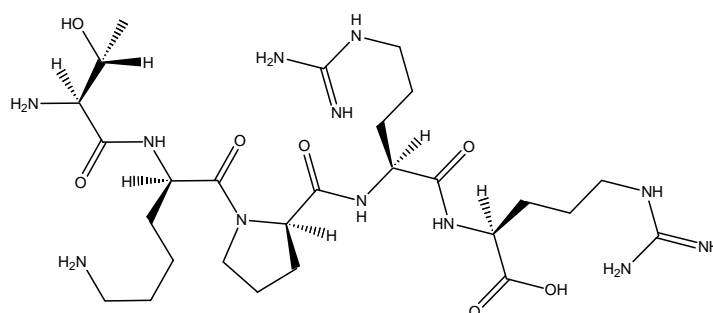
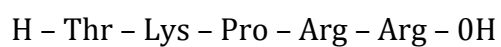




**Figure 31 : Supports greffés à 1 et 2 bras DEG-N<sub>3</sub>**

#### 4.3.2. Synthèse du peptide

Le pentapeptide TKPRR est utilisé pour cette synthèse. Ses formules en code trilettres et développée sont présentées ci-dessous (Figure 33) :



**Figure 32 : Formule développée et en code trilettres du TKPRR**

La synthèse de TKPRR est réalisée sur support solide. Cette technique permet de simplifier les purifications qui sont réduites à de simples lavages intermédiaires. En effet, chaque acide aminé ajouté vient se fixer sur la chaîne en formation, puis l'excédent est éliminé par lavage. La purification de réactions en phase liquide est beaucoup plus complexe et nécessite l'utilisation d'une grande quantité de solvant.

La synthèse du TKPRR est réalisée grâce à un synthétiseur automatique (Figure 34). La résine utilisée est fonctionnalisée par l'arginine (Fmoc-Arg(Pbf)-Wang resin; Substitution = 0.57 mmol/g).



**Figure 33 : Synthétiseur automatique de peptides**

Le groupement protecteur de la fonction aminée Fmoc (Fluorényl méthoxy-carbonyl) s'élimine dans des conditions basiques en présence de pipéridine. La déprotection des chaînes latérales des acides aminés et le clivage du peptide de la résine sont effectués en présence d'acide trifluoroacétique (TFA).

L'activation de l'acide aminé en C-terminal permet d'obtenir des rendements de couplage supérieurs à 99%. L'activation classique d'un acide aminé consiste à remplacer le groupement hydroxyle de la fonction acide par un bon groupement partant. Nous avons retenu une stratégie utilisant le HBTU (hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium) en présence de NMM (*N*-méthyl-2-morpholine). La réaction doit être rapide et totale, aussi travaille-t-on avec de larges excès d'acides aminés activés (3 à 10).

La séquence à obtenir ainsi que la quantité de peptide souhaitée sont entrées dans le programme, qui calcule alors les quantités de chaque acide aminé (Thr, Lys, Pro, Arg), d'agent de déprotection (pipéridine), d'activateur (HBTU) et de base (NMM) à ajouter. Un cycle est effectué par l'appareil pour chaque acide aminé. La synthèse se fait de l'extrémité C- vers l'extrémité N-terminale. Un cycle comprend différentes phases :

La fonction amine de l'arginine portée par la résine est déprotégée par l'ajout de pipéridine. Le premier acide aminé *N*-protégé (Arg) est ajouté ainsi que le HBTU et la NMM. L'acide aminé s'accroche par la fonction acide carboxylique sur la résine fonctionnalisée. Un rinçage permet d'éliminer l'excès de réactifs. Puis le groupement protecteur de l'amine terminale est clivé grâce à l'ajout de pipéridine, opération suivie d'un rinçage. Un second acide aminé (Pro) *N*-protégé est ajouté (en excès), ainsi que du réactif de couplage. On réalise ainsi 5 cycles pour constituer le pentapeptide. Les étapes de la synthèse peptidique sur support solide sont schématisées ci-dessous (Figure 35) :

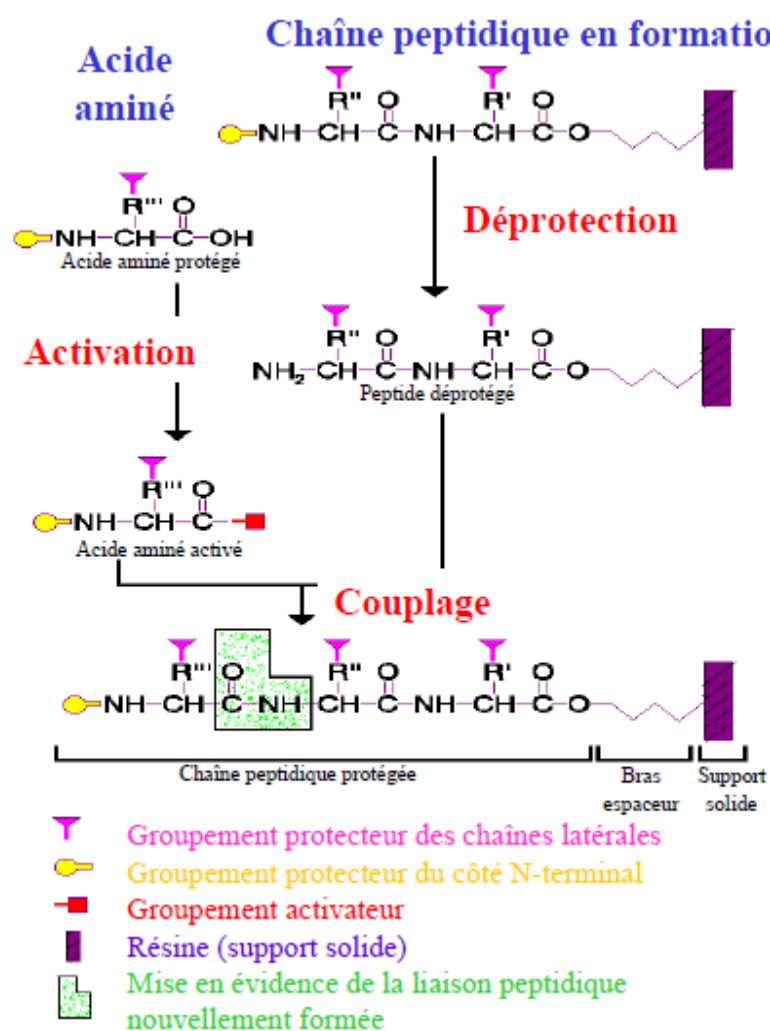


Figure 34 : Schéma des étapes de la synthèse peptidique en phase solide<sup>[113]</sup>

Lorsque tous les acides aminés ont été couplés, le peptide est déprotégé en N-terminal, puis un traitement acide au TFA enlève les protections latérales du peptide et le libère du support solide. Le peptide est ensuite purifié puis caractérisé par RMN.

Une fonction propargyle est ensuite greffée au peptide selon la figure suivante (Figure 36):

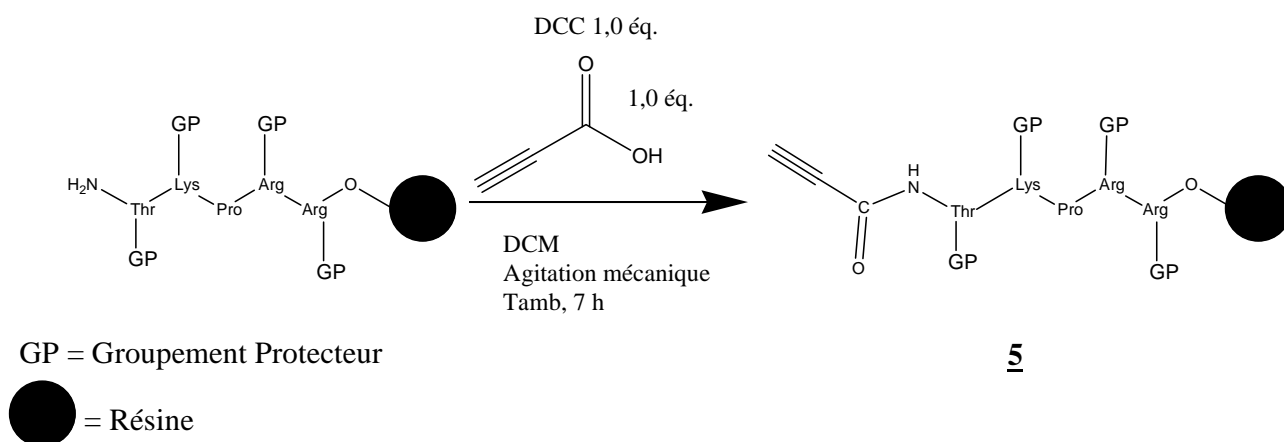


Figure 35 : Greffage d'une extrémité propargyle sur le peptide

#### 4.3.3. Synthèse du PS

Le PS qui sera utilisé est la TPC-COOH dont la formule développée est donnée ci-dessous (Figure 37). C'est un PS de deuxième génération de type chlorine, avec des propriétés photophysiques intéressantes. De plus, la présence d'un groupement carboxyle permet un couplage aisé sur la fonction amine d'un peptide, *via* la formation d'une liaison amide. Cette étape de synthèse du PS est actuellement en cours de réalisation au laboratoire.

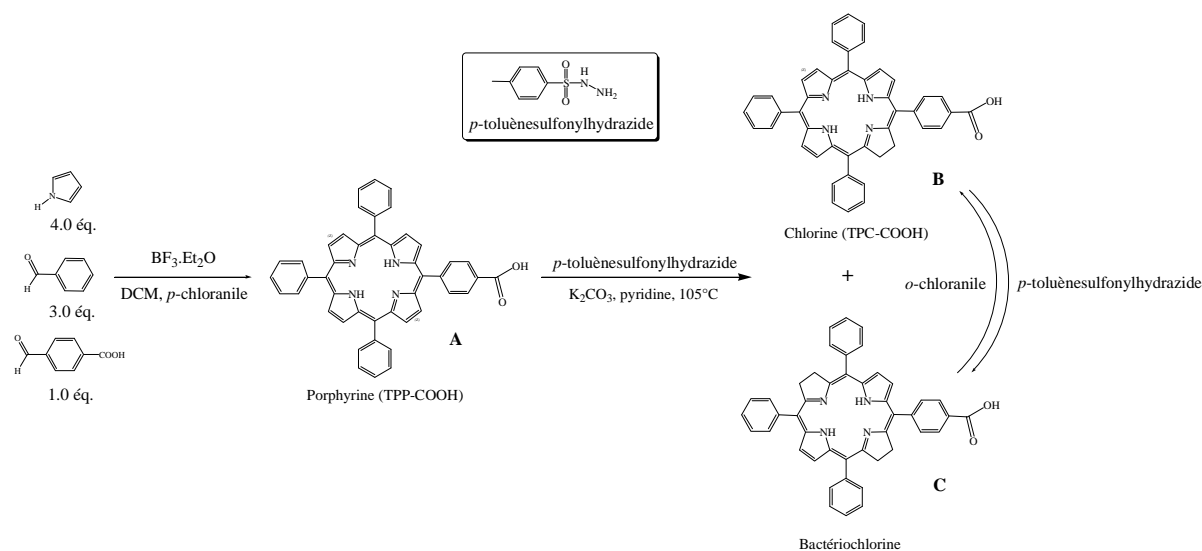


Figure 36 : Formule développée de la TPC-COOH

#### 4.3.4. Préparation des blocs support peptides



Deux stratégies différentes peuvent être envisagées pour la préparation des blocs support peptides :

- Phase liquide :

Le peptide fonctionnalisé par l'extrémité propargyle est décroché de la résine, puis la synthèse est poursuivie en phase liquide.

- Une stratégie sur « support solide » :

Au lieu de décrocher la molécule **5**, il est intéressant de continuer la synthèse sur la résine. L'objectif premier de ce projet est d'obtenir rapidement de petites quantités des différents supports peptides et PS afin de les assembler par chimie click et d'effectuer des tests *in vitro* et *in vivo*. La stratégie sur support solide nous permettra d'obtenir, à faibles rendements, la synthèse rapide des molécules à tester. Cette stratégie est donc celle que nous avons adoptée.

La synthèse est ainsi réalisée par chimie click des molécules **4a** à **4c** directement sur la molécule **5** accrochée à la résine. La synthèse est détaillée en partant de la molécule **4c** (Figure 38).

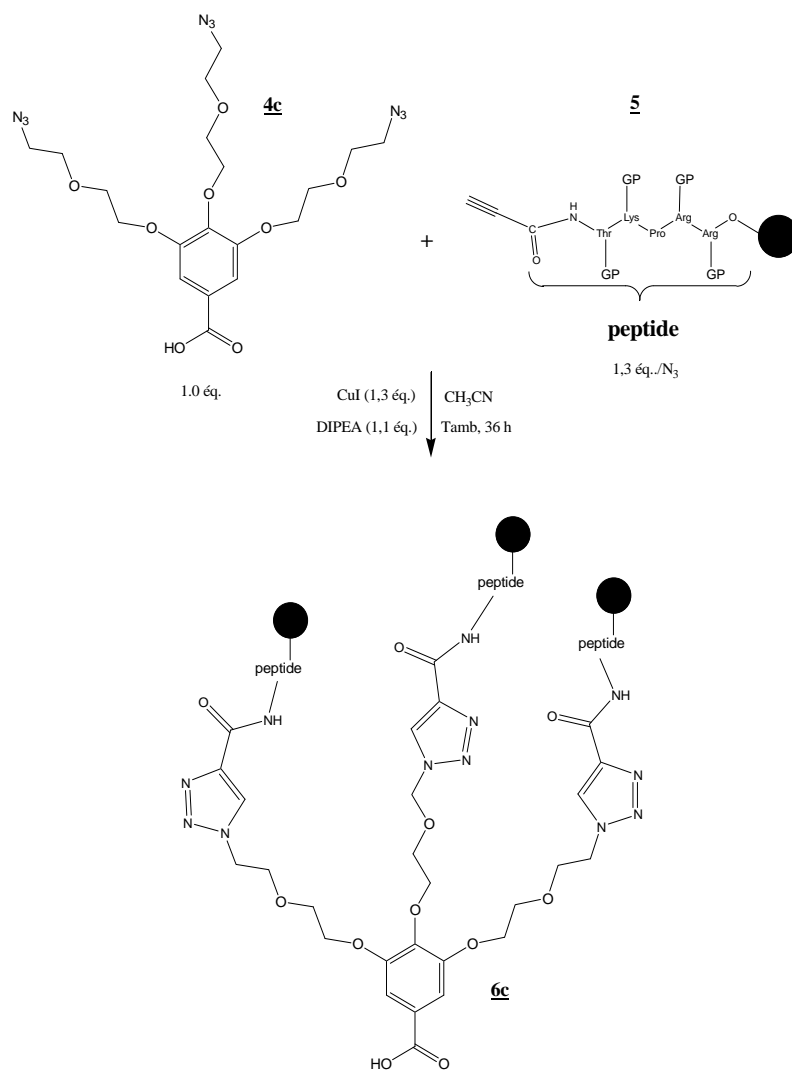


Figure 37 : Synthèse de la molécule **6c**

Nous simplifions l'écriture de cette molécule de la façon suivante :

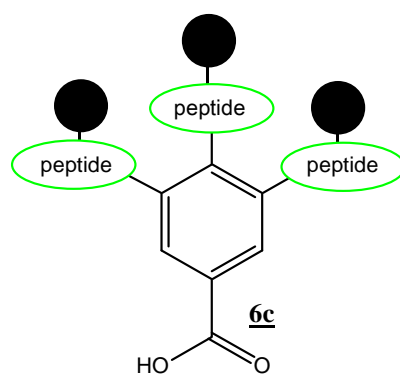
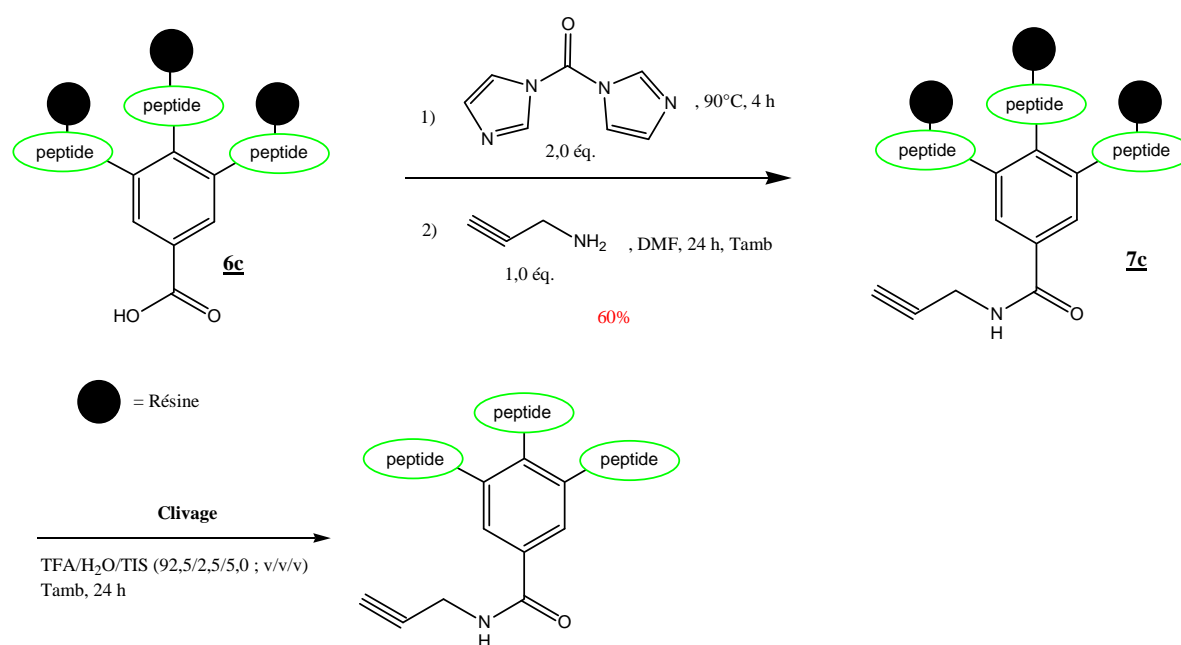


Figure 38 : Molécule **6c** simplifiée

L'étape suivante consiste à fonctionnaliser les molécules **6a** à **6c** avec un groupement propargyle<sup>[128]</sup> pour obtenir les molécules **7a** à **7c**. La synthèse est détaillée en partant de la molécule **6c** (Figure 40). Les rendements globaux obtenus sont les suivants :

- 31% pour **7a**,
- 26% pour **7b**,
- 60% pour **7c**.

Ces rendements sont satisfaisants car notre objectif à ce stade est d'obtenir une petite quantité de produit pour réaliser rapidement les tests.



**Figure 39 : Fonctionnalisation des supports peptides**

Pour vérifier l'obtention du bloc, une partie du produit est décroché de la résine et des analyses sont effectuées (RMN et LC-MS). Le chromatogramme obtenu par LC-MS confirme l'obtention des bons produits.

Les étapes suivantes n'ont pas encore été réalisées et seront donc présentées d'un point de vue théorique.

#### 4.3.5. Préparation des blocs support PS



Les réactions auront lieu en phase liquide. Les supports **4a** à **4c** déjà synthétisés dans la partie « peptides » seront utilisés. Les conditions de réaction permettant la « click » des PS sur ces supports sont identiques à celles décrites pour les blocs support peptide en utilisant des PS fonctionnalisés à leur extrémité par un propargyle. Nous obtiendrons ainsi les molécules **8a** à **8c** (Figure 41).

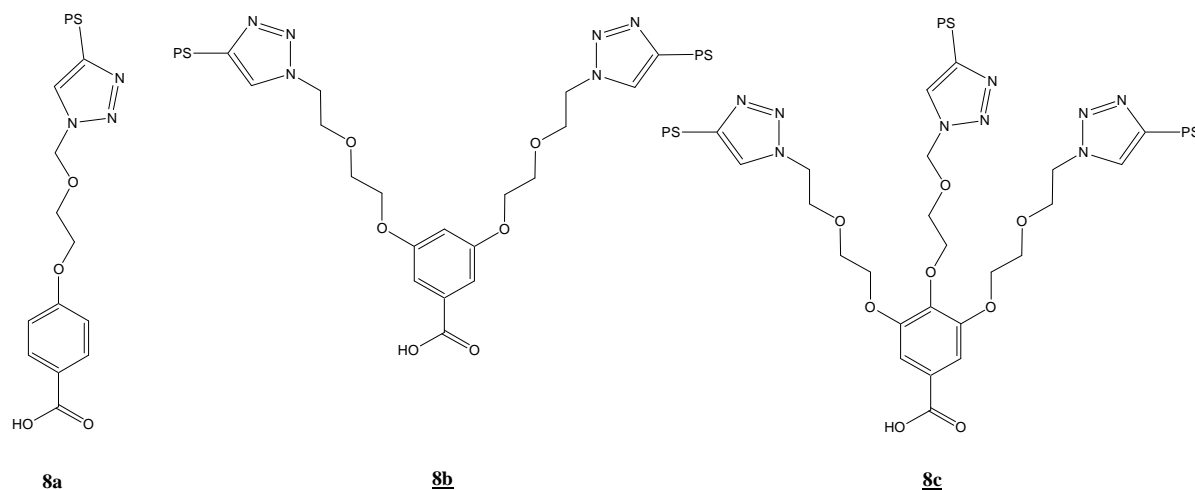


Figure 40 : Molécules **8a** à **8c**

Nous simplifions l'écriture de cette molécule de la façon suivante :

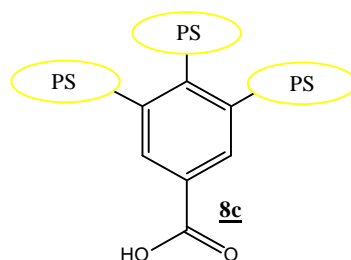


Figure 41 : Molécule **8c** simplifiée

A l'inverse des supports peptides, les molécules **8a** à **8c** seront fonctionnalisées par un azide. La molécule qui sera utilisée est le N<sub>3</sub>-DEG-N<sub>3</sub> **2'**, produit secondaire obtenu lors de l'étape de synthèse de la molécule **2'** (Figure 29). Elle permet d'augmenter l'hydrosolubilité de la molécule finale tout en recyclant les diazides, produits secondaires de la réaction de monoazidation. La réaction conduit à la formation de 1-amino-5-azido-3-oxapentane **9**.<sup>[129]</sup> (Figure 43)



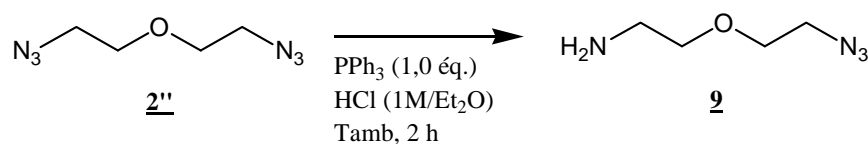


Figure 42 : Synthèse du 1-amino-5-azido- 3-oxapentane **9**

La molécule **9** sera ensuite greffée sur les molécules **8a** à **8c**. La Figure 44 présente cette étape pour la molécule **8c**.

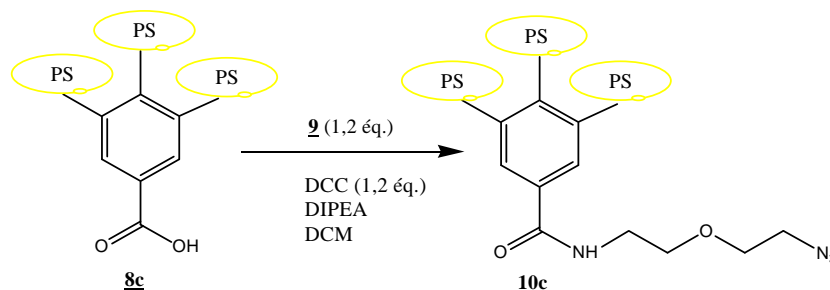
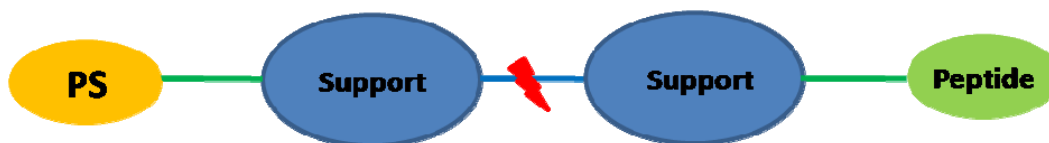


Figure 43 : Synthèse de la molécule **10c**

#### 4.3.6. « Click » finale



Les blocs support peptide et support PS seront ensuite assemblés par chimie click. La Figure 45 présente la click finale des molécules **10c** et **7c**.

9 molécules seront ainsi obtenues (voir Tableau 2 et annexe). Elles seront ensuite décrochées de la résine.

Support Peptide	Support PS	Molécule finale
<b>7a</b>	<b>10a</b>	<b>11aa</b>
<b>7a</b>	<b>10b</b>	<b>11ab</b>
<b>7a</b>	<b>10c</b>	<b>11ac</b>
<b>7b</b>	<b>10a</b>	<b>11ba</b>
<b>7b</b>	<b>10b</b>	<b>11bb</b>
<b>7b</b>	<b>10c</b>	<b>11bc</b>
<b>7c</b>	<b>10a</b>	<b>11ca</b>
<b>7c</b>	<b>10b</b>	<b>11cb</b>
<b>7c</b>	<b>10c</b>	<b>11cc</b>

Tableau 2 : Molécules obtenues après la click finale

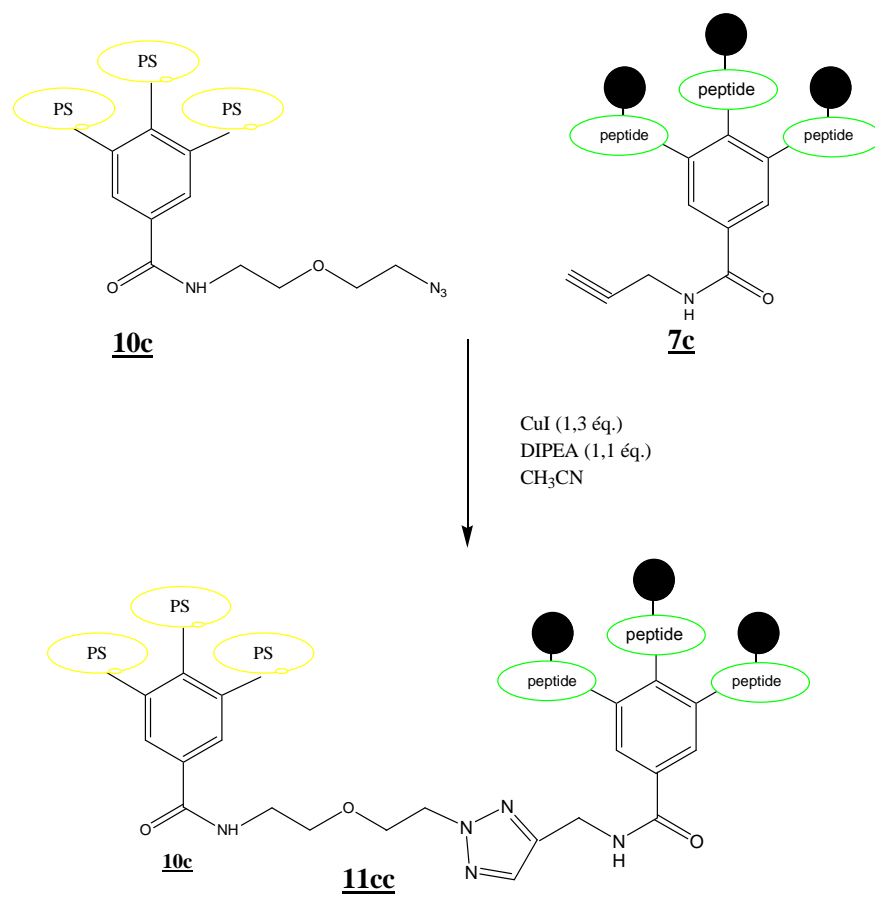


Figure 44 : Exemple de click finale pour la molécule **11cc**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif premier de ce travail est d'obtenir de petites quantités des différents supports peptides et PS afin de les assembler par chimie click puis d'effectuer rapidement des tests *in vitro* et *in vivo*. Nous avons donc dans un premier temps synthétisé les trois supports peptide avec un faible rendement en utilisant la stratégie sur support solide, qui est une méthode d'accès rapide à ces molécules. De meilleurs rendements seront recherchés par la suite si les résultats des tests *in vitro* et *in vivo* sont satisfaisants.

L'étape suivante consistera à synthétiser la TPC. Sa synthèse a déjà été réalisée au laboratoire. Des analyses photophysiques seront réalisées par UV pour détecter la TPP ((5-(4-carboxyphényl)-10,15,20- triphénylporphyrine), la bactériochlorine puis la TPC. Une fois cette molécule synthétisée et caractérisée (LC-MS et RMN), elle sera fonctionnalisée par une extrémité propargyle puis greffée aux différents supports par chimie click. Enfin une click finale sera réalisée (Figure 46) pour aboutir aux 9 molécules désirées (Tableau 2) qui seront ensuite étudiées *in vivo* et *in vitro*. Les résultats seront comparés afin de déterminer quelle molécule permet d'obtenir le meilleur ciblage et la meilleure efficacité phototoxique.

Nous supposons que l'efficacité cytotoxique atteint un palier à partir d'une certaine quantité de PS, par saturation de la cellule tumorale en oxygène singulet. Il se pourrait donc que le ratio peptides/PS penche en faveur des peptides. Cette hypothèse sera vérifiée après étude *in vitro* et *in vivo* à partir des 9 molécules obtenues.

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Initiation de l'angiogenèse .....	8
Figure 2 : La dissémination cancéreuse <sup>[1]</sup> .....	9
Figure 3 : Évolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2005 .....	10
Figure 4 : L'acridine .....	15
Figure 5 : L'éosine .....	16
Figure 6 : Principe de la PDT .....	18
Figure 7 : Mécanisme photochimique de la PDT .....	19
Figure 8 : Exemple d'oxydation et de cyclisation de molécules après réaction avec l'oxygène singulet .....	20
Figure 9 : Structure de l'hématoporphyrine .....	22
Figure 10 : L'hématoporphyrine dérivée (HpD) .....	23
Figure 11 : Le Photofrin <sup>®</sup> (n=1-9) .....	24
Figure 12 : Structures du 5-ALA et de la protoporphyrine IX (Pp-IX) .....	25
Figure 13 : Schéma représentant la biosynthèse de l'hème .....	26
Figure 14 : <i>m</i> -THPC (Foscan <sup>®</sup> ) .....	26
Figure 15 : Structure de la BPD-MA : Vertéporfine - Visudyne <sup>®</sup> .....	28
Figure 16 : Structure de l'étiopurpurine d'étain (Purlytin <sup>™</sup> ) .....	29
Figure 17 : Le Xcytrin <sup>™</sup> et le Lutrin <sup>™</sup> .....	29
Figure 18 : La Npe6 .....	30
Figure 19 : Structure de la chloroaluminium phthalocyanine sulfonée (ClAlPcS) .....	31
Figure 20 : Complexe 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique .....	33
Figure 21 : Le conjugué œstradiol-porphyrine .....	34
<b>Figure 22 : Exemples de structures actives conjuguées à des polyamines</b> .....	35
Figure 24 : Mécanisme de l'angiogenèse <sup>[91]</sup> .....	38
Figure 25 : Cycloadditions 1,3-dipolaire de Huisgen .....	46
Figure 26 : Chlorine couplée à l'heptapeptide ATWLPPR <i>via</i> le bras espaceur Ahx : TPC-Ahx-ATWLPPR .....	47
Figure 27 : Molécule type à trois bras PS et trois bras peptides .....	49
Figure 28 : Rétrosynthèse simplifiée d'une molécule associant 1 bras peptide à 1 bras PS .....	50
Figure 29 : Synthèse du Ms0-DEG-N <sub>3</sub> 2' .....	52
Figure 30 : Bis-(2-(azidoéthoxy)ethyl)éther 2'' .....	52
Figure 31 : Synthèse du support greffé avec 3 bras DEG-N <sub>3</sub> .....	53
Figure 32 : Supports greffés à 1 et 2 bras DEG-N <sub>3</sub> .....	54
Figure 33 : Formule développée et en code trilettre du TKPRR .....	54
Figure 34 : Synthétiseur automatique de peptides .....	55
Figure 35 : Schéma des étapes de la synthèse peptidique en phase solide <sup>[113]</sup> .....	56
Figure 36 : Greffage d'une extrémité propargyle sur le peptide .....	57
Figure 37 : Formule développée de la TPC-COOH .....	57
Figure 38 : Synthèse de la molécule 6c .....	59
Figure 39 : Molécule 6c simplifiée .....	59
Figure 40 : Fonctionnalisation des supports peptides .....	60
Figure 41 : Molécules 8a à 8c .....	61
Figure 42 : Molécule 8c simplifiée .....	61
Figure 43 : Synthèse du 1-amino-5-azido- 3-oxapentane 9 .....	62
Figure 44 : Synthèse de la molécule 10c .....	62
Figure 45 : Exemple de click finale pour la molécule 11cc .....	63

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Pantel, K.; Brakenhoff, R.H. *Nature Reviews Cancer*, **2004**, *4*, 448-456.
- [2] Inserm. *Cancer et environnement*. Expertise collective. Éditions Inserm, **2008** : 228 p.
- [3] Remontet, L. *et al. Rev. Epidemiol. Santé Publ.*, **2003**, *51*, 3-30.
- [4] Inserm. *Cancer, approche méthodologique du lien avec l'environnement*. Expertise collective. Éditions Inserm, **2005** : 92 p.
- [5] Académie Nationale de Médecine. *Les causes du cancer en France*. Rapport. Paris, **2008** : 276 p.
- [6] Inserm. *Cancer et environnement*. Expertise collective. Paris : Éditions Inserm **2008** : 228 p.
- [7] Toulemon, L.; Robert-Bobée, I. Population française : vers une stabilisation à 70 millions d'habitants. *Population et Sociétés*, **2006** ; n° 429.
- [8] Belot, A. *et al. Rev. Epidemiol. Santé Publ.*, **2008**, *56*, 159-175.
- [9] [www.artac.info/](http://www.artac.info/) [citée le 8 mars 2010].
- [10] [www.alexisvautrin.fr/](http://www.alexisvautrin.fr/) [citée le 8 mars 2010].
- [11] Jesionek, A.; Von Tappeiner, H. *Munch. Med. Wochenschr.*, **1903**, *41*, 2042-2051.
- [12] Meyer-Betz, H. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, **1913**, *112*, 476-503.
- [13] Policard, A.; Leulier, A. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **1924**, *91*, 1422-1433.
- [14] Figge, F. H. J.; Weiland, G. S.; Manganiello, L. O. J. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1948**, *68*, 640-641.
- [15] Lipson, R. L.; Baldes, E. J. *Arch. Dermatol.*, **1960**, *82*, 508-516.
- [16] Lipson, R.L.; Blades, E.J.; Olsen, A.M. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1961**, *26*, 1-12.
- [17] Dougherty, T.J.; Grindey, G. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1975**, *55*, 115-121.
- [18] Dougherty, T. J.; Kaufman, J. *Cancer Res.*, **1978**, *38*, 2628-2655.
- [19] Weishaupt, K. R.; Gomer, C. J.; Dougherty, T. J. *Cancer Res.*, **1976**, *36*, 2326-2329.
- [20] **a)** Jori, G.; Beltramini, M.; Reddi, E.; Salvato, B.; Pagnan, A.; Ziron, L.; Tomio, L.; Tsanov, T. *Cancer Lett.*, **1984**, *24*, 291-297.
- b)** Reyftmann, J. P.; Morlière, P.; Goldstein, S.; Santus, R.; Dubertret, L.; Lagrange D. *Photochem. Photobiol.*, **1984**, *40*, 721-729.
- [21] **(a)** Gal, D.; MacDonald, P. C.; Porter, J. C.; Simpson, E. R. *Int. J. Cancer*, **1981**, *28*, 315-319 ; **(b)** Mazière, J. C.; Mazière, C.; Mora, L.; Polonovski, J. *Biochimie*, **1981**, *63*, 221-226.
- [22] Kessel, D. *Cancer Lett.* , **1986**, *33*, 183-188.

- [23] Hoerni, B. *et al.* Dictionnaire des cancers, [http://www.sfc.asso.fr/glossaire/definition\\_1719\\_therapie+photodynamique+.html](http://www.sfc.asso.fr/glossaire/definition_1719_therapie+photodynamique+.html) [cité le 8 mars 2010].
- [24] Garcia, G. Thèse de doctorat en sciences. Université de Limoges, **2006**.
- [25] Foote, C. S. *Photochem. Photobiol.*, **1991**, *54*, 659.
- [26] Sternberg, E. D.; Dolphin, D.; Brückner, C. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 4151-4202.
- [27] Moan, J. *Photochem. Photobiol.*, **1990**, *6*, 343-347.
- [28] (a) Piette, J.; Volanti, C.; Vantieghem, A.; Matroule, J.Y.; Habraken, Y.; Agostinis, P. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, *66*, 1651-1659 ; (b) Castano, A.P.; Demidova, T.N.; Hamblin, M.R. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2005**, *2*, 1-23.
- [29] (a) Agostinis, P.; Buytaert, E.; Breyskens, H.; Hendrickx, N. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2004**, *3*, 721-729 ; (b) Kessel, D.; Vicente, M.G.; Reiners, J.J. *Jr. Autophagy*, **2006**, *2*, 289-290.
- [30] Yamamoto, N.; Homma, S.; Sery, T.W.; Donoso, L.A.; Hooper, J.K. *Eur. J. Cancer*, **1991**, *27*, 467-471.
- [31] (a) de Vree, W.J.; Essers, M.C.; Koster, J.F.; Sluiter, W. *Cancer Res.*, **1997**, *57*, 2555-2558 ; (b) Gollnick, S.O.; Evans, S.S.; Baumann, H.; Owczarczak, B.; Maier, P.; Vaughan, L.; Wang, W.C.; Unger, E.; Henderson, B.W. *Br. J. Cancer*, **2003**, *88*, 1772-1779.
- [32] Krosli, G.; Korbelik, M.; Dougherty, G.J. *Br. J. Cancer*, **1995**, *71*, 549-555.
- [33] (a) Gomer, C.J.; Ferrario, A.; Murphree, A.L. *Br. J. Cancer*, **1987**, *56*, 27-32 ; (b) Schreiber, S.; Gross, S.; Brandis, A.; Harmelin, A.; Rosenbach-Belkin, V.; Scherz, A.; Salomon, Y. *Int. J. Cancer*, **2002**, *99*, 279-285.
- [34] Gilissen, M.J.; van de Merbel-de Wit, L.E.; Star, W.M. ; Koster, J.F.; Sluiter, W. *Cancer Res.*, **1993**, *53*, 2548-2552.
- [35] Fingar, V.H.; Siegel, K.A.; Wieman, T.J.; Doak K.W. *Photochem. Photobiol.*, **1993**, *58*, 393-399.
- [36] Krammer, B. *Anticancer Res.*, **2001**, *21*, 4271-4277.
- [37] Dougherty, T.J.; Potter, W.R.; Weishaupt, K.R. *Progr. Clin. Biol. Res.*, **1984**, *170*, 301-314
- [38] Dougherty, T.J. *Semin. Surg. Oncol.*, **1986**, *2*, 24-37.
- [39] Pandey, R.K.; Majchzycki, D.F.; Smith, K.M.; Dougherty T.J. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, **1990**, *19*, 405-414.
- [40] Ressler, M.M.; Pandey, R.K. *Chemtech.*, **1998**, *28*, 39-45.

- [41] Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X.-H.; Childs, C. J. H.; Sibata, C. H. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2004**, *1*, 27-42.
- [42] Cramers, P.; Ruevekamp, M.; Oppelaar, H.; Dalesio, O.; Baas, P.; Stewart, F.A. *Brit. J. Cancer*, **2003**, *88*(2), 283-290.
- [43] Richter, A.M.; Waterfield, E.; Jain, A.K. *Photochem. Photobiol.*, **1990**, *52*, 495-500.
- [44] Lin, S.C.; Lin, C.P.; Feld, J.R. *Curr. Eye Res.*, **1994**, *13*, 513-522.
- [45] Schmidt-Erfurth, U.; Miller, J.; Sickenberg, M. *Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **1998**, *2365*, 365-374.
- [46] Primbs, G.B.; Casey, R.; Warmser, K.; Snyder, W.J. *Ophthalmic Surg. Laser*, **1998**, *29*, 832-838.
- [47] Kessel, D.; Luo, Y.; Chang, C.K. *Photochem. Photobiol.*, **1997**, *65*, 422-426.
- [48] Sessler, J. L.; Miller, R. A. *Biochem. Pharm.*, **2000**, *59*, 733-739.
- [49] Koudinova, N. V.; Pinthus, J. H.; Brandis, A.; Brenner, O.; Bendel, P.; Ramon, J.; Eshhar, Z.; Scherz, A.; Salomon, Y. *Int. J. Cancer*, **2003**, *104*, 782-789.
- [50] Boyle, R.W.; Dolphin, D. *Photochem. Photobiol.*, **1996**, *64*, 469-485.
- [51] Taber, S.W.; Fingar, V.H.; Coots, C.T. *Clin. Cancer Res.*, **1998**, *4*, 2741-2746.
- [52] Waszkowiak, A.; Frackowiak, D.; Wiktorowicz, K.; Miyake, J. *Acta Biochimica Polonica*, **2002**, *49*, 633-641.
- [53] Bachor, R.; Flotte, T.; Scholz, M.; Dretler, S.; Hasan, T. *Urology*, **1992**, *147*, 1404-1410.
- [54] Peng, Q.; Moan, J.; Kongshaug, M.; Evensen, J.F.; Anholt, H.; Rimmington, C. *Int. J. Cancer*, **1991**, *48*, 258-264.
- [55] Taquet, J.P.; Frochot, C.; Manneville, V.; Barberi-Heyob, M. *Curr. Med. Chem.*, **2007**, *14*, 103-112.
- [56] Chen, B.; Pogue, B.W.; Hoopes, P.J.; Hasan, T. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **2006**, *16*, 279-305.
- [57] (a) Mew, D.; Wat, C.K.; Towers, G.H.; Levy, J.G. *J. Immunol.*, **1983**, *130*, 1473-1477 ;  
(b) Mew, D.; Lum, V.; Wat, C.K.; Towers, G.H.; Sun, C.H.; Walter, R.J.; Wright, W.; Berns, M.W.; Levy, J.G. *Cancer Res*, **1985**, *45*, 4380-4386.
- [58] Hamblin, M.R.; Newman, E.L. *J. Photochem. Photobiol. B*, **1994**, *26*, 45-56.
- [59] Soukos, N.S.; Hamblin, M.R.; Keel, S.; Fabian, R.L.; Deutsch, T.F.; Hasan, T. *Cancer Res.*, **2001**, *61*, 4490-4496.
- [60] Vrouenraets, M.B.; Visser, G.W.; Stewart, F.A.; Stigter, M.; Oppelaar, H.; Postmus, P.E.; Snow, G.B.; van Dongen, G.A. *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 1505-1513.

- [61] Savellano, M.D.; Hasan, T. *Photochem. Photobiol.*, **2003**, *77*, 431-439.
- [62] Bonneau, S.; Morliere, P.; Brault, D. *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, *68*, 1443-1452.
- [63] Konan, Y.N.; Gurny, R.; Allemann, E. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2002**, *66*, 89-106.
- [64] Hamblin, M.R.; Newman, E.L. *J. Photochem. Photobiol. B*, **1994**, *26*, 147-157.
- [65] Schmidt-Erfurth, U; Diddens, H.; Birngruber, R.; Hasan, T. *Br. J. Cancer*, **1997**, *75*, 54-61.
- [66] Ponka, P.; Lok, C.N. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **1999**, *31*, 1111-1137.
- [67] Cavanaugh, P.G. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2002**, *72*, 117-130.
- [68] Schneider, R.; Schmitt, F.; Frochot, C.; Fort, Y.; Lourette, N.; Guillemin, F.; Muller, J.F.; Barberi-Heyob, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005**, *13*, 2799-2808.
- [69] Gravier, J.; Schneider, R.; Frochot, C.; Bastogne, T.; Schmitt, F.; Didelon, J.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 3867-3877.
- [70] Swamy, N.; James, D.A.; Mohr, S.C.; Hanson, R.N.; Ray, R. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10*, 3237-3243.
- [71] Di Stasio, B.; Frochot, C.; Dumas, D.; Even, P.; Zwier, J., Müller, A.; Didelon, D.; Guillemin, F.; Viriot, M.L.; Barberi-Heyob, M. *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, *40*, 1111-1122.
- [72] Sol, V.; Chaleix, V.; Champavier, Y.; Granet, R.; Huang, Y.M.; Krausz, P. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 7745-7760.
- [73] Verhille, M.; Couleaud, P.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyob, M.; Frochot, C. Sous presse, *Curr. Med. Chem*, **2010**.
- [74] Castros-Quemener, V.; Chamailard, L.; Bouet, F. *Médecine/Science*, **1999**, *15*, 1078-1085.
- [75] Jänne, J.; Poso, H.; Raina, A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1978**, *473*, 241-293.
- [76] Casero, R.A.; Woster, P.M. *J. Med. Chem.*, **2001**, *4*, 1-25.
- [77] Schneider, R.; Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Gravier, J.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *6*, 469-488.
- [78] Frochot, C.; Di Stasio, B.; Vanderesse, R.; Belgy, M.J.; Dodeller, M.; Guillemin, F.; Viriot, M.L.; Barberi-Heyob, M. *Bioorg. Chem.*, **2007**, *35*, 205-220.
- [79] Boisbrun, M.; Vanderesse, R.; Engrand, P.; Olié, A.; Hupont, S.; Regnouf-de-Vains, J.B.; Frochot, C. *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 3494-3504.
- [80] Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M.L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *J. Controll. Release*, **2006**, *111*, 153-164.
- [81] Tirand, L.; Thomas, N.; Dodeller, M.; Dumas, D.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Drug Metab. Dispos.*, **2007**, *35*, 806-813.

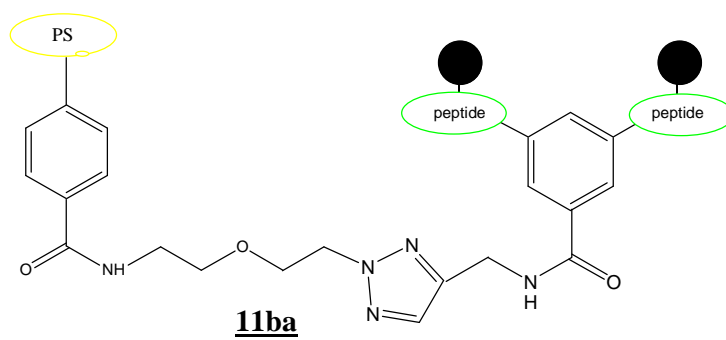
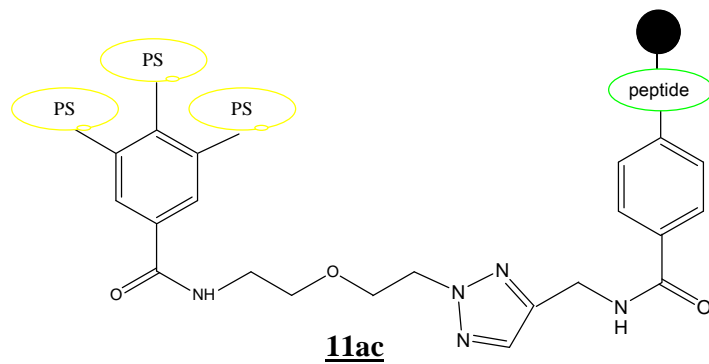
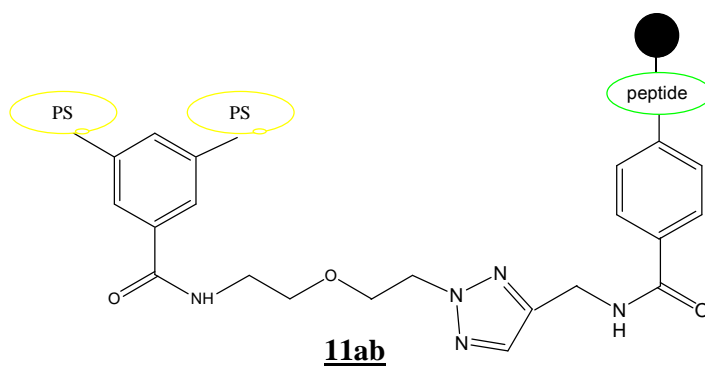
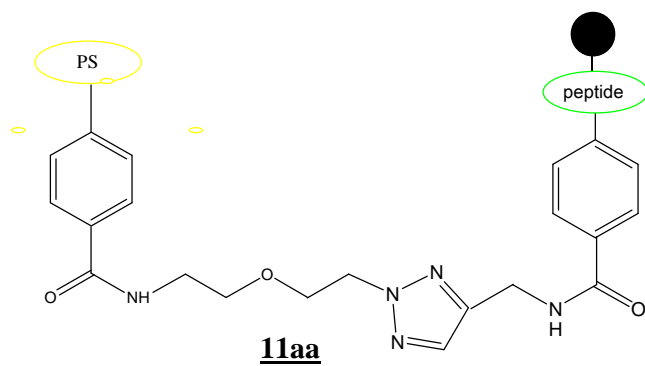


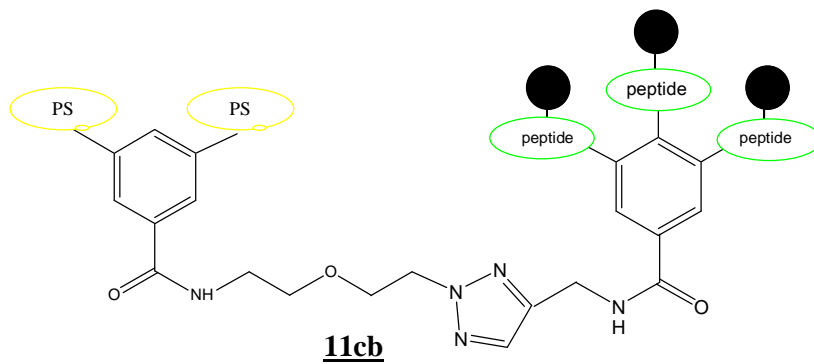
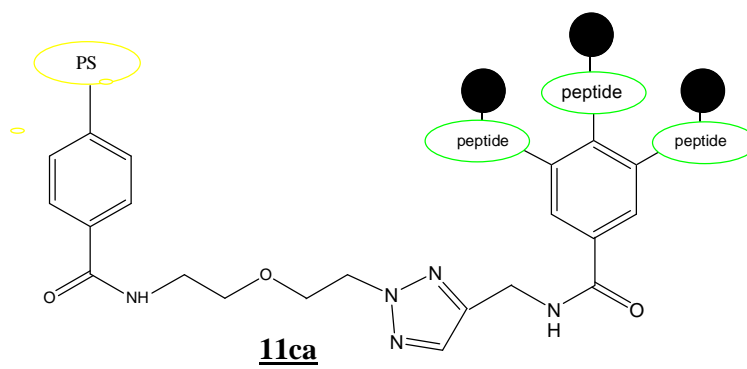
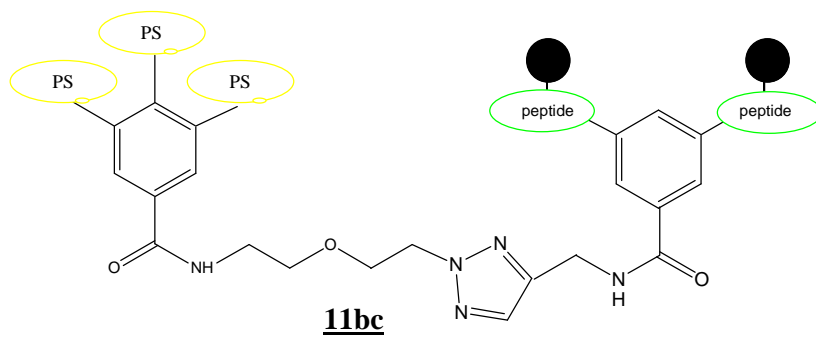
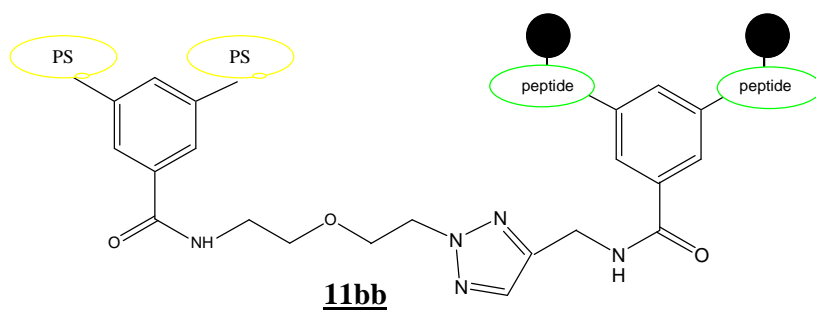
- [82] Thomas, N.; Tirand, L.; Chatelut, E.; Plénat, F.; Frochot, C.; Dodeller, M.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, *7*, 433-441.
- [83] Tirand, L.; Bastogne, T.; Bechet, D.; Linder, M.; Thomas, N.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, sous presse, **2009**.
- [84] Thomas, N.; Bechet, D.; Becuwe, P.; Tirand, L.; Vanderesse, R.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2009**, *96*, 101-108.
- [85] Bechet, D.; Tirand, L.; Faivre, B.; Plénat, F.; Bonnet, C.; Bastogne, T.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Pharm. Res.*, **2010**, *27(3)*, 468-479.
- [86] Thomas, N.; Pernot, M.; Vanderesse, V.; Becuwe, P.; Kamarulzaman, E.; Da Silva, D.; François, A.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Biochemical Pharmacology*, **2010**, *80(2)*, 226-235.
- [87] Dixon, W.; Kim, M.S.; Kumar, V.; Obara, G. *Antiviral. Chem. Chemother.*, **1992**, *3*, 279-282.
- [88] Folkman, J. *New Engl. J. Med.*, **1971**, *285*, 1182-1186.
- [89] Bergers, G.; Benjamin, L.E. *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 401-410.
- [90] Jussila, L.; Alitalo, K. *Physiol. Rev.*, **2002**, *82*, 673-700.
- [91] Soker, S.; Takashima, S.; Miao, H.Q.; Neufeld, G.; Klagsbrun, M. *Cell*, **1998**, *92*, 735-745.
- [92] Gluzman-Poltorak, Z.; Cohen, T.; Herzog, Y.; Neufeld, G. *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 299-322.
- [93] (a) Carmeliet, P. *et al. Nature*, **1996**, *380*, 435-439 ; (b) Ferrara, N.; Carver-Moore, K.; Chen, H.; Dowd, M.; Lu, L.; O'Shea, K. S.; Powell-Braxton, L.; Hillan, K. J.; Moore, M. W. *Nature*, **1996**, *380*, 439-442.
- [94] (a) Bergers, G. *et al. Nature Cell Biol.*, **2000**, *2*, 737-744 ; (b) Inoue, M. *et al. Cancer Cell*, **2002**, *1*, 193-202.
- [95] Ferrara, N.; Davis-Smyth, T. *Endocr. Rev.*, **1997**, *18*, 4-25.
- [96] Ferrara, N.; Gerber, H.P. *Acta Haematol.*, **2001**, *106*, 148-156.
- [97] Aase, K.; von Euler, G.; Li, X.; Ponten, A.; Thoren, P.; Cao, R.; Cao, Y.; Olofsson, B.; Gebre-Medhin, S.; Pekny, M.; Alitalo, K.; Betsholtz, C.; Eriksson, U. *Circulation*, **2001**, *104*, 358-364.
- [98] Bellomo, D.; Headrick, J.P.; Silins, G.U.; Paterson, C.A.; Thomas, P.S.; Gartside, M.; Mould, A.; Cahill, M.M.; Tonks, I.D.; Grimmond, S.M.; Townson, S.; Wells, C.; Little, M.; Cummings, M.C.; Hayward, N.K.; Kay, G.F. *Circ. Res.*, **2000**, *86*, E29-E35.

- [99] Olofsson, B.; Korpelainen, E.; Pepper, M.S.; Mandriota, S.J.; Aase, K.; Kumar, V.; Gunji, Y.; Jeltsch, M.M.; Shibuya, M.; Alitalo, K.; Eriksson, U. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 11709–11714.
- [100] Rafii, S.; Lyden, D.; Benezra, R.; Hattori, K.; Heissig, B. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 826-835.
- [101] Heissig, B. *et al. Cell*, **2002**, *109*, 625-637.
- [102] Carmeliet, P. *et al. Nat. Med.*, **2001**, *7*, 575-583.
- [103] Jussila, L.; Alitalo, K. *Physiol. Rev.*, **2002**, *82*, 673-700.
- [104] Barleon, B.; Sozzani, S.; Zhou, D.; Weich, H.A.; Mantovani, A.; Marme, D. *Blood*, **1996**, *87*, 3336-3343.
- [105] Clauss, M.; Weich, H.; Breier, G.; Knies, U.; Rockl, W.; Waltenberger, J.; Risau, W. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 17629-17634.
- [106] Sawano, A.; Iwai, S.; Sakurai, Y.; Ito, M.; Shitara, K.; Nakahata, T.; Shibuya, M. *Blood*, **2001**, *97*, 785-791.
- [107] Takahashi, H.; Hattori, S.; Iwamatsu, A.; Takizawa, H.; Shibuya, M. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 46304-46314.
- [108] Kanno, S.; Oda, N.; Abe, M.; Terai, Y.; Ito, M.; Shitara, K.; Tabayashi, K.; Shibuya, M.; Sato, Y. *Oncogene*, **2000**, *19*, 2138-2146.
- [109] Fong, G. H.; Rossant, J.; Gertsenstein, M.; Breitman, M. L. *Nature*, **1995**, *376*, 66-70.
- [110] Fong, G. H.; Zhang, L.; Bryce, D. M.; Peng, J. *Development*, **1999**, *126*, 3015-3025.
- [111] Katoh, O.; Tauchi, H.; Kawaishi, K.; Kimura, A.; Satow, Y. *Cancer Res.*, **1995**, *55*, 5687-5692.
- [112] Grosskreutz, C.L.; Anand-Apte, B.; Duplaa, C.; Quinn, T.P.; Terman, B.I.; Zetter, B.; D'Amore, P.A. *Microvasc. Res.*, **1999**, *58*, 128-136.
- [113] Ishida, A.; Murray, J.; Saito, Y.; Kanthou, C.; Benzakour, O.; Shibuya, M.; Wijelath, E.S. *J. Cell Physiol.*, **2001**, *188*, 359-368.
- [114] Shalaby, F.; Rossant, J.; Yamaguchi, T.P.; Gertsenstein, M.; Wu, X.F.; Breitman, M.L.; Schuh, A.C. *Nature*, **1995**, *376*, 62-66.
- [115] Nagy, J.A.; Vasile, E.; Feng, D.; Sundberg, C.; Brown, L.F.; Detmar, M.J.; Lawitts, J.A.; Benjamin, L.; Tan, X.; Manseau, E.J.; Dvorak, A.M.; Dvorak, H.F. *J. Exp. Med.*, **2002**, *196*, 1497- 1506.
- [116] Hong, Y.K.; Lange-Asschenfeldt, B.; Velasco, P.; Hirakawa, S.; Kunstfeld, R.; Brown, L.F.; Bohlen, P.; Senger, D.R.; Detmar, M. *Faseb. J.*, **2004**, *18*, 1111-1113.
- [117] Ferrara, N.; Gerber, H. P.; LeCouter. *J. Nat. Med.*, **2003**, *9*, 669-676.

- [118] Tobelem, G.; Dupuy, E. *Bulletin du cancer*, **2003**, *90*, 595-599.
- [119] Kolb, H.C.; Sharpless, K.B. *Drug Discov. Today*, **2003**, *8*, 1128-1137.
- [120] Kolb, H.C.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2004-2021.
- [121] Chandrasekhar, M.; Sekar, G.; Singh, V.K. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 10079-10083.
- [122] Pinel, S. *et al. Int. J. Radiat. Oncol.*, **2004**, *59*, 250-259.
- [123] Pinel, S. *et al. J. Neurol. Oncol.*, **2006**, *76*, 31-38.
- [124] Thomas, N. Thèse de doctorat en sciences. Université Nancy I, **2009**.
- [125] Ingham, A.M.; Xu, C.; Whitcombe, T.W.; Xu, C.; Bridson, J.N.; Mc Auley, A. *Can. J. Chem.*, **2002**, *80*, 155-162.
- [126] Sirion, U. *et al. Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 3953-3957.
- [127] **(a)** Fernandez-Megia, E.; Correa, J.; Rodríguez-Meizoso, I.; Riguera, R. *Macromolecules*, **2006**, *39*, 2113-2120 ; **(b)** Meunier, S.J.; Quijkan ; W., Wang, S.N.; Roy, R. *Can. J. Chem.*, **1997**, *75*, 1472-1482.
- [128] Franz, Andreas, H. *Synthesis and characterization of biotin derivatives as multifunctional oligosaccharides tags (XV)*, **2008**, 21-33.
- [129] Backley M.E.; Sol, V. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 7385-7392.

## ANNEXE : Molécules finales





## CHAPITRE III: PARTIE EXPERIMENTALE

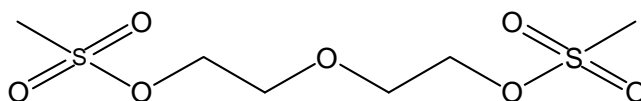
Ce chapitre sera rédigé en anglais.

### 1. General

Unless otherwise stated, reagents were purchased from chemical companies and used without prior purification. Reactions were monitored by thin-layer chromatography (TLC) using aluminium-backed silica gel plates (Macherey–Nagel ALUGRAM® SIL G/UV254). TLC spots were viewed under ultraviolet light and by heating the plate after treatment with a staining solution of phosphomolybdic acid. Product purifications were performed using Geduran 60 H Silica Gel (63–200 mesh). Reagent grade solvents were used as received.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a Bruker Advance 300 spectrometer. Multiplicities are reported as follow: s = singlet, d = doublet, m = multiplet, br = broad, Ar. = aromatic. Solid phase synthesis was recorded on a Intavis Bioanalytical Instruments AG PepRes XL. IR spectra were recorded on a Bruker Tensor 27. LC-MS spectra were recorded on a Shimadzu LCMS-2010 EV. Melting points (mp) were obtained on a hot-stage apparatus and were uncorrected.

## 2. Synthesis

### Bis-(2-(-methylsulfonyl)oxyethyl)ether **2**



**Formula** : C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> ; **Molecular Weight** : 262,30 g/mol

#### Experimental section :

To a solution of triethylamine (44.5 mL, 0.32 mol) and DEG (9.5 mL, 0.10 mol) in DCM (600 mL) at -10°C was added a solution of MsCl (31 mL, 0.40 mol) in DCM (100 mL) dropwise over a period of 1 h. The mixture was stirred overnight at room temperature and washed successively with HCl 1M (40 mL), water (3 × 40 mL) and NaHCO<sub>3</sub> saturated (40 mL) and the organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrated and evaporated *in vacuo*. The crude mixture was precipitated in Petroleum ether (PE), filtrated and recrystallized from hot methanol to give **2** (21.6 g, 82%) as a white crystal.

#### Characterization :

mp = 58°C

R<sub>f</sub> (DCM/MeOH, 95/5) + MPA = 0.69

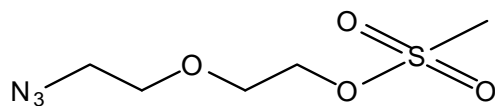
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 3.08 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 3.79 (ddd, 4H, CH<sub>2</sub>-O), 4.38 (ddd, 4H, CH<sub>2</sub>-OMs).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 38.3 (CH<sub>3</sub>), 69.4 (CH<sub>2</sub>-OMs), 69.7 (CH<sub>2</sub>-O).

IR (KBr) : 3031, 1346, 1332, 1302, 1169, 919 cm<sup>-1</sup>.

MS (*m/z*): 263 [M + H]<sup>+</sup>.

## **2-(2-Azidoethoxy)ethyl methanesulfonate 2'**



**Formula** : C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S ; **Molecular Weight** : 209,22 g/mol

### Experimental section :

To solution of 2 (15.0 g, 57.2 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (250 mL) was added NaN<sub>3</sub> (3.72g, 57.2 mmol) and the mixture was stirred at 70 °C for 1.5 days. The precipitate was filtered off, and the filtrate was evaporated and purified by flash column chromatography (EtOAc/PE, 4/6) to give 2' (5.67 g, 52%) as a colorless oil and a side product in 2'' (1.61 g, 18%) as a colorless oil.

### Characterization :

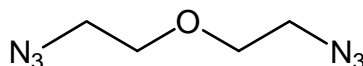
2' : R<sub>f</sub> (EtOAc/PE, 4/6) + MPA = 0.33

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 3.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.41 (dt, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.70 (dt, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 3.78 (ddd, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 4.37 (ddd, 2H, CH<sub>2</sub>-OMs).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 37.8 (CH<sub>3</sub>), 51.0 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 69.3 (CH<sub>2</sub>-OMs), 69.5 (CH<sub>2</sub>-O), 70.5 (CH<sub>2</sub>-O).

IR (KBr) : 2942, 2111, 1349, 1173, 1133, 920 cm<sup>-1</sup>.

### Side Product = Bis-(2-(azidoethoxy)ethyl)ether 2''



**Formula** : C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>N<sub>6</sub>O ; **Molecular Weight** : 156,15 g/mol

R<sub>f</sub> (EtOAc/PE, 4/6) + MPA = 0.69

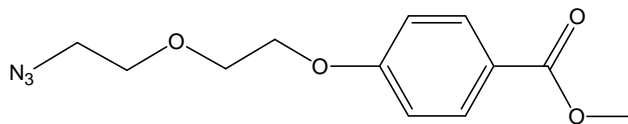
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 3.41 (dt, 4H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.68 (dt, 4H, CH<sub>2</sub>-O).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 51.3 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 70.6 (CH<sub>2</sub>-O).

IR (KBr) : 2872, 2098, 1442, 1286, 1127, 849 cm<sup>-1</sup>.



### Methyl-4-(2-Azidoethoxy)ethyl)benzoate **3a**



**Formula** : C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ; **Molecular Weight** : 265,27 g/mol

#### Experimental section :

A mixture of methylparaben **1a** (1.00 g, 6.47 mmol), **2'** (1.80 g, 8.60 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.97 g, 21.5 mmol) in DMF (53 mL) was heated at 80 °C for 7 h. Then, it was allowed to reach room temperature and was partitioned between EtOAc (300 mL) and H<sub>2</sub>O (300 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (2 x 200 mL). The combined organic phase was washed with brine (100 mL) and then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by gel silica chromatography (EtOAc/PE, 1/1) to afford **3a** (1.67 g, 96%) as a colorless oil.

#### Characterization :

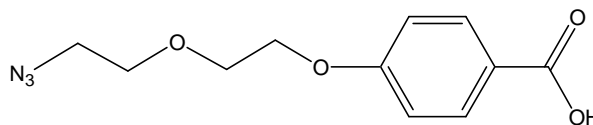
R<sub>f</sub> (EtOAc/PE, 5/5) + MPA = 0.7

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 3.34 (t, J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.67 (t, J = 5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 3.80 (t, J = 4.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 3.81 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.11 (t, J = 4.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OAr.), 6.88 (d, J = 8.9 Hz, 2H, Ar.), 7.93 (d, J = 8.9 Hz, 2H, Ar.).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 51.2 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 52.3 (COOCH<sub>3</sub>), 68.1 (CH<sub>2</sub>-O), 70.1 (CH<sub>2</sub>-O.), 70.8 (CH<sub>2</sub>-O), 114.7 (2 C Ar.), 123.5 (C Ar.), 132.1 (2 C Ar.), 163.1 (C Ar.), 167.2 (COOCH<sub>3</sub>).

IR (KBr) : 2948, 2102, 1714, 1606, 1512, 1436, 1281, 1254, 1170, 1108, 771 cm<sup>-1</sup>.

### 4-(2-Azidoethoxy)ethyl)benzoic acid **4a**



**Formula** : C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ; **Molecular Weight** : 251,24 g/mol

#### Experimental section :

To a solution of **3a** (1.00 g, 3.77 mmol) in MeOH (25 mL) was added 1M NaOH solution (7.5 mL, 7.54 mmol). The mixture was refluxed for 3 h and then allowed to reach room temperature.

After neutralization with Amberlite IR-120, followed by filtration, washings with MeOH and evaporation, the crude mixture was hydrolyzed with H<sub>2</sub>O and few drops of 1M HCl solution, and extracted with Et<sub>2</sub>O. The combined extracts were then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give pure acid **4a** (0.88 g, 93 %) as a white solid.

#### Characterization :

mp = 120°C

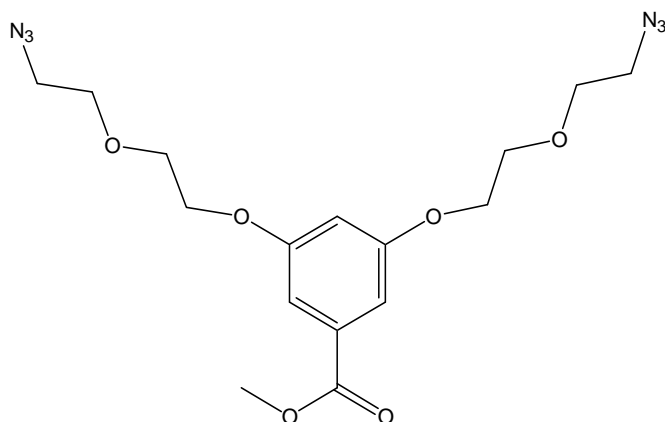
Rf (EtOAc/PE, 5/5 and few drops of MeOH) + MPA = 0.25

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 3.42 (t, J = 5.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.76 (t, J = 5.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 3.89 (t, J = 4.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 4.22 (t, J = 4.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OAr.), 6.97 (d, J = 8.9 Hz, 2H, Ar.), 8.06 (d, J = 8.9 Hz, 2H, Ar.), 11.5 (br s, 1H, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 51.4 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 68.3 (CH<sub>2</sub>-O), 70.2 (CH<sub>2</sub>-O), 70.9 (CH<sub>2</sub>-O), 115.0 (2 C Ar.), 122.6 (C Ar.), 133.0 (2 C Ar.), 163.8 (C Ar.), 172.6 (COOH).

IR (KBr): 2891, 2362, 2086, 1678, 1604, 1428, 1352, 1295, 1251, 1175, 1127, 1061 cm<sup>-1</sup>.

### Methyl-3,5-di-(2-Azidoethoxy)ethyl)benzoate **3b**



**Formula** : C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub> ; **Molecular Weight** : 394,16 g/mol

#### Experimental section :

A mixture of methyl 3,5-dihydroxybenzoate **1b** (1.00 g, 5.95 mmol), **2'** (2.61 g, 12.5 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.47 g, 39.6 mmol) in DMF (53 mL) was heated at 80 °C for 7 h. Then, it was allowed to reach room temperature and was partitioned between EtOAc (300 mL) and H<sub>2</sub>O (300 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (2 x 200 mL). The combined organic phase was washed with brine (200 mL) and then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by gel silica chromatography (EtOAc/PE, 4/6) to afford **3b** (2.17 g, 93%) as a colorless oil.

#### Characterization :

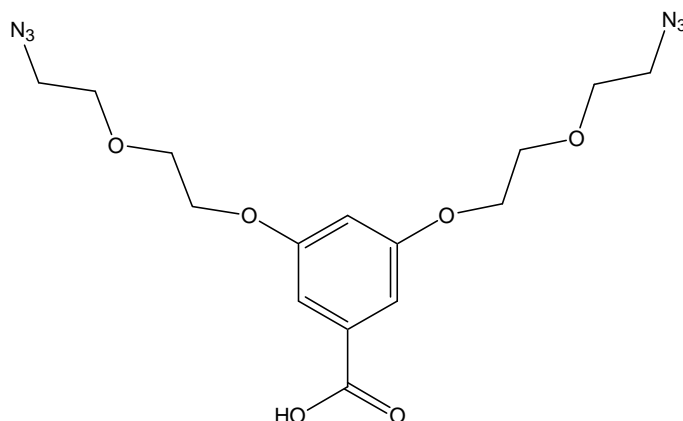
R<sub>f</sub> (EtOAc/PE, 4/6) + MPA = 0.36

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 3.37 (t, J = 5 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.70 (t, J = 5 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-O), 3.82 (t, J = 4.6 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-O), 3.85 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.12 (t, J = 4.6 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-OAr.), 6.68 (t, J = 2.1 Hz, 1H, Ar.), 7.17 (d, J = 1.8 Hz, 2H, Ar.).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 51.2 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 52.7 (COOCH<sub>3</sub>), 68.3 (CH<sub>2</sub>-O), 70.1 (CH<sub>2</sub>-O), 70.7 (CH<sub>2</sub>-O), 107.5 (C Ar.), 108.7 (2 C Ar.), 132.5 (C Ar.), 160.3 (2 C Ar.), 167.2 (COOCH<sub>3</sub>).

IR (KBr) : 2874, 2102, 1721, 1595, 1444, 1301, 1239, 1173, 1128, 1067, 767 cm<sup>-1</sup>.

### **3,5-di-(2-Azidoethoxy)ethylbenzoic acid 4b**



**Formula** :  $C_{15}H_{20}N_6O_6$  ; **Molecular Weight** : 380,36 g/mol

#### Experimental section :

To a solution of **3b** (1.00 g, 2.54 mmol) in MeOH (25 mL) was added 1M NaOH solution (5.1 mL, 5.08 mmol). The mixture was refluxed for 3 h and then allowed to reach room temperature.

After neutralization with Amberlite IR-120, followed by filtration, washings with MeOH and evaporation, the crude mixture was hydrolyzed with  $H_2O$  and few drops of 1M HCl solution, and extracted with  $Et_2O$ . The combined extracts were then dried over  $MgSO_4$  and concentrated *in vacuo* to give pure acid **4a** (1.02 g, 100 %) as a colorless oil.

#### Characterization :

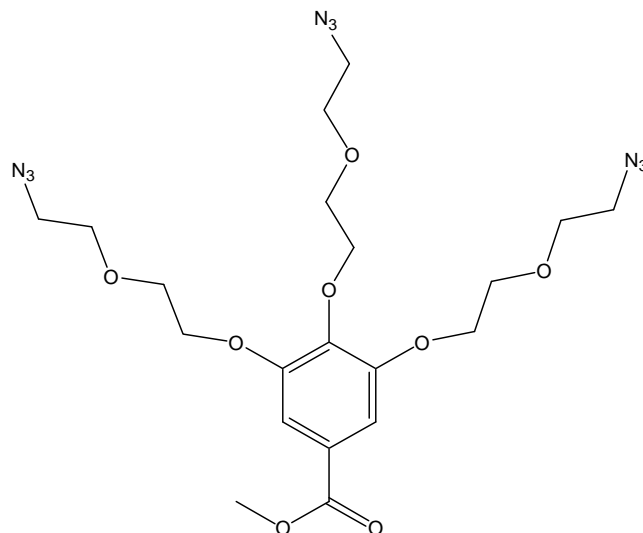
Rf (EtOAc/PE, 6/4 and few drops of MeOH) + MPA = 0.18

$^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ) : 3.42 (t,  $J = 5.1$  Hz, 4H,  $CH_2-N_3$ ), 3.75 (t,  $J = 5.1$  Hz, 4H,  $CH_2-O$ ), 3.87 (t,  $J = 4.6$  Hz, 4H,  $CH_2-O$ ), 4.17 (t,  $J = 4.6$  Hz, 4H,  $CH_2-OAr$ ), 6.76 (t,  $J = 2.3$  Hz, 1H, Ar.), 7.26 (d,  $J = 2.3$  Hz, 2H, Ar.), 11.1 (br s, 1H, COOH).

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ) : 51.1 ( $CH_2-N_3$ ), 68.3 ( $CH_2-O$ ), 70.1 ( $CH_2-O$ ), 70.7 ( $CH_2-O$ ), 108.2 (C Ar.), 109.1 (2 C Ar.), 131.6 (C Ar.), 160.3 (2 C Ar.), 171.9 (COOH).

IR (KBr) : 3044, 2921, 2859, 2102, 1691, 1595, 1445, 1344, 1300, 1173, 1128  $cm^{-1}$ .

### Methyl-3,4,5-tri-(2-Azidoethoxy)ethylbenzoate **3c**



**Formula** : C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>9</sub>O<sub>8</sub> ; **Molecular Weight** : 523,50 g/mol

#### Experimental section :

A mixture of methyl gallate **1c** (1.00 g, 5.43 mmol), **2'** (3.18 g, 15.2 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.50 g, 54.3 mmol) in DMF (53 mL) was heated at 80 °C for 19 h. Then, it was allowed to reach room temperature and was partitioned between EtOAc (300 mL) and H<sub>2</sub>O (300 mL). The aqueous phase was extracted with EtOAc (2 x 100 mL). The combined organic phase was washed with brine (100 mL) and then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified by gel silica chromatography (EtOAc/PE, 4/6) to afford **3c** (2.09 g, 73%) as a colorless oil.

#### Characterization :

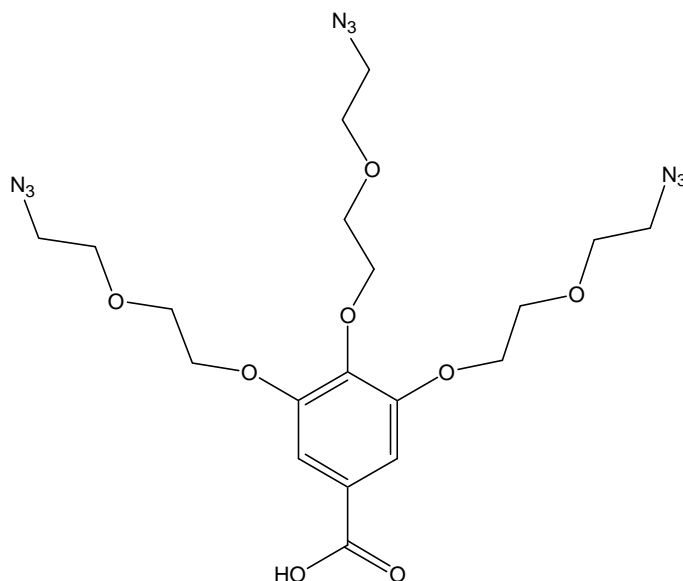
R<sub>f</sub> (EtOAc/PE, 5/5) + MPA = 0.38

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 3.39 (t, *J* = 5.1 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.74 (dt, *J* = 5 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>-O), 3.82 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OAr.*para*), 3.87 (t, *J* = 4.7 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-OAr.*meta*), 3.88 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 4.21 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-OAr.*meta*), 4.24 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OAr.*para*), 7.30 (s, 2H, Ar.).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 51.4 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 52.8 (COOCH<sub>3</sub>), 69.4 (CH<sub>2</sub>-OAr.*para*), 69.5 (CH<sub>2</sub>-OAr.*meta*), 70.5 (CH<sub>2</sub>-OAr.*para*), 70.8 (CH<sub>2</sub>-OAr.*meta*), 71.3 (CH<sub>2</sub>-ON<sub>3</sub>*meta*), 73.1 (CH<sub>2</sub>-ON<sub>3</sub>*para*), 109.7 (2C Ar.), 125.8 (C Ar.), 143.1 (C Ar.), 152.9 (2C Ar.), 167.1 (COOCH<sub>3</sub>).

IR (KBr) : 2927, 2100, 1717, 1587, 1432, 1334, 1215, 1123, 765 cm<sup>-1</sup>.

### 3,4,5-tri-(2-Azidoethoxy)ethylbenzoic acid **4c**



**Formula** : C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>9</sub>O<sub>8</sub> ; **Molecular Weight** : 509,47 g/mol

#### Experimental section :

To a solution of **3c** (1.00 g, 1.91 mmol) in MeOH (25 mL) was added 1M NaOH solution (3.8 mL, 3.82 mmol). The mixture was refluxed for 3 h and then allowed to reach room temperature.

After neutralization with Amberlite IR-120, followed by filtration, washings with MeOH and evaporation, the crude mixture was hydrolyzed with H<sub>2</sub>O and few drops of HCl 1M, and extracted with Et<sub>2</sub>O. The combined extracts were then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo* to give pure acid **4c** (0.93 g, 95 %) as a colorless oil.

#### Characterization :

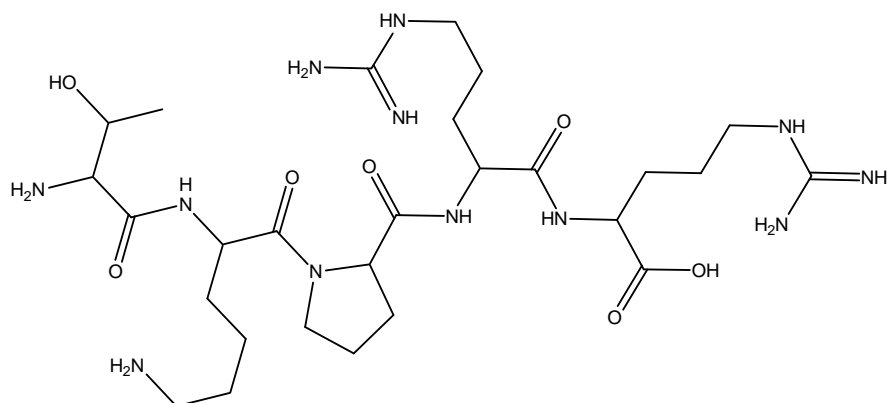
R<sub>f</sub> (EtOAc/PE, 5/5 and few drops of MeOH) + MPA = 0.12

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 3.40 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.75 (t, J = 5 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>-O), 3.85 (t, J = 4.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OAr.*para*), 3.90 (t, J = 4.7 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-OAr.*meta*), 4.24 (t, J = 4.7 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>-OAr.*meta*), 4.29 (t, J = 4.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-OAr.*para*), 7.39 (s, 2H, Ar.), 11.2 (br s, 1H, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 51.3 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>*meta*), 51.4 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>*para*), 69.4 (CH<sub>2</sub>-OAr.*meta*), 70.2 (CH<sub>2</sub>-OAr.*meta*), 70.4 (CH<sub>2</sub>-OAr.*para*), 70.7 (CH<sub>2</sub>-ON<sub>3</sub>*meta*), 71.2 (CH<sub>2</sub>-OAr.*para*), 72.9 (CH<sub>2</sub>-ON<sub>3</sub>*para*), 110.2 (2 C Ar.), 124.8 (C Ar.), 143.7 (C Ar.), 152.8 (2 C Ar.), 171.6 (COOH).

IR (KBr) : 2938, 2866, 2102, 1720, 1689, 1587, 1431, 1327, 1281, 1226, 1121, 936 cm<sup>-1</sup>.

## Synthesis of TKPRR



**Formula** :  $C_{27}H_{52}N_{12}O_7$  ; **Molecular Weight** : 656,78 g/mol

### Standard method :

The synthesis was performed using the preloaded Fmoc-Arg(Pbf)-Wang resin (capacity, 0.57 mmol/g) on a 2 x 175 mg (100  $\mu$ mol) scale. The side chains of arginine, proline, lysine and threonine were, respectively, protected by Pbf group, Boc group and *t*Bu group. The successive coupling of Fmoc-Arg(Pbf)-OH (1.3 g), Fmoc-Pro-OH (693 mg), Fmoc-Lys(Boc)-OH (962 mg) and Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH (816 mg) in the presence of HBTU (3.1 g), NMM (*N*-Méthylmorpholine) (1.9 mL) and NMP in 274 mL of DMF were achieved. After the final removal of the Fmoc group, the peptide resin was washed with EtOH (6 x 2 mL), DCM (7 x 2 mL) of DCM and then dried *in vacuo* overnight. A portion of the initial product was cleaved with a TFA/H<sub>2</sub>O/TIS solution (92.5/2.5/5.0) for 2 h at room temperature. The product was lyophilized. <sup>1</sup>H NMR spectrometry analysis gave the expected spectrum for deprotected TKPRR peptide.

### Sequence : TKPR (x2)

Résine utilisée : Fmoc-Arg(Pbf)-Wang resin

Substitution = 0.57 mmol/g, n = 100  $\mu$ mol, Masse = 175 mg (x 2)

Pos.	Code	Weight [mg]	add Solv.	Volume [ml]	Couplings	Derivative
2	R	1332	2.62	3.42	4	Fmoc-Arg(Pbf)-OH
12	K	962	2.84	3.42	4	Fmoc-Lys(Boc)-OH
15	P	693	3.00	3.42	4	Fmoc-Pro-OH
16	T	816	2.93	3.42	4	Fmoc-Thr( <i>t</i> Bu)-OH

derivatives weight calculation: C = 0,6

Zone	Name	ml used:	prepare:
Activator	HBTU	13.6	3.1 g
Base	NMM	4.1	1.9 ml
NMP	NMP	0.4	
DCM	DCM	168.5	
EtOH	EtOH	76.4	
CapMixture	Cap	24.1	1.2 ml
Piperidine	Piperidine 20%	46.0	9.2 ml

reagents weight calculation: - no excess -

Activator: MW = 380 C = 0,6

Base: C = 45 %  
CapMixture: C = 5 %  
Piperidine: C = 20 %

Solvents used: Reservoir DMF 274mL

**Cycles:**

	1	2	3	4
R	3.420	<	<	<
K	0	<	3.420	<
P	0	3.420	<	<
T	0	<	<	3.420

**Method :**

method-listing: TKPRR Ludo-06-01-2010.MPM

path: C:\Documents and Settings\INTAVIS AG\Bureau\Methods\  
08/01/2010 - 10:19:24

Software : MultiPep

**Prepare**

1 Memo  
2 RinseNeedle 1000 / 3900 ul  
3 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
4 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
5 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
6 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
7 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
8 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
9 WashColumns 3000 µl, Air->Peptides

**Cycle : 1 -> max (-> 4)**

10 Deprotection 2000 µl, Piperidine->Peptides  
11 Deprotection 1300 µl, Piperidine->Peptides  
12 Agitate 600/300 µl, 00:04 hh:mm  
13 Deprotection 1300 µl, Piperidine->Peptides  
14 Agitate 600/300 µl, 00:08 hh:mm  
15 RinseNeedle 500 / 2500 ul  
16 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
17 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
18 WashColumns 2000 µl, EtOH->Peptides  
19 WashColumns 2000 µl, EtOH->Peptides  
20 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
21 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
22 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
23 WashColumns 3000 µl, Air->Peptides  
24 RinseNeedle 500 / 2500 ul  
25 Coupling 830+250+20+840->Peptides /... /...  
26 Agitate 600/300 µl, 00:25 hh:mm  
27 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
28 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
29 WashColumns 3000 µl, Air->Peptides  
30 Coupling 830+250+20+840->Peptides /... /...  
31 Agitate 600/300 µl, 00:35 hh:mm  
32 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
33 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
34 WashColumns 3000 µl, Air->Peptides  
35 Capping 3000 µl, CapMixture->Peptides  
36 Agitate 600/300 µl, 00:06 hh:mm  
37 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
38 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
39 WashColumns 2000 µl, EtOH->Peptides  
40 WashColumns 2000 µl, EtOH->Peptides  
41 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
42 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
43 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
44 WashColumns 3000 µl, Air->Peptides

**Final**

45 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
46 Deprotection 2000 µl, Piperidine->Peptides  
47 Deprotection 1300 µl, Piperidine->Peptides  
48 Agitate 600/300 µl, 00:04 hh:mm  
49 Deprotection 1300 µl, Piperidine->Peptides  
50 Agitate 600/300 µl, 00:08 hh:mm  
51 RinseNeedle 500 / 2500 ul  
52 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
53 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
54 WashColumns 2000 µl, Reservoir->Peptides  
55 WashColumns 2000 µl, EtOH->Peptides  
56 WashColumns 2000 µl, EtOH->Peptides  
57 WashColumns 2000 µl, EtOH->Peptides



58 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides, 2x  
59 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
60 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides, 2x  
61 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides  
62 WashColumns 2000 µl, DCM->Peptides, 2x  
63 WashColumns 3000 µl, Air->Peptides, 10x

**Synthesis of**  
**(5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20- triphenylchlorine (TPC)**

*Experimental section :*

The synthesis was begin with the synthesis of TPP (**A**) : Benzaldehyde (0.38 mL, 3.75 mmol), 4-carboxybenzaldehyde (0.17 mL, 1.25 mmol) and freshly distilled pyrrole (0.35 mL, 5.00 mmol) were added in the necked flask (1 L) containing DCM (700 mL). The resulting solution was stirred under N<sub>2</sub> for 15 min at room temperature. The reaction mixture was protected from light and boron trifluoride dietherate (0.24 mL, 2.01 mmol) was added. The solution was stirred for 2 h at room temperature. Subsequently, *p*-chloranil (0.62 mL, 5.00 mmol) was added and the reaction was refluxed at 60°C for another 2 h. After cooling to room temperature, the reaction was treated with silica and the crude product was then purified by gel silica chromatography (EtOH/DCM, 3/97 followed by acetone/DCM, 10/90 to 5/95) to afford **A** (0.24 g, 15 %) as a purple solid.

The synthesis of TPC (**B**) was done in the dark under N<sub>2</sub> atmosphere with the refluxion of TPP (200 mg, 0.304 mmol), para-toluenesulfonylhydrazide (PTSH) (283 mg, 1.52 mmol), anhydrous K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (420 mg, 3.04 mmol) and pyridine (10 mL) at 105°C. A solution containing the same initial amount of anhydrous K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and PTSH in pyridine (2 mL) was added several times into the reaction at every hour and stirring overnight. EtOAc (30 mL) and water (30 mL) were added and the reaction was kept stirring for 1 h at 90°C. The organic layer was treated and washed with 1M HCl solution (3 × 40 mL), water (3 × 40 mL) and followed by Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturated aqueous solution (3 × 40 mL). *O*-chloranil (30 mg, 0.122 mmol) was gradually added several times into the stirred organic solution at room temperature until the absorption peak of 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphenylbacteriochlorine (**C**) at 730 nm had just disappeared. The organic solution was further separated and washed with water (3 × 40 mL), 1M NaOH solution (3 × 40 mL) and NaHCO<sub>3</sub> saturated solution (3 × 40 mL). The solution was dried over MgSO<sub>4</sub> and the filtered solution was evaporated to dryness. The product is purified by preparative HPLC\* to afford **B** (25 mg, 12.5 %) as a purple solid.

*Characterization :*

**A** : MS (m/z) = 659.5 [M+H]<sup>+</sup>

**B** : MS (m/z) = 661.5 [M+H]<sup>+</sup>

\* TPC (B) was purified by preparative HPLC using Waters™ apparatus :

- Column : VARIAN 150 x 21.2 mm C18 HPLC Column.

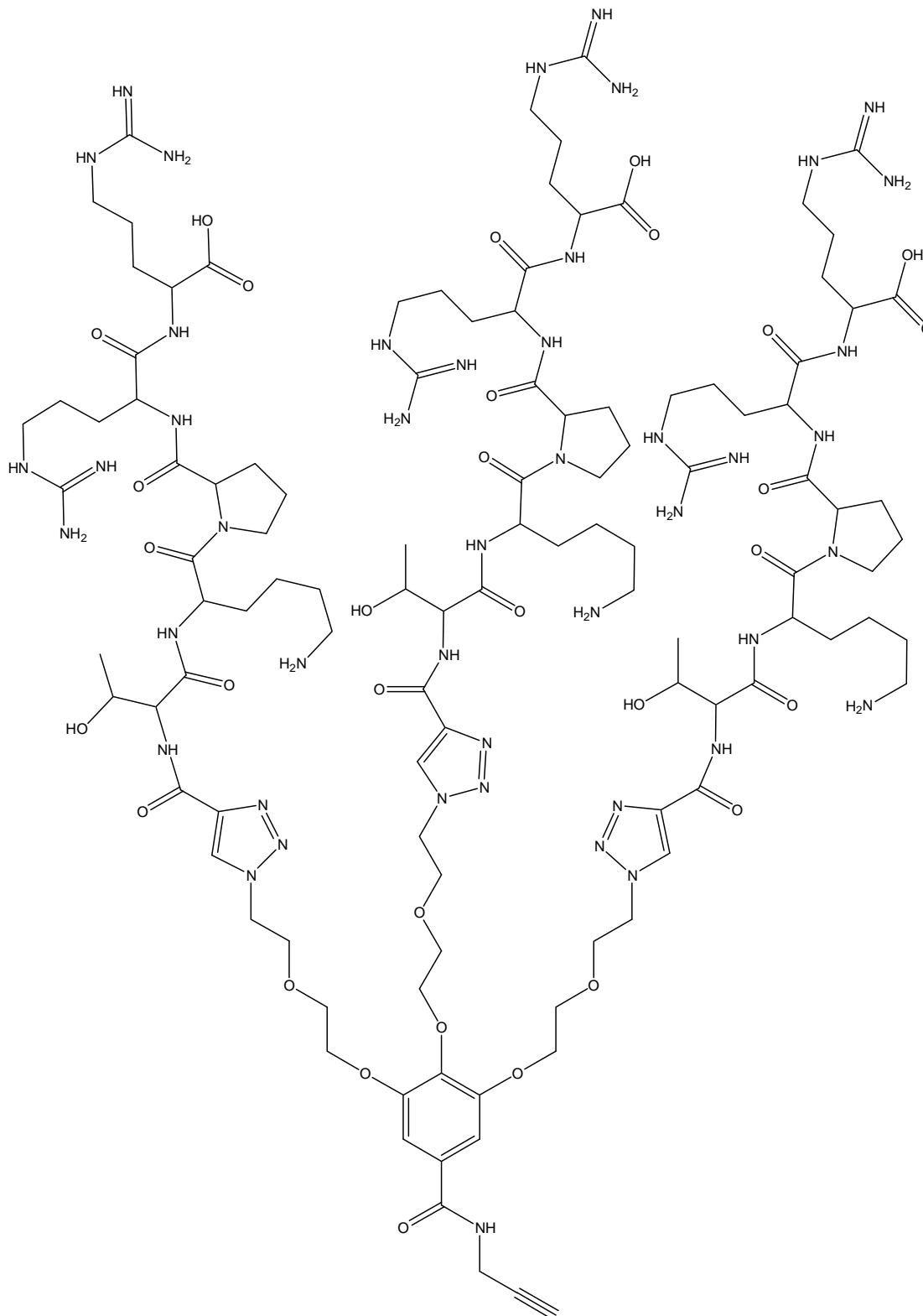
- Conditions : flow rate 21 mL/min.

- Programm : t<sub>0</sub>      75% MeOH / 25% H<sub>2</sub>O

                  t<sub>15</sub>     100% MeOH

                  t<sub>40</sub>     100% MeOH

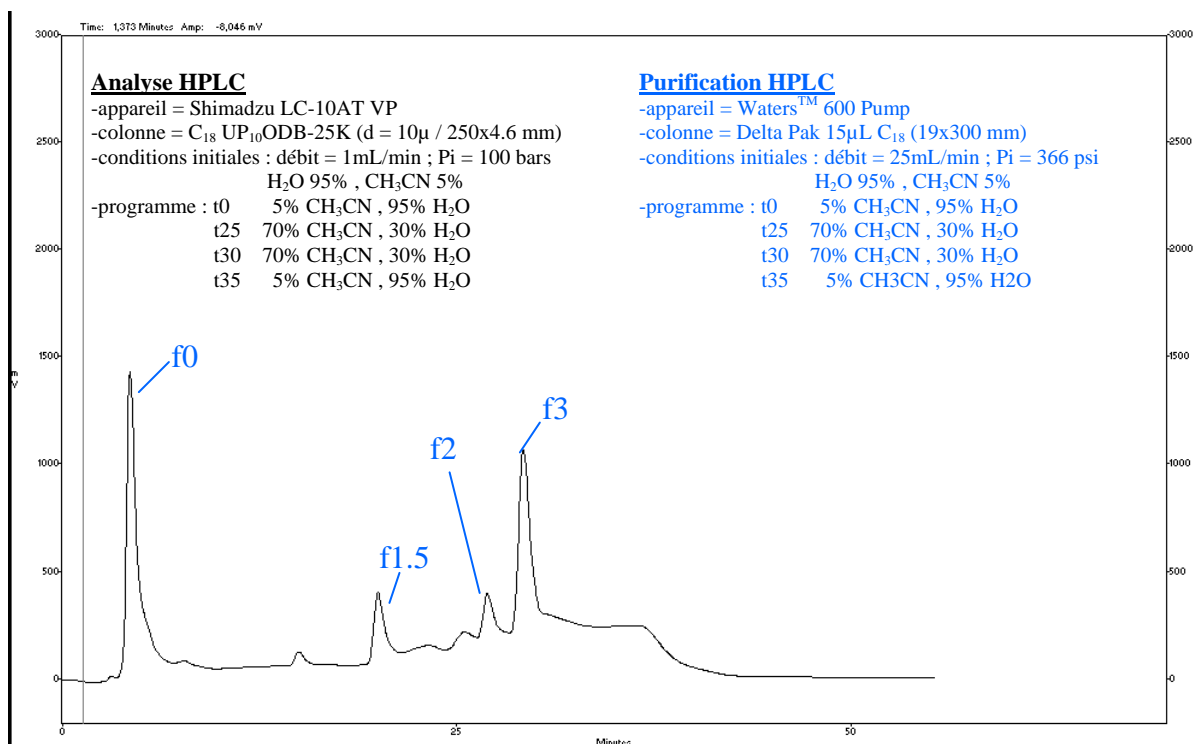
## Synthesis of 7c



**Formula :**  $C_{112}H_{186}N_{46}O_{31}$ ; **Molecular Weight :** 2672,97 g/mol

Mass = 43 mg

Overall yield = 60%



### Standard method :

In a cylindrical reactor, 100 µmol of protected TKPRR peptide resin were solubilised in 2 mL of DCM. Then DCC (1.0 eq.) and propiolic acid (1.0 eq.) was added with vigourous stirring. After one night, the protected peptide resin was washed with DCM (3 x 5 mL) and EtOH (3 x 5 mL).

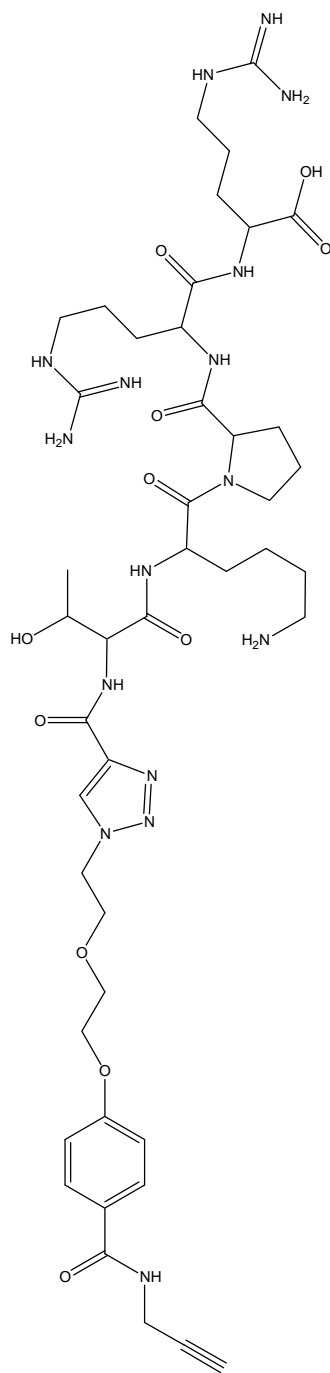
In a cylindrical reactor were introduced solution of **5** (100 µmol) in 2 mL of CH<sub>3</sub>CN, **4c** (0.026mmol), CuI (1.3 eq.) and DIPEA (1.1 eq.). The mixture was stirred at room temperature for 24 h. **6c** was washed with DCM (3 x 5 mL) and EtOH (3 x 5 mL).

DCI (2 eq.) was added with good stirring to a solution of **6c** (100 µmol) in 2 mL of DMF. After 4 h, propargylamine (1 eq.) was added to the mixture and the reaction was purchased overnight. The crude **7c** was cleaved with a TFA/H<sub>2</sub>O/TIS solution (92.5/2.5/5.0) for 2 h at room temperature. The product was lyophilized. After RP-HPLC (detection at 214 nm, retention time 5 min) and lyophilisation, 43 mg of the expected compound **7c** were obtained as a white solid.

### Characterization:

MS (*m/z*): 891.74 [M]<sup>3+</sup>, 669.03 [M]<sup>+</sup>, 553.43 [M]<sup>5+</sup>, 446.35 [M]<sup>6+</sup>

## Synthesis of **7a**



**Formula** : C<sub>44</sub>H<sub>68</sub>N<sub>16</sub>O<sub>11</sub>; **Molecular Weight** : 997,11 g/mol

Mass = 24 mg

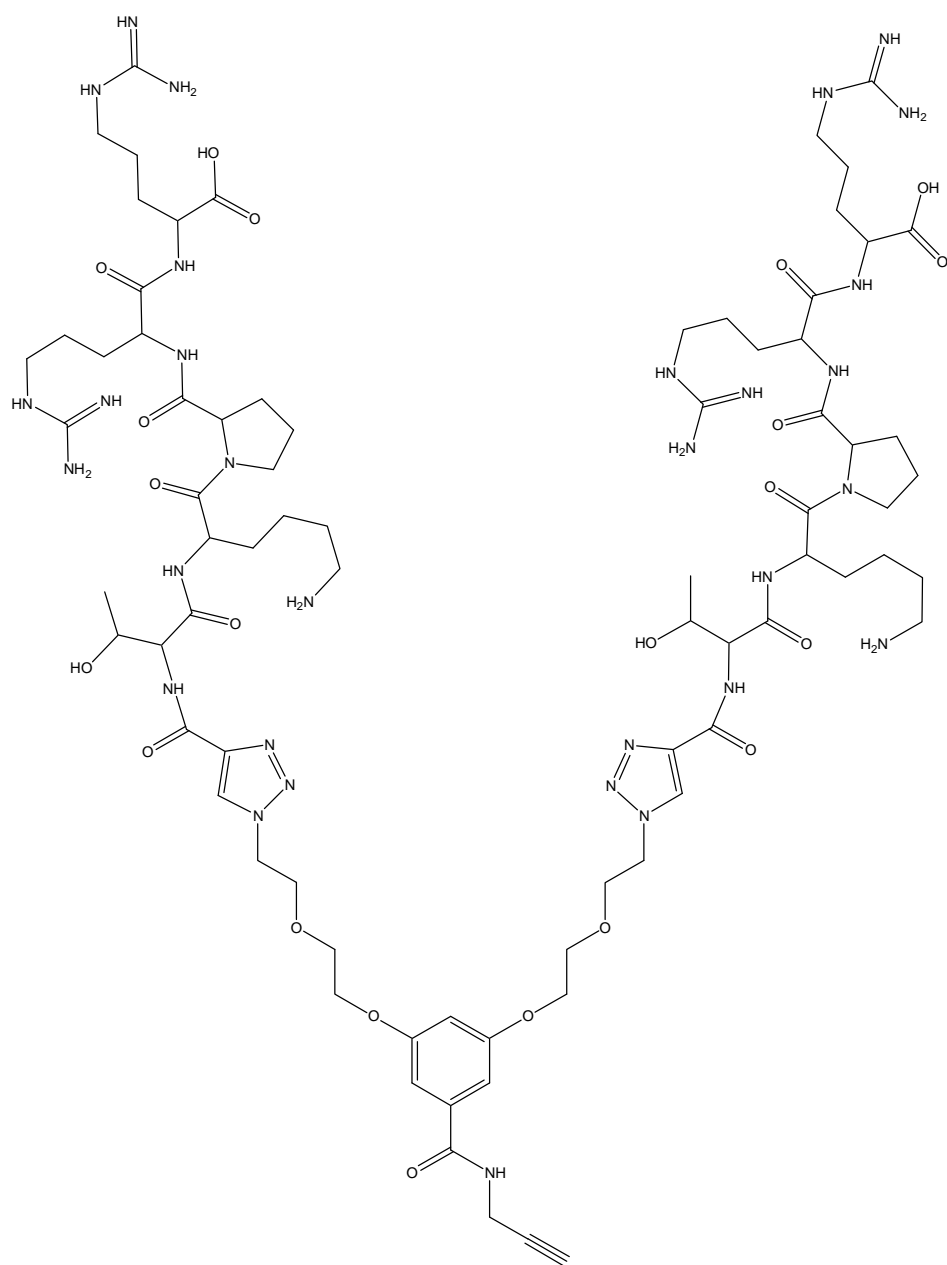
Overall yield = 31%

**7a** was synthesized according to standard method (see synthesis of **7c**).

Characterization:

MS (*m/z*): 499.50 [M]<sup>2+</sup>, 333.20 [M]<sup>3+</sup>

## Synthesis of 7b



**Formula** : C<sub>78</sub>H<sub>127</sub>N<sub>31</sub>O<sub>21</sub>; **Molecular Weight** : 1835,04 g/mol

Mass = 26 mg

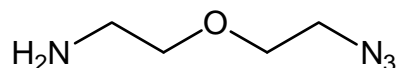
Overall yield = 37%

**7b** was synthesized according to standard method (see synthesis of **7c**).

### Characterization:

MS ( $m/z$ ): 918.66 [M]<sup>2+</sup>, 612.50 [M]<sup>3+</sup>, 459.70 [M]<sup>4+</sup>, 367.90 [M]<sup>5+</sup>, 306.66 [M]<sup>6+</sup>

### 1-amino-5-azido- 3-oxapentane 6



**Formula** : C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O; **Molecular Weight** : 130,15 g/mol

#### Experimental section :

To a solution of 2'' (1.00 g, 6.40 mmol) in Et<sub>2</sub>O (20 mL) and THF (3 mL) was added 1M HCl solution (30 mL). With vigorous stirring, a solution of PPh<sub>3</sub> (1.68 g, 6.40 mmol) in Et<sub>2</sub>O (15 mL) was added dropwise during 30 min. After 2 h, the organic layer was decanted, and extracted with 1M HCl solution (2 x 15 mL). Aqueous layers were saturated with NaCl, and then made basic (to pH = 14) by addition of NaOH pellets and extracted with toluene (3 x 20 mL). Pooled organic layers were washed with brine and dried over KOH pellets. After concentration *in vacuo*, the oily residue was purified by flash chromatography over silica gel (DCM/MeOH, 100/0 to 50/50) to afford 6 (130 mg, 16%) as a yellowish oil.

#### Characterization :

R<sub>f</sub> = 0,22 (DCM/MeOH, 90/10).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 2.05 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.83 (t, J = 5.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.32 (t, J = 4.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 3.47 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O), 3.61 (t, J = 5.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-O).

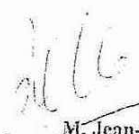
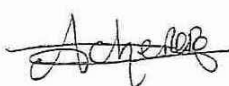

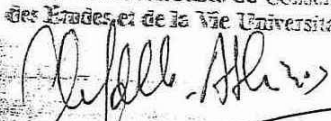
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ) : 42.0 (CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 51.1 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 70.3 (CH<sub>2</sub>-O), 73.4 (CH<sub>2</sub>-O).

IR (KBr) : 2934, 2869, 2351, 2105, 1285, 1123, 752 cm<sup>-1</sup>.



DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 30 juin 2010

<p style="text-align: center;"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par Marie-Camille BRIQUELER</p> <p><u>Sujet</u> : Synthèse par chimie click de molécules associant photosensibilisateurs et peptides de ciblage pour une utilisation en photothérapie dynamique anticancéreuse</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Jean-Louis MERLIN, Professeur Directeur : Samir ACHERAR, Maître de conférences</p> <p>Juges : Régis VANDERESSE, Chargé de recherche CNRS Muriel BARBERI-HEYOB, Chargée de recherche CAV Céline FROCHOT, Chargée de recherche CNRS</p>	<p style="text-align: center;">Vu.</p> <p style="text-align: center;">Nancy, le 27 mai 2010</p> <p style="text-align: center;">Le Président du Jury      Le Directeur de Thèse</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">               M. Jean-Louis MERLIN         </div> <div style="text-align: center;">               M. Samir ACHERAR         </div> </div> <p><b>M. Jean-Louis MERLIN</b>          Unité de Biologie des Tumeurs          Centre Alexis Vautrin          Avenue de Bourgogne          54511 Vandœuvre lès Nancy - France          j.l.merlin@nancy.fnclcc.fr</p>
<p style="text-align: center;">Vu et approuvé,</p> <p style="text-align: center;">Nancy, le 28 MAI 2010</p> <p style="text-align: center;">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1.</p> <p style="text-align: center;"><i>Le Vice Doyen,</i>            Francine PAULUS</p>	<p style="text-align: center;">Nancy, le 28 mai 2010</p> <p style="text-align: center;">Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1.          Pour le Président          et par Délégation,          La Vice-Présidente du Conseil          des Etudes et de la Vie Universitaire.</p> <div style="text-align: center;">               Jean-Pierre FINANCE              CAPDEVILLE-ATKINSON         </div> <p style="text-align: center;">N° d'enregistrement : 3324</p>

Laboratoire de CHIMIE-PHYSIQUE  
 MACROMOLECULAIRE  
 UMR CNRS - INPL 7568, Groupe ENSIC  
 11, rue Grandville - B.P. 451  
 54001 NANCY Cedex

N° d'identification :

**TITRE**

**SYNTHESE PAR CHIMIE CLICK DE MOLECULES  
ASSOCIANT PHOTOSENSIBILISATEURS ET PEPTIDES  
DE CIBLAGE POUR UNE UTILISATION EN  
THERAPIE PHOTODYNAMIQUE ANTICANCEREUSE**

**Thèse soutenue le 30 juin 2010  
Par Marie-Camille Briqueler**

**RESUME**

Dans le cadre de la thérapie photodynamique (PDT), des équipes de l'ENSIC (LCPM, DCPR) ont synthétisé une molécule associant un photosensibilisateur (PS), la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine (TPC), à un peptide (ATWLPPR) ciblant la neuropiline 1 (NRP1), co-récepteur du VEGF<sub>165</sub>. Une amélioration de l'incorporation intracellulaire et une meilleure activité photodynamique du PS conjugué avec ce peptide ont été démontrées sur des cellules endothéliales surexprimant NRP1.

Néanmoins, des améliorations peuvent être apportées à cette stratégie pour améliorer la spécificité. Ainsi, l'objectif de ce projet est d'élaborer des molécules associant un à trois PS à un à trois peptides d'adressage (TKPRR) afin d'augmenter la sélectivité de l'agent PS vis-à-vis des cellules tumorales. Pour réaliser le couplage des PS et des peptides, la chimie click est utilisée et neuf molécules différentes seront synthétisées. Les bras PS et peptides sont greffés sur des molécules support avec des bras espaceurs permettant de jouer sur la balance hydrophile/hydrophobe.

Les trois supports peptides ont été synthétisés avec un faible rendement en utilisant la stratégie sur support solide, qui est une méthode d'accès rapide à ces molécules. De meilleurs rendements seront recherchés par la suite si les résultats des tests *in vitro* et *in vivo* sont satisfaisants. Les supports PS sont en cours de synthèse.

**MOTS CLES :**

Cancer, thérapie photodynamique, photosensibilisateur, peptide d'adressage, co-récepteur NRP1, VEGF<sub>165</sub>, chimie click

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
M. Samir Acherar	LCPM (Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire)	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème <input type="text" value="3-5"/>

3 - Médicament  
5 - Biologie