

Table des matières

Abréviations	11
Préambule	13
I Introduction Bibliographique	15
I.1 Radiopharmaceutiques	15
I.1.1 Radiopharmaceutiques : imagerie et thérapie	15
I.1.1.a Rayonnements	15
I.1.1.b Techniques d'imagerie et de radiothérapie	17
I.1.1.c Radioéléments utilisés pour les radiopharmaceutiques	21
I.1.1.d Propriétés et marquage des radiopharmaceutiques	24
I.1.2 Technétium et Rhénium	29
I.1.2.a Propriétés physicochimiques du technétium et du rhénium	29
I.1.2.b Cœurs de technétium et de rhénium	32
I.1.3 Motifs de complexation des cœurs de technétium (+V) et de rhénium (+V)	34
I.1.3.a Complexation par le motif HYNIC	35
I.1.3.b Complexation du cœur TcO_2^+	36
I.1.3.c Complexation du cœur TcO^{3+}	36
I.2 Cancer, angiogenèse et intégrines	39
I.2.1 Cancer	39
I.2.1.a Etat des lieux	39
I.2.1.b Cancérogenèse	40
I.2.1.c Outils de diagnostic du cancer	41
I.2.2 Angiogenèse	44
I.2.2.a Angiogenèse normale	44
I.2.2.b Néangiogenèse tumorale	46
I.2.3 Intégrines	48
I.2.3.a Caractéristiques générales	48
I.2.3.b Expression et ligands	50
I.2.3.c Rôles des intégrines	52
I.2.3.d Activation des intégrines	52
I.2.3.e Clusterisation des intégrines	53
I.2.3.f Phénomène d'internalisation	53
I.2.4 Intégrines et pathologies	54
I.2.5 Intégrine $\alpha_V\beta_3$	56
I.2.5.a Description	56

I.2.5.b	Structure de $\alpha_V\beta_3$	56
I.2.5.c	Antagonistes de $\alpha_V\beta_3$	58
I.2.6	Traitements antiangiogéniques et antagonistes d'intégrines	58
I.2.6.a	Lutte contre l'angiogenèse tumorale	58
I.2.6.b	Antagonistes d'intégrines	61
I.2.7	Imagerie de l'angiogenèse tumorale par ciblage des intégrines	63
I.2.7.a	Techniques non-irradiantes	63
I.2.7.b	Scintigraphies : TEP et TEMP	65
I.3	Présentation du projet	70
II	Tests préliminaires en vue des études <i>in vivo</i>	75
II.1	Validation du modèle tumoral	76
II.1.1	Description du modèle tumoral	76
II.1.2	Validation	78
II.1.2.a	Synthèse du propionyl-c(RGDfK)et du c(RGDyV)	79
II.1.2.b	Evaluation <i>in vivo</i> de [^3H]-propionyl-c(RGDfK)	81
II.2	Injection <i>in vivo</i> de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et ^{99m}TcO -gluconate	83
II.3	Mise au point de la méthode de criblage <i>in vivo</i>	85
II.3.1	Composés modèles : synthèse et radiomarquage	85
II.3.1.a	Synthèse des composés modèles	87
II.3.1.b	Complexation des composés modèles	89
II.3.2	Tests <i>in vivo</i> avec les composés modèles	93
	Partie expérimentale - Chapitre II	101
III	Analogues de la séquence RGD, assemblés par coordination de TcO^{3+}	115
III.1	Principe et choix des sous-chimiothèques	115
III.1.1	Assemblage combinatoire	115
III.1.2	Choix des modules A (NS_2) et B (S)	117
III.2	Synthèse des modules A et B	119
III.2.1	Synthèse sur support solide des modules A	119
III.2.2	Synthèse en solution des modules B	122
III.3	Assemblage par complexation	123
III.3.1	Complexation par Re et ^{99g}Tc	123
III.3.2	Complexation au ^{99m}Tc	125
III.4	Etudes de stabilité des complexes bimoléculaires	131
III.4.1	Stabilité au glutathion	131
III.4.2	Stabilité dans du plasma murin	135
	Partie expérimentale - Chapitre III	141
IV	Analogues de la séquence RGD, cyclisés par coordination de TcO^{3+}	169
IV.1	Métallopeptides cycliques	169
IV.2	Principe et choix des chimiothèques	173
IV.2.1	Cilengitide et dérivés	173
IV.2.2	Conception des chimiothèques	174
IV.3	Synthèse des ligands linéaires	177
IV.3.1	Résine sulfamylbutyryl	177

IV.3.2	Résine Wang	177
IV.3.2.a	Résine Wang - Voie 1	177
IV.3.2.b	Résine Wang - Voie 2	178
IV.3.3	Résine Rink	179
IV.3.4	Résine Mmt	181
IV.4	Complexes cycliques de rhénium	184
IV.4.1	Cyclisation par coordination de ReO^{3+}	184
IV.4.2	Etudes de plasticité du complexe Re-1A1	187
IV.4.2.a	Isomères de Re-1A1 et homodimère	187
IV.4.2.b	Effet du pH sur les différentes espèces de Re-1A1	188
IV.4.2.c	Effet de la température sur les différentes espèces de Re-1A1	190
IV.4.2.d	Stabilité dans le plasma de l'isomère monomérique b de Re-1A1	192
IV.4.2.e	Tests <i>in vitro</i> préliminaires des complexes de rhénium	192
IV.5	Complexes cycliques de technétium	195
IV.5.1	Complexation au ^{99g}Tc	195
IV.5.2	Complexation au ^{99m}Tc	198
IV.5.2.a	Optimisation du marquage de 1A1 , 2B2 et 4D3	198
IV.5.2.b	Essais de marquages en mélange	203
IV.5.2.c	Cas des ligands à linker para	203
IV.5.2.d	Détermination du coefficient de partition	205
IV.5.2.e	Modélisation de $^{99m}\text{Tc-1A1}$	207
IV.6	Etudes de stabilité des complexes marqués au ^{99m}Tc	208
IV.6.1	Stabilité au glutathion	208
IV.6.2	Stabilité dans du plasma murin	210
IV.7	Evaluation <i>in vivo</i> des complexes cycliques	213
IV.7.1	Criblage de 12 complexes par souris	213
IV.7.1.a	Principe	213
IV.7.1.b	Protocole de marquage au ^{99m}Tc et screening	213
IV.7.1.c	Résultats	214
IV.7.2	Criblage de 4 complexes par souris	216
IV.7.2.a	Principe	216
IV.7.2.b	Protocole de marquage au ^{99m}Tc et screening	216
IV.7.2.c	Résultats	217
IV.7.3	Stabilité dans l'homogénat de tumeur	217
IV.7.4	Etude de biodistribution	220
IV.7.4.a	Principe	220
IV.7.4.b	Résultats	221
	Partie expérimentale - Chapitre IV	227
	Conclusion et perspectives	277
	Annexe Générale	283

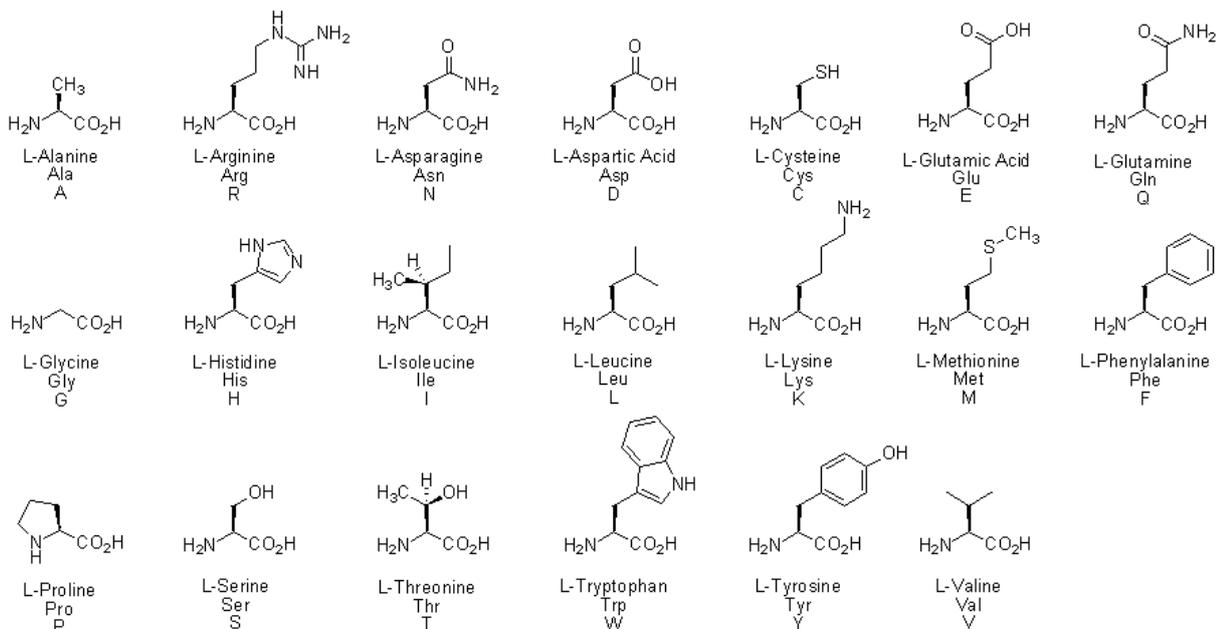
Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

Abréviations

Ac	acétyle
AcOEt	acétate d'éthyle
AcOH	acide acétique
AcN	acétonitrile
Bn ou Bz	benzyle
Boc	tert-butyloxycarbonyl
BSA	albumine de sérum bovin
°C	degrés Celsius
CCM	chromatographie sur couche mince
cp / 0,1 s	coups par 0,1 seconde
DCC	dicylohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
Dde	1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)-éthyl
DIPA	diisopropylamine
DIPEA	diisopropyléthylamine
DMAP	4-(<i>N,N</i> -diméthylamino)pyridine
DMF	diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
DOTA	acide 1,4,7,10-tétraazacyclododécane-1,4,7,10-tétraacétique
EACNOx	2-éthyl-2-(hydroxyimino)-2-cyanoacétate
EDC	<i>N</i> -(3-diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide
eq.	équivalents
EtOH	éthanol
Fmoc	9-fluorenylméthoxyloxycarbonyl
GSH	glutathion
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -trétraméthyluronium hexafluorophosphate
HCl	acide chlorhydrique
HEPES	acide <i>N</i> -2-hydroxyéthylpipérazine- <i>N</i> -2-éthane-sulphonique
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	"high performance liquid chromatography"
HRMS	high resolution mass spectrometry
Hz	Hertz
%ID	pourcentage de la dose injectée ("Injected Dose")
M	molaire (mol/l)
Me	méthyle
MeOH	méthanol

mmol	milli mole
NMM	<i>N</i> -méthylmorpholine
NMP	<i>N</i> -méthylpyrrolidone
NPS	<i>N</i> -propionyl-succinimide
Pbf	2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PBS	"phosphate buffered saline" = tampon phosphate
Ph	phényle
Rdt	rendement
Rf	rapport frontal
RMN	résonance magnétique nucléaire
RP-HPLC	"reverse-phase HPLC" = HPLC en phase inverse
Tamb	température ambiante
tBu	tertio-butyl
TEL	transfert d'énergie linéique
TEP	tomographie par émission de positrons
TEMP	tomographie par émission monophotonique
TFA	acide trifluoroacétique
THF	tétrahydrofurane
TIPS	triisopropylsilylène
TMS	trétraméthylsilane
TNBS	acide trinitrobenzènesulfonique
Trt	triphénylméthyl (trityl)
Z	benzyloxycarbonyl

Liste des acides aminés



Le code à une lettre utilise une lettre majuscule pour les acides aminés de configuration L et une lettre minuscule pour ceux de configuration D.

Préambule

Le travail de recherche décrit dans ce manuscrit porte sur le développement, selon une approche combinatoire, de nouveaux radiopharmaceutiques marqués au ^{99m}Tc et analogues de la séquence peptidique RGD, pour la détection précoce de la néoangiogenèse tumorale.

Ce sujet se trouve à l'interface de la chimie organique et inorganique, de la médecine nucléaire et de la biologie. Nous avons donc été amenés, dans l'introduction bibliographique, à replacer ce travail dans son contexte général. Nous y aborderons à la fois le domaine des radiopharmaceutiques et celui du cancer, en particulier le rôle des intégrines et leurs potentialités comme cibles thérapeutiques et pour l'imagerie moléculaire des tumeurs. Nous terminerons ce premier chapitre par la présentation des objectifs et de la démarche que nous avons adoptée.

Le chapitre II portera sur la validation du modèle tumoral que nous avons utilisé, ainsi que sur l'évaluation d'une approche de criblage *in vivo*, à l'aide de composés modèles.

Les chapitres III et IV seront consacrés aux deux stratégies que nous avons développées pour la conception des chimiothèques de traceurs et dans lesquelles le technétium joue à la fois le rôle de marqueur, mais également d'agent structurant. La synthèse des ligands et leur radiomarquage seront exposés, ainsi que l'évaluation de la stabilité des complexes formés. Les résultats des premiers tests *in vitro* et *in vivo* seront également présentés.

Ce projet a nécessité la mise en place de plusieurs techniques nouvelles au laboratoire, notamment le développement de méthodes de calcul et de prédiction de structures *ab initio* de complexes de technétium ainsi que la mise au point de protocoles de criblage *in vivo* sur souris et *in vitro* sur intégrines purifiées. Ces nouvelles techniques sont intervenues parfois tardivement au cours de cette thèse et, pour cette raison, certains résultats seront exposés *a posteriori*, c'est-à-dire en ne correspondant pas toujours parfaitement à l'ordre logique auquel on pouvait s'attendre.

Nous concluons ce manuscrit en faisant ressortir les principaux résultats obtenus et présenterons les perspectives envisagées ou d'ores et déjà en cours de réalisation.

Chapitre I

Introduction Bibliographique

I.1 Radiopharmaceutiques

I.1.1 Radiopharmaceutiques : imagerie et thérapie

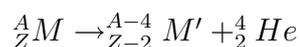
La médecine nucléaire est un ensemble de techniques utilisant un radionucléide pour des applications diagnostiques ou thérapeutiques. Dans les deux cas, un radiopharmaceutique, produit biologiquement actif marqué avec un isotope radioactif, est administré au patient. L'entité sur laquelle est fixé le radionucléide permet d'atteindre la cible biologique visée et de favoriser la concentration de la radioactivité à ce niveau. On peut alors déterminer la localisation de cette cible (imagerie) et/ou provoquer sa destruction (radiothérapie). Diverses stratégies de radiothérapie ont été développées et plusieurs techniques de diagnostic sont aujourd'hui couramment utilisées. Le choix du radionucléide, basé sur la nature du rayonnement émis, ses propriétés physiques, son énergie et sa période, ainsi que ses propriétés chimiques, conditionne le type d'utilisation du radiopharmaceutique. Celui-ci doit respecter un certain nombre de caractéristiques pour être utilisable chez des patients.

I.1.1.a Rayonnements

Il existe plusieurs types d'émetteurs utilisables pour développer des radiopharmaceutiques. Ils présentent des propriétés diverses et, par conséquent, conduisent à des applications différentes.

Emetteurs α

Les émetteurs α donnent naissance à un rayonnement particulaire constitué de deux protons et de deux neutrons (noyau d'hélium ${}^4_2\text{He}$).

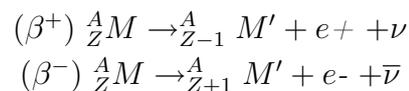


Il est peu pénétrant (0,03 mm dans les tissus mous constituant majoritairement l'organisme) et est arrêté par une feuille de papier. Ce rayonnement est très ionisant : son transfert d'énergie linéique (TEL) est élevé (6-7 MeV sur 50-90 μm). Ces émetteurs sont utilisés en radiothérapie métabolique dans les cas où l'on souhaite toucher seulement un faible diamètre cellulaire. Leurs hautes énergies permettent une forte concentration au niveau du tissu ciblé et une bonne activité tumoricide tout en épargnant les tissus sains. Le mécanisme d'action des radiopharmaceutiques à émetteur α consiste le plus souvent en l'insertion de la particule ${}^4_2\text{He}$ entre deux atomes, générant ainsi une entité instable [Zimmermann 06].

Malgré leur nombre important, peu de radionucléides émetteurs α sont utilisables pour des applications médicales. En effet, la plupart d'entre eux a une demie-vie trop longue et ils sont en général difficiles à produire. Les radionucléides couramment utilisés en laboratoires de recherche sont : ${}^{211}\text{At}$, ${}^{212}\text{Bi}$ et ${}^{225}\text{Ac}$ [Volkert 99, Zimmermann 06].

Emetteurs β

Il existe deux types d'émetteurs β : les β^+ qui émettent un positron et les β^- qui émettent un électron.



Les premiers sont utilisés en imagerie TEP (tomographie à émission de positrons ou PET scan) en utilisant les deux photons émis par l'annihilation du positron. Ces photons d'annihilation, émis avec un angle de 180° à 511 keV, sont détectables par des capteurs externes et peuvent être corrélés spatialement, augmentant ainsi la résolution de cette technique (4-5 mm). Les rayonnements β^+ ne parcourent que quelques millimètres dans l'organisme (en fonction de leur énergie) et ne provoquent donc qu'une faible diffusion du signal. Les émetteurs β^+ les plus utilisés aujourd'hui sont le ${}^{11}\text{C}$, l' ${}^{15}\text{O}$ et le ${}^{18}\text{F}$ [McCarthy 94]. La substitution d'un ${}^{12}\text{C}$ par le ${}^{11}\text{C}$, ou du ${}^{16}\text{O}$ par le ${}^{15}\text{O}$, présente l'avantage de ne pas modifier la nature chimique de la molécule marquée, l'inconvénient étant la courte période de ces éléments : 20,4 min et 2 min respectivement.

Les émetteurs β^- sont utilisés en radiothérapie. Ils ont un TEL plus faible que les émetteurs α mais ont un pouvoir pénétrant plus important, allant de quelques micromètres à une dizaine de millimètres. Ce sont les plus utilisés en radiothérapie. Ils peuvent donner naissance à des rayons X par capture électronique et leur excédent d'énergie est évacué sous forme de chaleur. Ils génèrent des radicaux libres et peuvent donc servir à la destruction localisée de cellules. Les plus utilisés sont l' ${}^{90}\text{Y}$, l' ${}^{131}\text{I}$ et de plus en plus, le ${}^{186}\text{Re}$ et le ${}^{188}\text{Re}$ [Volkert 99, Perkins 05]. Notons que le ${}^3\text{H}$ ou le ${}^{14}\text{C}$, qui sont également des émetteurs β^- , permettent de réaliser de l'imagerie *ex vivo* de coupes anatomiques, avec détection par un β -imager. Cette technique a une efficacité de détection proche de

100% ; elle est précise car le signal diffuse peu et permet une exceptionnelle vitesse de lecture.

Emetteurs d'électrons Auger

Ces émetteurs donnent naissance à un rayonnement particulaire issu de la désintégration de l'isotope par capture électronique (CE) ou conversion interne (CI). Environ la moitié des radionucléides connus émettent des électrons Auger, dont certains des radioéléments parmi les plus utilisés en imagerie nucléaire tels que le ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I et le ^{201}Tl . Les émetteurs Auger ont un TEL élevé sur quelques nanomètres qui diminue ensuite pour atteindre celui des émetteurs β^- . Leur effet thérapeutique est très localisé : l'isotope doit donc être introduit à proximité de la cible, le plus souvent l'ADN, c'est-à-dire près du noyau cellulaire à détruire. A l'heure actuelle, bien que de nombreuses études aient été réalisées, aucun radiopharmaceutique basé sur ce type d'émetteur n'est disponible pour la radiothérapie, notamment à cause de l'hétérogénéité de l'absorption du radionucléide par les cellules [O'Donoghue 96].

Emetteurs γ

Ils émettent un rayonnement électromagnétique constitué d'un photon de haute énergie à fort pouvoir pénétrant et à TEL faible. Le rayonnement γ traduit la désexcitation du noyau permettant le retour vers une entité plus stable. Ces rayonnements interagissent peu avec la matière et sont par conséquent utilisés en imagerie. L'énergie émise est caractéristique de l'isotope. L'émetteur γ de loin le plus utilisé aujourd'hui pour les examens par scintigraphie est le ^{99m}Tc .

L'activité d'un radionucléide est mesurée en becquerels (Bq). Un becquerel correspond à la désintégration d'un atome par seconde. Cette unité a remplacé le curie (Ci) qui correspond à 37 milliards de becquerels. Compte tenu de la radioactivité émise par les radionucléides, on utilise couramment les méga- ou gigabecquerels (MBq et GBq).

I.1.1.b Techniques d'imagerie et de radiothérapie

La scintigraphie regroupe différentes techniques d'imagerie diagnostique et a d'abord été développée avec des émetteurs γ . L'amélioration des techniques de détection et de traitement informatique a permis d'utiliser les émetteurs β^+ et de proposer de l'imagerie par tomographie, c'est-à-dire des images 2D (en coupe) ou 3D. L'imagerie nucléaire fait appel, soit à des sels et complexes radioactifs, soit à des molécules vectrices classiques (médicaments, hormones, anticorps) marquées par un radionucléide. Ces composés sont administrés au patient et leur localisation est suivie par des détecteurs adéquats. Un avantage majeur de l'imagerie nucléaire est sa grande sensibilité puisque des quantités inférieures au nanogramme sont détectables. Pour les applications en thérapie, c'est l'effet

destructeur du rayonnement (β^- ou α) du radionucléide qui est mis à profit. On parle de radiothérapie vectorisée quand le radioélément est associé à un vecteur et que le radiopharmaceutique est administré au patient. La radiothérapie externe consiste, pour sa part, en l'utilisation de sources externes de radioactivité sous forme d'implants (curiethérapie) ou de générateurs de particules (proton- et neutronothérapie). Ce type d'applications ne sera pas détaillé ici.

Radiothérapie vectorisée

Cette méthode permet de concentrer un radiopharmaceutique dans un tissu ou un organe particulier pour le traiter grâce aux effets ionisants du radionucléide [Volkert 99, Kassis 05]. La spécificité dépend du vecteur sur lequel le radionucléide est fixé. Seule l'iode fait exception : administrée sous forme d'iodure, elle se concentre spontanément et spécifiquement dans les tissus thyroïdiens. L'iode 131 fait partie des radionucléides utilisés en *radiothérapie métabolique*. Cette technique utilise une molécule marquée participant au métabolisme et qui irradie la zone ciblée. La *radiothérapie locale* consiste quant à elle à injecter dans des espaces naturels (ex. articulations) une substance radioactive qui aura un effet très localisé. Cette technique est aujourd'hui principalement utilisée dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde. La *radioimmunothérapie* consiste à cibler les antigènes, par exemple ceux présents à la surface de cellules tumorales, par des anticorps radiomarqués. Ainsi, le ^{131}I -tositumomab et le ^{90}Y -ibritumomab ont été commercialisés en 2003 pour le traitement de patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens et résistants aux thérapies classiques [Jacene 07].

D'une manière plus générale, la radiothérapie vectorisée fait appel à une molécule organique marquée servant de vecteur [Perkins 05]. Des peptides de synthèse ont été utilisés comme vecteurs, avec par exemple des analogues de la somatostatine comme l'octreotide qui ont tout d'abord été marqués au ^{99m}Tc [Gabriel 03], à l' ^{111}In [deJong 98] ou au ^{64}Cu [Lewis 99] à des fins d'imagerie des tumeurs. La transposition avec des radionucléides thérapeutiques (^{188}Re [Zamora 96], ^{177}Lu [Lewis 01] ou ^{90}Y [Ginj 05]) permet d'envisager l'utilisation de ces mêmes molécules pour le traitement de cancers [van Essen 07]. La majorité des radiopharmaceutiques utilisés en thérapie font appel à des émetteurs β^- .

Imagerie par rayonnements γ

La scintigraphie permet l'analyse des rayonnements γ pour fournir une image plane cumulée, semblable à une radiographie X. Les applications de cette technique sont nombreuses. L'une des explorations les plus courantes est la scintigraphie osseuse qui permet le diagnostic des métastases osseuses (Fig. I.1 **A**). La scintigraphie myocardique permet l'étude fonctionnelle du cœur, méthode particulièrement intéressante après un accident cardiaque (Fig. I.1 **B**). L'analyse fonctionnelle des reins, de la thyroïde, des poumons et du cerveau fait couramment appel à cette technique.

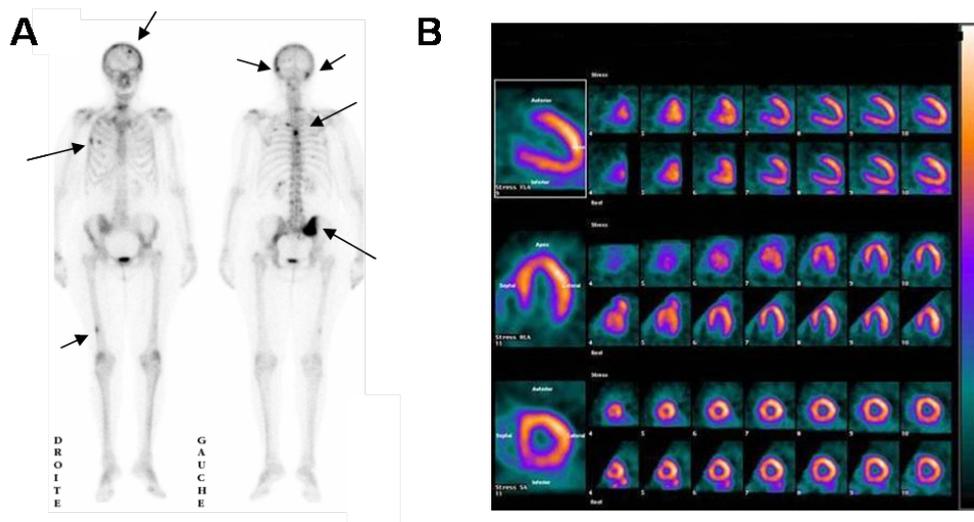


FIG. I.1 – Exemples de scintigraphies γ . **A.** Scintigraphie osseuse réalisée avec un diphosphonate marqué au ^{99m}Tc mettant en évidence de multiples métastases osseuses d'un cancer du sein [Cachin 06]. **B.** Scintigraphie cardiaque réalisée au ^{99m}Tc -SestaMIBI montrant la perfusion du myocarde après un effort et au repos, selon trois plans de coupe.

Les images sont obtenues par des γ -caméras qui peuvent enregistrer, en un seul passage, une fenêtre de 40×60 cm (Fig. I.2). Un collimateur permet de n'enregistrer que les rayonnements perpendiculaires au détecteur. Celui-ci est en général constitué d'un cristal sensible aux rayonnements (de type iodure de sodium dopé au thallium). Un photomultiplicateur permet de transformer le rayonnement en signal électrique. Ce type d'appareil permet également d'obtenir des images dynamiques d'une zone donnée.

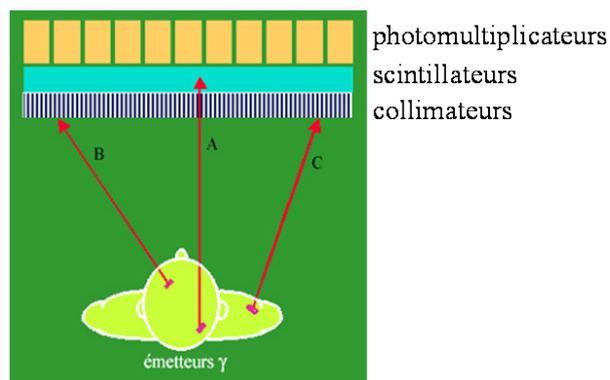


FIG. I.2 – Schéma de principe d'une γ -caméra. Seuls les photons A, perpendiculaires aux collimateurs, sont détectés.

La méthode TEMP (tomographie d'émission monophotonique ou SPECT en anglais) utilise le principe de la γ -caméra, appliqué au scanner. Deux ou trois détecteurs tournent alors autour du patient et permettent d'obtenir des images en coupe. Une reconstruction

d'image permet d'accéder à une image tridimensionnelle avec une résolution de l'ordre de 3 mm. La principale limitation de cette technique est sa faible sensibilité, puisque seulement 0,01 à 0,03% des rayonnements sont détectés, mais des améliorations peuvent être apportées en multipliant le nombre de détecteurs ou en améliorant les collimateurs par exemple [Jansen 07].

Imagerie par rayonnements β^+

Pendant longtemps, seuls les rayonnements γ ont permis d'obtenir des images de qualité et beaucoup d'efforts ont été fournis pour développer des radiopharmaceutiques à partir d'émetteurs γ . Ces vingt dernières années ont vu l'essor des traceurs à base d'émetteurs β^+ grâce aux progrès techniques qui ont conduit à la mise au point de nouveaux détecteurs plus sensibles et ayant une meilleure résolution, mais aussi grâce aux avancées informatiques (puissance des calculateurs) qui permettent de retraiter les images.

Comme cela a déjà été mentionné, l'annihilation du positron conduit à l'émission de deux photons γ de 511 keV émis dans des directions opposées. Les caméras TEP sont disposées en couronne autour du patient et mesurent ainsi les doubles impacts qui sont corrélés spatialement (Fig. I.3 A). Ainsi, on peut atteindre des résolutions de l'ordre de 5 mm avec une sensibilité de 1 à 3% des rayonnements détectés. Le principal produit utilisé est le ^{18}F -FDG (fluorodésoxyglucose). Ce traceur permet d'imager la consommation de glucose qui est plus importante dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales (Fig. I.3 B).

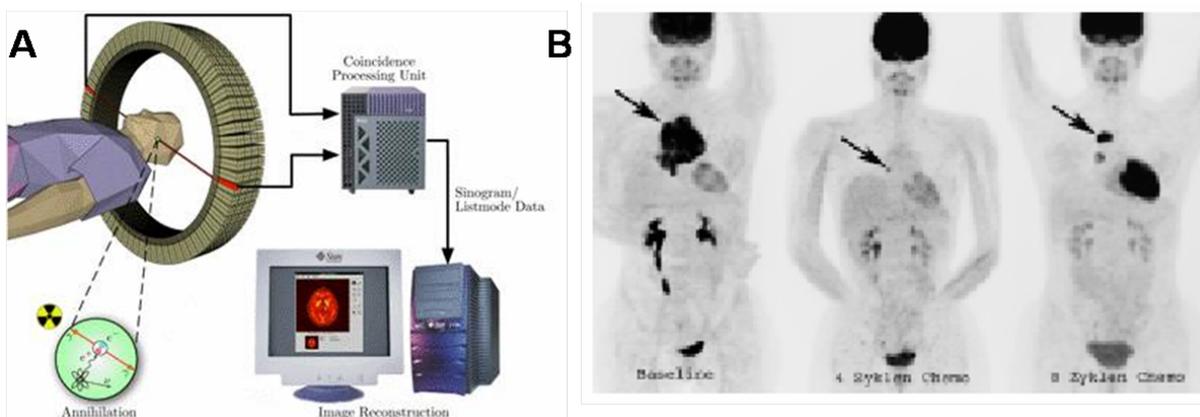


FIG. I.3 – **A.** Schéma de principe de l'imagerie TEP. **B.** Contrôle du traitement d'un patient souffrant de lymphome hodgkinien par images TEP au ^{18}F -FDG [Strobel 07].

Tendances actuelles

Les différentes techniques d'imagerie décrites précédemment présentent individuellement des limitations (sensibilité, résolution, Tab. I.1) qui sont en passe d'être résolues par les améliorations techniques et par la combinaison de différents modes d'imagerie. Ainsi, on assiste à un développement croissant des études en SPECT-CT (SPECT +

computed tomographie), en PET-CT ou encore en les associant à l'IRM. Ces techniques permettent d'obtenir de bien meilleures résolutions et une amélioration des diagnostics par la combinaison d'informations fonctionnelles et morphologiques (Fig. I.4).

TAB. I.1 – Comparaison des propriétés de l'imagerie TEP et TEMP (d'après [Jansen 07]).

	TEP préclinique	TEMP préclinique	TEP clinique	TEMP clinique
Sensibilité	~ 2% - 4%	~0,3%	1% - 3%	0,01% - 0,03%
Résolution	~1,5 mm	~1,2 mm	~5 mm	~10 mm
Champ d'observation	~7 cm	~8 cm	~50 cm	~50 cm

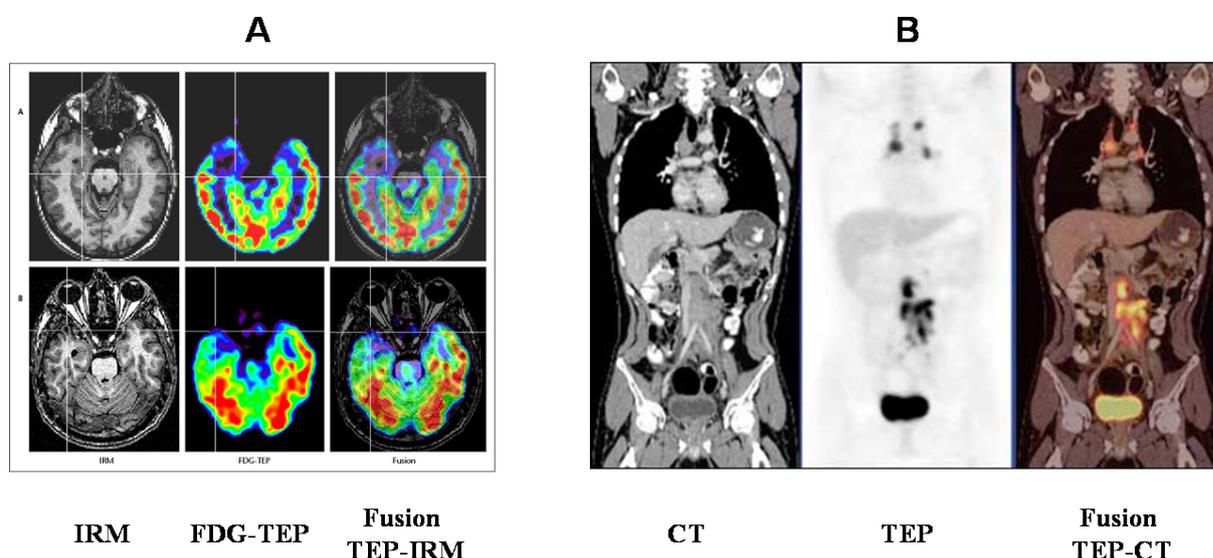


FIG. I.4 – Exemples d'images de fusion. A. TEP-IRM (haut) hypométabolisme temporal interne étendu au pôle temporal dans un cas de DNT (Dysembryoplastic Neuroepithelial Tumors) localisées dans l'hippocampe; (bas) hypométabolisme temporal étendu (pôle, cortex basal et latéral) dans une DNT du pôle temporal [Chassoux 06]. B. TEP-CT de lymphome (www.imagingeconomics.com/issues/articles/2005-03_03.asp).

I.1.1.c Radioéléments utilisés pour les radiopharmaceutiques

Les radionucléides utilisables pour développer des radiopharmaceutiques doivent présenter un certain nombre de caractéristiques. Parmi les critères de choix d'un radionucléide, les plus importants sont :

- *son rayonnement*. Les émetteurs α , β^- et d'électrons Auger sont utilisés en radiothérapie tandis que les émetteurs γ et β^+ servent en imagerie. Un émetteur γ doit avoir une énergie comprise entre 100 et 200 keV et un émetteur β^+ , une énergie de 0,5 à 2 MeV, afin

de traverser les tissus tout en limitant la diffusion du signal. Pour la thérapie, l'éventuelle composante γ doit être faible afin de limiter les problèmes de radioprotection.

- *sa période physique ou demi-vie*. C'est la durée à l'issue de laquelle l'activité du radionucléide est divisée par deux. Elle doit être adaptée aux délais de concentration spécifique (biolocalisation) et aux propriétés d'élimination du radiopharmaceutique. Elle doit être suffisamment longue pour que la synthèse de l'agent d'imagerie ou de thérapie puisse être réalisée et qu'il atteigne sa cible, et suffisamment courte pour limiter le temps d'irradiation du patient. La période des radionucléides utilisés en thérapie est comprise entre 10 h et 10 jours. Pour l'imagerie, la période est idéalement de 6 à 8 h en TEMP, et au maximum de 24 h. Pour la TEP, elle est de préférence supérieure à 1 h.

- *son activité spécifique*. Selon son mode de production, le radionucléide est obtenu à l'état pur (= sans entraîneur, "no-carrier added") ou sous forme d'un mélange d'isotopes comportant entre autres des nucléides stables (= avec entraîneur, "carrier added"). L'activité spécifique mesure l'activité du radionucléide dans le mélange (Bq.g^{-1} ou Bq.mol^{-1}). Une activité spécifique élevée permet, dans le cas de la radiothérapie, d'administrer une forte dose de rayonnement sans risque de toxicité chimique.

- *son isotope de décroissance*. Il faut tenir compte des caractéristiques de l'élément formé par décroissance. Il peut être stable ou non et, dans ce cas, le type de particules émises par l'élément fils doit être pris en compte dans le choix du radionucléide père.

- *son coût et sa disponibilité*. Le mode de production du radioélément détermine en partie son coût. Les radionucléides utilisés en médecine nucléaire sont produits dans des réacteurs nucléaires, dans des cyclotrons ou dans des générateurs portables. La production des radionucléides par cyclotron ou réacteur est très coûteuse. Au contraire, la formule des générateurs portables est très attractive à la fois par son coût et par sa facilité d'utilisation. Ils sont constitués d'un système de séparation permettant d'éluer un radionucléide fils à partir d'un radionucléide père immobilisé dans une enceinte portable. Le système le plus utilisé est le générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$.

Il faut également connaître les propriétés chimiques du radioélément, comme par exemple : ses propriétés d'oxydo-réduction, sa stabilité, la stéréochimie du complexe formé (importante pour cibler des récepteurs spécifiques), sa charge (un traceur de charge négative favorisera une élimination par les reins, une charge positive donnera une accumulation dans le cœur, et un produit neutre pourra passer la barrière hématoencéphalique), sa lipophilie (les complexes lipophiles s'éliminent majoritairement par voie hépatobiliaire et s'accumulent dans les tissus gras).

Ainsi, le choix des radionucléides utilisables pour la conception des radiopharmaceutiques est sujet à de nombreuses contraintes. Seul un faible nombre de radionucléides peut être finalement utilisé pour la conception de radiopharmaceutiques à but thérapeutique

TAB. I.2 – Radionucléides les plus couramment utilisés en médecine nucléaire.

Radionucléide	Emission	Période	Energies	Production	Application
^{67}Ga	γ CE	3,26 j	0,19 MeV 0,09 MeV	cyclotron	imagerie (thérapie)
^{99m}Tc	γ	6,02 h	0,14 MeV	générateur	imagerie
^{111}In	γ CE	67,3 h	0,17 MeV 0,25 MeV	cyclotron	imagerie (thérapie)
^{123}I	γ CE	13,2 h	0,16 MeV	cyclotron	imagerie (thérapie)
^{125}I	γ	60 j	35,5 keV	réacteur	imagerie
^{201}Tl	γ	3,05 j	0,17 MeV	cyclotron	imagerie
^{11}C	β^+	20,4 min	0,96 MeV	cyclotron	imagerie
^{15}O	β^+	2 min	1,73 MeV	cyclotron	imagerie
^{18}F	β^+	108 min	0,63 MeV	cyclotron	imagerie
^{64}Cu	β^+ β^-	12,7 h	0,66 MeV	cyclotron	imagerie (thérapie)
^{68}Ga	β^+ γ	1,12 h	1,90 MeV	générateur	imagerie
^{82m}Rb	β^+ γ	6,4 h	3,35 MeV	générateur	imagerie
^{86}Y	β^+	14,7 h	1,25 MeV	cyclotron	imagerie
^{94m}Tc	β^+ γ	53 min	2,47 MeV	cyclotron	imagerie
^{32}P	β^-	14,3 j	1,71 MeV	réacteur	thérapie
^{89}Sr	β^-	50,5 j	1,49 MeV	réacteur	thérapie
^{90}Y	β^-	64,1 j	2,28 MeV	générateur	thérapie
^{131}I	β^- γ, CE	8,02 j	0,61 MeV	réacteur	thérapie
^{153}Sm	β^- γ	46,3 h	0,70 MeV	réacteur	thérapie
^{169}Er	β^-	9,4 j	0,35 MeV	réacteur	thérapie
^{186}Re	β^- γ, X	3,77 j	1,08 MeV	réacteur	thérapie
^{188}Re	β^- γ	16,9 h	2,12 MeV	générateur	thérapie
^{213}Bi	α β^-	45,6 min	5,87 MeV	générateur	thérapie
^{225}Ac	α	10,0 j	5,73 MeV	cyclotron	thérapie

$CE = \text{capture électronique}$

ou d'imagerie (Tab. I.2). Le ^{18}F est le plus utilisé pour l'imagerie TEP. En TEMP, les deux radionucléides prépondérants sont le ^{99m}Tc (85% des examens de routine) et l' ^{131}I qui sert principalement au diagnostic des cancers thyroïdiens. En revanche, l' ^{123}I est encore peu utilisée à cause de son coût élevé de production. De par sa période relativement longue, l' ^{111}In est employé pour des vecteurs ayant une biodistribution lente. En thérapie, l' ^{90}Y , l' ^{169}Er et le ^{186}Re sont employés pour les synoviorthèses [Siegel 97], c'est-à-dire la destruction de la membrane synoviale produite de façon incontrôlée dans l'arthrite. Le ^{89}Sr et le ^{153}Sm sont quant à eux utilisés pour la palliation des douleurs liées aux métastases osseuses [Volkert 99].

I.1.1.d Propriétés et marquage des radiopharmaceutiques

L'efficacité d'un radiopharmaceutique dépend de la spécificité du vecteur, c'est-à-dire la partie non radioactive de la molécule, et des caractéristiques de l'isotope qui lui est rattaché. Il faut également prendre en compte sa demi-vie effective. Pour cela, il est nécessaire de connaître le temps de résidence au contact de la cible, appelé demi-vie biologique. Idéalement, le temps de résidence devrait être maximum dans l'organe visé et quasi nul dans les autres parties du corps, mais c'est rarement le cas. On définit la demi-vie effective en combinant la période de l'isotope et la demi-vie biologique, ce qui donne accès à l'impact réel du radiopharmaceutique sur sa cible.

La stabilité chimique et les propriétés pharmacocinétiques conditionnent aussi le comportement des radiopharmaceutiques. Ils doivent être stables dans le milieu circulant et la présence du radioélément ne doit pas perturber les propriétés ciblantes du vecteur. Les contraintes de pharmacocinétique sont les mêmes que pour les médicaments et une excrétion trop rapide ou des interactions non spécifiques sont des obstacles à la biodisponibilité. La rétention dans le sang doit être suffisamment longue pour que le produit atteigne sa cible, étape qui doit être la plus courte possible. Le taux de dissociation de la cible doit être faible et l'élimination rénale doit être prépondérante pour éviter une accumulation de radioactivité dans le système gastro-intestinal qui gêne la visualisation des cibles abdominales en imagerie.

La méthode de marquage doit être simple, une ou deux étapes maximum, et avec un délai de synthèse en rapport avec la période du radionucléide (au maximum 60 min pour le ^{99m}Tc). La pureté radiochimique doit être supérieure à 90% et la méthode de marquage ne doit pas nécessiter de purification. Il existe deux stratégies de marquage des radiopharmaceutiques : par liaison covalente ou par complexation.

Certains éléments peuvent être introduits de manière covalente sur le radiopharmaceutique. C'est le cas de l' $^{125/131}\text{I}$ ou du ^{18}F qui sont introduits à la place d'un hydrogène, ou encore le ^{11}C qui est substitué au ^{12}C (Fig. I.5). Le principal attrait du marquage covalent est la faible modification des propriétés chimiques et structurales des molécules ainsi ra-

diomarquées. L'anticorps polyclonal anti-PAP (prostatic acid phosphatase) a par exemple été iodé à l' ^{123}I pour l'immunoscintigraphie de patients atteints de cancers prostatiques [Richardson 86]. En contrepartie, cette approche nécessite la mise en œuvre de méthodes de marquage contraignantes (introduction du radioélément à la dernière étape à cause des courtes périodes) et fait appel à des radionucléides produits dans des cyclotrons ou des réacteurs.

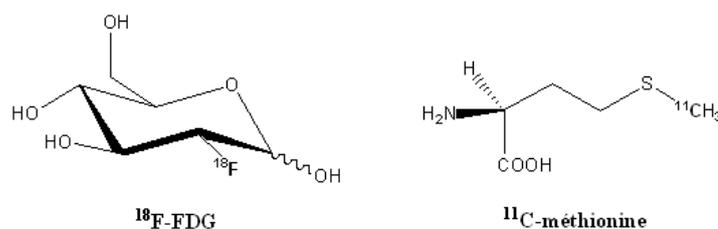


FIG. I.5 – Exemples de traceurs obtenus par marquage covalent et utilisés pour visualiser la métabolisme du glucose (^{18}F -FDG) et la synthèse protéique (^{11}C -méthionine) dans les cellules tumorales.

Dans l'approche de marquage par complexation, illustrée ici par des traceurs marqués au $^{99\text{m}}\text{Tc}$, on distingue les **traceurs non dirigés** de première génération des **traceurs vectorisés**. Les premiers sont constitués de complexes non-ciblants de radionucléides et agissent en général comme traceurs de débit. Parmi ces traceurs non dirigés, on peut citer le Cetec ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO) ou le Cardiolite ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi) qui sont respectivement utilisés pour l'imagerie du cerveau et du cœur (Fig. I.6). Notons que la majorité des traceurs autorisés par la FDA (Food and Drug Administration) sont de ce type.

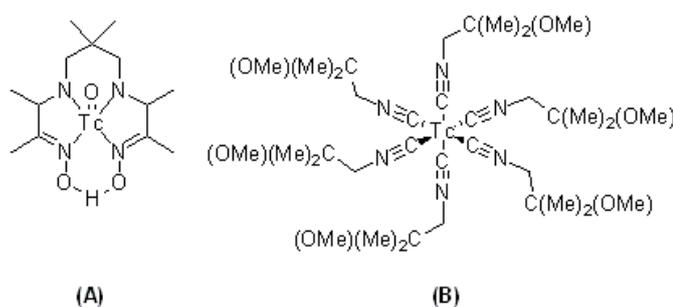


FIG. I.6 – Traceurs de première génération. (A) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO (**Ceretic**) pour l'imagerie du cerveau et (B) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi (**Cardiolite**) pour l'imagerie du cœur.

La seconde catégorie de traceurs associe un groupe complexant à un motif vecteur. Trois approches ont été développées pour introduire le radioélément : la voie directe, l'approche bifonctionnelle et l'approche intégrée.

Voie directe

Cette méthode met à profit les groupements chélatants des chaînes latérales des acides aminés. A titre d'exemple on peut citer l'anticorps arcitumomab qui a été marqué au ^{99m}Tc [Goldenberg 97]. Cette approche ne nécessite pas de modification de la molécule vectrice et est aisée à mettre en œuvre. Toutefois, les complexes résultants peuvent être instables et le site de marquage est difficilement contrôlable. De plus, le marquage peut avoir un effet sur les propriétés biologiques de la macromolécule en modifiant par exemple sa structure ou sa polarité. Cette méthode est donc peu utilisée.

Approche bifonctionnelle

Cette technique est la plus utilisée pour le radiomarquage par complexation des traceurs vectorisés actuellement décrits. Elle est aussi appelée "approche BFCA" pour "bi-functional chelating agent". Elle consiste à utiliser une molécule ciblante reliée, par un linker, à un motif de complexation du radioélément à introduire (fig. I.7).

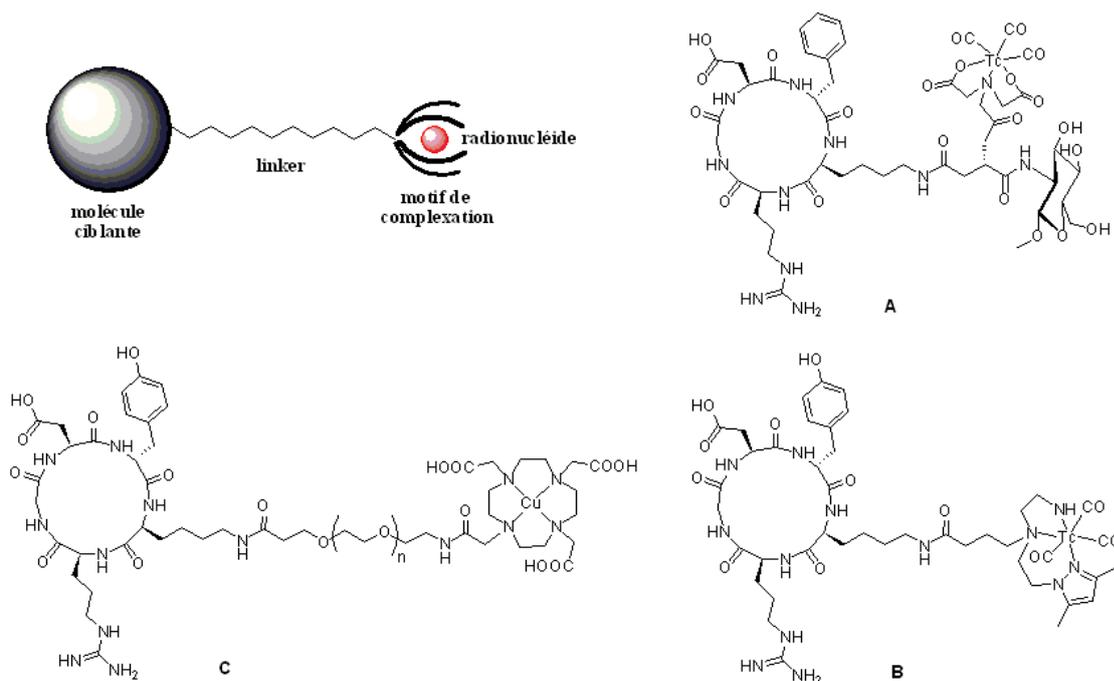


FIG. I.7 – *Approche BFCA : principe et exemples de ciblage de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. (A) ^{99m}Tc -glucosamino-*c*(RGDfK) [Jung 06], (B) $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -pyrazolyl-*c*(RGDyK) [Alves 07], (C) ^{64}Cu -DOTA-PEG-*c*(RGDyK) [Chen 04a].*

Cette approche présente l'avantage de préserver l'affinité de la molécule ciblante pour son récepteur en éloignant le motif chélatant. Le linker peut être une simple chaîne hydrocarbonnée pour augmenter la lipophilie, une séquence d'acides aminés pour améliorer l'élimination rénale ou encore de type PEG pour ralentir l'élimination hépatique. On peut au contraire mettre à profit cette métabolisation pour favoriser l'élimination rapide du

radionucléide. L'inconvénient majeur de cette approche est la taille des objets formés qui les rend immunogène, poser des problèmes de biodisponibilité, ou modifier la spécificité et/ou la sélectivité initiales du vecteur.

Approche intégrée

Dans cette stratégie, la partie chélatante du radionucléide fait partie intégrante de la partie ciblante. Il faut en théorie parvenir à former un objet dont la taille est proche de celle de la molécule ciblante modèle. Les structures chimiques et tridimensionnelles reconnues par le récepteur doivent être conservées afin de maintenir une affinité et une spécificité suffisantes. Le ciblage du récepteur de la progestérone a ainsi été étudié par cette approche (Fig. I.8), mais l'affinité des traceurs s'est révélée faible. La taille des complexes ainsi que leur polarité globale étaient pourtant favorables. Le manque d'affinité pourrait s'expliquer par une faible tolérance des récepteurs aux distributions électroniques des complexes, ainsi que par l'absence de certaines fonctionnalités essentielles pour la reconnaissance [Hom 97]. Bien que ces résultats soient décevants, ce type d'approche reste prometteur et offre de larges potentialités, notamment pour l'étude de récepteurs reconnaissant des peptides.

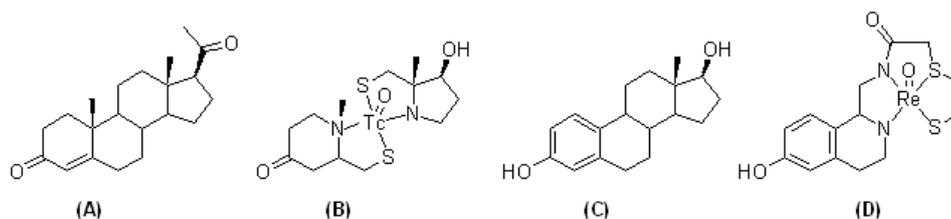


FIG. I.8 – *Approche intégrée*. (A) *progestérone*, (B) *mime de progestérone*, (C) *estradiol*, (D) *mime d'estradiol*

L'approche intégrée a été exploitée au laboratoire pour mettre au point une nouvelle stratégie de synthèse de composés organométalliques par assemblage combinatoire de modules indépendants mais complémentaires. Cette méthode consiste à assembler deux entités A_i et B_j capables de coordonner un cœur métallique M pour former un complexe $[A_i.M.B_j]$. Les banques de complexes formées peuvent alors être criblées vis-à-vis de cibles d'intérêt biologique. La validation de cette technique au laboratoire a été réalisée sur la cyclophiline A, une peptidyl isomérase impliquée dans de nombreuses pathologies humaines, et a permis la sélection de nouveaux ligands [Clavaud 06a]. Cette méthode a également été appliquée avec succès avec une approche combinatoire dynamique [Clavaud 08]. Nous reviendrons en détail sur ces travaux en introduction du chapitre III.

Parmi les radiopharmaceutiques commercialisés, ceux marqués au ^{99m}Tc sont très représentés pour l'imagerie (Tab. I.3). Le nombre de mises sur le marché a pourtant fortement ralenti ces dernières années malgré l'important effort de recherche dans ce domaine. Les radiopharmaceutiques thérapeutiques de rhénium sont encore peu utilisés en routine mais de plus en plus d'exemples d'applications sont aujourd'hui décrits dans la littérature. Les complexes de $^{186/188}\text{Re}$ sont développés pour le traitement de tumeurs malignes, en particulier dans la palliation de la douleur liée aux tumeurs osseuses (^{186}Re -etidronate(R)) [Lam 04], mais également pour le traitement de l'inflammation des articulations, en particulier pour l'arthrite, ou encore la prévention de la resténose après angioplastie [Volkert 99].

TAB. I.3 – Radiopharmaceutiques au ^{99m}Tc commercialisés pour le diagnostique en 2005 [Thakur 05, Zimmermann 06].

forme chimique du traceur	indication
albumine humaine (MMA)	imagerie vasculaire et pulmonaire
apcitide	thromboscintigraphie
bicisate dihydrochloride (ECD)	imagerie cérébrale
disofenine (DISIDA)	évaluation de la fonction biliaire
exametazine (HMPAO)	perfusion cérébrale, marquage des cellules sanguines pour la détection des infections
gluceptate	imagerie du cerveau et des reins
mébrofénine	imagerie hépatique
mertiatile (MAG3)	filtration rénale
pentetate (DTPA)	imagerie vasculaire cérébrale, rénale et pulmonaire
pertechnétate de sodium	imagerie vasculaire cérébrale, imagerie des glandes salivaires, gastro-entérologie, voies lacrymales
medronate (MDP) - PYP - oxydronate(HDP)	scintigraphie osseuse - imagerie des métastases osseuses
phytate	imagerie hépatique
pyrophosphate (PYP)	imagerie vasculaire
sestamibi	imagerie cardiaque
sulfure de Tc colloïdal	imagerie hépatique, détection du ganglion sentinelle
succimer (DMSA)	imagerie du cortex rénal
tetrofosmine	imagerie des sites infectieux de structures cancéreuses
anticorps et peptides	imagerie ciblée (ex. arcitumomab, fanolesomab)

D'un point de vue plus global, le marché des produits d'imagerie, toutes techniques confondues, était de 4,5 milliards d'euros en 2002. A cette date, plus de 28 millions de patients ont pu bénéficier d'examens de médecine nucléaire, ce qui représentait un budget de 1,7 milliards d'euros. Les principales sociétés se partageant le marché des agents de contraste (RX, IRM et ultrasons) et de médecine nucléaire sont Amersham Health, Mallinkrodt/Tyco et Schering [Meunier 03].

I.1.2 Technétium et Rhénium

L'utilisation de technétium et de rhénium est très attractive pour le développement de métallopeptides. En effet, leurs potentialités exploitables pour l'imagerie moléculaire et la radiothérapie sont largement démontrées puisque le ^{99m}Tc est utilisé en imagerie dans plus de 85% des analyses hospitalières (Tab. I.3), et que la radiothérapie au $^{186/188}\text{Re}$ commence à être utilisée. Ceci s'explique en partie par leur disponibilité ainsi que par leurs propriétés physicochimiques. De plus, le rhénium et le technétium ont des propriétés voisines ; leur chimie de coordination a été largement étudiée et l'analogie de structure de leurs complexes permet d'envisager une transposition aisée d'un élément à l'autre.

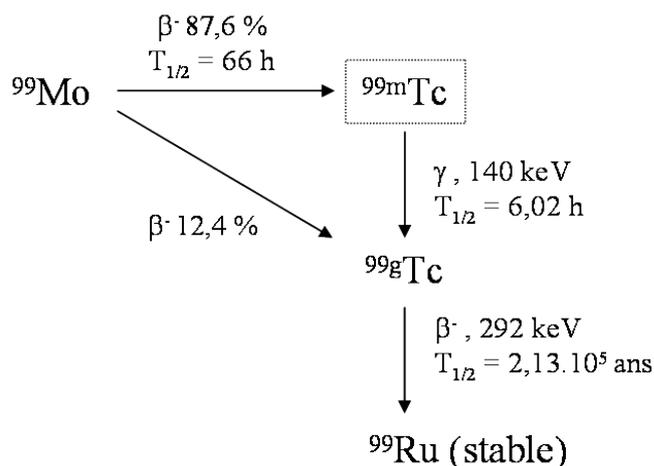
I.1.2.a Propriétés physicochimiques du technétium et du rhénium

Le technétium ($Z = 43$) a été prédit par Mendeleïev et isolé par Segré et Perrier en 1937 [Perrier 37, deJonge 96]. Son nom vient du grec *technetos* qui signifie "artificiel" et a été choisi pour rappeler que c'est le premier élément artificiel à avoir été isolé [Perrier 47]. Il possède plus de 30 radioisotopes connus (du ^{90}Tc au ^{110}Tc). Parmi ces isotopes, les ^{94m}Tc , ^{99m}Tc et ^{99g}Tc sont les plus utilisés (Tab.I.4), mais le ^{95m}Tc et le ^{96}Tc commencent à être étudiés. Le ^{94m}Tc est un émetteur majoritairement β^+ (2,44 MeV), de période 52 min, produit dans un cyclotron par irradiation de ^{94}Mo . Il est utilisable en imagerie TEP mais le développement de traceurs à base de ^{94m}Tc est à l'heure actuelle très limité en raison de la concurrence exercée par le ^{18}F .

TAB. I.4 – Principaux isotopes du Tc et du Re utilisés pour les radiopharmaceutiques.

Nucléides	Emission et énergie	Période	Production	Application
^{99m}Tc	γ , 140 keV	6,02 h	$^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ générateur	médecine nucléaire, recherche
^{99g}Tc	β^- , 294 keV	$2,13 \cdot 10^5$ ans	réacteur	recherche
^{94m}Tc	β^+ , 2,44 MeV	52 min	cyclotron	recherche
^{186}Re	β^- , 1,1 MeV γ , 137 keV (9%)	90,6 h	réacteur	médecine nucléaire, recherche
^{188}Re	β^- , 2,0 MeV γ , 155 keV (15%)	17,0 h	$^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ générateur	médecine nucléaire, recherche
$^{185}\text{Re}/^{185}\text{Re}$	stable	-	naturel	recherche

Le ^{99m}Tc est un émetteur γ de période 6,02 h et d'énergie 140 keV. Il est facilement produit à partir du générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Fig. I.9 et I.10). Ce générateur, mis au point dès 1958 par Tucker et Greene, est constitué de $^{99}\text{MoO}_4^-$ adsorbé au sommet d'une colonne d'alumine échangeuse d'ions. Le ^{99}Mo peut être produit soit par activation neutronique

FIG. I.9 – *Filiation du ^{99}Mo*

du ^{98}Mo en réacteur nucléaire, soit par fission de l' ^{235}U . Le ^{99}Mo génère le ^{99m}Tc sous forme de pertechnétate $^{99m}\text{TcO}_4^-$, qui est ensuite élué par une solution saline (NaCl 9 mg/ml et nitrate de Na 0,05 mg/ml) sur une période de 7 à 10 jours. La solution obtenue est très diluée, de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-8} M. La synthèse des radiopharmaceutiques doit par conséquent être réalisée à haute dilution, ce qui joue de manière importante sur les cinétiques de complexation. La caractérisation des complexes est alors difficile par des méthodes analytiques classiques. L'utilisation de l'isotope ^{99g}Tc permet de caractériser chimiquement les complexes de ^{99m}Tc et de réaliser éventuellement une structure par RMN ou diffraction de rayons X.

La première utilisation du ^{99m}Tc en médecine, en 1962, a permis un examen diagnostique de la thyroïde à l'aide de pertechnétate. En 1963 a eu lieu la première scintigraphie hépatique et en 1964 la première scintigraphie cérébrale. Depuis, les applications n'ont cessé de se multiplier [Liu 99, Jurisson 99].

Le ^{99g}Tc , g pour "ground" par opposition à m pour "metastable", se désintègre en émettant une radiation β^- forte (294 keV) et a une période de 213 000 ans (Fig.I.9). Il est obtenu par extraction des produits de fission de l'uranium 235 et représente environ 6% des produits de fission (un réacteur nucléaire de 100 MW en produit quotidiennement 2,5 g). La manipulation de cet élément est réalisée dans des conditions de radioprotection assouplies qui permettent de l'utiliser en quantité pondérale (1 à 20 mg). Il nécessite toutefois, comme pour tout élément radioactif, la mise en place d'une prévention de la contamination et d'une filière d'évacuation des déchets. Il n'est pour l'instant utilisé que pour les études préliminaires en recherche afin de caractériser chimiquement et structuralement les complexes à base de technétium.

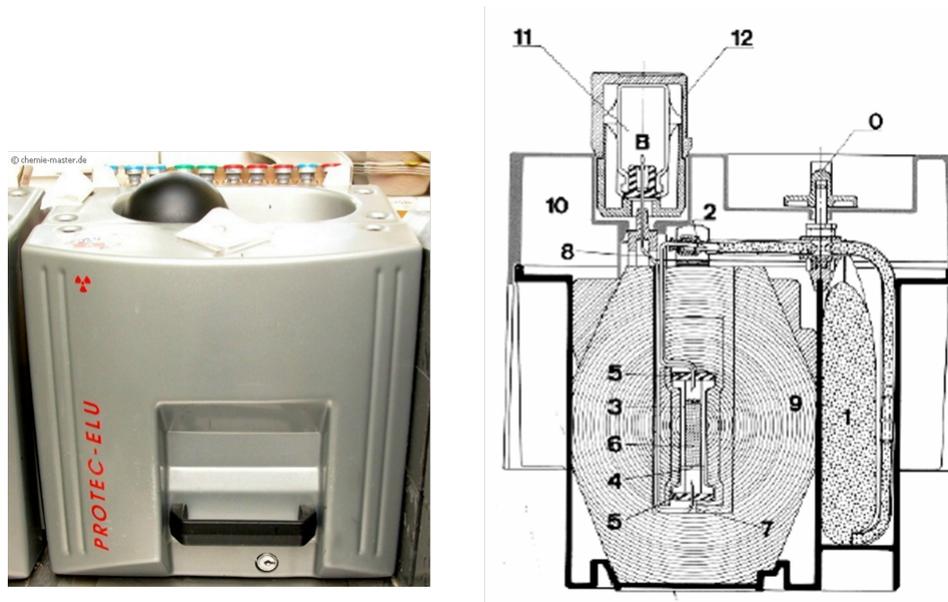


FIG. I.10 – Générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Elumatic-III, CisBio International) et schéma de principe. 0) robinet de sécurité; 1) poche contenant une solution saline stérile; 2) aiguille; 3) colonne en verre; 4) filtre; 5) capsules métalliques; 6) alumine; 7)-8) aiguille; 9) enceinte plombée; 10) habillage; 11) flacon de solution bactériostatique; 12) conteneur du flacon.

Le rhénium ($Z = 75$) a été découvert en 1925 par Tacke, Noddack et Berg. Il appartient à la même colonne de la classification périodique que le technétium. Il a pendant longtemps été utilisé uniquement pour ses propriétés en catalyse [Herrmann 95]. Il possède deux isotopes naturels, ^{185}Re (37,4%) et ^{187}Re (62,6%), et deux isotopes radioactifs émetteurs β^- , ^{186}Re et ^{188}Re (Tab. I.4). Ces derniers sont utilisables en radiothérapie mais peuvent également être imagés en temps réel grâce à leur émission γ . L'isotope 188 est produit dans un générateur portable $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ alors que le rhénium 186 est obtenu dans un réacteur nucléaire à partir du ^{185}Re . La distance moyenne parcourue par la particule β^- dans les tissus est de 5 mm pour le ^{186}Re et de 11 mm pour le ^{188}Re . Le premier est donc plus adapté au traitement des petites tumeurs alors que le second sera utilisé pour des masses tumorales plus importantes. Leurs périodes sont compatibles avec des applications de radiothérapie (90,6 h pour ^{186}Re et 17,0 h pour ^{188}Re).

Les chimies du rhénium et du technétium sont très similaires, en particulier pour l'état d'oxydation +V [Dilworth 98, Schwochau 00]. En effet, le phénomène de contraction des orbitales f des lanthanides assure des propriétés voisines aux complexes de ces deux éléments (rayons ionique et atomique, *etc.*)(Tab. I.5). Toutefois, des différences importantes existent, en particulier sur les potentiels d'oxydo-réduction et les cinétiques d'échange des ligands. Ainsi, le technétium est plus facile à réduire que le rhénium et ce dernier présente

généralement des cinétiques de complexation plus lentes. Cette relative facilité d'oxydation du rhénium entraîne la formation *in vivo* de l'espèce ReO_4^- . La stabilité de cet ion perrhénate conduit à une élimination rénale du radiomarquage sous forme anionique.

TAB. I.5 – *Caractéristiques du rhénium et du technétium.*

propriétés	Tc	Re
numéro atomique	43	75
configuration électronique	$[\text{Kr}]4d^55s^2$	$[\text{Xe}]4f^{14}5d^56s^2$
rayon métallique (Å)	1,36	1,37
énergie de première ionisation (eV)	7,28	7,87
$E_0(\text{V}) \text{MO}_4^-/\text{M}$	+ 0,48	+ 0,37
$E_0(\text{V}) \text{MO}_2/\text{M}$	+ 0,28	+ 0,26
$E_0(\text{V}) \text{MO}_4^-/\text{MO}_2$	+ 0,74	+ 0,55

Par ailleurs, la plus grande inertie cinétique à l'échange de ligands du rhénium par rapport au technétium peut conduire à la formation de produits différents sur le plan chimique ou stéréochimique. En effet, un autre aspect important de la chimie de ces éléments est l'isomérisme géométrique lié au positionnement du cœur métallique et à l'arrangement spatial des atomes coordinants, notamment les azotes impliquant leur doublet libre dans la coordination [Liu 99]. Dans les complexes de géométrie pyramidale à base carrée ou octaédrique, on rencontre souvent des diastéréomères dus à l'orientation *syn* et *anti* des substituants du cœur métallique (Fig. I.11).

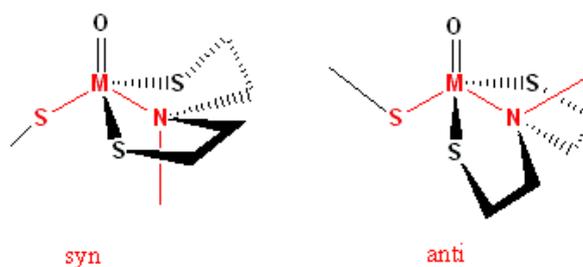


FIG. I.11 – *Diastéréomères syn et anti d'un cœur TcO_3^+ ou ReO_3^+ coordonné par le motif de complexation NS_2+S .*

La lipophilie des complexes de rhénium et de technétium peut également être différente et entraîner des variations de biodistribution pour les radiopharmaceutiques correspondants.

I.1.2.b Cœurs de technétium et de rhénium

Le technétium possède neuf degrés d'oxydation de -I à +VII. En solution aqueuse, le diagramme potentiel-pH du technétium montre que seuls les degrés d'oxydation +VII,

+IV voire +III sont stables en présence d'eau. Les autres degrés d'oxydation ne sont stabilisés que par des ligands hétéroatomiques différents de H_2O [Comet 98]. A potentiel d'oxydoréduction élevé, la forme stable est l'ion pertechnétate TcO_4^- . Quand le potentiel diminue, c'est le degré +IV qui devient prépondérant. La zone de prépondérance de Tc(III), en milieu acide, est très limitée. Enfin, à faible potentiel, c'est le Tc métallique (0) qui est stable. Au pH physiologique ($\text{pH} = 7,4$), c'est la forme pertechnétate qui est la plus stable. Les complexes technétiés injectés *in vivo* doivent donc être stables, sans quoi c'est la biodistribution de TcO_4^- qui est observée.

La chimie du technétium est dominée par la formation de complexes métal-donneurs. Les groupements donneurs les plus couramment rencontrés sont les amines, les amides, les hydrazines, les thiols, les phosphines, les oximes et les isonitriles. Le contrôle de l'état d'oxydation du technétium et de la stabilité du complexe formé peuvent être difficiles à cause de sa chimie d'oxydoréduction très riche. Mais cette richesse est aussi un atout, puisqu'elle offre la possibilité de modifier la structure et les propriétés des complexes par le choix du système chélatant et de l'état d'oxydation du cœur métallique (Fig. I.12). Les degrés +I, +III et +V sont les plus stables et les plus accessibles dans la forme complexée.

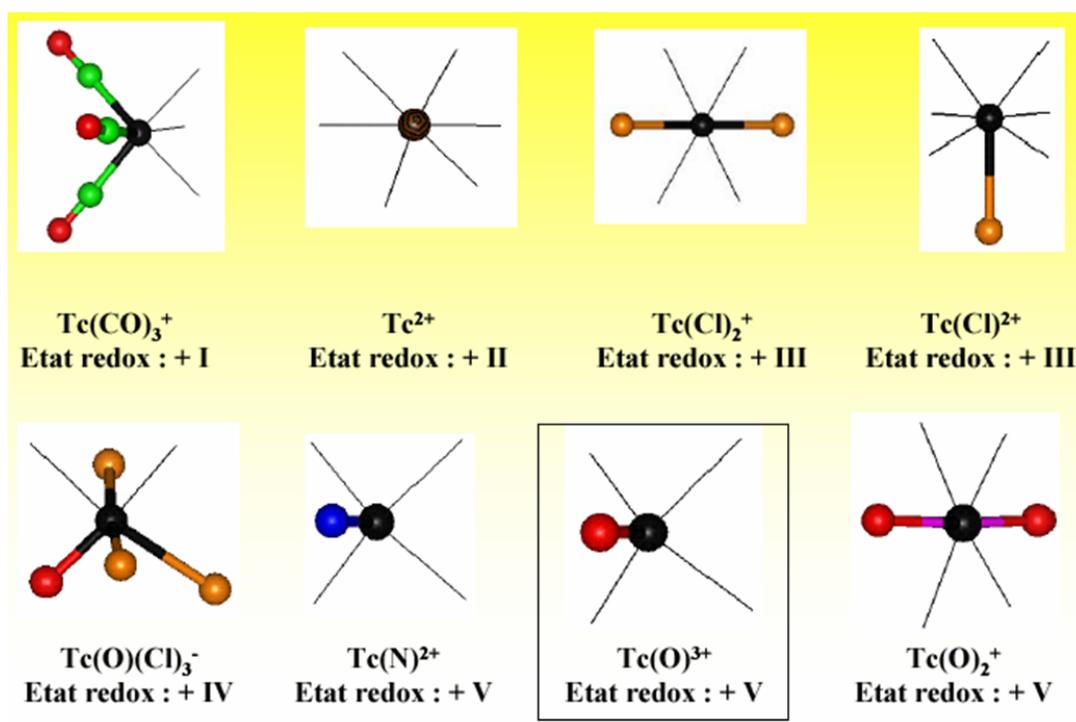


FIG. I.12 – Principaux cœurs de technétium

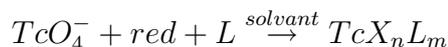
Le cœur métallique détermine en partie la structure du complexe et le choix des atomes donneurs. Nous avons choisi d'utiliser le degré d'oxydation +V. En effet, cet état d'oxydoréduction est le plus utilisé aujourd'hui pour le marquage des radiopharmaceutiques : il est bien connu et a été largement décrit. A ce degré d'oxydation, les complexes comprennent

en général un ou deux atomes d'oxygène (ou d'azote) directement liés au technétium, formant le cœur, et quatre sites de coordination pour les autres ligands. Les principaux cœurs sont l'oxotechnétium (TcO^{3+}), le dioxotechnétium (TcO_2^+) et le nitrurotechnétium (TcN^{2+}). Les géométries observées sont de type pyramide ou bipyramide à base carrée.

La chimie du rhénium est elle aussi caractérisée par l'existence d'un grand nombre de degrés d'oxydation facilement accessibles. Le degré d'oxydation +VII est le plus stable en milieu aqueux sous forme d'un anion perrhénate. Les hauts degrés d'oxydation sont, comme pour le technétium, stabilisés par la coordination de ligands π -donneurs forts très électronégatifs. On retrouve les mêmes cœurs de degré +V que pour le technétium.

I.1.3 Motifs de complexation des cœurs de technétium (+V) et de rhénium (+V)

La seule forme commerciale du ^{99m}Tc est le pertechnétate TcO_4^- . La synthèse des complexes technétiés peut être réalisée selon diverses méthodes. La méthode directe consiste à réduire le pertechnétate en présence du ligand L (avec X = O, N, Cl, CO selon le cœur) :



Pour observer une réduction totale et la complexation, il faut maintenir les rapports $[\text{red}]/[\text{TcO}_4^-]$ et $[\text{L}]/[\text{TcO}_4^-]$ élevés. Le solvant est l'eau quand le ligand est hydrophile, ou un mélange alcool/eau quand il est plus lipophile. Divers réducteurs peuvent être utilisés : l'étain stanneux (SnCl_2 en milieu acide ou *Sn-tartrate* en milieu basique), le borohydrure de sodium (NaBH_4), le dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), l'hydrate d'hydrazine ($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Les ligands, quand ils sont réducteurs, peuvent aussi être utilisés à cet effet, tels les phosphines, phosphites, thiols et arsines (R_3P , $(\text{RO})_3\text{P}$, $\text{R}-\text{SH}$, R_3As).

La méthode indirecte consiste à synthétiser un complexe de faible stabilité, puis à faire un échange de ligand par transchélation :



Cette technique est utilisée pour la synthèse de complexes stables dont la cinétique de formation est lente. Elle permet ainsi d'éviter la réaction plus rapide de l'eau avec le pertechnétate et la précipitation de TcO_2 .

La charge des complexes dépend de leur pKa, de la charge du cœur et, éventuellement, du pH de la solution dans le cas des complexes susceptibles de conduire à un équilibre acide-base. Les ligands durs stabilisent les formes acides dures du métal, donc les degrés

d'oxydation élevés, tandis que les ligands mous complexent les degrés inférieurs. Les ligands π -accepteurs stabilisent les bas degrés d'oxydation alors que les ligands π -donneurs (ou sans effet π) favorisent la complexation des degrés supérieurs.

Nous donnons ici quelques exemples de motifs de complexation du degré +V couramment utilisés.

I.1.3.a Complexation par le motif HYNIC

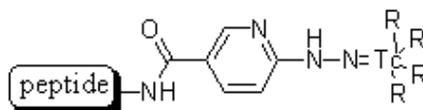


FIG. I.13 – Structure du cœur ^{99m}Tc -HYNIC-peptide

Le cœur Tc-HYNIC (hydrazino nicotinamide) a été décrit pour la première fois par l'équipe d'Abrams pour le marquage d'anticorps [Abrams 90] (Fig. I.13). Depuis, ce motif a été largement utilisé sur des peptides, comme par exemple des analogues de la somatostatine [Decristoforo 99], des liposomes [Laverman 99], des oligonucléotides [Shen 07], *etc.* L'HYNIC présente une fonction acide à l'une de ses extrémités qui peut être conjuguée à diverses amines primaires de vecteurs biologiques. Une fonction hydrazine située à l'autre extrémité se complexe au technétium pour donner un cœur diazotechnetium. Les propriétés du complexe formé dépendent en partie des co-ligands qui complètent le motif de complexation. Parmi les ligands utilisés, on trouve par exemple la tricine, le glucoheptonate, l'acide éthylène diamine diacétique (EDDA) ou des phosphines [Liu 99, Jurisson 99]. Le choix de ces co-ligands est délicat car ils permettent d'influencer la biodistribution et la pharmacocinétique des radiopharmaceutiques mais peuvent aussi inhiber la reconnaissance de la cible [Liu 08, Liu 05]. Le degré d'oxydation de ce motif n'est pas clairement établi même s'il semble être +V quand la tricine est utilisée comme co-ligand. Des géométries pyramidales à base carrée ou octaédriques peuvent être obtenues. De nombreux exemples en stratégie BFCA ont validé ce motif de complexation qui permet un marquage rapide et offre des points de modification permettant de faire varier l'hydrophilie ou la pharmacocinétique des traceurs. Decristoforo *et al.* ont par exemple utilisé cette approche pour marquer un cyclopentapeptide, le c(RGDfK), afin d'imager l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ par le ^{99m}Tc [EDDA/HYNIC-c(RGDfK)] [Decristoforo 06] (Fig. I.14). Des dimères et des tetramères du c(RGDfK) ont également été marqués via le motif HYNIC et des études de biodistribution ont permis de sélectionner les meilleurs coligands dans chaque cas [Jia 06, Liu 08].

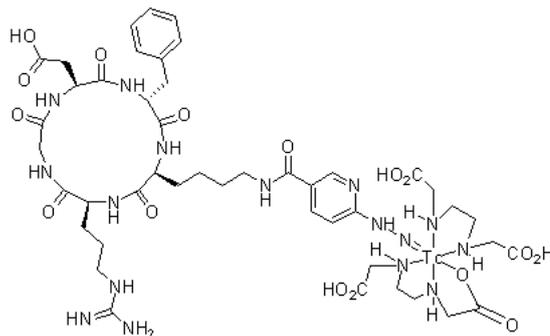
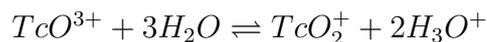


FIG. I.14 – Structure du $^{99m}\text{Tc|EDDA/HYNIC-c(RGDfK)}$

I.1.3.b Complexation du cœur TcO_2^+

Le cœur trans-dioxotechnétium TcO_2^+ se forme essentiellement en milieu basique et conduit à des complexes de géométrie octaédrique. Il est la base conjuguée du groupe monoxotechnétium :



Il est favorisé par des ligands π -accepteurs de type phosphines, arsines ou pyridines et par des structures sans effet π , bidentées (diamines) ou tétradentées (cyclam, tétraamine) (Fig. I.15). Les deux oxygènes sont en position *trans* avec une liaison $\text{Tc}=\text{O}$ plus longue que dans le cœur TcO^{3+} (1,75 Å et 1,65 Å respectivement). Tous les dérivés à cœur trans dioxotechnétium sont hexacoordinés. Ce cœur a été principalement utilisé pour marquer des biomolécules ou de petits peptides dans une approche BFCA [Liu 99].

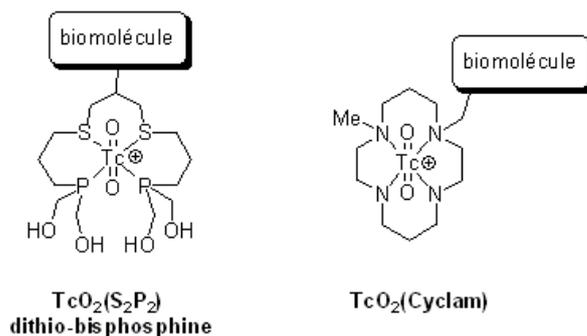


FIG. I.15 – Exemples de coordination du cœur TcO_2^+

I.1.3.c Complexation du cœur TcO^{3+}

Le cœur monoxotechnétium TcO^{3+} est le plus fréquemment utilisé pour le marquage au technétium. Il se forme facilement lors de la réduction du pertechnétate en milieu

aqueux légèrement acide. Il conduit à des complexes de géométrie pyramidale à base carrée. La liaison $Tc=O$ (1,65 Å) est relativement courte car il y a un important recouvrement des orbitales d du métal et p de l'oxygène. Le cœur est stabilisé par des ligands π -donneurs forts (O, S, N, P, Cl). Ainsi, les ligands bis(aminodithiols) ou bis(amidodithiols) donnent des complexes relativement inertes. En effet, le recouvrement entre les orbitales du métal et celles du soufre, sous forme thiol ou thiolate, est optimal. Le plus souvent, le motif chélatant est du type $N_xS_{(4-x)}$. Ce motif peut être porté par un ligand tétradentate (du type MAG3) ou sous forme de combinaisons "2 + 2", par exemple NS + NS [Hom 97, Barda 04], ou encore "3 + 1" telles que $NS_2 + S$ (Fig. I.16). Cette dernière approche a récemment été développée au laboratoire pour la cyclisation de ligands par complexation du rhénium ou du technétium ainsi que pour l'assemblage combinatoire de 2 chimiothèques de molécules indépendantes présentant, respectivement, chacune des deux parties du motif de complexation [Clavaud 06a, Clavaud 06b, Clavaud 06c, Clavaud 08].

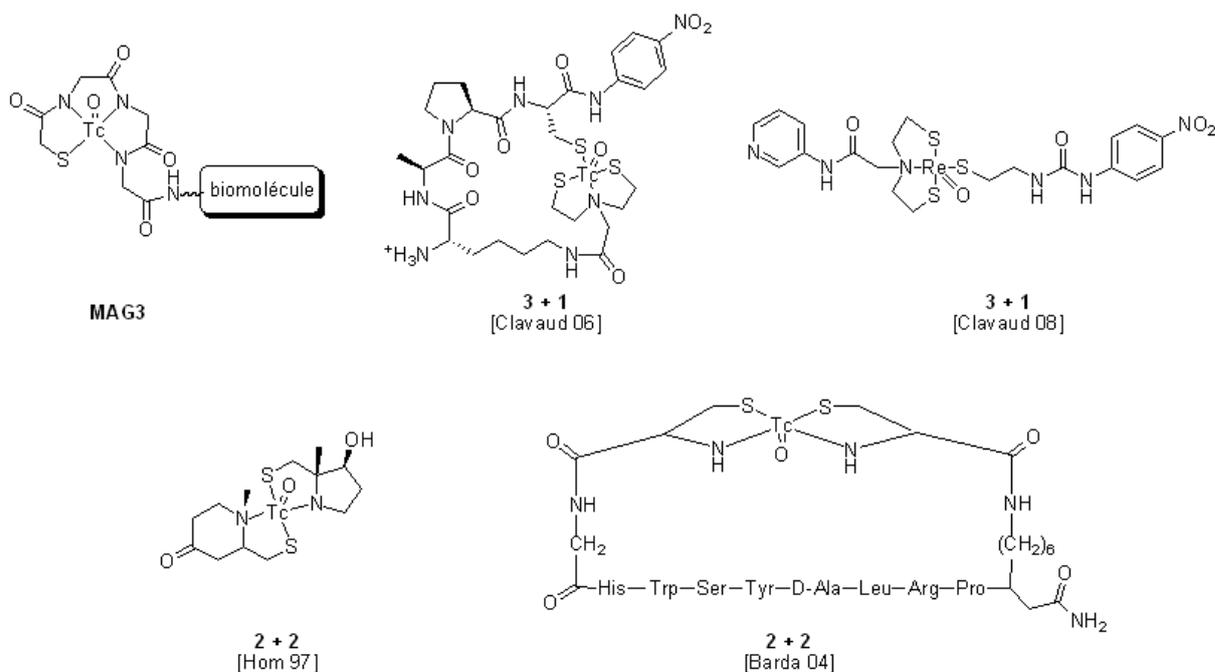


FIG. I.16 – Exemples de coordination du cœur TcO^{3+}

Résumé

Les métallostructures sont très représentées dans le domaine de la médecine nucléaire. Que ce soit pour des agents thérapeutiques ou d'imagerie, l'introduction d'un métal radioactif dans une structure peptidique a donné des produits couramment utilisés en milieu hospitalier. Pourtant, il reste des efforts à fournir pour disposer de traceurs toujours plus sensibles et spécifiques des cibles visées. Parmi les métaux d'intérêt, le technétium-99m

est aujourd'hui le plus utilisé dans les hôpitaux en raison de sa facilité d'utilisation et de sa disponibilité. Le rhénium, qui présente un grand nombre de similitudes avec le technétium, peut être utilisé en radiothérapie sous ses formes $^{186/188}\text{Re}$ et en recherche sous sa forme stable, de même que le ^{99g}Tc . Parmi les états d'oxydation courants de ces métaux, le degré +V a été largement utilisé. Nous avons choisi d'utiliser de ce cœur pour développer de nouveaux metallopeptides utilisables en imagerie moléculaire. Parmi les motifs de complexation pouvant complexer le cœur TcO^{3+} , le motif NS_2+S nous a paru offrir le plus de potentialités, que ce soit pour former des complexes cycliques ou pour développer de nouveaux complexes bimoléculaires.

Suite à des travaux préliminaires menés au laboratoire sur la cyclophiline A, que nous exposerons de manière plus détaillée dans la suite de ce manuscrit, nous avons cherché à démontrer l'utilité de notre stratégie en amorçant la mise au point de metallopeptides pour l'imagerie moléculaire du développement tumoral. En effet, pour répondre au problème majeur de santé publique qu'est le cancer, il faut pouvoir disposer d'outils d'imagerie efficaces, permettant la détection précoce des tumeurs mais aussi leur caractérisation biochimique. Des approches d'imagerie moléculaire sont attendues par les cliniciens pour leur permettre de déterminer l'éligibilité des patients pour des thérapies ciblées et pour suivre l'efficacité de ces traitements. En particulier, des avancées ont été réalisées dans le développement de médicaments anti-angiogéniques, c'est-à-dire empêchant la création de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires à l'alimentation et au développement de la tumeur. Parmi les cibles potentielles impliquées dans la néoangiogenèse tumorale, nous nous sommes intéressés aux intégrines et avons cherché à développer de nouveaux radio-traceurs ciblant cette famille de protéines membranaires.

I.2 Cancer, angiogenèse et intégrines

I.2.1 Cancer

I.2.1.a Etat des lieux

En 2002, 278 000 nouveaux cas de cancers et 150 000 décès ont été dénombrés en France. Les taux d'incidences varient suivant le type de cancer mais, globalement, ils ont augmenté entre 1980 et 2000 de 23% chez les hommes et de 20% chez les femmes [Rapport 07]. Le perfectionnement des méthodes diagnostiques et la systématisation du dépistage expliquent en partie cette augmentation.

La principale cause de cancer reste aujourd'hui le tabac avec 33,5% des décès par cancer chez l'homme et 10% chez la femme. L'alcool est responsable d'environ 9% des décès par cancer chez l'homme et 3% chez la femme. Ainsi, à eux deux, tabac et alcool sont responsables de plus de 28% des décès par cancer en France pour les deux sexes confondus. L'excès de poids et le manque d'activité physique causent environ 2% des cancers chez l'homme et 5,5% chez la femme. Quant aux expositions professionnelles, elles sont à l'origine de 3,7% des cancers chez l'homme et de 0,5% chez la femme. La pollution de l'eau, de l'air et de l'alimentation, ainsi que les traitements hormonaux et l'exposition au soleil, sont chacun à l'origine d'environ 0,5 à 2% des cancers. La cancérogénicité de nombreux agents physiques, chimiques ou biologiques fait l'objet de controverses et est difficile à évaluer. La combinaison de plusieurs agents cancérogènes peut être un facteur aggravant alors qu'avec une exposition à un agent unique, le risque est moins élevé. Par ailleurs, des cancers peuvent survenir sans cause exogène apparente. Ils sont alors dus à des erreurs lors de la réplication de l'ADN, à des infections virales ou bactériennes souvent silencieuses, ou encore à des facteurs héréditaires.

Chez les femmes, le cancer du sein reste le plus fréquent et sa mortalité diminue lentement en France (-1% par an) comparé à l'Espagne, à la Grande-Bretagne ou aux Etats-Unis (-2% par an ou davantage). Une amélioration des techniques diagnostiques est donc indispensable pour une détection plus précoce et une meilleure prise en charge. Le cancer du col de l'utérus, qui était autrefois la première cause de mortalité des femmes par cancer en France, a vu sa mortalité diminuer drastiquement notamment grâce au dépistage. De même, l'incidence et la mortalité du cancer de l'estomac ont été divisées par cinq en France depuis 1950, reflétant une meilleure hygiène alimentaire. Le cancer de la prostate a vu son incidence augmenter depuis la fin des années 80 mais, dans le même temps, sa mortalité a été réduite, sans doute grâce à l'introduction du dosage de PSA (Prostate Specific Antigen), permettant un diagnostic plus précoce. Le cancer colo-rectal est, sur l'ensemble de la population française, le cancer qui cause le plus de décès après celui du poumon. Pourtant, sa mortalité diminue grâce à un diagnostic plus précoce et à des traitements plus efficaces.

Au vu de ces données, on comprend aisément que des outils diagnostiques performants permettant une détection précoce des cancers sont des gages de survie notable quand des traitements pour ces pathologies sont disponibles. Les efforts de recherche doivent donc se concentrer à la fois sur la prévention et sur la mise au point de nouveaux agents thérapeutiques, mais aussi sur la mise à disposition d'outils diagnostiques toujours plus sensibles et précis.

I.2.1.b Cancérogenèse

Le cancer se définit par une prolifération anormale des cellules d'un organe ou d'un tissu et par leur capacité à métastaser à distance du foyer primitif. Ces cellules échappent au contrôle des mécanismes normaux de régulation et de différenciation. Le développement d'un cancer comprend généralement quatre grandes étapes (Fig. I.17) :

- *la carcinogénèse* : c'est la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale. Cette étape est aussi appelée tumorigénèse.
- *le désordre monoclonal* : c'est la prolifération incontrôlée de la cellule devenue cancéreuse.
- *l'angiogénèse* : afin de permettre l'extension locale de la tumeur, de nouveaux vaisseaux sanguins sont créés pour l'alimenter en oxygène et en nutriments.
- *l'invasion* : l'invasion à distance ou métastatique suit l'invasion régionale ou ganglionnaire.

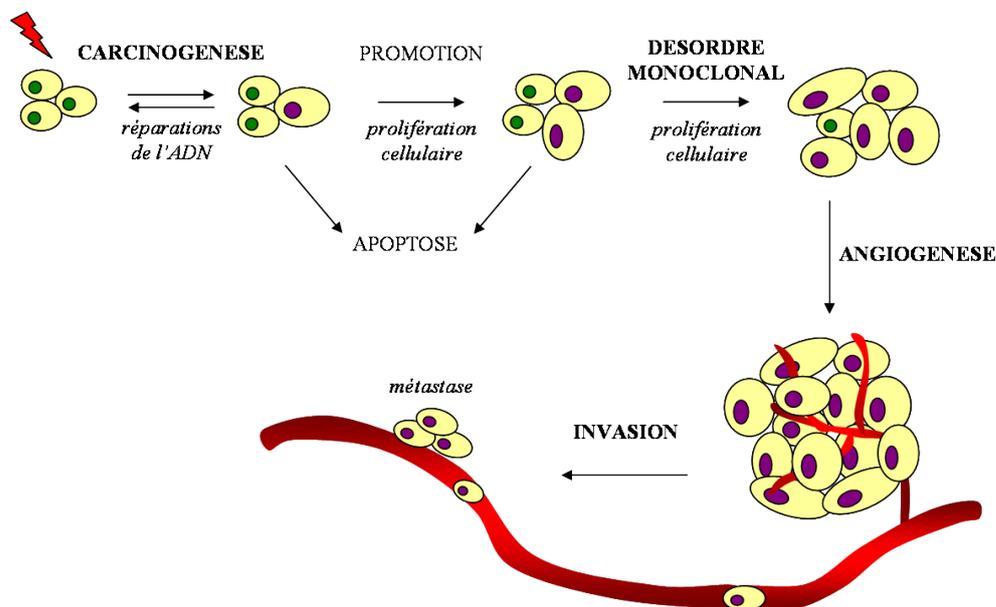
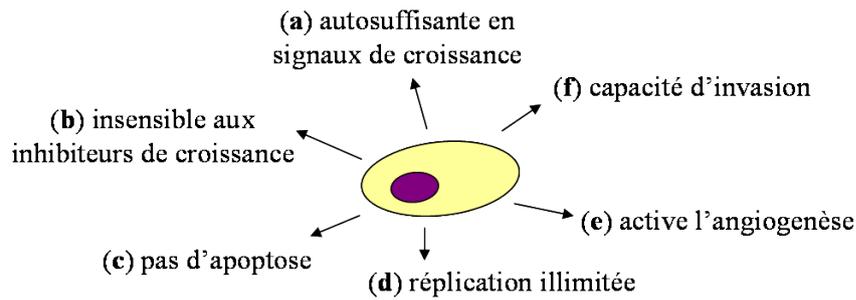


FIG. I.17 – Les étapes du développement d'un cancer.

Hanahan et Weinberg ont décrit les propriétés essentielles conférant un caractère malin aux cellules tumorales (Fig. I.18) [Hanahan 00] :

FIG. I.18 – *Propriétés des cellules tumorales.*

(a) Elles présentent une autosuffisance en signaux de stimulation de la croissance cellulaire. Dans le cas des cellules normales, le passage de l'état quiescent à l'état prolifératif est gouverné par un ensemble de signaux de croissance mitogènes issus de voies de signalisation paracrines ou endocrines. Au contraire, les cellules cancéreuses autogènèrent leurs propres signaux de croissance qui peuvent être renforcés par des signaux issus du stroma tumoral.

(b) Elles deviennent insensibles aux inhibiteurs de la croissance cellulaire.

(c) Les cellules tumorales sécrètent des facteurs de survie et inactivent les récepteurs des signaux de mort cellulaire, leur permettant d'échapper à l'apoptose.

(d) Ces cellules possèdent une capacité de division illimitée par l'activation des mécanismes de conservation des télomères, leur permettant ainsi d'échapper à la mort par sénescence.

(e) Lorsque la tumeur dépasse 1 ou 2 mm³, les cellules cancéreuses émettent des signaux permettant le développement d'un nouveau réseau vasculaire autour de la tumeur : c'est la néo-angiogenèse. Nous reviendrons en détail sur ce phénomène par la suite.

(f) Enfin, les cellules tumorales présentent une capacité exceptionnelle d'invasion des tissus à distance du foyer primaire. Cette capacité métastatique est due d'une part à la modification ou à la perte des glycoprotéines de surface de ces cellules et, d'autre part, à une surexpression anormale de molécules d'adhésion cellule-tissu interstitiel. Elles libèrent également des enzymes permettant la dissolution de la membrane basale et du tissu interstitiel, ce qui facilite leur migration.

I.2.1.c Outils de diagnostic du cancer

De nos jours, le diagnostic des cancers est principalement réalisé par des techniques d'imagerie traditionnelles et des analyses de prélèvements faits chez le malade. Ceux-ci sont essentiellement sanguins, urinaires et tissulaires (prélèvements lors de biopsies ou d'opérations). Dans certains types de cancers, il est possible de détecter dans les urines ou le sang des traceurs circulants caractéristiques (Tab. I.6). Ils sont normalement présents en faibles quantités chez le sujet sain et leurs taux deviennent anormalement élevés en

cas de cancer [Duffy 01, Lai 03]. Parmi ces marqueurs, on trouve des protéines onco-fœtales (ACE, AFP), des hormones (HCG, thyrocalcitonine, corticostimuline - ACTH, calcitonine, vasopressine - ADH), des enzymes (phosphatases acides prostatiques, autres phosphatases alcalines, lactate-deshydrogenase, NSE) ou encore des antigènes associés aux tumeurs (CA 125, CA 15.3, CA 19.9, *etc.*). Le dépistage du cancer de la prostate repose par exemple sur ce principe, avec le dosage du PSA (prostate specific antigen). Notons que la détection de certains marqueurs circulants peut être tardive et limiter son intérêt diagnostique. Elle reste toutefois intéressante pour le suivi de la maladie. Quand la tumeur a été localisée, une biopsie peut être réalisée permettant ainsi l'examen histologique du tissu et l'établissement du diagnostic.

TAB. I.6 – *Principaux marqueurs tumoraux sériques.*

Tumeur	Marqueur principal	Marqueur associé
sein	CA 15.3	ACE
pancréas	CA 19.9	ACE
colon	ACE	CA 19.9
estomac	CA 72.4	CA 19.9
foie	AFP	ACE
testicule	β HCG ou AFP	-
prostate	PSA	-
poumon	NSE	ACE
ovaire	CA 125	CA 72.4

ACE : antigène carcino-embryonnaire, *AFP* : alpha fœto protéine, *CA* : carcino antigen, *NSE* : neuron-specific enolase, *PSA* : prostate specific antigen, *β HGC* : hormone gonadotrope placentaire.

L'imagerie médicale permet d'étudier *in situ* et *in vivo* la physiologie des organismes, sans en perturber les équilibres. Les techniques d'imagerie non invasives reposent sur l'acquisition d'images pertinentes permettant de rendre compte du fonctionnement de certains organes. Certaines techniques d'imagerie n'utilisent pas de traceurs. Ce sont alors les propriétés de l'objet à visualiser qui sont utilisées, comme c'est le cas en IRM ou en échographie. Les autres techniques d'imagerie font appel à un traceur (élément radioactif ou isotope stable, sonde optique, *etc.*). Certaines de ces techniques peuvent être utilisées en tomographie, donnant des images bi- ou tridimensionnelles (IRM, scanner rayons X, TEP, TEMP). Les techniques d'imagerie couramment utilisées pour le diagnostic des cancers sont décrites ci-dessous [Weissleder 08].

Endoscopie

Cette technique invasive permet d'explorer les organes creux (coloscopie, fibroscopie bronchique) et de procéder à des prélèvements.

Echographie

Cette technique non-irradiante fait appel aux ultrasons et s'applique aux organes pleins. Elle repose sur la capacité des ultrasons à être réfléchis de manière différente suivant les tissus, leurs échos étant ensuite convertis en images. Sa résolution dépend de la fréquence de la sonde : plus la fréquence est élevée, plus l'image est précise, mais l'ultrason est alors rapidement amorti et ne permet plus d'examiner les structures profondes. La résolution est maximale pour l'examen de structures superficielles (artères, veines) et peut être améliorée avec des agents de contraste (microbulles). Cet examen est cependant impossible pour les organes mous. De faible coût, cette technique dépend beaucoup de l'opérateur et peut être difficile chez les patients atteints d'obésité.

IRM (imagerie par résonance magnétique)

Cette technique non-irradiante utilise les propriétés magnétiques intrinsèques du corps humain. Elle repose sur l'étude des protons placés dans un champ magnétique et soumis à une impulsion radiofréquence. L'imagerie par résonance magnétique permet d'imager les organes riches en eau comme le cerveau, la moëlle épinière ou osseuse. Elle apporte des informations morphologiques et fonctionnelles avec une résolution infra-millimétrique, mais présente l'inconvénient d'avoir une faible spécificité. Les efforts actuels de recherche sont concentrés sur la mise au point de nouveaux agents de contraste fonctionnalisés. Cette technique permet de mettre en évidence des tumeurs peu accessibles comme des métastases de la colonne vertébrale et de la moëlle épinière.

Radiographie

Cette technique, utilisant les rayons X, permet de distinguer des anomalies au niveau des os, du crâne et des poumons. Associée à l'absorption de produits opacifiants, elle peut être appliquée aux organes creux. Utilisée en tomographie, la radiographie permet d'établir des images en coupe avec une épaisseur de l'ordre du centimètre. En tomodensitométrie (ou scanner), des images selon différents plans sont réalisées pour chaque coupe (1 à 10 mm) et permettent de caractériser la taille des tumeurs ou métastases avec une résolution de l'ordre de 0,5 à 1 mm. Cette méthode fournit uniquement des informations morphologiques.

Techniques d'imagerie nucléaire

Déjà détaillées en I.1.1.b, ces méthodes très sensibles utilisent des images produites après l'administration d'une faible quantité de composé radioactif, par détection de la radiation provenant du corps du patient. Les radiopharmaceutiques peuvent être "ciblants" et servir au traitement *in situ* par radiations. La scintigraphie est principalement utilisée pour les os, la thyroïde, les reins, les poumons ou le cerveau. Les améliorations techniques permettent aujourd'hui d'obtenir des images tridimensionnelles ou de réaliser de l'image-

rie fonctionnelle.

Outre ces techniques d'imagerie couramment utilisées pour le diagnostic du cancer, d'autres méthodes sont en cours de développement [Weissleder 08]. C'est le cas de l'imagerie optique, mais dont l'utilisation reste pour l'instant limitée à cause de sa faible capacité d'analyse en profondeur (inférieure au mm). Les imageries infra-rouge (IR) et proche IR consistent en l'étude de l'absorbance par les tissus de rayonnements dont la longueur d'onde est comprise entre 600 et 2400 nm. L'imagerie par fluorescence ou bioluminescence met à profit des sondes vectrices couplées à la GFP (green fluorescent protein) ou à une activité enzymatique comme la luciférase, mais présente une profondeur de champ faible.

Quelle que soit la technique de détection, les approches d'imagerie moléculaire se développent de plus en plus. Elles mettent en œuvre des vecteurs moléculaires qui reconnaissent des phénomènes spécifiques du cancer. Ces vecteurs sont marqués aussi bien par des radioisotopes que par des sondes détectables par fluorescence, par rayons X, par ultrasons, *etc.*

I.2.2 Angiogenèse

La néoangiogenèse tumorale est l'une des voies actuelles de recherche pour le diagnostic et le traitement des tumeurs solides. Cibler la néoangiogenèse permet, en imagerie, de faire un diagnostic plus précoce (tumeur visible à partir de 1 mm³, bien avant une détection par palpation) et d'évaluer la pathologie afin d'ajuster les traitements. En thérapie, les stratégies anti-angiogéniques permettent de limiter la progression tumorale et la dissémination métastatique.

I.2.2.a Angiogenèse normale

L'angiogenèse est un processus naturel par lequel de nouveaux capillaires sanguins sont formés à partir d'un réseau préexistant. Elle se produit normalement chez l'embryon, lors de la formation de l'arbre vasculaire primaire et, chez l'adulte, lors du cycle ovarien et dans des processus physiologiques de réparation (cicatrisation). L'angiogenèse normale est un processus très ordonné qui se déroule sous le contrôle de nombreuses régulations.

Les vaisseaux sanguins sont constitués de cellules endothéliales qui forment une monocouche délimitant la lumière où circule le sang (Fig. I.19). Ces cellules sont entourées d'une membrane basale et de la matrice extracellulaire contenant des cellules musculaires lisses. La néoangiogenèse physiologique débute par une différenciation de cellules endothéliales, suite à une activation par divers facteurs de croissance. La matrice extracellulaire est localement dégradée par des métalloprotéases, dégageant ainsi un espace où vont migrer les cellules (Fig. I.20). Cette dégradation entraîne localement la sécrétion de nouveaux facteurs de croissance tels le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou le FGF

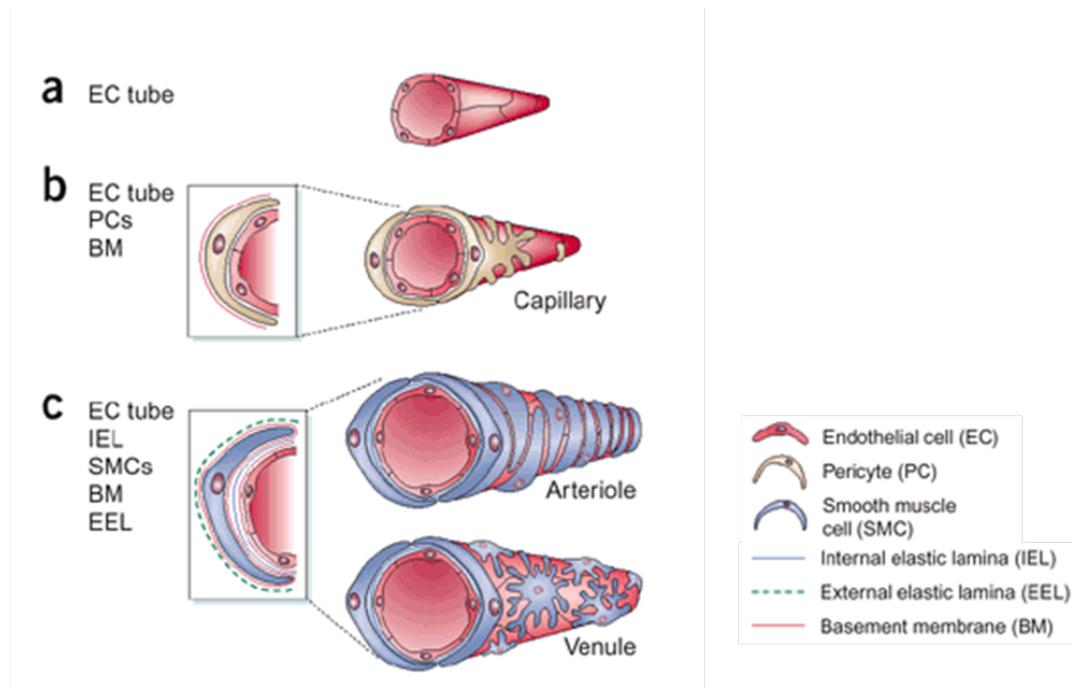


FIG. I.19 – Représentation de la structure d'un vaisseau sanguin [Jain 03].

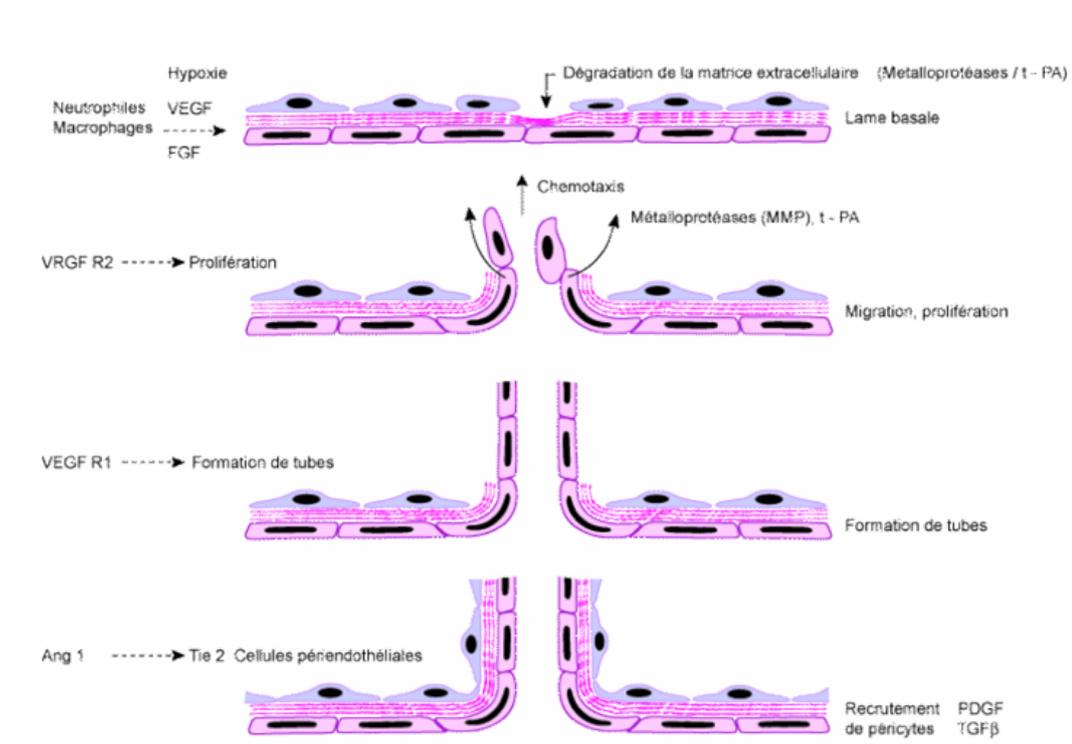


FIG. I.20 – Représentation du processus de l'angiogénèse physiologique [Jain 03].

(Fibroblast Growth Factor). Le premier augmente la perméabilité des vaisseaux sanguins, facilitant la migration cellulaire et le second stimule la prolifération des cellules. Enfin, les cellules endothéliales s'organisent pour former un réseau adjacent et développent une membrane basale et une matrice extracellulaire.

Durant ce processus, la membrane basale produit plusieurs protéines d'adhésion, comme par exemple le facteur de von Willbrand, la fibronectine ou la fibrine. Parallèlement, les vaisseaux sanguins impliqués expriment divers marqueurs parmi lesquels on trouve les intégrines.

La régulation de l'angiogenèse est contrôlée par plusieurs facteurs endogènes [Papetti 02, Carmeliet 00]. Parmi les régulateurs positifs, on trouve entre autres le VEGF, le FGF et le TNF- α (tumor necrosis factor) et pour les régulateurs négatifs, on trouve l'angiotensine ou la thrombospondine.

I.2.2.b Néoangiogenèse tumorale

La néovascularisation se produit également lors de processus pathologiques (Tab. I.7), en particulier lors du développement des tumeurs cancéreuses.

TAB. I.7 – *Pathologies impliquant la néoangiogenèse [Carmeliet 00, Carmeliet 03].*

Organe	Pathologie
divers	cancers, maladies infectieuses, maladies auto-immunes
intestins	ascites, inflammations
os, articulations	arthrite
peau	psoriasis, allergies, sarcome de Kaposi
poumons	asthme
système reproductif	hyperstimulation ovarienne, endométriose
tissus adipeux	obésité
vaisseaux sanguins	malformations vasculaires, athérosclérose
yeux	rétinopathies diabétiques

Quand une tumeur atteint environ 1 à 2 mm³, sa croissance se poursuit à condition qu'un réseau sanguin se forme autour d'elle (Fig.I.21, **A**). En effet, au delà de cette taille, les processus de diffusion passive ne sont plus suffisants pour alimenter la masse tumorale en oxygène et nutriments, ainsi que pour l'élimination de ses déchets. Aux premiers temps de leur développement, les cellules cancéreuses dégradent et remodelent localement la matrice extracellulaire permettant une prolifération anarchique. Leur surnombre conduit à une situation d'hypoxie (manque d'oxygène) qui induit la sécrétion de divers facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF, PDGF platelet-derived growth factor) et de transcription (HIF hypoxia-inducible factor), ainsi que l'inhibition de la sécrétion de facteurs antiangiogéniques comme la thrombospondine. Ce passage d'une tumeur quiescente

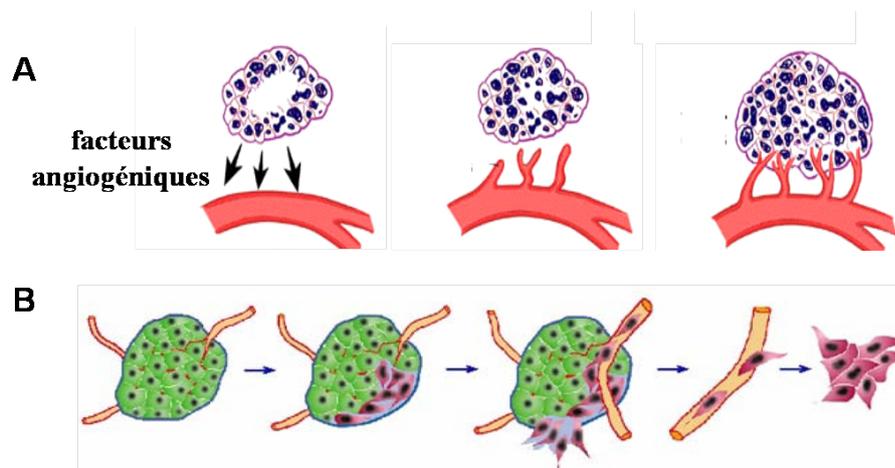


FIG. I.21 – Représentation schématique des processus d'angiogenèse tumorale (A) et de dissémination métastatique (B).

à une tumeur agressive est appelé "switch angiogénique".

Le développement des nouveaux capillaires est dirigé et régulé positivement ou négativement par un ensemble complexe de mécanismes. Le processus est assez similaire à celui de l'angiogenèse physiologique :

- *initiation de la réponse angiogénique* : les cellules endothéliales, activées suite à une situation d'hypoxie, sécrètent du VEGF et de l'angiopoïétine Ang-2, augmentant ainsi la perméabilité vasculaire et affaiblissant les jonctions intercellulaires. Il y a également perte de contact entre les péricytes et les cellules endothéliales qui peuvent alors être activées en réponse aux facteurs de croissance.

- *dégradation de la membrane basale* : le VEGF vient se fixer sur son récepteur VEGFR2 exprimé à la surface des cellules endothéliales qui entrent alors dans le cycle cellulaire. Elles synthétisent des métalloprotéases (MMP) qui dégradent localement la matrice extracellulaire. Cette dégradation permet également la libération de nouveaux facteurs de croissance solubles qui étaient retenus dans la matrice (VEGF, FGF, IGF-1 insulin-like growth factor).

- *migration et prolifération des cellules endothéliales* : une partie de leurs interactions étant affaiblies, les cellules endothéliales migrent vers la source du stimulus angiogénique. Cette migration est possible notamment grâce aux intégrines $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_V\beta_5$.

- *formation des néovaisseaux* : après leur migration et leur prolifération, les cellules endothéliales reforment les interactions leur permettant de s'organiser en structures tubulaires immatures mais suffisamment fonctionnelles. La mise en place d'une paroi cellulaire permet de stabiliser les nouveaux vaisseaux.

Le réseau sanguin résultant est structurellement et fonctionnellement anormal. Il est chaotique, en constant remodelage, avec un diamètre des vaisseaux variable et irrégulier,

ce à cause des compressions causées par les cellules tumorales adjacentes sur leurs parois immatures. Le débit sanguin y est par conséquent irrégulier, rendant difficile la distribution aussi bien des nutriments que des médicaments. Par la suite, les nouveaux vaisseaux formés peuvent favoriser la dissémination des cellules tumorales et la formation de métastases éloignées du foyer principal (Fig. I.21, **B**). C'est aussi par cette voie que passe la dissémination aux ganglions.

Il existe deux autres mécanismes de formation des néovaisseaux tumoraux plus rarement décrits. Il s'agit d'une part de l'angiogenèse intussusceptive qui fait appel à un élargissement et une séparation des vaisseaux existants et, d'autre part, la septation où les cellules endothéliales prolifèrent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés. Ces deux mécanismes interviennent certainement dans un deuxième temps, durant le remodelage du réseau sanguin tumoral.

La tumeur est donc largement dépendante de l'angiogenèse pour assurer sa survie, son développement et sa dissémination [Folkman 90]. Cette étape clé, qui survient au début de la croissance de la masse tumorale, fait l'objet de nombreuses études visant à la bloquer, afin de permettre un traitement précoce de la maladie, essentiel à une évolution favorable. Afin de contrôler l'efficacité de ces traitements, mais aussi pour caractériser les tumeurs, il est important de pouvoir disposer d'agents d'imagerie spécifiques de l'angiogenèse. Parmi les cibles caractéristiques de ce processus, les intégrines sont particulièrement intéressantes.

I.2.3 Intégrines

I.2.3.a Caractéristiques générales

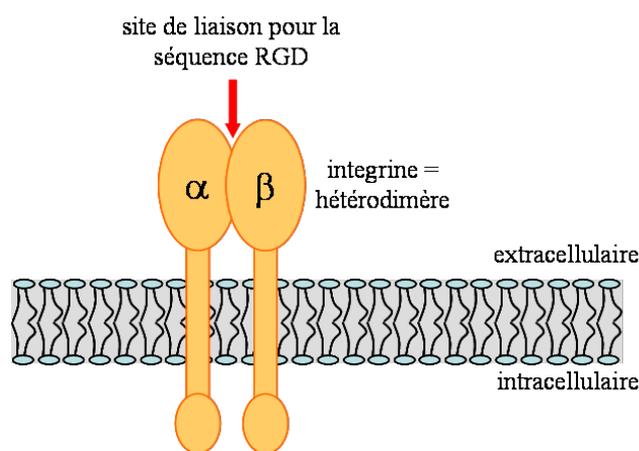


FIG. I.22 – Représentation schématique d'une intégrine.

Les intégrines sont une famille de récepteurs hétérodimériques, présentant une masse d'environ 200 à 350 kDa (Fig.I.22). Ces protéines intégrales sont normalement impliquées

dans les processus d'adhésion et de migration cellulaire par reconnaissance cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. Elles participent à l'organisation du cytosquelette et à l'activation de signaux cellulaires. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires constituées de deux sous-unités α et β présentant de longs domaines extracellulaires et de courts domaines intracellulaires peu connus. Chez les mammifères, on compte 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui se combinent pour conduire à 24 hétérodimères différents (Fig. I.23).

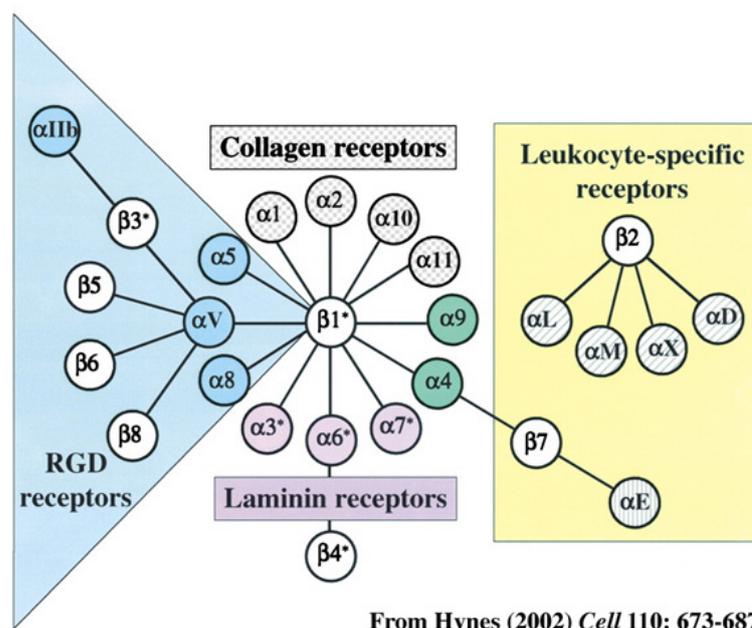


FIG. I.23 – Combinaisons connues des sous-unités α et β et types de ligands associés.

La sous-unité α compte environ 1100 résidus extracellulaires. La région N-terminale est composée de 7 répétitions d'environ 60 acides aminés, de séquences similaires, à l'exception des 3 ou 4 dernières répétitions qui contiennent des séquences de 12 à 15 résidus capables de s'associer aux cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} . Dans certaines intégrines, un module d'environ 200 résidus, désigné sous le nom de domaine α A, est inséré entre les répétitions 2 et 3 de l'extrémité N-terminale. La sous-unité β compte environ 800 résidus extracellulaires, exceptée la sous-unité de type β_4 qui en a 1750. A proximité du domaine transmembranaire de la sous-unité β se trouve une quarantaine de résidus fortement conservés, riches en cystéines. La partie N-terminale, exposée vers le milieu extracellulaire, est repliée en une large boucle. Le domaine transmembranaire des deux sous-unités est composé de 20 à 30 résidus hydrophobes. Les domaines cytoplasmiques, d'environ 50 résidus chacun, contiennent les extrémités C-terminales qui n'ont pas d'activité enzymatique intrinsèque mais qui peuvent, par exemple, s'associer avec les filaments d'actine.

I.2.3.b Expression et ligands

Les profils d'expression en intégrines des cellules varient selon le type cellulaire et changent suivant le stade de développement cellulaire et selon les conditions physiologiques. En particulier, les intégrines sont fortement exprimées sur les fibroblastes, les plaquettes, les cellules tumorales et les cellules endothéliales néoformées pour lesquelles l'expression est à la fois basale et apicale, l'intégrine pouvant par conséquent se trouver en contact avec le milieu circulant. Plusieurs types d'intégrines sont souvent présents sur une même cellule, mais elles peuvent avoir des ligands communs. La plupart des intégrines lie plusieurs ligands comme indiqué dans le tableau I.8 [Humphries 06]. L'interaction entre le ligand et l'intégrine dépend principalement de quatre facteurs [Arnaout 02] :

- la composition des sous-unités de l'intégrine et, en particulier, la présence ou non d'un domaine αA sur la chaîne α du récepteur [Humphries 00],
- la présence sur le ligand de séquences reconnues par un type d'intégrine [Ploew 00],
- la formation d'un complexe ternaire avec des cations divalents (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}),
- la transition vers une conformation active de l'intégrine [Hynes 02a].

Parmi les intégrines, huit reconnaissent une séquence peptidique structurée RGD (Arginine-Glycine-acide Aspartique), présente notamment dans la fibronectine, la vibronectine, le facteur de Willebrand, le fibrinogène, le collagène, la laminine et la thrombospondine. La reconnaissance de cette séquence est conditionnée par sa structure qui varie selon les ligands en fonction des peptides adjacents de la triade RGD (Fig. I.24). A titre d'exemple, on peut citer le peptide ACDCRGDCFCG, identifié par criblage d'une banque de peptides exprimés par des phages comme ligand de $\alpha_V\beta_5$ et $\alpha_V\beta_3$. Il se présente sous deux formes cyclisées par les cystéines. Le peptide avec les ponts disulfures 1-4 et 2-3 a une activité de liaison des intégrines $\alpha_V\beta_5$ et $\alpha_V\beta_3$ ($K_d \sim 100$ nM) alors que celui en 1-3 et 2-4 est 10 fois moins efficace [Assa-Munt 01]. L'analyse de la structure en solution par RMN a montré que le motif RGD est présenté de façon très différente dans ces deux isomères (Fig. I.24).

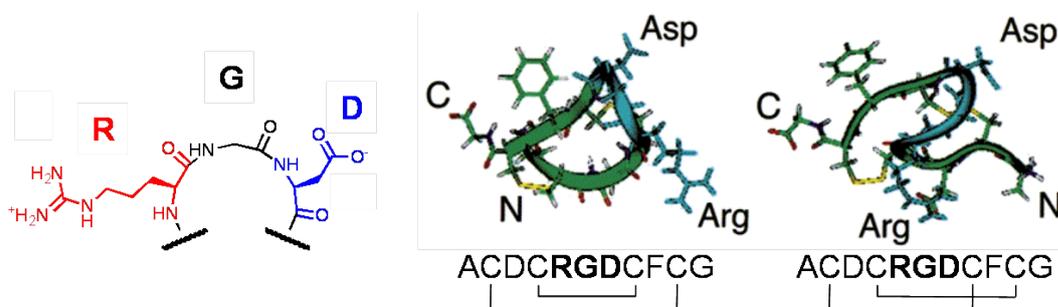


FIG. I.24 – Représentation des structures RMN des deux isomères de ACDCRGDCFCG [Assa-Munt 01].

TAB. I.8 – Séquences (RGD ou LDV) et ligands reconnus par les 24 intégrines humaines (d'après [Humphries 06]).

Intégrine	Séquence reconnue		Ligands																				
	RGD	LDV	BSP	COL	FAX	FBL	FB	FBN	iC3b	LAM	LAP	MGF	OSP	TEN	TSP	VTN	vWF	Ecad	ICAM	MAdCAM	PECAM	VCAM	
$\alpha_1\beta_1$				x						x													
$\alpha_2\beta_1$				x						x					x								
$\alpha_3\beta_1$										x					x								
$\alpha_4\beta_1$		x						x					x		x					x		x	
$\alpha_5\beta_1$	x							x					x										
$\alpha_6\beta_1$										x													
$\alpha_7\beta_1$										x													
$\alpha_8\beta_1$	x							x					x	x		x							
$\alpha_9\beta_1$		x											x	x									x
$\alpha_{10}\beta_1$				x						x													
$\alpha_{11}\beta_1$				x																			
$\alpha_V\beta_1$	x							x		x		x											
$\alpha_V\beta_3$	x		x			x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x					x	
$\alpha_V\beta_5$	x		x								x	x				x							
$\alpha_V\beta_6$	x							x		x		x											
$\alpha_V\beta_8$	x									x													
$\alpha_{IIb}\beta_3$	x						x	x							x	x	x						
$\alpha_6\beta_4$										x													
$\alpha_4\beta_7$		x						x					x							x		x	
$\alpha_E\beta_7$		x																x					
$\alpha_L\beta_2$		x																		x			
$\alpha_M\beta_2$		x			x		x	x												x			
$\alpha_X\beta_2$		x			x		x	x												x			
$\alpha_D\beta_2$		x																		x			x

BSP bone sialoprotein, *COL* collagène, *FAX* coagulation factor X, *FBL* fibrilline, *FB* fibrinogène, *FBN* fibronectine, *iC3b* inactivated component of complement 3b, *LAM* laminine, *LAP* pour LAP-TGF- β latency associated peptide transforming growth factor β , *MGF* pour MGF-E8 (milk fat globule EGF factor 8) et *Del 1* (developmental endothelial locus-1), *OSP* ostéopontine, *TEN* tenascin, *TSP* thrombospondine, *VTN* vitronectine, *vWF* von Willebrand factor, *Ecad* E-cadhérine, *ICAM* intercellular cell adhesion molecule, *MAdCAM* mucosal addressin cell adhesion molecule, *PECAM* platelet endothelial cell adhesion molecule, *VCAM* vascular cell adhesion molecule.

I.2.3.c Rôles des intégrines

Les intégrines modulent divers processus : croissance, mort, migration et invasion cellulaire. Elles permettent principalement l'adhésion cellule/substrat en se liant aux protéines de la matrice extracellulaire. En particulier, elles assurent les interactions entre les microfilaments d'actine du cytosquelette des cellules endothéliales et certains composants spécifiques de la matrice extracellulaire. De façon moindre, elles sont impliquées dans l'adhésion cellule/cellule en se couplant à d'autres récepteurs cellulaires de surface, elles jouent alors un rôle dans l'agrégation plaquettaire et dans les fonctions immunitaires. Enfin, elles sont impliquées dans la transduction des signaux entre la matrice extracellulaire et l'intérieur de la cellule ; ce sont des complexes de signalisation. La communication est alors assurée de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur ou inversement, par des signaux mécaniques ou chimiques. Cette signalisation permet entre autres la régulation de l'entrée dans le cycle cellulaire, de l'apoptose, du pH intracellulaire, de la migration et de la force d'adhésion [Rust 02]. Les mécanismes d'activation du signal sont complexes et n'ont été que partiellement élucidés.

I.2.3.d Activation des intégrines

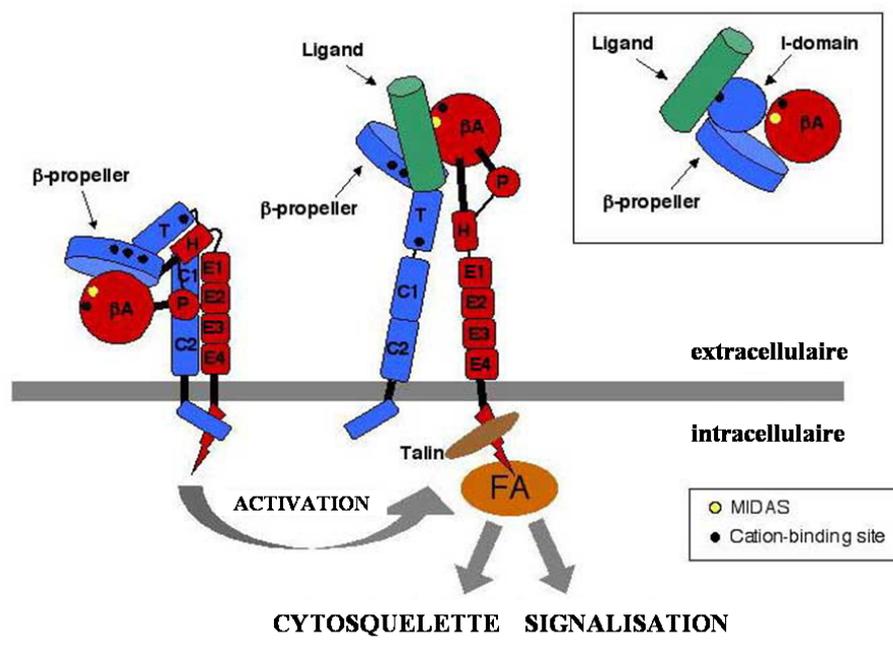


FIG. I.25 – Mécanisme d'activation des intégrines : en bleu, la sous-unité α , en rouge, la sous-unité β . (d'après http://www.chuv.ch/cpo_research/introduction.html)

Ces processus de signalisation sont liés à la nécessité d'activation des intégrines (Fig. I.25), phénomène qui les rends aptes à l'adhésion à la matrice extracellulaire. Cette ac-

tivation est réalisée en deux temps avec, tout d'abord, l'action d'un stimulus local (hormones, cytokines) ou d'une interface physique qui confère à l'intégrine un état de faible affinité pour le ligand. Ces interactions de faible affinité sont médiées par les intégrines clusterisées (I.2.3.e) [Arnaout 02]. La liaison du ligand induit ensuite un changement de conformation qui conduit à un état de haute affinité, notamment par l'éloignement des deux parties intracellulaires de l'hétérodimère. L'intégrine est alors active et peut se lier au cytosquelette ou permettre la transmission de signaux. Les intégrines doivent parfois être désactivées pour éviter une adhésion cellule-matrice extracellulaire inopportune, sans quoi des risques d'inflammation ou de thrombose permanents sont encourus. En revanche, les cellules cancéreuses perdent ce pouvoir de régulation.

I.2.3.e Clusterisation des intégrines

Les intégrines présentent des extrémités cytoplasmiques généralement courtes qui sont dédiées à l'activation de processus enzymatiques [Giancotti 99]. La transduction des signaux est réalisée par l'association de ces extrémités avec des protéines adaptatives qui connectent l'intégrine au cytosquelette, aux kinases et aux récepteurs transmembranaires des facteurs de croissance. L'occupation des intégrines par leur ligand ainsi que leur clustering semblent nécessaires pour obtenir une réponse cellulaire complète à ces signaux. Le clustering correspond au regroupement des récepteurs dans un espace restreint de la membrane.

Les intégrines ont tendance à se clusteriser et à interagir avec le cytosquelette lorsqu'elles sont liées à leur ligand, et ce d'autant plus lorsque celui-ci est présenté de façon multivalente, comme cela a été mis à profit dans la conception de traceurs multimériques (cf. paragraphe I.2.7.b). De plus, des mutations du domaine cytoplasmique des intégrines, impliqué dans leur diffusion dans la membrane, ont conduit à une altération de l'adhésion et de l'étalement cellulaire. Ces résultats tendent à montrer que le clustering est nécessaire pour engager des interactions entre les intégrines et le cytosquelette et permettre ainsi la migration cellulaire [Maheshwari 00]. Toutefois, le rôle du clustering des intégrines n'est pas encore entièrement élucidé [Minami 07].

I.2.3.f Phénomène d'internalisation

Lors de la migration cellulaire, après le détachement des cellules de la matrice, les intégrines peuvent diffuser à la surface de la cellule ou subir une endocytose et être recyclées dans la membrane cellulaire. Les processus d'internalisation et de recyclage n'ont pas été clairement établis [Castel 01]. Par ailleurs, l'internalisation de ces récepteurs permet de faire entrer certains de leurs ligands dans la cellule. Ainsi, $\alpha_V\beta_5$ participe à l'internalisation de la vitronectine à partir de la matrice extracellulaire. D'autre part, des études ont montré que l'internalisation de divers antagonistes des intégrines peut survenir, soit de

façon passive, soit de façon dépendante des intégrines regroupées en cluster [Castel 01]. Le mode d'internalisation semble dépendre du nombre et/ou de la taille des ligands puisque de petits peptides comme le c[RGDf(N-Me)V] sont internalisés de façon passive alors que l'internalisation d'anticorps ou de multimères de la séquence RGD dépend de la présence d'intégrines [Boturyn 04]. La détermination du mode d'internalisation des antagonistes des intégrines est importante pour élucider leur mode d'action. De plus, elle doit être prise en compte pour la conception de traceurs qui devront éventuellement affronter un milieu intracellulaire réducteur.

I.2.4 Intégrines et pathologies

Différentes pathologies humaines sont causées par des variations d'expression des intégrines [Wehrle-Haller 03], à titre d'exemples, on peut citer :

- *le déficit d'adhésion des leucocytes (LAD-A : leucocyte adhesion deficiency type 1)*. Cette altération récessive autosomale du système immunitaire se traduit par des infections récurrentes menaçant le pronostic vital. Elle est causée par une absence ou des mutations des intégrines de type β_2 ;
- *la thrombasthénie de Glanzmann*. De multiples défauts génétiques (délétions, mutations) de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ empêchent la liaison avec le fibrinogène et la fibrine. Il en résulte un dysfonctionnement des plaquettes (aucune tendance à l'agglutination) qui se traduit par l'augmentation des temps de saignement ;
- *l'Epidermolysis bullosa (épidermolyse bulleuse)*. Dans cette maladie, les sous-unités α_6 et β_4 ne peuvent pas être exprimées sous la forme d'un hétérodimère fonctionnel. Le lien entre la membrane basale et la couche basale des kératinocytes est alors rompu, se traduisant par l'apparition de cloques sur l'épiderme ;
- *les cancers*. Diverses intégrines, en particulier $\alpha_V\beta_3$, sont impliquées dans l'angiogénèse tumorale. Leur action angiogénique peut être liée à une surexpression mais aussi à l'absence de certaines intégrines.

Les intégrines contribuent à la progression cancéreuse et sont impliquées dans l'angiogénèse tumorale. Elles participent à la survie cellulaire, à la prolifération et à la migration des cellules endothéliales. Elles stimulent notamment les mécanismes de résistance à la mort cellulaire (apoptose) et agissent en coopération avec les récepteurs des facteurs de croissance pour induire la prolifération. Les modifications des profils d'expression des intégrines peuvent fortement influencer la progression des tumeurs malignes. Les intégrines ont en général un rôle différent selon le type cellulaire, mais on peut considérer que $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_V\beta_1$ ralentissent la progression tumorale alors que $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_6$ et $\alpha_6\beta_4$ la favorisent.

Les intégrines sont également impliquées dans la formation de métastases [Cleardin 98]. Celles-ci se forment à l'issue d'une "cascade métastatique" qui commence avec le déta-

chement d'une cellule tumorale et une infiltration active dans le stroma environnant où l'entrée dans le système vasculaire et lymphatique est possible (le stroma est le tissu conjonctif formant la charpente d'un organe ou d'une tumeur). L'invasion est facilitée grâce aux intégrines qui ont une action coordonnée avec les MMP pour la dégradation partielle de la matrice extracellulaire, permettant ainsi la migration des cellules vers le système sanguin et l'intravasation (*i.e.* l'entrée dans le vaisseau sanguin). Au niveau du site métastatique, les intégrines favorisent l'extravasation (*i.e.* la sortie du vaisseau sanguin) des cellules tumorales qui ne peuvent adhérer directement à la matrice subendothéliale à cause du débit sanguin. Les plaquettes, activées par les cellules tumorales, permettent cette adhésion. L'association entre les cellules tumorales et les plaquettes est médiée, soit par l'intégrine plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$, soit par l'intégrine tumorale $\alpha_V\beta_3$.

Tout au long de la progression tumorale, des signaux spécifiques sont transmis par les intégrines [Guo 04]. Ils permettent aux cellules cancéreuses de se détacher de leurs voisines. Ils réorientent leur polarité durant la migration et leur permettent de proliférer dans un environnement étranger.

TAB. I.9 – *Surexpression des intégrines en fonction des tumeurs et de leur stade de développement, déterminée par des techniques immunohistochimiques sur des cellules tumorales humaines (adapté de [Mizejewski 99]). Les intégrines reconnaissant la séquence RGD sont en rouge.*

Tissu tumoral	Tumeur primaire	Métastase
sein	-	$\alpha_1\beta_1/\alpha_6\beta_1/\alpha_V\beta_1$
colon	-	$\alpha_5\beta_1/\alpha_6\beta_4$
rein	$\alpha_3\beta_1$	$\alpha_5\beta_1$
poumons (NSCLC)	-	$\alpha_3\beta_1/\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$
mélanome	$\alpha_3\beta_1/\alpha_4\beta_1/\alpha_V\beta_3$	$\alpha_1\beta_1/\alpha_2\beta_1/\alpha_5\beta_1/\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}/\alpha_V\beta_3/\alpha_6\beta_4$
ovaire	$\alpha_3\beta_1$	$\alpha_3\beta_1$
peau (squameux)	$\alpha_V\beta_3$	$\alpha_2\beta_1/\alpha_3\beta_1/\alpha_6\beta_1/\alpha_6\beta_4$
cerveau (glioblastome astrocytaire)	$\alpha_V\beta_3$	$\alpha_V\beta_3$

Durant la croissance de la tumeur primaire, la structure des intégrines est modifiée (changements quantitatifs et qualitatifs), de même que leur niveau d'expression (sur- ou sous-régulation) [Mizejewski 99]. Le tableau I.9 donne un aperçu des surexpressions d'intégrines en fonction du type de tumeur et de son stade de développement. Dans ce cadre, les intégrines peuvent servir d'indicateurs thérapeutiques en tant que marqueurs de la maladie. De plus, l'expression des intégrines peut aussi être spécifique du niveau de la résistance d'une tumeur aux chimiothérapies anticancéreuses classiques. Ces corrélations pourraient permettre de choisir le traitement adapté à la pathologie du patient après avoir

établi la "signature cellulaire" de l'expression des intégrines. Dans ce contexte, l'expression spécifique des intégrines au niveau des tumeurs pourrait être déterminée par de l'imagerie non invasive qui permettrait, *a priori*, d'identifier des tumeurs particulières et d'évaluer leur réponse éventuelle à un traitement. Bien que très prometteuses, ces applications relèvent encore à l'heure actuelle du domaine de la recherche [Cristofanilli 02, Rust 02, Liu 06].

I.2.5 Intégrine $\alpha_V\beta_3$

I.2.5.a Description

L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ fut la première intégrine à être associée à l'angiogenèse tumorale. C'est un récepteur de la vitronectine qui reconnaît la séquence peptidique RGD dans de nombreuses protéines extracellulaires (fibronectine, fibrinogène, vitronectine, facteur de Willebrand, osteopontine, thrombospondine, petits peptides). Cette intégrine est exprimée à la surface de différents types de cellules comme les ostéoclastes (cellules de la moelle osseuse), les plaquettes, les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et certaines cellules tumorales.

L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ joue un rôle clé dans de nombreux processus physiologiques comme l'angiogenèse [Brooks 94a], l'apoptose et la résorption des os [Horton 97]. En particulier, elle est impliquée dans la migration des cellules endothéliales, dans l'induction de l'angiogenèse tumorale et dans le développement des métastases. Elle agit en coopération avec les récepteurs à l'EGF, au PDGF, au VEGF et à l'insuline pour promouvoir la migration cellulaire. Son rôle principal consiste au recrutement et à l'activation des MMP-2 et de la plasmine qui dégradent la membrane basale et génèrent de nouveaux sites d'adhésion nécessaires à la migration.

L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ est surexprimée sur les cellules endothéliales angiogéniques et néoformées mais pas ou très peu sur les cellules endothéliales quiescentes. Elle est également sur- ou sous-exprimée sur les cellules tumorales (Tab. I.9). En particulier, elle est surexprimée dans les cancers agressifs [Jin 04], les mélanomes métastatiques [Albeda 90, Montgomery 94] et certains glioblastomes [Gladson 91]. L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ peut servir de facteur pronostique pour les tumeurs solides comme cela a été démontré à plusieurs reprises pour des mélanomes, des cancers du sein [Gasparini 98] et le cancer du colon [Vonlaufen 01].

I.2.5.b Structure de $\alpha_V\beta_3$

En 2001, la structure cristalline des fragments extracellulaires de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ a été résolue (Fig. I.26 A) et, en 2002, la structure cristalline des domaines extracellulaires liés à un ligand RGD a également été obtenue [Xiong 02, Xiong 01].

La résolution de la structure du co-cristal entre $\alpha_V\beta_3$ et le c[RGDf-(NMe)V] (Cilengitide) en présence d'ions Mn^{2+} a permis d'identifier les interactions entre le cyclopeptide et l'intégrine (Fig. I.26 B). Il est apparu que huit cations Mn^{2+} interviennent dans le co-cristal alors que seulement six sont nécessaires pour l'intégrine seule. Les deux cations supplémentaires sont coordonnés à l'interface entre le ligand et le domaine βA de la sous-unité β (Fig. I.26 C, D). L'association du ligand à l'intégrine se fait sur les deux sous-unités. L'arginine interagit avec la chaîne α_V , l'acide aspartique avec la chaîne β_3 et la glycine est à l'interface entre les deux chaînes, servant d'espaceur et donnant des contacts hydrophobes avec α_V . Le site de reconnaissance du ligand est relativement confiné ($\sim 350 \text{ \AA}^2$).

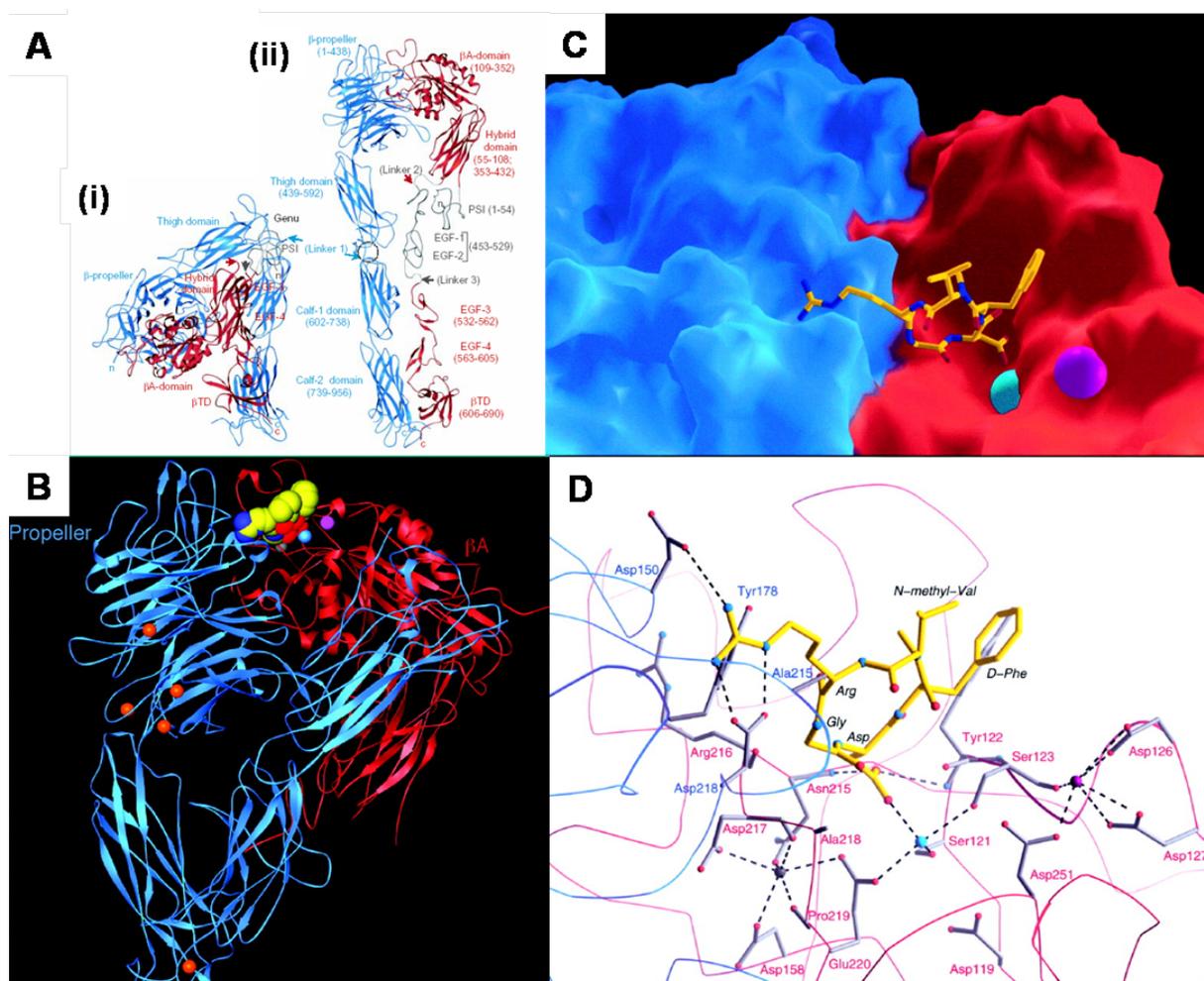


FIG. I.26 – (A) Structure cristalline des segments extracellulaires de $\alpha_V\beta_3$ (i) et modélisation de la forme activée (ii) [Xiong 01]. (B) Structure cristalline de $\alpha_V\beta_3$ -RGD-Mn et site de liaison ligand-intégrine (C, D) [Xiong 02]. Les sous-unités α_V et β_3 apparaissent respectivement en bleu et rouge et le ligand c(RGDf-NMeV) en jaune. Les ions Mn^{2+} sont représentés en orange ($\times 5$) et en gris ($\times 1$), cyan ($\times 1$) et magenta ($\times 1$) au niveau du site de liaison.

I.2.5.c Antagonistes de $\alpha_V\beta_3$

Des petits peptides, comme le Cilengitide, ou des anticorps humanisés, telle la Vitaxine, sont actuellement en cours de tests cliniques en tant qu'antagonistes pour leur effet thérapeutique dans les cancers humains. Pendant longtemps, l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ a été considérée comme un régulateur positif de l'angiogenèse car il a été montré de façon récurrente que l'action d'antagonistes supprime l'angiogenèse pathologique. Pourtant, son rôle est en fait plus complexe et encore mal compris, puisque des tests sur des souris knock-out ont montré que si α_V n'est pas exprimé, il y a mort *in utero* ou quelques jours après la naissance, alors que si β_3 est absent, les souris sont viables et fertiles [Eliceiri 01]. La sous-unité α_V est donc essentielle dans l'angiogenèse. Par contre, des délétions de β_3 ont montré que, en l'absence de cette sous-unité, la sensibilité des cellules endothéliales au VEGF-A augmente et que, par conséquent, la perméabilité des vaisseaux sanguins est plus grande. La sous-unité β_3 aurait donc un rôle de régulateur négatif dans l'angiogenèse [Robinson 04]. Reynolds *et al.* ont également montré que la délétion de β_3 peut conduire à une augmentation de l'angiogenèse et de la croissance tumorale [Reynolds 02]. Enfin, $\alpha_V\beta_3$ peut activer la thrombospondine ou d'autres inhibiteurs de l'angiogenèse, tels que l'endostatine ou l'angiostatine. Ainsi l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ pourrait avoir un rôle de régulateur négatif et les agents pharmacologiques testés pourraient être des agonistes de cette fonction de régulateur négatif [Hynes 02b]. Il semble donc que l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ pourrait jouer un rôle de régulateur positif ou négatif selon le substrat et le contexte cellulaire.

Les ligands de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ sont supposés avoir un impact majeur dans le traitement de plusieurs maladies humaines comme l'ostéoporose, l'arthrite rhumatoïde et le cancer. L'un des enjeux majeurs réside dans la conception de ligands affins et sélectifs de cette intégrine.

I.2.6 Traitements antiangiogéniques et antagonistes d'intégrines

I.2.6.a Lutte contre l'angiogenèse tumorale

Alors que la chimiothérapie classique cible la tumeur, la vascularisation tumorale devient une cible de plus en plus étudiée car elle n'est pas soumise aux phénomènes de résistance et de variation génétique. En effet, contrairement aux cellules tumorales, les cellules endothéliales ont un pouvoir de prolifération faible et régulé, ainsi qu'un génome stable. Le développement de traitements antiangiogéniques est particulièrement attractif puisque les cibles vasculaires sont *a priori* facilement accessibles et que, chez l'adulte, les zones angiogéniques sont essentiellement pathologiques. Contrairement aux thérapies classiques, une thérapie antiangiogénique n'a pas pour but de détruire directement la tumeur, mais d'empêcher sa croissance en bloquant l'apport en nutriments et l'élimination des métabolites toxiques. Il existe différents niveaux d'inhibition de l'angiogenèse qui

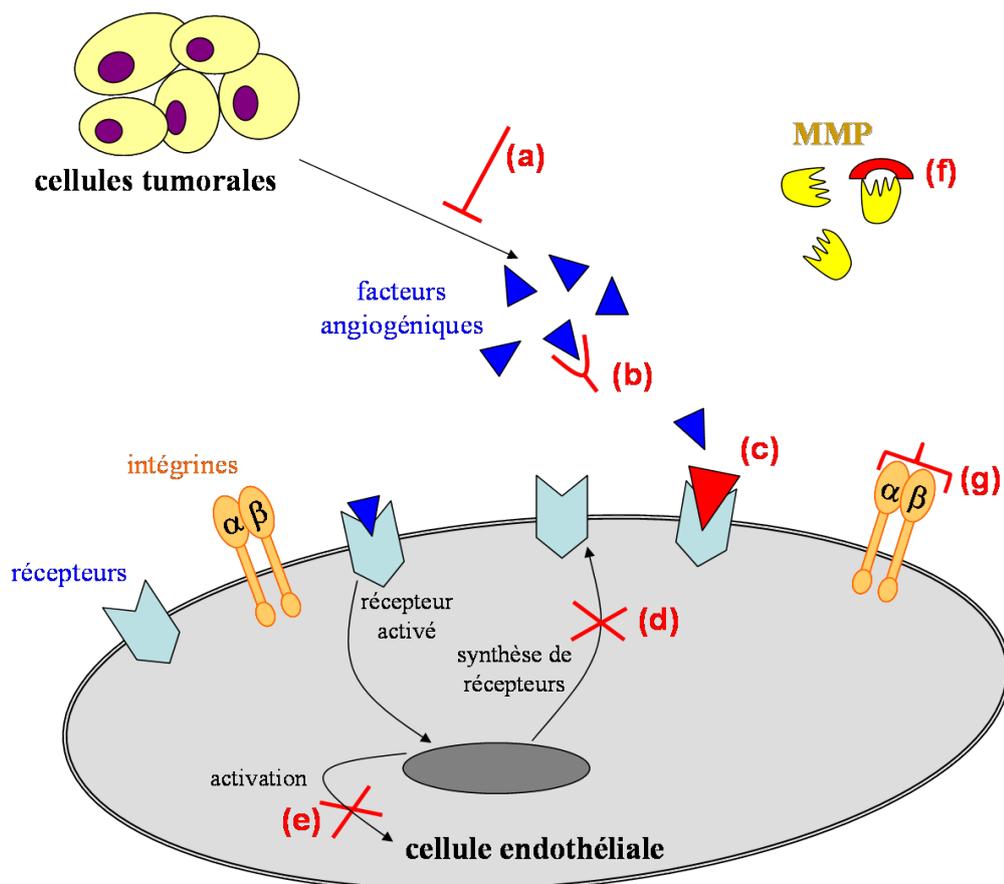


FIG. I.27 – Représentation des différents niveaux d'inhibition de l'angiogénèse tumorale (d'après [Sancey 06]).

peuvent donner lieu à des traitements (Fig. I.27) [Fox 01]. Ainsi, il est possible de limiter la formation de nouveaux vaisseaux en inhibant la synthèse des facteurs angiogéniques au niveau des cellules tumorales (a). On peut également espérer bloquer ces facteurs avec des anticorps (b) ou entrer en compétition au niveau de leurs récepteurs (c). Le signal d'activation émis par les facteurs angiogéniques peut aussi être ciblé directement au niveau de la cellule endothéliale soit en empêchant la synthèse des récepteurs (d), soit en inhibant l'activation des cellules endothéliales (e). Il est aussi possible de bloquer les métalloprotéases (f), ainsi que les intégrines (g), afin de bloquer des voies de signalisation.

Un certain nombre d'agents thérapeutiques a été accepté par la FDA pour des thérapies antiangiogéniques ; ils sont présentés dans le tableau I.10. Des molécules angiostatiques comme la thrombospondin-I, l'angiostatine ou l'endostatine sont aussi utilisées. A l'heure actuelle, plus d'une soixantaine de produits sont en cours d'évaluation clinique pour une action antiangiogénique sur divers cancers. Le tableau I.11 présente quelques exemples de ces composés. Les résultats des tests pré-cliniques de ces produits en développement

TAB. I.10 – Principales molécules anti-angiogéniques utilisées dans les thérapies antiangiogéniques.

Type de thérapie	Produit (nom commercial)	Cible visée	Cancers traités
Anticorps monoclonaux	Bevacizumab (Avastin)	anti-VEGF	mCRC, sein, poumon NSCLC
	Cetuximab (Erbix)	anti-EGFR	mCRC, tête, cou
	Panitumumab (Vectibix)	anti-EGFR	mCRC
	Trastuzumab (Herceptin)	anti-HER-2	sein
Petites molécules inhibitrices des tyrosines kinases	Erlotinib (Tarveca)	EGFR	NSCLC, pancréas
	Sorafenib (Nexavar)	VEGFR-1/2/3, PDGFR- β , Raf-1	rein, foie
	Sunitinib (Sutent)	VEGFR-1/2/3, PDGFR- β , RET	rein, GIST
Inhibiteur de mTor	Temsirolimus (Torisel)	mTOR	rein
Autres	Bortezomib (Velcade)	protéasome	myelome multiple, MCL
	Thalidomide (Thalidomid)	?	myelome multiple

GIST : gastrointestinal stroma tumor ; *MCL* : mantle cell lymphoma ; *mCRC* : metastatic colorectal cancer ; *mTOR* : mammalian target of rapamycin ; *NSCLC* : non small cell lung cancer.

étaient très prometteurs. Toutefois, dans les études cliniques, les réponses positives n'ont pu être montrées que dans certains cas.

Ces nouveaux traitements antiangiogéniques sont apparemment en contradiction avec les chimiothérapies et radiothérapies. En effet, les traitements antiangiogéniques ciblent l'endothélium vasculaire et visent à détruire les vaisseaux irrigant la tumeur. Au contraire, dans le cas d'une chimiothérapie, il faut amener le maximum de produit dans la tumeur, via le réseau sanguin, pour qu'il exerce son action cytotoxique. De même, en radiothérapie, les cellules cancéreuses doivent être suffisamment oxygénées pour une action efficace du traitement. En effet, l'oxygène intervient dans la cascade radicalaire permettant la création de radicaux libres, à l'origine de l'effet cytotoxique de l'irradiation. Toutefois, les études cliniques tendent à montrer que, pour les traitements antiangiogéniques, la phase

TAB. I.11 – Exemples de molécules antiangiogéniques en cours d'évaluation clinique.

composé	mécanisme	essai clinique
Bevacizumab = Avastine	anticorps monoclonal humanisé dirigé contre VEGF	phase IV : cancer colorectal phase III : cancer de la prostate, du pancréas, du sein phase II : cancer rénal, pulmonaire, Kaposi
Cilengitide c[RGDf(NMe)V]	peptide inhibiteur des intégrines $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_V\beta_5$	phase I/II : gliomes, glioblastomes mélanomes, prostate, cancers solides
Gleevec STI-571	inhibiteur de la tyrosine kinase (c-kit, BLC-ABL, PDGFR)	phase I/II : leucémies
Marimastat	inhibiteur de MMP	phase III : cancer pulmonaire, du sein, du pancréas glioblastome
Néovastat	inhibiteur de MMP, empêche la liaison du VEGF et l'activité tyrosine kinase du VEGFR	phase III : cancer pulmonaire, du rein phase II : myélome
SU11248	inhibiteur des récepteurs du VEGF et du PDGF	phase III : cancer rénal, gastrointestinal phase II : cancer pulmonaire
TNP-470	inhibiteur de l'activité endothéliale	phase III : cancer du pancréas
Vitaxine	anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine $\alpha_V\beta_3$	phase I et II : cancer solide, lymphome, prostate, myélome, mélanome

de régression du réseau tumoral est suivie par sa réorganisation et sa restructuration. La chimiothérapie ou la radiothérapie sont donc alors possibles en complément et sont rendues plus efficaces [Jain 05].

I.2.6.b Antagonistes d'intégrines

Les intégrines sont des cibles potentielles pour la thérapie antitumorale puisqu'elles interviennent à toutes les étapes de la progression du cancer. De plus, les transformations oncogéniques sont souvent accompagnées par des modifications de leur expression.

Parmi les 24 intégrines humaines connues, une dizaine peut être envisagée comme cibles pour des traitements antiangiogéniques compte tenu de leur localisation et de leur

rôle [Tucker 02]. En particulier, le ciblage d'antagonistes contre $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_V\beta_5$ est reconnu pour bloquer l'angiogenèse tumorale [Brooks 94b, Eliceiri 99].

Plusieurs inhibiteurs d'intégrines sont en cours de tests cliniques et offrent des résultats prometteurs en tant qu'antiangiogéniques, antimétastatiques et antiprolifératifs. Ce sont soit des anticorps monoclonaux dirigés contre une intégrine donnée, soit de petites molécules peptidiques. Les plus avancés sont à l'heure actuelle la Vitaxine et le Cilengitide, des antagonistes de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.

La Vitaxine est un anticorps monoclonal anti- $\alpha_V\beta_3$, forme humanisée du LM609. Il est actuellement en cours de tests cliniques de phase II pour divers cancers. Il ne présente pas ou peu d'effets secondaires et n'a pas d'impact sur la vasculature saine [Tucker 02, Gutheil 00]. Il a démontré son efficacité sur des modèles expérimentaux en bloquant la croissance tumorale et l'angiogenèse [Brooks 94a, Brooks 95]. Toutefois, son efficacité chez l'homme n'est pas démontrée. En effet, dans une étude sur 14 patients, Gutheil *et al.* n'ont observé une réponse partielle que chez un patient et une maladie stable pour sept autres. Dans une autre étude menée sur 15 patients atteints de leïmoysarcomes avancés, aucune réponse n'a été observée [Patel 01]. Il faudrait pourvoir déterminer le taux d'expression de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ chez les patients, par de l'imagerie par exemple, pour déterminer s'ils sont éligibles pour ce type de traitement et, ainsi, trancher sur l'efficacité de cet anticorps. Le développement de nouveaux outils d'imagerie moléculaire ciblant $\alpha_V\beta_3$ fait actuellement l'objet d'études par de nombreuses équipes de recherche. Nous reviendrons en détail sur cet aspect dans le paragraphe suivant (I.2.7).

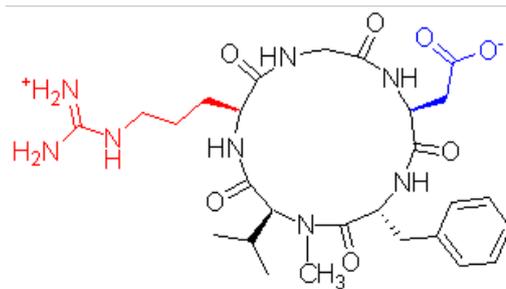


FIG. I.28 – Structure du Cilengitide $c[RGDf(N-Me)V]$.

De nombreux efforts de recherche ont par ailleurs abouti au développement d'un cyclopentapeptide prometteur pour le traitement de l'angiogenèse. Le Cilengitide (EMD-121974 ou EMD-85189), $c[RGDf(N-Me)V]$ (Fig.I.28), est un antagoniste sélectif des intégrines $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_V\beta_5$, développé par Merck [Haubner 96a, Dechantsreiter 99, Goodman 02, Smith 03]. Cette molécule cible les cellules endothéliales en prolifération. Sa séquence RGD est reconnue par $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_V\beta_5$, exprimées à la surface de ces cellules. Dans l'étude de phase I, aucune DLT (dose limiting toxicity) n'a été observée pour les tumeurs solides

[Eskens 03]. Cette molécule a été testée en phase II chez des patients atteints de glioblastomes et a donné des résultats encourageants en termes de réduction de tumeur, de délais avant récurrence et de survie globale. Des essais de phase III sont prévus chez des patients présentant un glioblastome nouvellement diagnostiqué et des essais de phase II sont en cours pour d'autres indications.

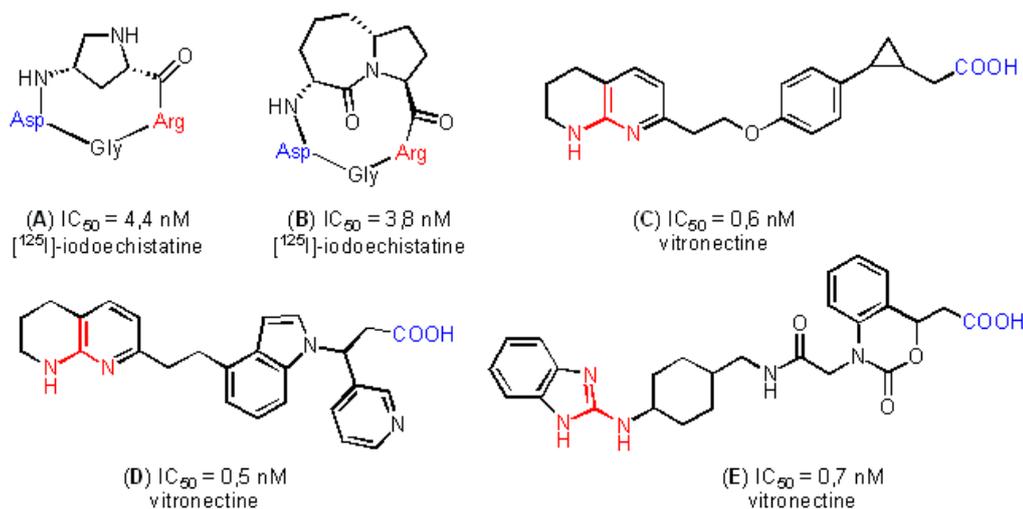


FIG. I.29 – Antagonistes cycliques ou linéaires de $\alpha_V\beta_3$ et leur IC_{50} déterminée par un test de liaison sur l'intégrine purifiée, par déplacement de l' ^{125}I -echistatine ou de la vitronectine. (A) [Zanardi 08], (B) [Belvisi 06], (C) [Nagarajan 07], (D) [Raboisson 07], (E) [Seitz 08].

D'autres peptides antagonistes d'intégrines sont actuellement en cours d'études pré-cliniques ou font l'objet de tests *in vitro*, notamment des analogues linéaires de la séquence RGD et des cycles contraints contenant cette séquence. La figure I.29 donne quelques exemples récents d'antagonistes cycliques ou linéaires de $\alpha_V\beta_3$ en cours d'étude. Cependant, aucune donnée concernant la biodisponibilité et la réelle efficacité *in vivo* de ces produits n'est disponible dans la littérature.

I.2.7 Imagerie de l'angiogénèse tumorale par ciblage des intégrines

I.2.7.a Techniques non-irradiantes

Les effets cliniques des traitements anti-angiogéniques semblent, dans la plupart des cas, être moins prometteurs qu'attendu d'après les études pré-cliniques. Toutefois, avec ce type de traitements, une régression de la taille des tumeurs ne peut pas être attendue dans les premiers temps de la thérapie puisque c'est d'abord les vaisseaux tumoraux qui sont touchés et pas directement les cellules tumorales. Les critères habituels de réponse aux

thérapies cytotoxiques, par contrôle de la taille des tumeurs, ne sont donc pas adaptés dans les premiers temps des thérapies anti-angiogéniques. Par conséquent, il peut être intéressant de disposer de techniques d'imagerie qui soient des indicateurs précoces de l'efficacité des traitements à un niveau fonctionnel ou moléculaire. Ces techniques doivent aussi être utilisables pour confirmer la présence des cibles moléculaires avant d'initier le traitement et pour étudier leur évolution. Les techniques diagnostiques du cancer décrites précédemment (cf. paragraphe I.2.1.c : IRM, ultrasons, scintigraphies) ont été appliquées à la détection de l'angiogenèse, en particulier par ciblage des intégrines, le plus souvent $\alpha_V\beta_3$ [Cai 05]. De nouvelles techniques sont également en cours d'évaluation, comme l'imagerie optique (fluorescence dans le proche IR), mais restent pour l'instant du ressort de la recherche, presque exclusivement sur le petit animal [Weissleder 08].

Ainsi, les développements de l'imagerie moléculaire ont conduit à mettre au point des agents de contraste paramagnétiques spécifiques pour obtenir des informations précises par IRM. Le ciblage de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ a été réalisé avec des anticorps monoclonaux [Anderson 00, Benedetto 06], des liposomes [Sipkins 98], ou des mimes peptidiques de RGD [Zhang 07a], liés à des agents de contraste paramagnétiques. L'intégrine a pu être visualisée *in vivo* chez l'animal et des analyses quantitatives de son expression semblent possibles. Les applications récentes de l'IRM pour l'imagerie de l'angiogenèse ont fait l'objet d'une revue par Kiessling *et al.* [Kiessling 07].

L'utilisation des ultrasons pour l'imagerie de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ est pour l'instant peu développée. Des microbulles liées à l'echistatine, une toxine de venin de serpent présentant plusieurs sites RGD, ont par exemple été employées comme agents de contraste pour l'imagerie de gliomes implantés chez des rats [Ellegala 03]. Cette technique pourrait être envisagée pour le suivi de l'efficacité des traitements anti-angiogéniques par visualisation des modifications des volumes et débits de sang dans la tumeur.

L'imagerie par fluorescence dans le proche infrarouge tend actuellement à se développer pour la détection de l'angiogenèse tumorale. Cette technique présente une sensibilité comparable aux techniques de scintigraphie puisque des quantités picomolaires de traceurs peuvent être détectées. Au niveau clinique, cette méthode pourrait être transposée pour certains organes comme le sein ou la tête ainsi que des tumeurs du cou. De plus, des applications sont envisagées en chirurgie : la délimitation des tumeurs à résecter pourrait être visualisée au cours de l'opération. Pendant longtemps, l'inconvénient majeur des techniques optiques a été leur capacité limitée à pouvoir quantifier les fluorophores. Récemment, la tomographie par fluorescence a permis de faire de l'imagerie tridimensionnelle et quantitative des fluorochromes. Von Wallbrunn *et al.* ont par exemple utilisé un peptide cyclo-RGD marqué avec la sonde fluorimétrique Cy5.5 pour l'imagerie de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. L'affinité de ce traceur est modérée ($IC_{50} = 60$ nM). Il s'accumule dans le foie et les reins mais des modifications telles que sa glycosylation ou une multimérisation

pourraient être envisagées pour améliorer ses propriétés [von Wallbrunn 07]. Cheng *et al.* ont étudié l'effet de la multimérisation sur les propriétés de Cy5.5-c(RGDyK) (Fig. I.30). Ils ont montré que les tétramères présentent une affinité de liaison supérieure à celle des monomères pour $\alpha_V\beta_3$, mais que la multimérisation n'a qu'un effet modéré *in vivo* sur l'accumulation dans la tumeur par rapport aux tissus normaux [Cheng 05].

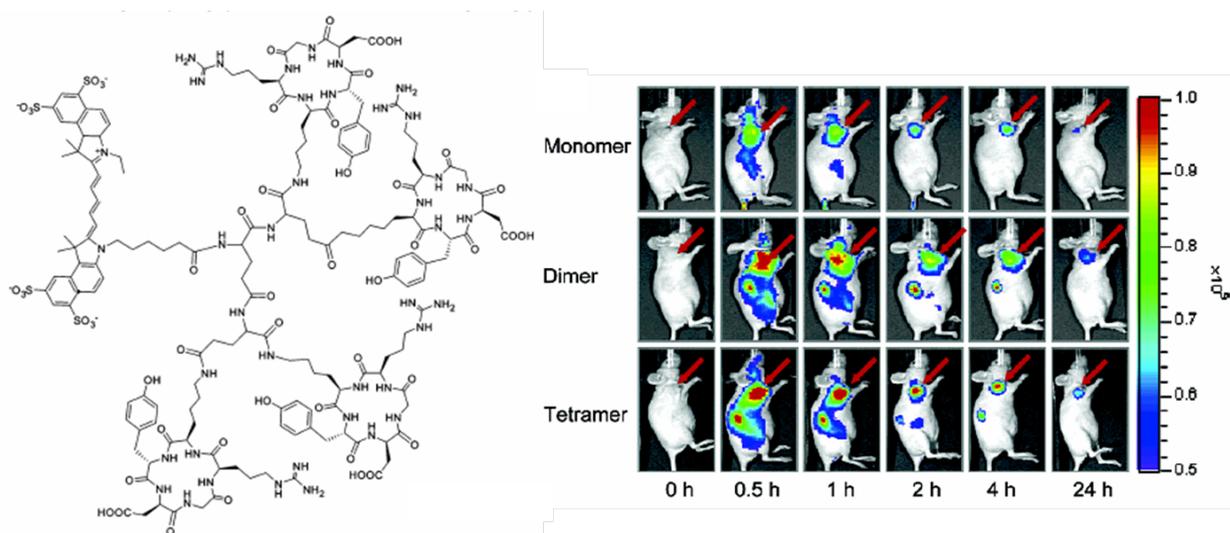


FIG. I.30 – Structure du tétramère $Cy5.5-E(E[c(RGDyK)]_2)_2$ et imagerie de fluorescence *in vivo* de souris portant une tumeur sous-cutanée U87-MG après injection de 500 pmol de monomère, dimère ou tétramère - d'après [Cheng 05].

I.2.7.b Scintigraphies : TEP et TEMP

De nombreux agents d'imagerie de l'angiogénèse ont été développés avec des radionucléides, que ce soit des anticorps ou de petites molécules peptidiques ou non. Ainsi, des anticorps anti-VEGF et anti-domaine ED-B de la fibronectine ont été marqués respectivement à l' ^{124}I et ^{123}I [Jayson 02, Santimaria 03]. Une part importante des études de l'imagerie de l'angiogénèse est actuellement basée sur des ligands de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, marqués par divers radioéléments (^{99m}Tc , ^{111}In , ^{18}F , ^{90}Y , ^{64}Cu , $^{125}/^{123}/^{124}\text{I}$, *etc.*) [Haubner 06]. La plupart de ces composés présente des sélectivités et des spécificités satisfaisantes *in vitro* et les résultats varient selon les modèles tumoraux chez la souris. Chez l'homme, les résultats sont contrastés, variant selon le type tumoral et l'activité angiogénique.

En particulier, des dérivés de cyclopeptides contenant la séquence RGD ont été proposés pour le ciblage de $\alpha_V\beta_3$. Haubner *et al.* ont synthétisé en 1999 le ^{125}I -c(RGDyV) (Fig. I.31), premier cyclo-RGD pour l'imagerie moléculaire de cette intégrine [Haubner 99]. Ce traceur à l'efficacité moyenne présente une élimination essentiellement hépatobiliaire et une absorption intestinale importante chez la souris. Van Hagen *et al.* ont ensuite proposé un dérivé DTPA-c(RGDyK) marqué à l' ^{125}I ou à l' ^{111}In [van Hagen 00] (Fig. I.31). La

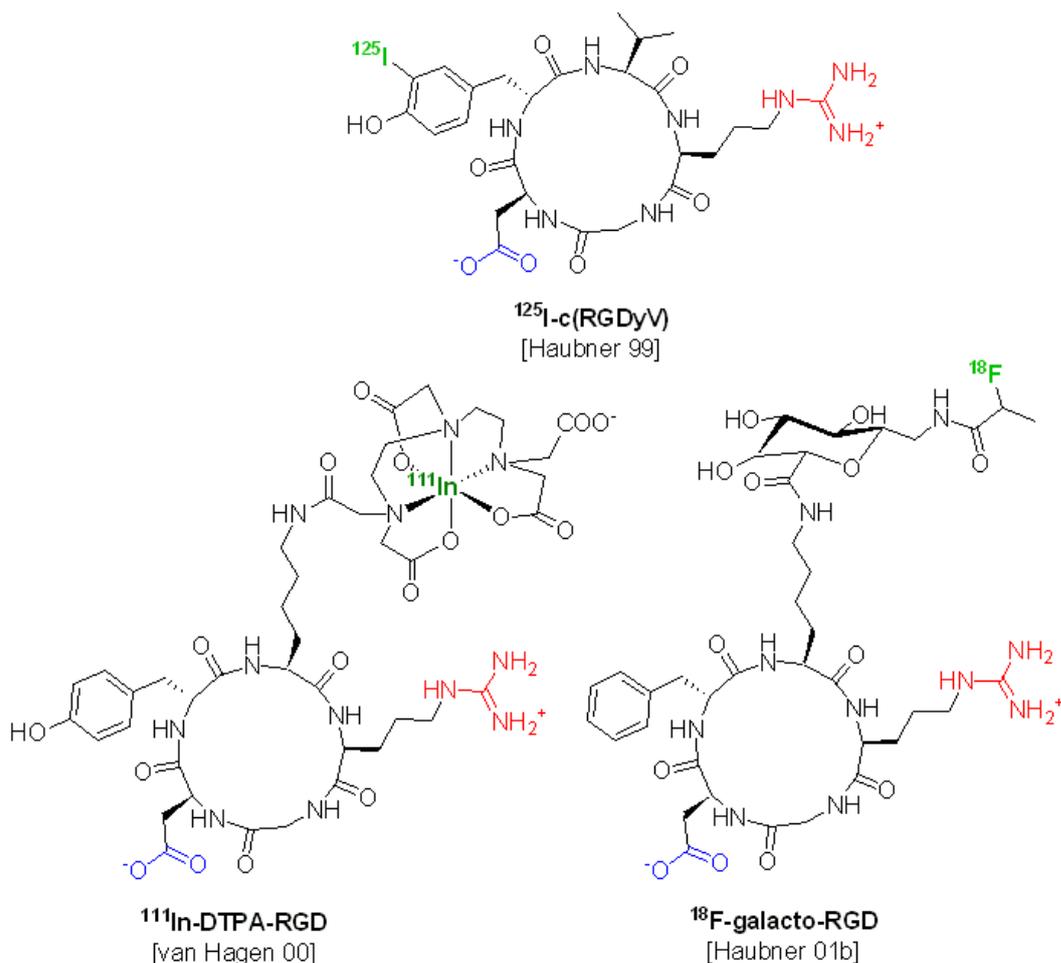


FIG. I.31 – Dérivés cyclopentapeptidiques pour l'imagerie ciblée de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.

forme iodée montre une meilleure accumulation dans les néovaisseaux tumoraux et dans certaines cellules tumorales en culture. Chez le rat, le composé marqué à l' ^{111}In présentait une accumulation rénale importante, 4 à 8 fois plus que dans les autres tissus, et le rapport d'accumulation tumeur/tissus normaux était faible (proche de l'unité). Une avancée majeure a été réalisée par l'introduction d'un groupement glucidique (SAA, pour "sugar amino acid") sur ces traceurs [Haubner 01a]. Haubner a montré chez la souris, sur diverses tumeurs, que le $^{125}\text{I-c(RGDyK)(SAA)}$ avait une métabolisation hépatique et une excrétion urinaire identiques à celles du c(RGDyV) mais avec une rétention tumorale supérieure (jusqu'à 3% ID/g après 4h) et un rapport tumeur/sang plus important (de 9 à 16). Cette équipe a finalement mis au point un peptide glycosylé de troisième génération marqué au ^{18}F : le $^{18}\text{F-galacto-RGD}$ (Fig. I.31) [Haubner 01b]. Ce composé a démontré une rétention spécifique dans les tumeurs de type M21 (mélanome) sur des modèles murins [Haubner 04b, Haubner 05]. Il a été testé à plusieurs reprises chez des patients atteints de divers cancers (Fig. I.32) [Haubner 05, Beer 05, Beer 06, Beer 08]. Le $^{18}\text{F-galacto-RGD}$ présente pourtant une affinité de liaison pour $\alpha_V\beta_3$ relativement faible et, bien que la

glycosylation ait amélioré le comportement pharmacocinétique, les accumulations rénale, hépatique et gastrointestinale restent importantes. De plus, sa synthèse est complexe et relativement longue par rapport à la période du fluor 18. Ainsi, en dépit des premiers succès de ce composé, il semble que ses applications soient finalement limitées.

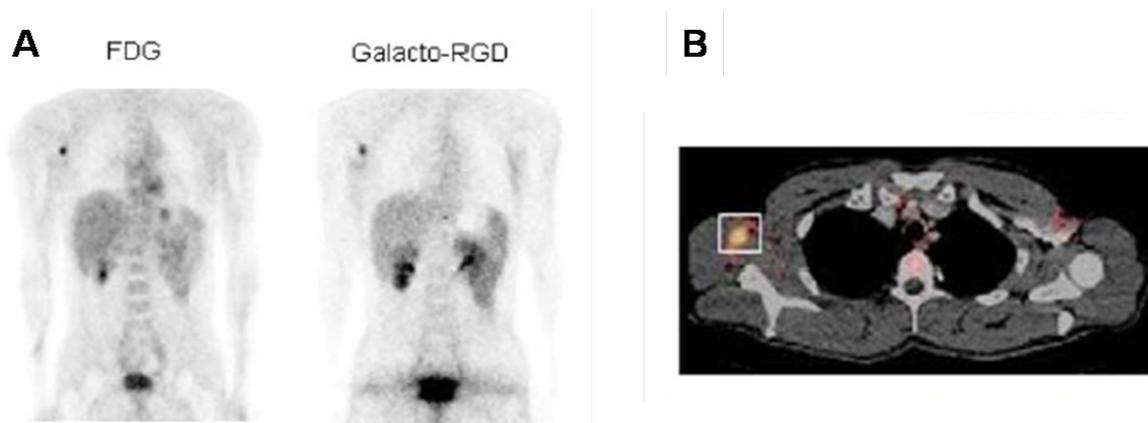


FIG. I.32 – (A) Images coronales TEP, 60 min après injection de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ou de $[^{18}\text{F}]\text{Galacto-RGD}$ chez d'un patient atteint d'un mélanome malin et d'une métastase lymphatique. (B) Image de fusion, entre les images CT et TEP, après injection de $[^{18}\text{F}]\text{Galacto-RGD}$, de la métastase lymphatique - d'après [Haubner 06].

La tendance est aujourd'hui à la multimérisation de ce type de traceurs, allant de dimères à des octamères [Liu 06]. La polyvalence induit des modifications dans la distribution et l'affinité des traceurs.

La structure polymérique peut provenir de la fonctionnalisation d'anticorps [Kok 02] ou de dendrimères [Lesniak 07]. Des chassis cyclodécapeptidiques RAFT (regioselectively addressable functionalised template) ont également été utilisés, avec l'avantage de présenter deux faces d'adressage indépendantes [Garanger 05]. L'une des faces a été fonctionnalisée avec 4 séquences ciblant de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (c(-RGDfK-)), alors que la seconde face a pu être utilisée, entre autres, pour radiomarquer l'ensemble et l'utiliser comme traceur. Ce type de structure a été marqué à ^{125}I , au ^{111}In et au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [Sancey 06]. Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RAFT-RGD a été testé *in vivo* sur des modèles murins portant des tumeurs exprimant $\alpha_V\beta_3$ (Fig. I.33). Sancey *et al.* ont montré que ce traceur cible bien $\alpha_V\beta_3$ et il semble qu'il puisse donner des informations qualitatives quant à son taux d'expression [Sancey 07]. Toutefois, l'importante excrétion rénale de ce produit limite ses applications et des améliorations de sa biodistribution sont envisagées.

L'approche la plus courante pour obtenir des multimères consiste à relier les c(RGDxK) (avec x = D-Phe, ou D-Tyr) par les chaînes latérales de leurs lysines, via des acides glutamiques ou aspartiques. Le radiomarquage a été réalisé par l'équipe de Chen avec du ^{64}Cu par un motif chélatant de type DOTA sur des dimères [Chen 04b], des tetramères [Wu 05] et des octamères [Li 07] (Fig. I.34 A). Wu *et al.* ont également marqué des dimères

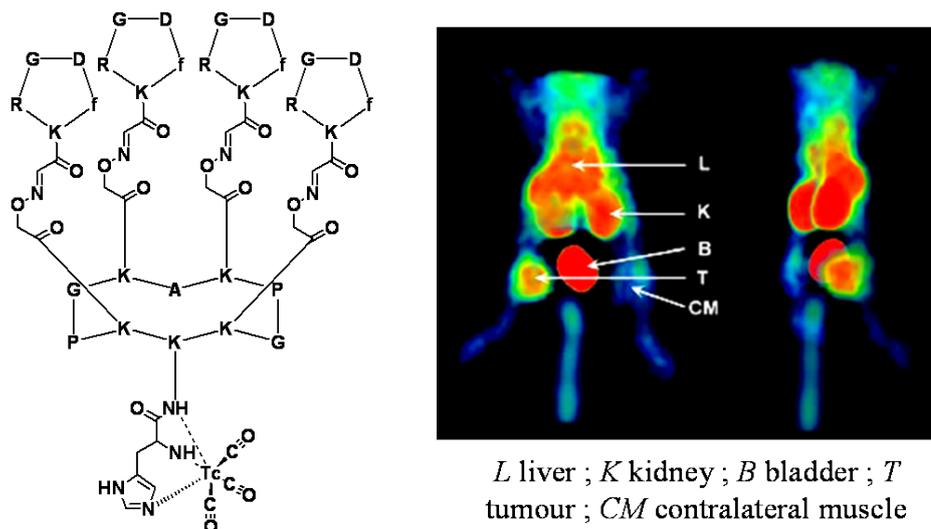


FIG. I.33 – Structure du ^{99m}Tc -RAFT-RGD et imagerie TEMP *in vivo* de souris portant une tumeur sous-cutanée TS/A-pc après injection de ^{99m}Tc -RAFT-RGD - d'après [Sancey 07].

et tétramères au ^{18}F en introduisant un espaceur de type PEG (polyéthylène glycol) [Wu 07a, Wu 07b] (Fig. I.34 B). Liu *et al.* ont utilisé le motif HYNIC pour marquer des dimères et des tétramères au ^{99m}Tc [Liu 01, Liu 07]. D'une manière générale, la multimérisation semble améliorer l'affinité des traceurs et a un effet coopératif avec le récepteur, facilitant l'internalisation. *In vitro*, ces produits présentent une bonne affinité et une sélectivité satisfaisante. Il a été montré que l'accumulation tumorale *in vivo* augmente quand le nombre de cycles RGD croît. Pourtant, l'importante rétention rénale des plus grosses entités est limitante pour leur utilisation *in vivo*.

D'une manière générale, la plupart des traceurs développés pour l'imagerie de l'angiogenèse a une bonne affinité pour leurs cibles et une bonne rétention tumorale, mais présente des problèmes de biodistribution et de rétention hépatique ou rénale. Ces composés doivent donc être améliorés pour que l'on puisse disposer d'agents d'imagerie efficaces pour la détection de l'angiogenèse et le suivi des traitements anti-angiogéniques.

Résumé

Le cancer représente un véritable fléau puisque c'est, avec les maladies cardiovasculaires, la première cause de décès dans les pays industrialisés. La prévention et la mise au point de nouveaux traitements sont indispensables pour faire reculer la mortalité encore très élevée. On sait que, dans le cas général, plus un cancer est détecté tôt, plus le pronostic est favorable ; il faut donc pouvoir disposer de techniques diagnostiques efficaces, c'est-à-dire sensibles, spécifiques et sélectives. En particulier, les techniques non invasives d'imagerie ont un rôle majeur à jouer. L'essor de l'imagerie moléculaire ouvre des poten-

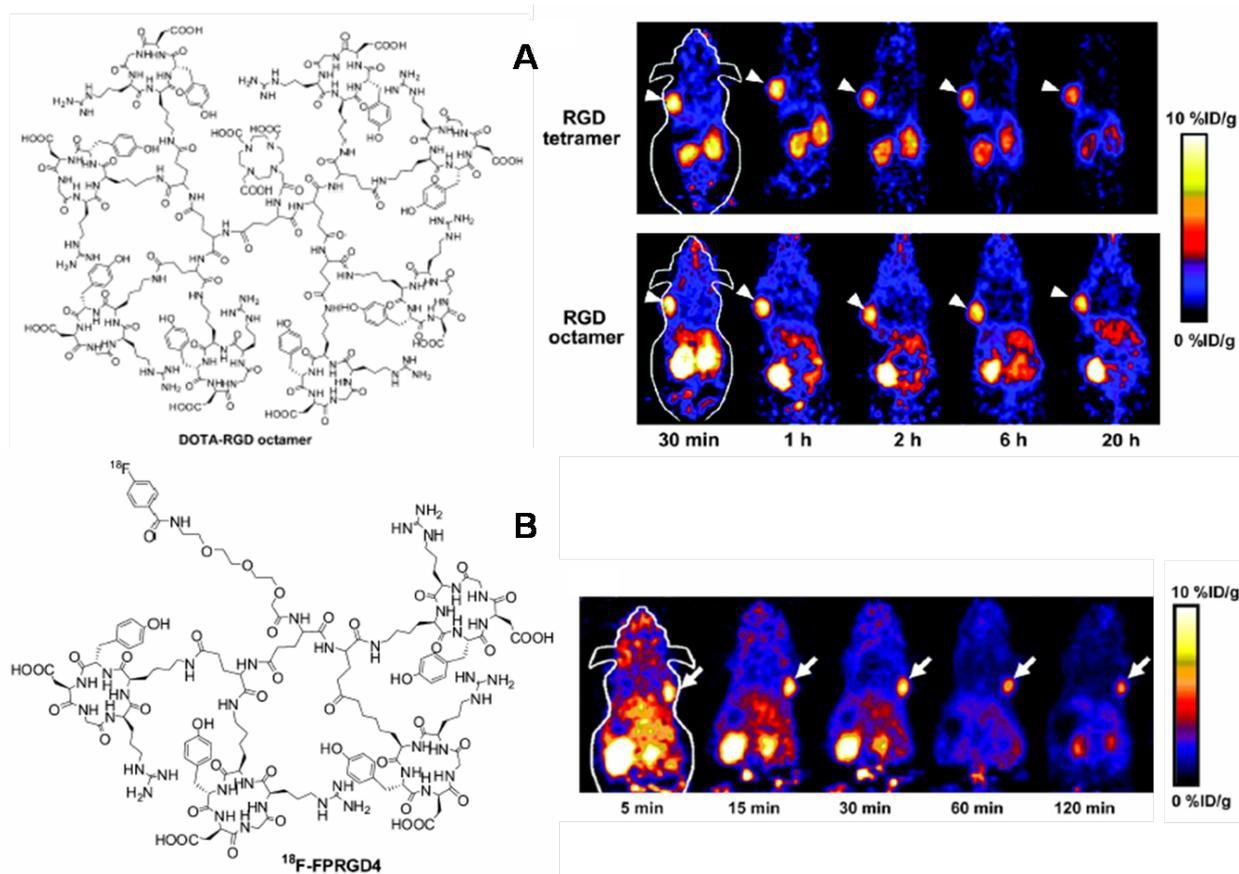


FIG. I.34 – (A) Structure de l'octamère DOTA-RGD et imagerie TEP *in vivo* de souris portant une tumeur sous-cutanée U87-MG après injection du tétramère ou de l'octamère marqué au ^{64}Cu - d'après [Li 07]. (B) Structure du tétramère ^{18}F -FPRGD₄ et imagerie TEP *in vivo* de souris portant une tumeur sous-cutanée U87-MG après injection du tétramère - d'après [Wu 07b].

tialités pour des détections spécifiques permettant non seulement le diagnostic, mais aussi le suivi de la réponse à un traitement.

Parmi les nombreuses cibles moléculaires pouvant être envisagées pour l'imagerie du cancer, nous avons tourné nos efforts vers les intégrines. Ces protéines sont impliquées dans la néoangiogénèse tumorale à un stade précoce du développement d'une tumeur. En ciblant les intégrines, on peut donc espérer réaliser à la fois un diagnostic précoce, mais aussi caractériser biochimiquement la tumeur afin de proposer un traitement plus adapté et moins invalidant.

I.3 Présentation du projet

Nous avons détaillé dans l'introduction bibliographique l'intérêt que peuvent présenter les intégrines, en particulier $\alpha_V\beta_3$, pour l'imagerie moléculaire du cancer. La présence de ces protéines est fortement liée à la gravité des cancers et à un pronostic défavorable. Les intégrines sont impliquées dans l'angiogenèse tumorale et dans les processus métastatiques et jouent, par conséquent, un rôle clé dans le développement et la dissémination des cancers. Parmi les intégrines humaines, une dizaine (dont $\alpha_V\beta_3$) reconnaît un motif peptidique RGD (Arg-Gly-Asp) dont la structure tridimensionnelle détermine la sélectivité d'un ligand pour une intégrine donnée. Des études de relation structure-activité et de design *ab initio*, basées sur des données rayon-X ou RMN, ont conduit au développement d'antagonistes mimant la séquence RGD. Des agents d'imagerie ont été conçus à partir de certains de ces antagonistes, essentiellement les cyclopentapeptides dérivés de c(RGDfV), et marqués avec des radioéléments ou des fluorophores. Nous avons vu qu'à l'heure actuelle, ces traceurs ciblant $\alpha_V\beta_3$ ne sont pas satisfaisants que ce soit au niveau de leur affinité et de leur sélectivité pour $\alpha_V\beta_3$ ou de leur biodisponibilité et de leurs propriétés pharmacocinétiques.

Parmi les techniques d'imagerie existantes, nous avons présenté les avantages des radiopharmaceutiques, en particulier ceux marqués au ^{99m}Tc . Le ^{99m}Tc peut être remplacé par du ^{99g}Tc et du $^{185/187}\text{Re}$ dans les études préliminaires, tout en laissant des possibilités d'élargissement des applications avec le ^{94m}Tc ainsi que le ^{186}Re et le ^{188}Re pour la radiothérapie. Nous avons choisi d'utiliser le degré d'oxydation +V et de complexer le cœur TcO^{3+} par le motif NS_2+S .

Nous avons donc souhaité développer de nouveaux traceurs, marqués au ^{99m}Tc , ciblant l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ par un mime de la séquence RGD. Contrairement aux travaux précédemment décrits (approches BFCA), nous avons préféré nous intéresser à de nouveaux mimes de RGD contenant un cœur technétium "essentiel", c'est-à-dire jouant le rôle d'élément structurant. La structure de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ est connue et sa co-cristallisation avec un antagoniste cyclopentapeptidique [Xiong 02] a permis à diverses équipes de proposer des ensembles de nouveaux antagonistes potentiels par docking [Feuston 02, Marinelli 03, Dayam 06]. Dans notre cas, l'absence de méthode prédictive fiable pour la détermination des structures de dérivés technétiés *ab initio* ne nous permettait pas de concevoir *de novo* des traceurs. Aussi, nous avons choisi d'adopter une démarche combinatoire permettant d'explorer les effets de divers arrangements structuraux autour du technétium. Une exploration systématique devait alors mettre en évidence des groupements fonctionnels récurrents qui, par raffinements issus d'études de relations structure-activité (SAR), conduisent à un ligand de haute affinité.

Le criblage des chimiothèques de traceurs peut être réalisé classiquement par divers tests *in vitro*, en particulier en compétition avec des ligands connus de la cible biolo-

gique visée ($\alpha_V\beta_3$). Des tests sur différentes intégrines immobilisées peuvent également être utilisés pour déterminer la sélectivité des traceurs. Toutefois, lorsque nous avons débuté ce projet, ce type de tests *in vitro* n'était pas disponible au laboratoire et nous n'avons pas trouvé de prestataire de service assurant un criblage systématique sur différentes intégrines. De plus, seul un nombre très restreint d'intégrines était commercial alors qu'aujourd'hui 6 sont disponibles, dont 5 impliquées dans la néoangiogenèse tumorale. La mise au point de ces tests, succinctement décrits dans la littérature, s'est avérée assez lourde et ce n'est qu'au printemps 2008 qu'ils ont été opérationnels au sein de notre laboratoire.

Compte tenu de ces impératifs, nous avons souhaité évaluer la faisabilité d'un criblage *in vivo* qui permet, *a priori*, de prendre en compte au plus tôt les aspects de biodistribution et de pharmacocinétique. En effet, ces facteurs appréciés souvent tardivement dans les démarches classiques sont généralement rédibitoires, alors même que les composés ont montré une activité *in vitro*. Nous avons donc proposé d'injecter des mélanges de composés technétiés à des animaux portant un modèle tumoral surexprimant l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (Fig. I.35). Une détection par imagerie moléculaire *in vivo* ou *ex vivo*, suivie d'une identification par extraction des tumeurs et analyse par radio-HPLC, a alors été envisagée. Différentes alternatives pourraient être proposées comme le prélèvement et le comptage de la tumeur, suivis de la déconvolution des chimiothèques, ou encore l'injection de composés à base de $^{185/187}\text{Re}$ suivie d'une analyse des extraits de tumeurs en LC-MS ou sur Maldi-Tof. Cette dernière méthode compenserait son défaut de sensibilité par rapport à la radioactivité en détectant sélectivement le motif isotopique caractéristique de $\text{NS}_2\text{-ReO-S}$ [Clavaud 08].

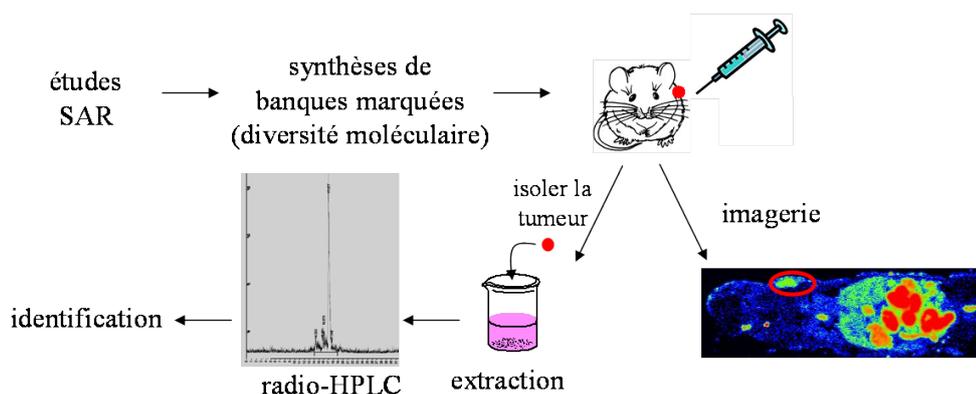


FIG. I.35 – Principe du criblage *in vivo*.

Afin de disposer d'une diversité moléculaire suffisante, nous avons cherché à développer des chimiothèques de nouveaux traceurs dans lesquels le ^{99m}Tc joue le rôle de marqueur, mais aussi d'élément structurant. Nous disposons au laboratoire d'un savoir-faire dans l'utilisation du motif de chélation NS_2+S dans une approche combinatoire. En effet, C. Clavaud a démontré la faisabilité d'un assemblage combinatoire de ligands de protéines

autour d'un cœur oxorhénium [Clavaud 06a]. Elle a ainsi développé une nouvelle approche consistant à assembler des séries indépendantes mais complémentaires de modules A et B, capables de coordonner un cœur métallique M pour former des chimiothèques de complexes organométalliques A-M-B ($M = \text{ReO}^{3+}$ ou TcO^{3+}) (Fig. I.36 (i)). Cette stratégie a été évaluée pour la mise au point de ligands de la cyclophiline A (hCyp18). Cette protéine cytosolique est une peptidyl isomérase impliquée dans de nombreuses pathologies humaines (cancers, SIDA) qui possède deux sous-sites distincts et fonctionnellement indépendants. L'assemblage de modules mimant chacun des motifs reconnus par les deux sous-sites a été réalisé par coordination d'un cœur oxorhénium (Fig. I.36 (ii)). Les chimiothèques bimoléculaires ont été testées *in vitro* et deux ligands spécifiques, dont l'affinité a été améliorée d'un facteur 2700 par rapport au ligand de référence, ont été sélectionnés. De plus, C. Clavaud a montré que le système NS_2+S permettait aussi de cycliser un peptide par coordination de ReO^{3+} . Le complexe cyclique présentait une affinité équivalente à celle du substrat de référence de la cyclophiline A, suggérant que la proximité du cœur oxotechnétium, fortement polarisé, ne destructurait pas la protéine.

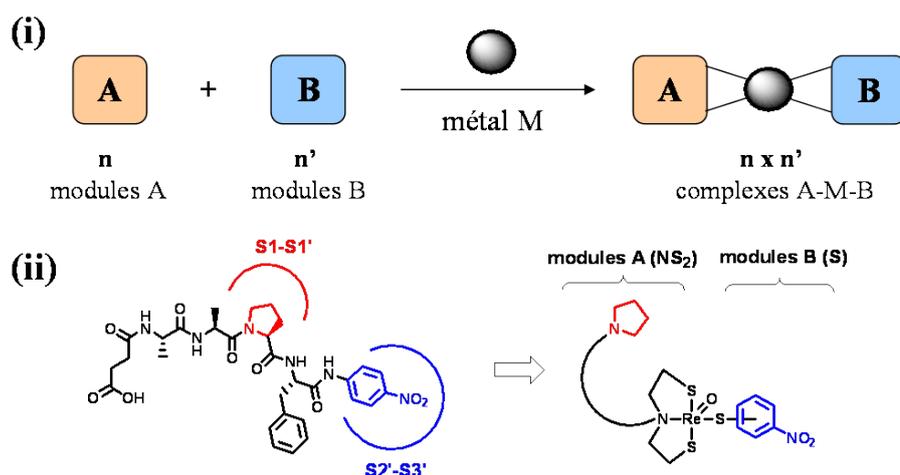


FIG. I.36 – (i) Principe de l'assemblage combinatoire par coordination d'un cœur métallique. (ii) Application à la mise au point de ligands de la cyclophiline A : structure du substrat de référence en interaction avec les 2 sous-sites de hCyp-18 et chimiothèque combinatoire.

Ainsi, une approche d'assemblage combinatoire développée au laboratoire pouvait *a priori* être adaptée à notre projet pour assembler ou en cycliser des analogues de la séquence RGD, reconnue par l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. Le principe consiste dans notre cas à relier deux ensembles de modules complémentaires, l'un comprenant un mime de l'arginine et l'autre un mime de l'acide aspartique, autour du cœur oxotechnétium, pour développer des traceurs utilisables en imagerie (Fig. I.37). Pour initier ce projet, nous avons souhaité mettre en œuvre une chimie simple, permettant d'accéder aisément à une grande variété de molécules, tant sur le plan de la structure que de la diversité fonctionnelle. Cette technique

d'assemblage conduit à des complexes métalliques bimoléculaires dont la stabilité *in vivo* doit être évaluée avant tout autre test de validation. En effet, il a été démontré que ces complexes sont, sans surprise, relativement sensibles aux thiols endogènes, en particulier au glutathion [Clavaud 08, Nock 99].

Nous avons également cherché à appliquer le principe de cyclisation par ReO^{3+} ou TcO^{3+} au développement de nouveaux traceurs spécifiques des intégrines en utilisant cette fois une approche combinatoire plus classique (Fig.I.37). Ainsi, les peptides précurseurs des complexes sont obtenus par synthèse parallèle en phase solide selon les techniques classiques de chimie combinatoire et sont cyclisés en solution par coordination du cœur métallique.

Dans tous les cas, comme nous l'avons vu au paragraphe I.1.2.a, on peut s'attendre à une augmentation de la diversité moléculaire par la formation de plusieurs diastéréomères à partir d'un seul et même peptide (Fig. I.11). Le cœur métallique est donc à la fois un marqueur radioactif, mais joue aussi un rôle central dans la structure des complexes et, par conséquent, sur leur activité biologique.

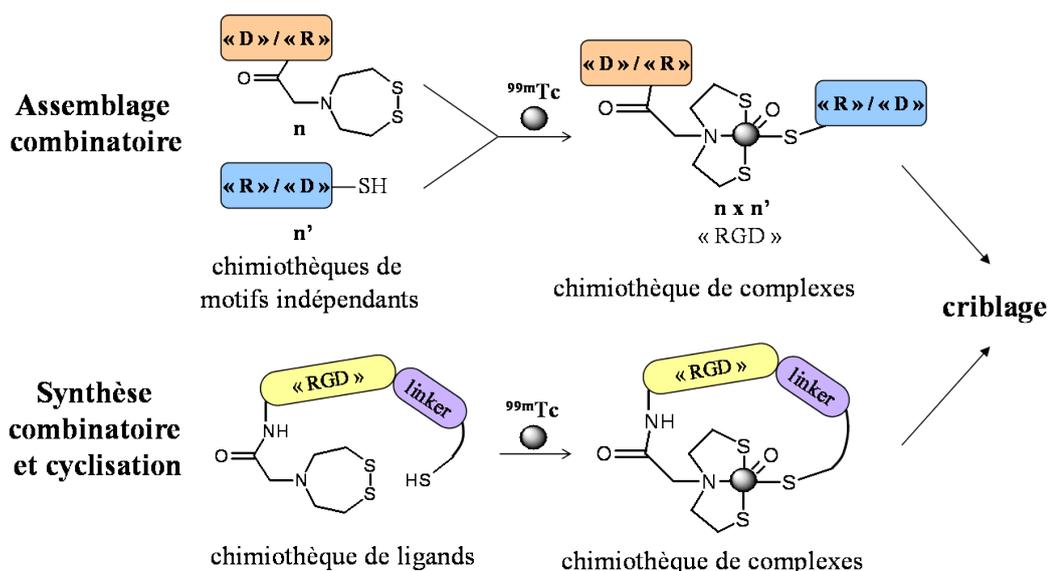


FIG. I.37 – Approches complémentaires de conception des banques de traceurs analogues de la séquence peptidique RGD

Ce manuscrit est divisé en trois chapitres faisant suite à cette introduction. Dans le chapitre II, nous nous intéresserons à la validation du modèle tumoral et aux tests préliminaires de mise au point des tests *in vivo*. Nous détaillerons ensuite la mise au point de la chimiothèque de traceurs acycliques, allant de la synthèse des ligands à l'évaluation de la stabilité des complexes (Chap. III). Enfin, le chapitre IV exposera l'approche de cyclisation par coordination de technétium de chimiothèques de ligands, l'étude de la stabilité de ces traceurs, ainsi que les premières évaluations *in vitro* et *in vivo*.

Chapitre II

Tests préliminaires en vue des études *in vivo*

Comme nous l'avons détaillé en I.3, l'objectif de notre projet est de mettre au point de nouveaux agents d'imagerie, marqués au ^{99m}Tc , par des approches combinatoires. Nous avons choisi d'appliquer notre travail à l'imagerie moléculaire des intégrines, en particulier pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.

L'approche classique de criblage de chimiothèques consiste à mettre au point des tests *in vitro* permettant de mesurer l'affinité des composés pour leur cible. Dans notre cas, il faudrait disposer de tests de liaison faisant appel à l'intégrine visée, purifiée et immobilisée, et à un ligand connu radiomarké, dont on mesure le déplacement par les produits testés. Nous ne disposions pas d'un tel test au laboratoire au début de ce projet, ni de prestataire pouvant assurer le criblage des chimiothèques alors même que nous disposions d'un savoir faire en matière de criblage *in vivo*. Par ailleurs, les tests de liaison donnent accès à l' IC_{50} des composés testés vis-à-vis du substrat déplacé : le résultat dépend donc largement des conditions employées et ne concerne qu'un petit nombre d'intégrines. Actuellement, seules 6 d'entre elles sont disponibles commercialement. Les tests de liaison n'ont été mis en place au laboratoire qu'au printemps 2008 ; les études *in vitro* ne sont donc intervenues que très tardivement dans ce projet.

Des tests cellulaires ont tout d'abord été envisagés sur des souches exprimant l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. Ainsi des tests de liaison de l'échistatine iodée ($[^{125}\text{I}]$ -iodoéchistatine) ont été réalisés sur des souches cellulaires A549, CHO 3a et HEK β_3 . L'échistatine est une toxine de venin de serpent se liant aux intégrines $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ [Kumar 97]. Elle est souvent utilisée dans la littérature sous sa forme iodée, pour des tests de liaison. La souche A549 d'adénocarcinome pulmonaire (ATCC) est décrite comme exprimant $\alpha_V\beta_3$, mais les données sont contradictoires dans la littérature [Garanger 05, Benedetto 06]. Dans notre cas, un test de liaison par l' $[^{125}\text{I}]$ -iodoéchistatine n'a pas permis de mettre en évidence une fixation spécifique. La souche CHO 3a, fournie par A. Duperray (INSERM

IAB, Grenoble), a été obtenue par transfection stable de la lignée cellulaire CHO (cellules épithéliales ovariennes de hamster chinois) par un plasmide codant pour la sous-unité β_3 humaine. Le clone CHO 3a est supposé présenter une expression prépondérante de $\alpha_V\beta_3$ par rapport aux autres couples α - β . Les résultats obtenus au laboratoire n'ont montré qu'une faible fixation spécifique de l' $[^{125}\text{I}]$ -iodoéchistatine sur ces cellules. La souche HEK β_3 , fournie par J.L. Coll (INSERM IAB, Grenoble), a été obtenue par transfection stable de la lignée cellulaire HEK293 (cellules épithéliales humaines de rein embryonnaire) par un plasmide codant pour la sous-unité β_3 humaine. Les sous-unités α_V endogènes et β_3 transfectées sont alors d'origine humaine. Ces cellules sont décrites comme surexprimant le récepteur $\alpha_V\beta_3$. Les résultats de liaison sur cellules complètes, obtenus au laboratoire, donnent une IC_{50} de 120 nM pour l' $[^{125}\text{I}]$ -iodoéchistatine, très supérieure aux données de la littérature ($\sim 0,3$ nM) [Kumar 97].

Compte tenu de ces résultats et en attendant que des tests *in vitro* sur intégrines purifiées soient développés au laboratoire, nous avons pris le parti d'évaluer, dans un premier temps, la faisabilité d'un criblage *in vivo*. A cet effet, nous avons utilisé en référence un certain nombre de traceurs décrits dans la littérature. Cette approche présente, *a priori*, l'avantage de rendre compte directement de l'efficacité du traceur, en permettant de statuer sur son affinité, sa spécificité, sa sélectivité et de prendre en compte au plus tôt les aspects pharmacocinétiques et de biodistribution. Le criblage *in vivo* consiste à injecter des mélanges de molécules radiomarquées à un animal porteur d'une tumeur, surexprimant ici l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, puis à déterminer si un ou plusieurs produits se sont concentrés dans la tumeur. L'identification de ces produits peut être réalisée par imagerie suivie d'une déconvolution ou par extraction de la tumeur et analyse par radio-HPLC (Fig. I.35). Les traceurs sélectionnés par cette méthode doivent ensuite faire l'objet d'études plus poussées, notamment par un retour vers l'*in vitro*, permettant d'évaluer la spécificité réelle du produit pour l'intégrine visée et éventuellement pour identifier les déterminants moléculaires de l'interaction.

II.1 Validation du modèle tumoral

II.1.1 Description du modèle tumoral

La mise au point d'un criblage *in vivo* nécessite de disposer d'un modèle animal exprimant la cible visée, dans notre cas, l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.

Nous avons vu en I.2.4 que l'expression des intégrines est caractéristique d'une tumeur donnée et de son stade de développement (tumeur primaire, métastase, tumeur secondaire). En particulier, l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ est surexprimée dans des cancers des reins, de la peau et des glioblastomes [Mizejewski 99]. Il existe diverses souches tumorales commerciales

ou facilement disponibles surexprimant des intégrines. Les principales sont répertoriées dans le tableau II.1.

TAB. II.1 – *Souches tumorales facilement disponibles surexprimant des intégrines.*

Lignée tumorale	Cancer humain	Intégrine	Source
U87-MG	cerveau	$\alpha_V\beta_3$	ECACC (Sigma)
MDA-MB 435	sein	$\alpha_V\beta_1/\alpha_V\beta_3/\alpha_V\beta_5$	ATCC (LGC Promochem)
MDA-MB 231	sein	$\alpha_6\beta_4$	M.D. Anderson Cancer Center
KG-1a	leucémie	$\alpha_{IIb}\beta_3$	ATCC (LGC Promochem)
A-375	mélanome	$\alpha_3\beta_1$	ATCC (LGC Promochem)
HT-144	mélanome	$\alpha_V\beta_3$	ATCC (LGC Promochem)

Ainsi, les souches U87-MG et HT-144 sont utilisables dans notre étude. D'autres, telles que MDA-MB 435, surexpriment $\alpha_V\beta_3$, mais sont moins attractives puisque cette intégrine n'est pas exprimée de manière prépondérante. La souche de mélanome M21, connue pour surexprimer $\alpha_V\beta_3$, est souvent utilisée dans les études décrites dans la littérature. Elle est particulièrement intéressante puisqu'une souche M21-L α_V -négative est également disponible et peut servir de contrôle. Toutefois, nous n'avons pas pu nous la procurer auprès de l'équipe de D. Cheresch qui a mis au point ces lignées et en limite l'utilisation. Nous avons choisi de conduire nos études sur la souche U87-MG qui est souvent utilisée dans les études d'imagerie sur petit animal et qui est réputée pour s'implanter et se développer facilement.

Diverses études ont tenté de déterminer le taux d'expression de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ sur les cellules U87-MG. Toutefois, une grande disparité est observée dans les résultats car, suivant la méthode employée, c'est soit le taux d'expression sur des cellules en culture qui est déterminé, soit le taux d'expression dans la tumeur. Dans ce dernier cas, on ne fait pas la différence entre les intégrines $\alpha_V\beta_3$ exprimées sur les cellules tumorales et sur les cellules endothéliales. Chen *et al.* ont déterminé une densité de $1,5 \cdot 10^5$ intégrines $\alpha_V\beta_3$ par cellule U87-MG via un test de liaison par compétition entre la vitaxine marquée au ^{64}Cu et l' ^{125}I -iodoéchistatine [Cai 06]. Zhang *et al.* ont décrit une densité du même ordre ($1,28 \cdot 10^5$ $\alpha_V\beta_3$ /cellule U87-MG) par un test de liaison avec de l'échistatine iodée. Ils ont également quantifié le taux d'intégrine dans du tissu tumoral par SDS-PAGE/autoradiographie ($4,24 \cdot 10^{12}$ $\alpha_V\beta_3$ /mg de protéine). La quantité d'intégrine trouvée dans la tumeur est très supérieure à celle obtenue dans du lysat de cellules U87-MG cultivées, cette différence étant due à la proportion d'intégrines exprimées sur les cellules endothéliales présentes dans la tumeur [Zhang 06]. D'une manière générale, les études comparatives des taux d'expression de $\alpha_V\beta_3$ en fonction des souches tumorales montrent que les cellules U87-MG ont le taux d'expression en $\alpha_V\beta_3$ le plus important. Toutefois,

nous avons vu dans le chapitre I que les intégrines doivent être activées pour donner une réponse cellulaire et que leur clusterisation joue également un rôle important. Ainsi un fort taux d'expression ne correspond pas nécessairement à une quantité correspondante d'intégrines fonctionnelles.

La culture des cellules U87-MG est peu contraignante et a été maintenue pendant plusieurs mois. Elles ont été cultivées dans du EMEM (Eagle's minimum essential medium) supplémenté en L-glutamine, acides aminés non-essentiels, pyruvate de sodium, SVF et antibiotiques et ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. Les xénogreffes ont été réalisées sur des souris athymiques Balb/C nu/nu femelles âgées de 6 semaines. Une suspension d'environ 5.10⁶ cellules dans 150 µL de milieu (EMEM) a été injectée en sous-cutané sur l'épaule avant droite des animaux. Cette localisation a été choisie en vue de futures études d'imagerie, afin d'éviter de masquer le signal de la tumeur par celui du tractus gastro-intestinal où se répartit la majorité des traceurs. Diverses études de l'angiogenèse ont été réalisées sur des tumeurs U87-MG implantées sur des souris nude et il apparaît qu'un délai de 2-3 semaines après l'implantation permet d'avoir une bonne expression de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ et des tumeurs d'un diamètre de 4 à 6 mm [Zhang 06, Cheng 05]. Ce délai peut être allongé à 3-4 semaines, pour donner des tumeurs de 5 à 8 mm de diamètre. Dans notre cas, l'ensemble des tests a été réalisé 15 jours après l'injection, alors que les tumeurs avaient un diamètre de 2 à 4 mm, les plus grosses étant logiquement les plus vascularisées. Les traceurs, en solution dans un tampon salin, ont été injectés par voie intraveineuse dans la queue des souris vigiles. Les animaux ont été sacrifiés par décervication avant le prélèvement des tumeurs.

II.1.2 Validation

Le modèle de xénogreffe murin U87-MG étant nouveau au laboratoire, nous avons tout d'abord cherché à le valider par l'étude *in vivo* d'un composé modèle liant $\alpha_V\beta_3$. L'objectif de ce test était de déterminer si les tumeurs développées exprimaient bien l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ et s'il était possible de l'observer par imagerie moléculaire *ex vivo*. Nous avons donc étudié l'accumulation tumorale d'un ligand tritié spécifique de $\alpha_V\beta_3$, la mise en évidence de cette accumulation étant réalisée par imagerie β^- sur un β^- -imager ainsi que par l'analyse d'extraits de tumeurs.

Le composé modèle choisi est le cyclopentapeptide c(RGDfK) tritié par propionylation de la lysine à l'aide de N-hydroxysuccinimidyl propionate (NPS), tritié au laboratoire par M.A. Lelait (Fig. II.1), et conduisant au composé [³H]-propionyl-c(RGDfK) ³H-1 (Fig. II.2). Comme nous l'avons vu en I.2.6.b et I.2.7, le c(RGDfK) et ses dérivés ont largement été décrits pour se lier spécifiquement à l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. Nous pouvions donc

raisonnablement espérer que le comportement *in vivo* de ce composé tritié serait similaire aux études décrites dans la littérature.

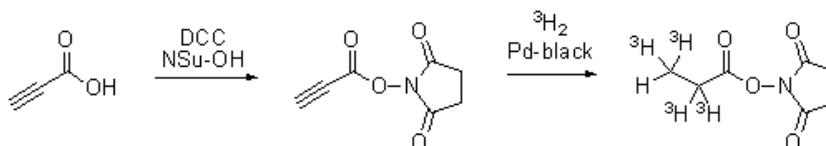


FIG. II.1 – Tritiation du *N*-propionyl-succinimide.

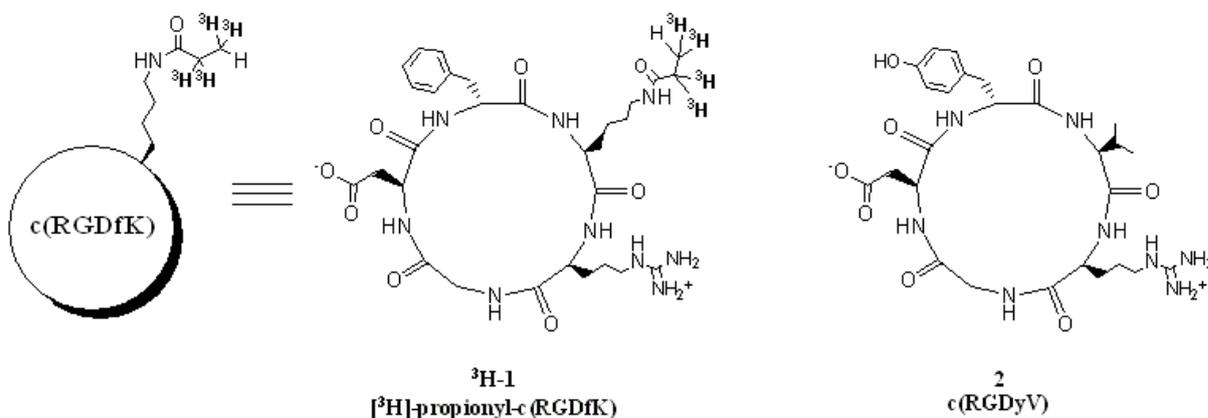


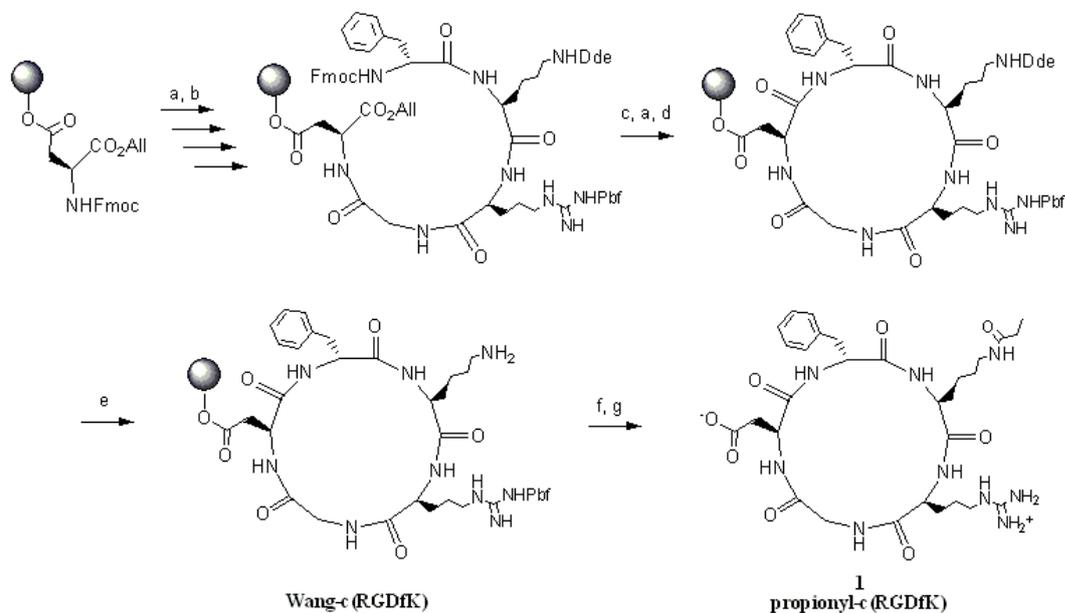
FIG. II.2 – Représentation simplifiée des dérivés du *c*(RGDfK) et structure de [β H]-propionyl-*c*(RGDfK) 3 H-1 et de *c*(RGDyV) **2**.

Obtenu par une synthèse sur support solide, le composé tritié 3 H-1 a été injecté seul ou en compétition avec son équivalent non radiomarqué **1**. Un test de compétition avec un ligand connu de $\alpha_V\beta_3$, *c*(RGDyV) **2**, a également permis de s'assurer de la spécificité de l'interaction entre le composé modèle et l'intégrine. Le composé **2** est connu pour être un assez bon ligand de $\alpha_V\beta_3$. Une IC_{50} de 144 nM sur l'intégrine purifiée a été obtenue par le déplacement de ^{111}In -DOTA-R-[*c*(RGDfK)]₂ par du *c*(RGDyV) [Kuijpers 07]. Par ailleurs, Haubner *et al.* ont trouvé une IC_{50} de 18 nM par compétition avec de la vitronectine [Haubner 99, Haubner 01a].

II.1.2.a Synthèse du propionyl-*c*(RGDfK) et du *c*(RGDyV)

La synthèse du cyclopeptide *c*(RGDfK) a été réalisée sur support solide en adaptant la méthode décrite par McCusker [McCusker 02] (Fig. II.3). En effet, les essais menés sur une résine NovaSyn TGT-alcool dans les conditions décrites dans l'article ne nous ont pas permis de greffer l'acide aspartique de façon satisfaisante sur la résine, ni d'obtenir le produit attendu. Nous avons donc utilisé une résine Wang sur laquelle le Fmoc-Asp-OAll a été greffé par sa chaîne latérale. Le greffage de Fmoc-Asp-OAll a tout d'abord été tenté

en présence de pyridine et de chlorure de 2,6-dichlorobenzyle [Sieber 87], conduisant à un rendement de couplage médiocre (19%). Finalement, le greffage de ce premier acide aminé a été réalisé avec un rendement quantitatif après activation de Fmoc-Asp-OAll sous forme d'anhydride symétrique.



a) pipéridine/DMF 1/4, 4 min (x 3) ; b) Fmoc-aa-OH (2 eq.), HATU (2 eq.), DIPEA (4 eq.), 1 x 30 min puis 1 x 1 h ; c) Pd(PPh₃)₄ (3 eq.), CHCl₃/AcOH/N-methylmorpholine 37/2/1, 2 h ; d) HATU (2 eq.), DIPEA (4 eq.), 16 h ; e) NH₂-NH₂·H₂O/DMF 2/98, 3 min (x 2) ; f) chlorure de propionyle (5 eq.), DIPEA (5 eq.), 30 min ; g) TFA/TIPS/H₂O 95/2,5/2,5 1 h (x 2).

FIG. II.3 – Synthèse du **propionyl-c(RGDfK) 1** sur support solide.

Après capping de la résine, les couplages de la glycine, de l'arginine, de la lysine et de la D-phénylalanine ont été réalisés en présence de HATU en stratégie Fmoc. L'ester d'allyle a été déprotégé à l'aide de tétrakistriphénylphosphine palladium(0) suivi de la déprotection du groupement Fmoc de la phénylalanine en N-terminal. La cyclisation a été réalisée en présence de HATU avant de déprotéger, par hydrazinolyse, le groupement Dde protégeant la chaîne latérale de la lysine. A partir d'une résine Wang présentant 0,6 mmol.g⁻¹ de fonctions alcool, nous avons finalement obtenu une résine **Wang-c(RGDfK)** substituée à 0,175 mmol/g (rendement de couplage = 44%). Ce taux de substitution a été déterminé par un test de Kaiser quantitatif (Test Sarin) permettant le dosage des fonctions amines primaires libres [Sarin 81].

Le composé propionylé **1** a été obtenu par réaction de chlorure de propionyle sur la résine **Wang-c(RGDfK)** en présence de DIPEA (Fig. II.3). Le décrochage de la résine et la déprotection de l'arginine ont été réalisés en milieu acide et le composé **1** a été isolé avec un rendement de 30% après purification par HPLC préparative.

L'analogue tritié [³H]-**propionyl-c(RGDfK) 3H-1** nous a été fourni par M.A. Lelait après acylation du c(RGDfK) immobilisé sur résine à l'aide du N-hydroxysuccinimidyl

propionate (NPS-NSU) tritié en mélange avec son équivalent non-tritié (rapport 1/9) pour obtenir une acylation quantitative (Fig. II.1). Le radio-chromatogramme HPLC de ce produit est présenté dans la figure II.5 A.

La synthèse du **c(RGDyV) 2** a été réalisée dans les mêmes conditions que pour le c(RGDfK), la tyrosine étant protégée par un groupement *tert*-butyl. Le produit a été isolé après purification sur HPLC préparative avec un rendement de 43%.

II.1.2.b Evaluation *in vivo* de [³H]-propionyl-c(RGDfK)

Un premier test *in vivo* a été réalisé avec le composé tritié ³H-1 pour vérifier par imagerie β^- qu'il se concentrait bien dans la tumeur. Environ 3,7 MBq (100 μ Ci) de composé ³H-1, en solution dans du tampon PBS, ont été injectés par voie intraveineuse (IV) dans la queue de souris vigiles ayant développé une tumeur U87-MG. Après sacrifice, des coupes ont été réalisées au microtome (20 μ m) et analysées au β -imager. Les images enregistrées 1 h et 6 h après injection montrent une nette concentration d'activité au niveau de la tumeur ainsi que dans le système gastrointestinal, comme c'est aussi le cas pour la plupart des agents d'imagerie développés à partir du c(RGDfK) (Fig.II.4).

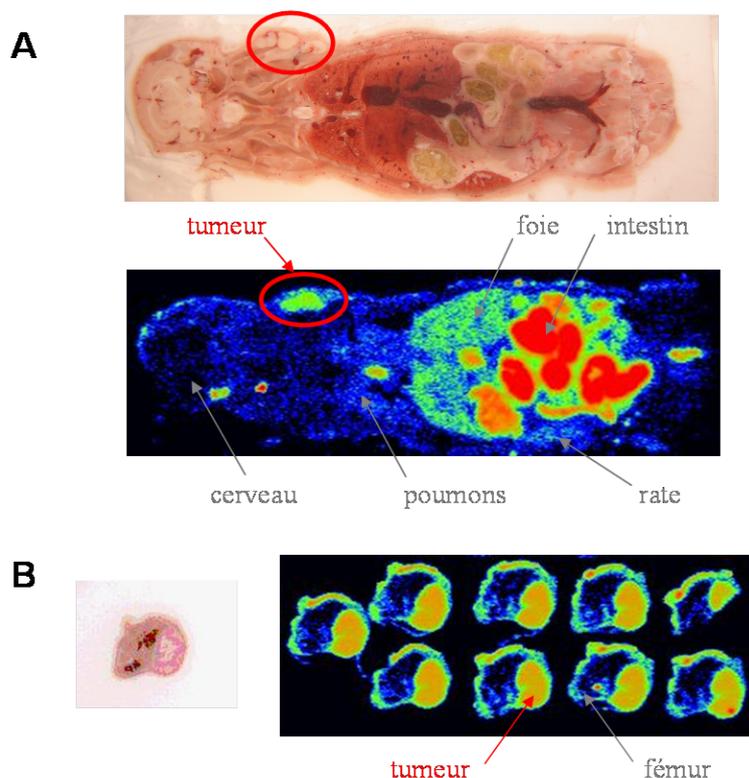


FIG. II.4 – Imagerie β^- après injection IV de 3,7 MBq (100 μ Ci) de [³H]-propionyl-c(RGDfK) ³H-1. Images optiques et β -imager (beta imager 2000, Biospace) d'une section coronale 6 h après injection (A) et de sections transverses de la patte 1 h après injection (B).

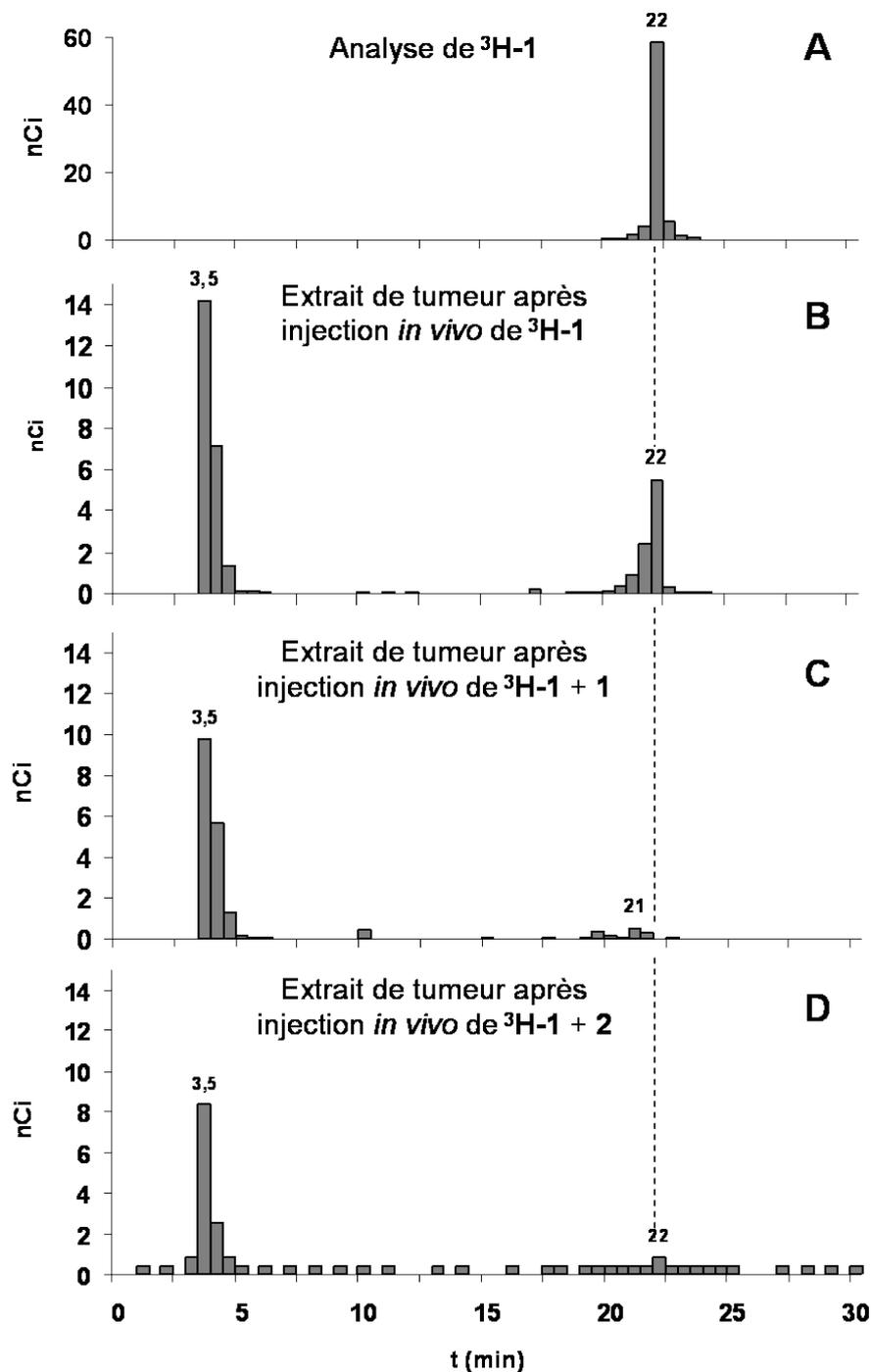


FIG. II.5 – Analyse HPLC de 3,7 kBq (100 nCi) de [^3H]-propionyl-c(RGDfK) $^3\text{H-1}$ (A) et des extraits de tumeurs après injection *in vivo* de 3,1 MBq (85 μCi) de $^3\text{H-1}$ (B), de 3,1 MBq (85 μCi) de $^3\text{H-1}$ en compétition avec 500 μg de **1** (C) et de 3,7 MBq (100 μCi) de $^3\text{H-1}$ en compétition avec 200 μg de c(RGDyV) **2** (D). HPLC Waters-3, colonne Varian Pursuit C18 analytique, gradient 0-100% B en 30 min, sortie d'HPLC collectée par tranches de 0,5 min et comptage des fractions en présence de liquide scintillant.

Une tumeur a été extraite dans un mélange PBS/MeOH 2/8 et le surnageant analysé par HPLC. La sortie d'HPLC a été collectée par tranches de 0,5 min et les fractions ont été comptées (Fig.II.5 B). Le composé $^3\text{H-1}$ (fraction 22-22,5 min), ainsi que de l'eau tritiée (fractions 3,0 à 4,5 min), pouvant résulter de la métabolisation *in vivo* du composé, ont été identifiés.

La co-injection *in vivo* de $^3\text{H-1}$ tritié avec son équivalent non-tritié **1** a permis de bien mettre en évidence la présence de sites saturables. Dans ce cas, en effet, le composé tritié disparaît presque totalement de l'extrait de tumeur (Fig.II.5 C) alors que la proportion d'eau tritiée reste du même ordre de grandeur. De plus, ce résultat confirme que l'eau tritiée est produite *in vivo* et non par dégradation du produit au moment de l'extraction de la tumeur.

Nous avons également voulu vérifier que l'accumulation de $^3\text{H-1}$ est bien spécifique de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. Une expérience de compétition avec un antagoniste connu de $\alpha_V\beta_3$, le **c(RGDyV) 2**, a donc été réalisée (Fig.II.5 D). La co-injection *in vivo* du peptide $^3\text{H-1}$ avec **2** a bien conduit à la diminution de la quantité de composé tritié **1** dans l'extrait de tumeur.

Ainsi, ces tests *in vivo* nous ont permis de valider le modèle de xénogreffe au laboratoire. Grâce à un peptide modèle tritié, nous avons montré que les tumeurs induites chez la souris à partir de cellules U87-MG expriment bien l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. Nous n'avons pas cherché à déterminer la densité en récepteurs $\alpha_V\beta_3$ dans notre modèle tumoral. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment, la détermination du taux d'expression de $\alpha_V\beta_3$ dans les tumeurs ne reflète pas la densité de récepteurs actifs.

II.2 Injection *in vivo* de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et ^{99m}TcO -gluconate

L'introduction d'un cœur oxotechnétium $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ (V) sur les traceurs peut être réalisée selon deux voies à partir du pertechnétate $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (VII) comme cela a été exposé en I.1.3. Dans ces travaux, nous avons utilisé la méthode indirecte de transchélation pour marquer les banques de traceurs, en passant par un intermédiaire ^{99m}TcO -gluconate (Fig. II.6). Dans les préparations de traceurs qui ont été injectées dans les études de criblage *in vivo*, le ^{99m}TcO -gluconate ainsi que le TcO_4^- sont absents des radio-HPLC de contrôle, preuve que la réduction et la transchélation sont totales. Nous avons toutefois voulu connaître le devenir *in vivo* du ^{99m}TcO -gluconate. De même, du pertechnétate TcO_4^- , résultant d'une dissociation des complexes et d'une oxydation de TcO^{3+} , pourrait être relargué au cours de la biodistribution, nous avons donc souhaité étudier son comportement *in vivo*.

Deux souris ont été injectées avec une solution saline de TcO_4^- directement éluée du générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (~ 74 MBq) et deux autres avec du ^{99m}TcO -gluconate (~ 68 MBq).

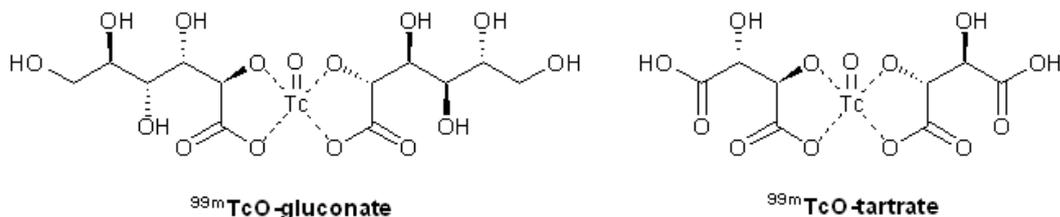


FIG. II.6 – Structure proposée des intermédiaires $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ et $^{99m}\text{TcO-tartrate}$.

Les activités injectées sont rapportées dans le tableau II.2. Les animaux ont été sacrifiés après 1 ou 3 h et les tumeurs ont été extraites dans un mélange PBS/MeOH 2/8 après comptage. La proportion de radioactivité contenue dans la tumeur par rapport à l'activité injectée (%ID, pour "injected dose") est en moyenne de 0,3% pour le $^{99m}\text{TcO}_4^-$ alors qu'elle n'est que de 0,06% pour le $^{99m}\text{TcO-gluconate}$. Les deux espèces ont donc des propriétés de pharmacocinétique et de biodistribution nettement différentes.

TAB. II.2 – Activités injectées lors des tests *in vivo* de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et $^{99m}\text{TcO-gluconate}$, activité des tumeurs isolées après sacrifice et pourcentage d'activité dans les tumeurs par rapport à l'activité totale injectée.

Produit	Temps avant le sacrifice	Activité injectée - Ai (MBq)	Activité de la tumeur - At (MBq)	%ID At/Ai (%)
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1h	74	0,20	0,27
	3h	45	0,14	0,31
$^{99m}\text{TcO-gluconate}$	1h	68	0,038	0,06
	3h	68	0,038	0,06

Les extraits de tumeurs ont été analysés par radio-HPLC et dans les deux cas, un signal de $t_R = 3,9$ min a été observé (Fig. II.7 A et B). Les radio-chromatogrammes des produits injectés ont été réalisés ainsi que l'analyse d'un mélange de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et de chlorure d'étain conduisant à une forme réduite oxotechnétium (Fig. II.7 C). Le signal obtenu dans l'analyse des extraits de tumeur correspond à celui du technétium libre réduit et les deux produits injectés n'ont pas été identifiés dans les extraits. Le $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et le $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ peuvent avoir été réduits *in vivo*, mais il semble plus probable que cette réduction ait eu lieu lors de l'extraction des tumeurs, par exemple par les thiols endogènes (GSH, *etc.*) libérés par la lyse cellulaire. Enfin, il faut noter que si de l'hydrolysé réduit s'est formé (TcO_2 colloïdal), il n'a pas pu être observé en radio-HPLC car cette espèce est retenue en tête de colonne.

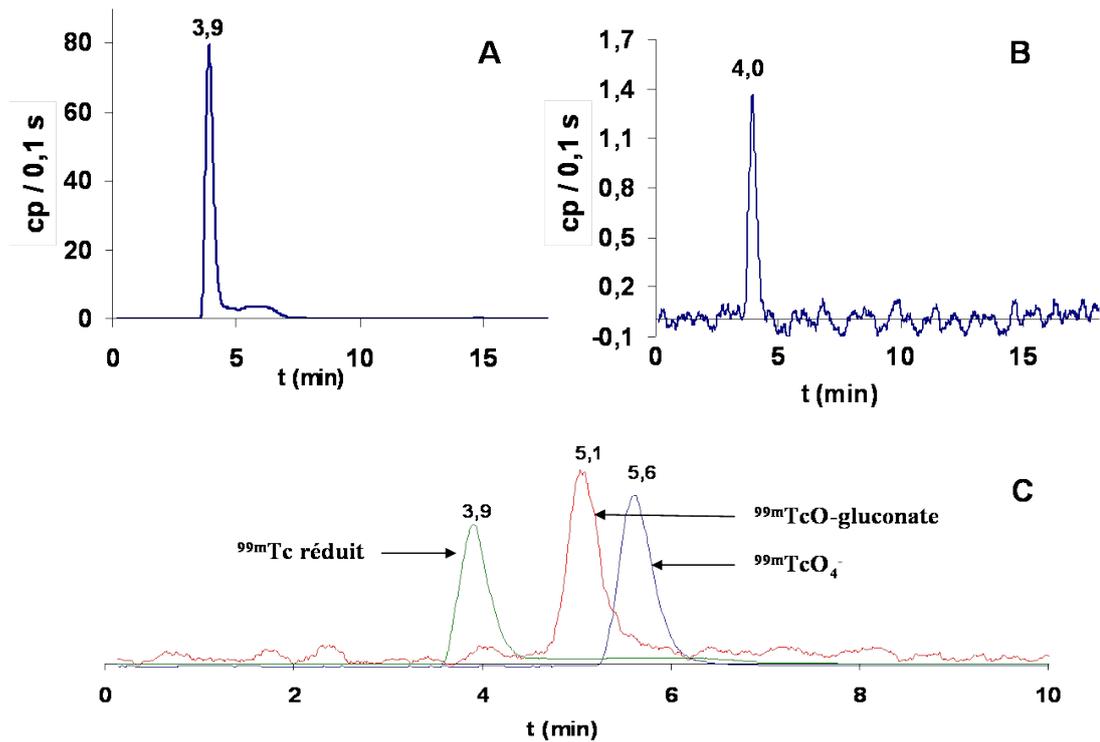


FIG. II.7 – Analyses des extraits de tumeurs prélevées 1 h après injection de 74 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (A) et de 68 MBq de $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ (B). Radio-chromatogrammes du $^{99m}\text{TcO}_4^-$, du $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ et du ^{99m}Tc réduit (C). HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.

II.3 Mise au point de la méthode de criblage *in vivo*

II.3.1 Composés modèles : synthèse et radiomarquage

Dans l'approche par criblage *in vivo* que nous proposons, l'identification des complexes de ^{99m}Tc s'étant concentrés dans la tumeur peut être réalisée par analyse radio-HPLC. A cet effet, la tumeur doit être broyée dans un solvant d'extraction et le surnageant analysé en HPLC avec détection γ . L'efficacité de cette technique dépend directement du rendement d'extraction des tumeurs, de l'activité des échantillons et de la rapidité d'exécution. Il nous a paru indispensable d'effectuer des tests préliminaires de validation de cette méthode d'identification dans des conditions réelles, avec des molécules ayant une affinité avérée pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ et tendant par conséquent à se concentrer dans la tumeur. Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction bibliographique, de nombreux traceurs ont été développés sur la base du c(RGDfK) et présentent une bonne affinité *in vitro* pour $\alpha_V\beta_3$ ainsi qu'*in vivo* dans des modèles murins. Nous avons souhaité valider notre approche avec un composé marqué au ^{99m}Tc afin de nous conformer aux conditions d'analyse qui seront utilisées par la suite. Les composés monomériques de c(RGDfK),

marqués au ^{99m}Tc , sont peu nombreux, certains très récemment décrits [Decristoforo 06, Zhang 07b] et n'ont pas tous été testés *in vivo* [Lee 07]. Nous avons donc sélectionné un composé décrit par l'équipe de Haubner pour cibler l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, le $^{99m}\text{Tc-DKCK-c(RGDfK)}$ $^{99m}\text{Tc-3}$ (Fig. II.8) [Haubner 04a]. Ce composé présente un motif de chélation du technétium de type N_3S lié covalamment au c(RGDfK) via une lysine qui améliore la solubilité du composé. Une accumulation spécifique de ce traceur vis-à-vis du récepteur $\alpha_V\beta_3$ a été montrée dans un modèle de xéno greffe de mélanome M21 implanté chez des souris. Ce composé présentait toutefois une forte accumulation rénale et dans le tractus gastro-intestinal ainsi qu'une faible stabilité métabolique. Cependant, nous nous sommes conformés dans un premier temps à ce modèle malgré ces problèmes de biodistribution, car sa synthèse était relativement simple. En effet, il nous était facile d'obtenir le ligand **DKCK-c(RGDfK) 3**, à partir de la résine **Wang-c(RGDfK)** déjà utilisée, et de le complexer par du ^{99m}Tc pour donner le $^{99m}\text{Tc-3}$.

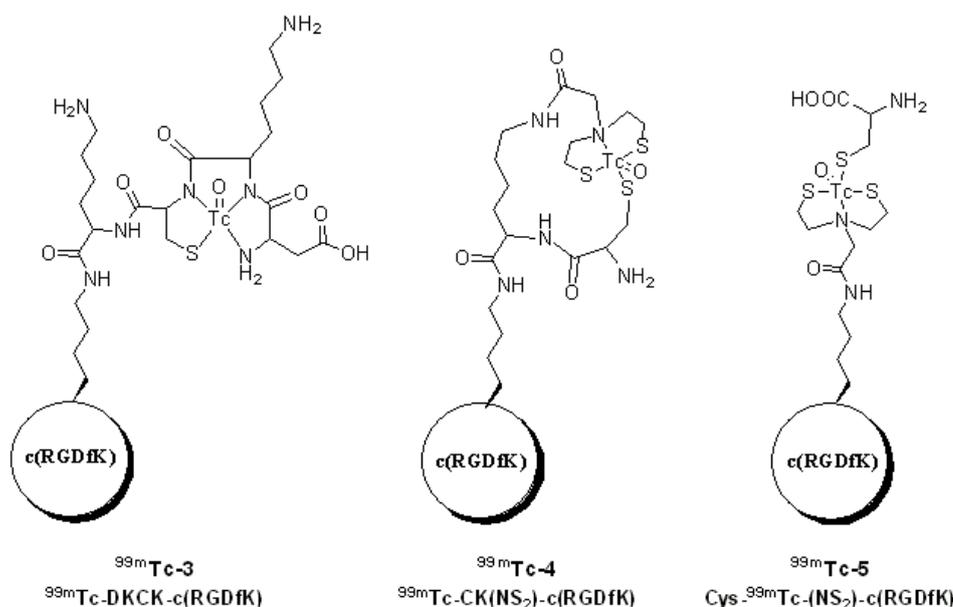


FIG. II.8 – Structure des complexes modèles sur squelette c(RGDfK), marqués au ^{99m}Tc .

Comme nous l'avons mentionné, le motif de chélation de ce composé modèle est différent du NS_2+S que nous avons retenu pour nos chimiothèques de traceurs, mais il présente l'avantage d'être bien caractérisé, tant sur le plan chimique, que biochimique. Nous avons également souhaité disposer de modèles pour nos deux stratégies de complexation par cyclisation ou assemblage. Nous avons donc synthétisé, sur la base du produit **3**, un composé présentant un modèle du motif de coordination intramoléculaire NS_2+S , le $^{99m}\text{Tc-CK(NS}_2\text{)-c(RGDfK)}$ $^{99m}\text{Tc-4}$, ainsi qu'un dérivé acyclique assemblé avec la cystéine, le $\text{Cys-}^{99m}\text{Tc-(NS}_2\text{)-c(RGDfK)}$ $^{99m}\text{Tc-5}$ (Fig. II.8).

II.3.1.a Synthèse des composés modèles

La synthèse des trois composés modèles a été réalisée sur support solide à partir de la résine **Wang-c(RGDfK)**, le peptide c-[R(Pbf)GDfK] étant greffé sur la résine par la chaîne latérale de l'acide aspartique (cf. II.1.2.a).

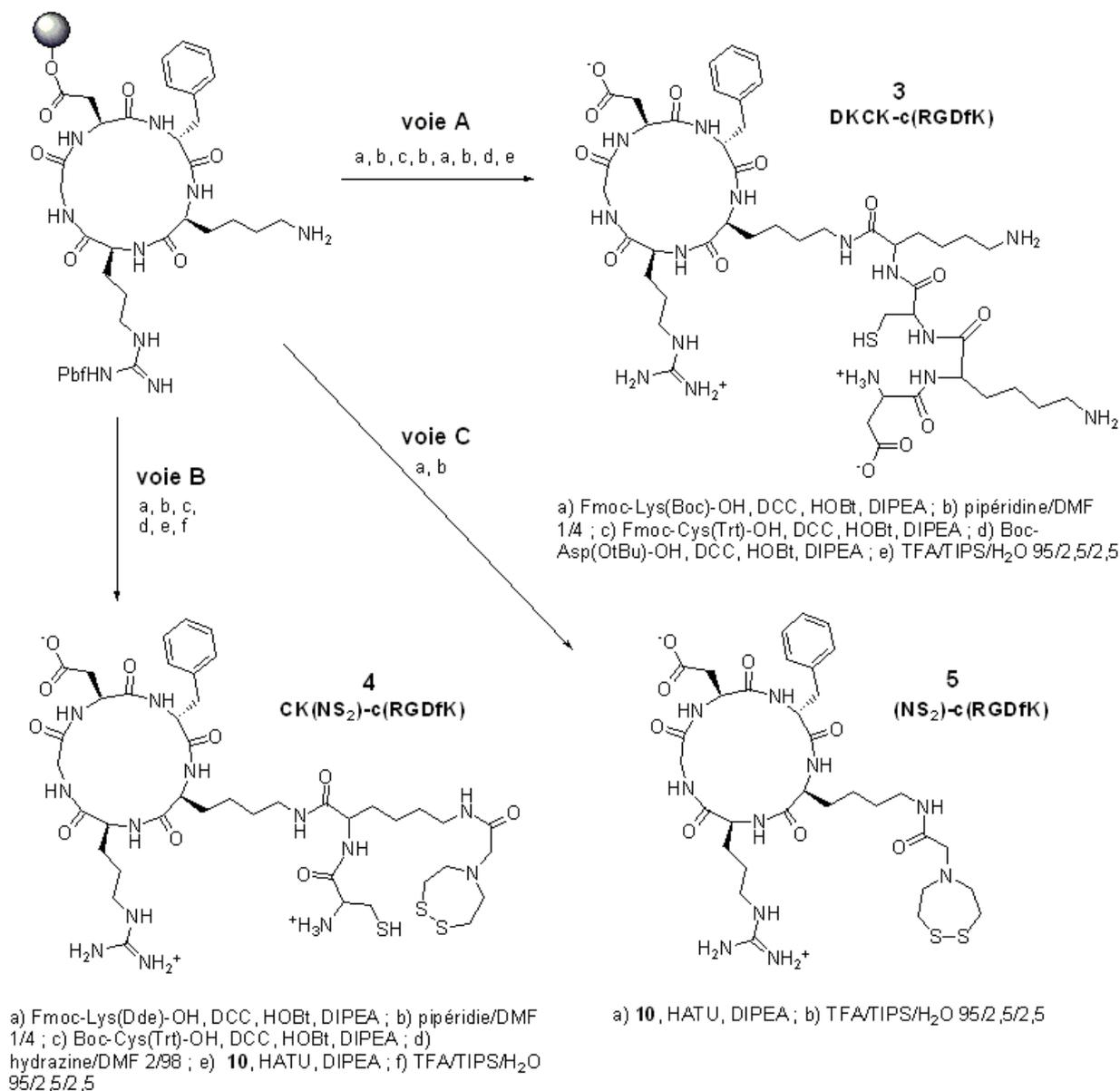
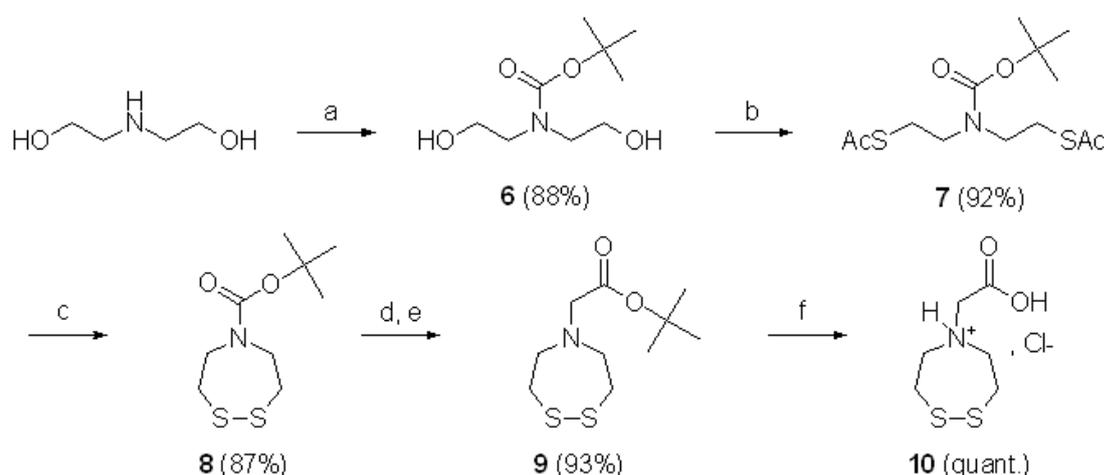


FIG. II.9 – Synthèse des dérivés **DKCK-c(RGDfK)** **3**, **CK(NS₂)-c(RGDfK)** **4** et **(NS₂)-c(RGDfK)** **5**.

Le composé **3** a été obtenu en stratégie Fmoc (voie A), comme décrit dans la figure II.9. Un traitement en milieu acide a permis le décrochage du peptide et la déprotection simultanée des chaînes latérales. Le ligand **DKCK-c(RGDfK)** **3** a été obtenu après purification par HPLC préparative.

La synthèse des composés **4** et **5** a nécessité la synthèse préalable du précurseur du motif NS₂ **10** (Fig. II.10). Cette synthèse a été mise au point au laboratoire par C. Clavaud [Clavaud 06c] et quelques améliorations du protocole ont été apportées. Après protection de la diéthanolamine par le di-*tert*-butyldicarbonate, une réaction de type Mitsunobu a permis d'obtenir le produit thioacétylé **7**. La méthanolyse à l'air libre a conduit au disulfure **8** en 5 jours. En pratique, l'élimination des groupements acétyles ne prend que quelques heures. Cependant, le produit obtenu est un mélange de bis-thiol et de disulfure difficilement séparables. L'oxydation, menée à complétion, permet de simplifier l'étape de purification. Après déprotection de l'amine, celle-ci a été couplée avec le bromoacétate de tertibutyle pour donner l'ester **9**. L'acidolyse de ce composé conduit quantitativement au sel **10**, précurseur du motif NS₂.



a) Boc₂O, DIPEA, MeOH ; b) PPh₃, DIAD, CH₃COSH, THF ; c) MeONa, O₂, MeOH ;
d) TFA/DCM 1/1 ; e) BrCH₂CO₂tBu, DIPEA, DCM ; f) HCl 1N H₂O/AcN 1/1

FIG. II.10 – Synthèse du précurseur de NS₂ **10**.

Le ligand **4** a été obtenu par greffage de Fmoc-Lys(Dde)-OH sur la chaîne latérale de la lysine de la résine **Wang-c(RGDfK)**, suivi d'un couplage à la Boc-Cys(Trt)-OH (Fig. II.9, voie **B**). La déprotection à l'hydrazine de la chaîne latérale de la lysine a permis d'introduire le précurseur de NS₂ **10** en utilisant le HATU comme agent de couplage. De nouveau, le produit a été décroché de la résine et totalement déprotégé en milieu acide puis purifié par HPLC.

L'ajout du motif NS₂ **10**, en présence de HATU, sur la résine **Wang-c(RGDfK)** a conduit au (NS₂)-**c(RGDfK)** **5** après purification par HPLC (Fig. II.9, voie **C**).

II.3.1.b Complexation des composés modèles

Les ligands **3**, **4** et **5** ont été complexés avec du ^{99m}Tc pour servir de composés modèles dans la validation du test d'extraction de tumeur. La métallation a également été réalisée avec du rhénium afin de caractériser les complexes, mais aussi pour réaliser des tests de compétition *in vivo* avec les traceurs correspondants radiomarqués au ^{99m}Tc . Enfin, la complexation a été réalisée avec du ^{99g}Tc afin d'effectuer une identification par LC-MS et de confirmer la formation des complexes de ^{99m}Tc par une corrélation des temps de rétention en HPLC (détection UV et γ) entre complexes de ^{99g}Tc et ^{99m}Tc .

Le marquage au ^{99m}Tc de **3** a été adapté du protocole décrit [Haubner 04a]. La complexation du motif N_3S a été réalisée par transchélation d'un intermédiaire tartrate, obtenu par réduction du pertechnétate à l'aide de SnCl_2 en présence de tartrate de sodium, en 15 min à 90°C , sur $0,01 \mu\text{mol}$ de ligand. Un essai de marquage, réalisé à l'aide de l'intermédiaire gluconate (30 min à 50°C) a donné un résultat identique. La métallation par co-marquage au $^{99m}/^{99g}\text{Tc}$, par transchélation des intermédiaires gluconate correspondants, a permis d'identifier le complexe $^{99g}\text{Tc-3}$ par LC-MS ($t_R = 15,5$ min, $m/z = 1184,3$ [$\text{M} + \text{H}^+$]) et de confirmer la formation du complexe $^{99m}\text{Tc-3}$ par comparaison des temps de rétention en HPLC ($t_R = 15,5$ min) (Fig. II.11). Les trois pics du massif isotopique correspondent à la présence des soufres 32 et 34. La complexation au rhénium a été obtenue par un intermédiaire tartrate à partir de perrhénate de sodium dans les conditions décrites par Haubner et le complexe **Re-3** a été purifié par HPLC.

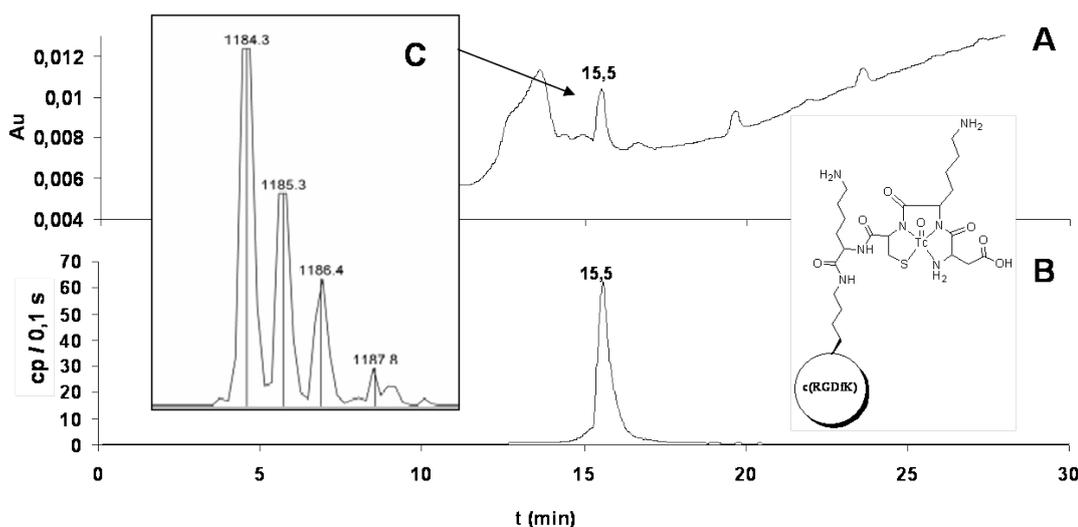


FIG. II.11 – Chromatogrammes HPLC de $^{99g}\text{Tc-3}$ (détection UV - 254 nm, **A**) et de $^{99m}\text{Tc-3}$ (détection γ , **B**). HPLC Varian, colonne C18 analytique, gradient 0-100% B en 30 min. Spectre de masse de $^{99g}\text{Tc-3}$ (**C**).

La complexation du ^{99m}Tc par le ligand **4** a été effectuée par transchélation de l'intermédiaire gluconate pour donner $^{99m}\text{Tc-4}$. Une étape préalable de réduction du disulfure du motif NS_2 a été réalisée juste avant la métallation à l'aide de tributylphosphine 1% dans de l'éthanol dégazé à l'argon. Le milieu réactionnel a ensuite été dilué dans du tampon PBS pour atteindre une concentration optimale de $500\ \mu\text{M}$ et disposer ainsi d'une solution au pH physiologique directement injectable *in vivo*. Les meilleurs résultats en termes de pureté ont été obtenus en incubant un mélange ^{99m}Tc -gluconate/ligand ($500\ \mu\text{M}$) 1/1 (v/v) pendant 30 min à 90°C . Ces conditions sont issues d'une optimisation portant sur la concentration en ligand dans le mélange de complexation, sur la température et sur le temps d'incubation. Des essais ont également été réalisés pour augmenter le volume de ^{99m}TcO -gluconate à introduire tout en conservant la même concentration finale de complexant. Nous souhaitons en effet pouvoir disposer d'une activité maximale dans un volume minimum, puisque les injections intraveineuses dans la queue des souris ne peuvent dépasser un volume de $100\ \mu\text{L}$. Nous avons ainsi pu atteindre des activités de 13 à 18 MBq/ $100\ \mu\text{L}$ pour les tests *in vivo*. Un essai de transchélation à partir de l'intermédiaire tartrate a été réalisé pour comparaison avec la méthode de marquage décrite précédemment [Haubner 04a]. Cependant, le complexe n'a pas été obtenu dans ces conditions. Comme précédemment, un co-marquage au $^{99m/99g}\text{Tc}$ a permis de confirmer la formation des complexes de technétium $^{99m}\text{Tc-4}$ (HPLC : $t_R = 17,6\ \text{min}$) et $^{99g}\text{Tc-4}$ ($t_R = 17,5\ \text{min}$, $m/z = 1124,1\ [\text{M} + \text{H}^+]$) (Fig. II.12). Là encore, le massif isotopique observé est caractéristique d'une molécule à trois atomes de soufre. La complexation au rhénium, réalisée avec le précurseur tétrabutylammonium tétrachlorooxorhénate, a conduit au produit **Re-4** qui a été purifié par HPLC.

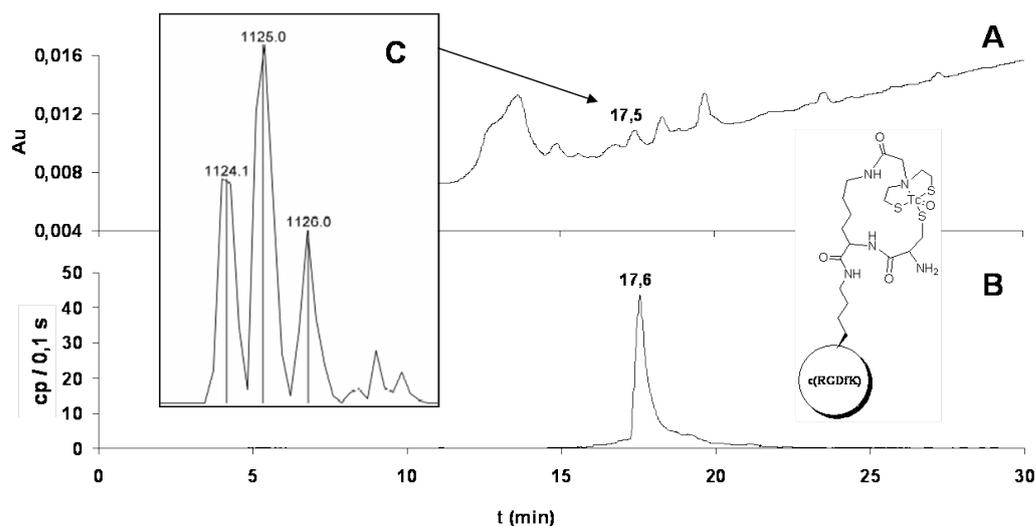


FIG. II.12 – Chromatogrammes HPLC de $^{99g}\text{Tc-4}$ (détection UV - $254\ \text{nm}$, **A**) et de $^{99m}\text{Tc-4}$ (détection γ , **B**). HPLC Varian, colonne C18 analytique, gradient 0-100% B en 30 min. Spectre de masse de $^{99g}\text{Tc-4}$ (**C**).

L'assemblage, par coordination du cœur oxotechnétium, du ligand (NS₂)-c(RGDfK) **5** avec la cystéine a été problématique et a nécessité une importante mise au point qui reste imparfaite. Le ligand **5** a été préalablement réduit avec une solution de tributylphosphine. Dès les premiers essais de marquage, nous avons obtenu plusieurs pics en radio-HPLC que nous avons pu identifier comme correspondant d'une part au complexe bimoléculaire attendu entre la cystéine et le ligand **5** et d'autre part à la complexation exclusive de la cystéine ou du ligand NS₂ (Fig. II.13 **B** et II.14). L'identification du complexe attendu a été possible par comparaison des temps de rétention HPLC entre les complexes ^{99m}Tc-**5** (HPLC : t_R = 18,5 min) et ^{99g}Tc-**5**, ce dernier ayant été identifié par LC-MS (t_R = 18,3 min, m/z = 1014,0 [M + H⁺]) (Fig. II.13). Le pic à 14,8 min a été identifié comme un complexe de cystéine, Cys-^{99m}TcO-Cys, aussi bien en ^{99g}Tc (Fig. II.13) qu'en ^{99m}Tc (Fig. II.14). Le pic à 3,9 min correspond à du technétium libre réduit (Fig. II.14).

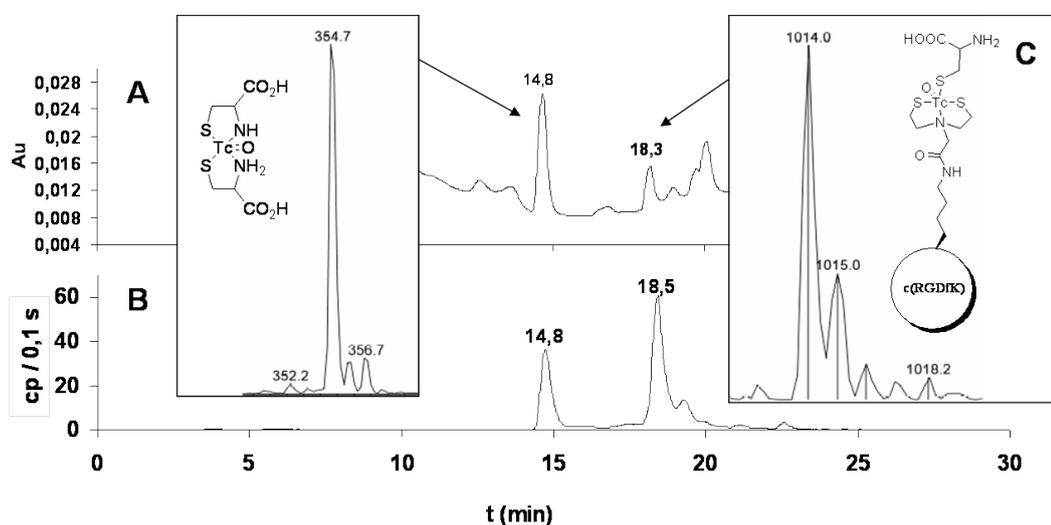


FIG. II.13 – Chromatogrammes HPLC de ^{99g}Tc-**5** (détection UV - 254 nm, **A**) et de ^{99m}Tc-**5** (détection γ , **B**). HPLC Varian, colonne C18 analytique, gradient 0-100% B en 30 min. Spectres de masse de ^{99g}Tc-**5** (**C**) et de Cys-^{99g}TcO-Cys avec sa structure supposée (**D**).

Des essais de transchélation de l'intermédiaire tartrate se sont avérés négatifs alors que le complexe a pu être mis en évidence par transchélation du ^{99m}TcO-gluconate. Nous avons montré que l'ajout du ^{99m}TcO-gluconate dans la solution de **5** réduit, suivi de la cystéine était préférable à l'ajout de l'intermédiaire gluconate sur un mélange des deux entités complexantes. Ce résultat reflète probablement la différence de cinétique de complexation qui serait curieusement plus rapide pour la cystéine que pour le ligand **5**. On peut supposer que l'addition de ^{99m}TcO-gluconate sur **5** réduit permet la formation d'un premier intermédiaire, l'ajout de cystéine permettant d'obtenir le complexe attendu (Fig. II.15 A). Lorsque que la cystéine est présente dès le départ, la transchélation conduirait préférentiellement au dimère de cystéine (Fig. II.15 B).

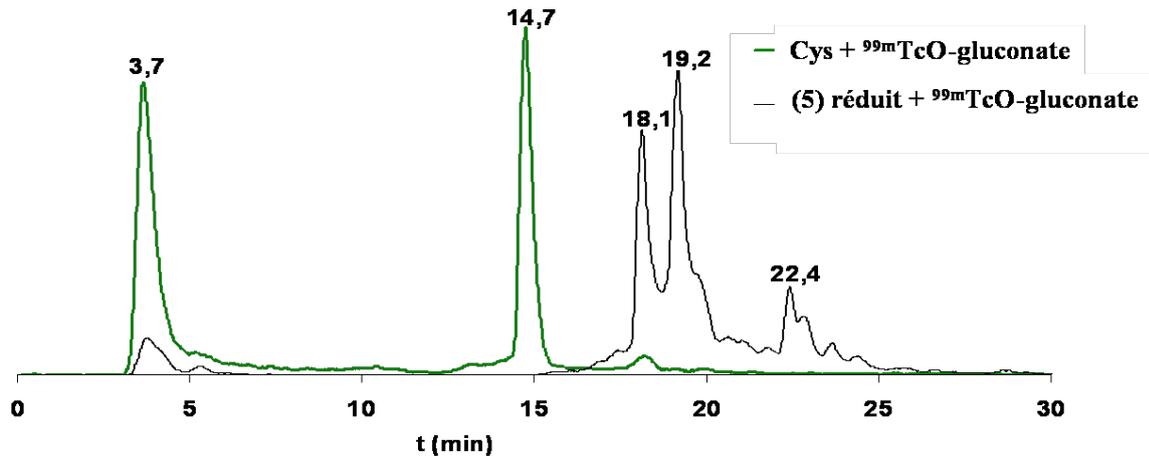


FIG. II.14 – Chromatogrammes HPLC des mélanges obtenus après incubation de ^{99m}TcO -gluconate avec de la cystéine ou du ligand **5** réduit. HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.

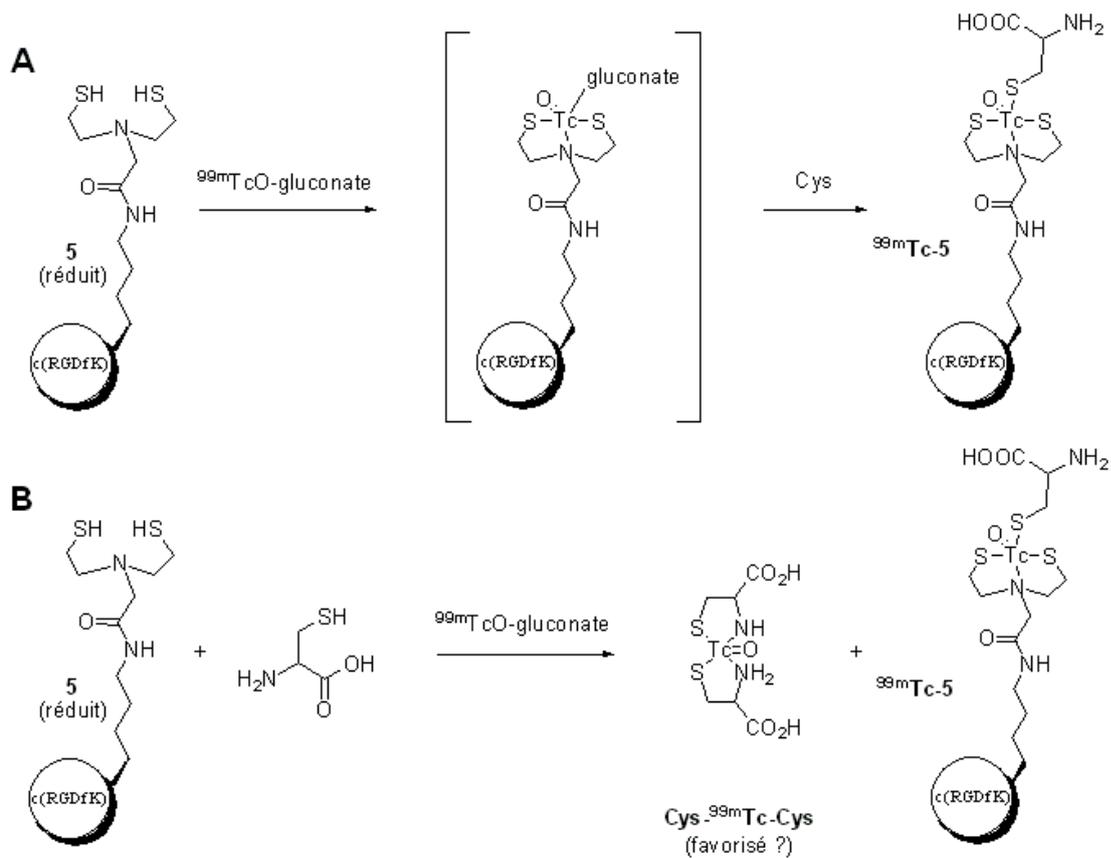


FIG. II.15 – Hypothèses de transchélation pour rendre compte de la formation du dimère de cystéine lors du marquage au ^{99m}Tc .

L'optimisation du marquage au ^{99m}Tc a ensuite porté sur la détermination de la concentration optimale en ligands dans le mélange de complexation ainsi que sur la température et le temps d'incubation. La proportion la plus importante de complexe attendu par rapport aux produits secondaires a été obtenue avec une concentration finale de chacun des ligands de 250 μM et une incubation de 15 min à 90°C.

II.3.2 Tests *in vivo* avec les composés modèles

Les composés $^{99m}\text{Tc-3}$ et $^{99m}\text{Tc-4}$ ont été radiomarqués juste avant leur injection *in vivo*. L'étude a été menée sur 8 souris ayant développé une tumeur U87-MG. Pour chacun des composés, deux souris ont été injectées avec une solution de traceur et ont été sacrifiées après 1 ou 3 h. Deux autres animaux ont été injectés avec le composé marqué au ^{99m}Tc en mélange avec 250 μg de l'équivalent rhénié et ont également été sacrifiés après 1 ou 3 h. Les activités injectées sont reportées dans le tableau II.3, elles sont corrigées de la décroissance radioactive et du bruit de fond.

TAB. II.3 – Activités injectées lors des tests *in vivo* de $^{99m}\text{Tc-3}$ et $^{99m}\text{Tc-4}$, activité des tumeurs isolées après sacrifice et pourcentage d'activité dans les tumeurs par rapport à l'activité totale injectée. Les activités sont corrigées de la décroissance radioactive et du bruit de fond.

Produit	Temps avant le sacrifice	Activité injectée - Ai (MBq)	Activité dans la tumeur - At (MBq)	%ID At/Ai (%)
$^{99m}\text{Tc-3}$	1h	78,5	0,39	0,49
	3h	69,6	0,22	0,32
$^{99m}\text{Tc-3}$ + Re-3	1h	65,8	0,071	0,11
	3h	63,8	0,049	0,08
$^{99m}\text{Tc-4}$	1h	18,6	0,17	0,91
	3h	18,5	0,080	0,43
$^{99m}\text{Tc-4}$ + Re-4	1h	12,8	0,072	0,56
	3h	13,0	(0,088)	(0,68)

Après le sacrifice, les tumeurs ont été isolées et leur activité mesurée. La proportion de radioactivité contenue dans la tumeur varie entre 0,08 et 0,91% de l'activité totale injectée (%ID), les pourcentages les plus élevés étant en général obtenus une heure après injection. Sachant qu'avec des traceurs optimisés, seuls 1 à 2% de l'activité injectée sont retrouvés dans les tumeurs, les valeurs trouvées dans cette étude restent acceptables. Comme attendu, le pourcentage corrigé de radioactivité détectée dans la tumeur diminue au cours du temps pour $^{99m}\text{Tc-3}$, traduisant l'élimination du produit. Dans le cas de $^{99m}\text{Tc-4}$, la

proportion de radioactivité retenue dans la tumeur augmente lors du test de compétition avec le composé rhénié. Ce résultat est assez surprenant et nous l'avons interprété comme un artefact, l'expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois.

Les tumeurs ont ensuite été extraites et les surnageants analysés par radio-HPLC (détection γ). Les chromatogrammes obtenus sont représentés dans les figures II.16 et II.17, l'intensité ayant été corrigée de la décroissance radioactive.

Le composé $^{99m}\text{Tc-3}$ a pu être mis en évidence dans les extraits de tumeur ($t_R = 15,7$ min) lorsqu'il a été injecté seul aux souris (Fig. II.16). Le pic de $t_R = 3,9$ min correspond à du technétium libre réduit comme cela a été montré en II.2. Il peut provenir de la dégradation du traceur après injection *in vivo* ou au moment de l'extraction de la tumeur. Le signal observé à 13,1 min pourrait être associé à un produit de dégradation du complexe. En effet, Haubner *et al.* avaient eux aussi mis en évidence la formation d'un métabolite lors des tests *in vivo*, mais sans l'avoir identifié. Les pourcentages des différentes espèces présentes sont donnés dans le tableau II.4. La proportion de $^{99m}\text{Tc-3}$ diminue au cours du temps (-11,7%) au profit du technétium libre réduit (+8,4%) et du produit de dégradation (+3,2%).

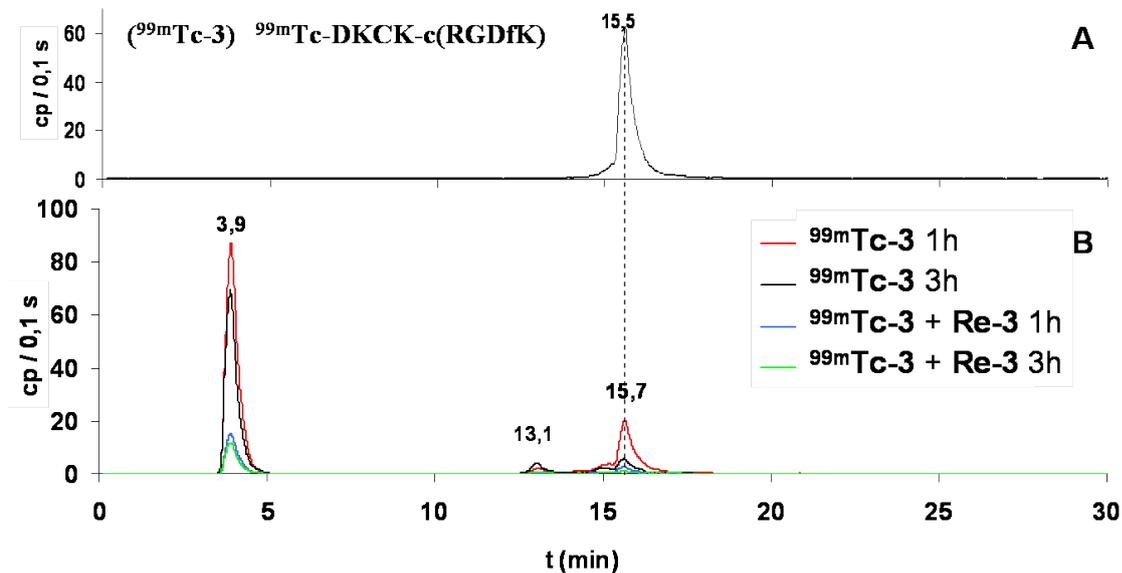


FIG. II.16 – Radio-chromatogramme de $^{99m}\text{Tc-3}$ (A) et analyse de 500 μL des extraits de tumeurs (B). L'intensité est corrigée de la décroissance radioactive. HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.

Lors des expériences de compétition avec l'équivalent rhénié, les proportions des différentes espèces identifiées par HPLC suivent une évolution semblable à celle observée précédemment, bien que moins marquée : -6,4% pour $^{99m}\text{Tc-3}$, +2,2% pour le technétium libre réduit et +4,2% pour le produit de $t_R = 13,1$ min. La différence notable observée

pour le test de compétition est la proportion de radioactivité retenue dans la tumeur, puisqu'elle représente le quart de la valeur trouvée pour le traceur seul, ce qui est en accord avec l'existence de sites saturables (Tab. II.3). Le composé rhénié rentre donc en compétition avec le traceur technétié dont il inhibe partiellement la fixation aux sites.

TAB. II.4 – Pourcentages, calculés sur les aires HPLC (aire pic/aire totale), des différentes espèces présentes (t_R) dans les extraits de tumeurs après injection *in vivo* de $^{99m}\text{Tc-3}$.

		3,9 min	13,1 min	15,7 min	autre
$^{99m}\text{Tc-3}$	1h	71,1	2,4	20,6	6,0
	3h	79,5	5,6	8,9	6,1
$^{99m}\text{Tc-3}$ + Re-3	1h	71,2	3,2	17,1	8,5
	3h	73,4	7,4	10,7	8,6

L'interprétation des résultats de l'analyse des extraits de tumeur après injection de $^{99m}\text{Tc-4}$ s'est avérée moins évidente que pour $^{99m}\text{Tc-3}$ (Fig. II.17). Comme précédemment, du technétium libre réduit est observé, représentant en moyenne 36% de l'activité totale (Tab. II.5). Cette proportion est inférieure à celle obtenue dans le cas précédent ($\sim 74\%$) et pourrait être expliquée par une meilleure résistance de l'espèce complexante lors de son transfert vers la tumeur ou lors de l'extraction des tumeurs. Toutefois, on observe un massif légèrement retardé ($t_R = 19,0$ min) par rapport au produit attendu et aucun pic correspondant au composé injecté ($t_R = 17,6$ min) n'est présent.

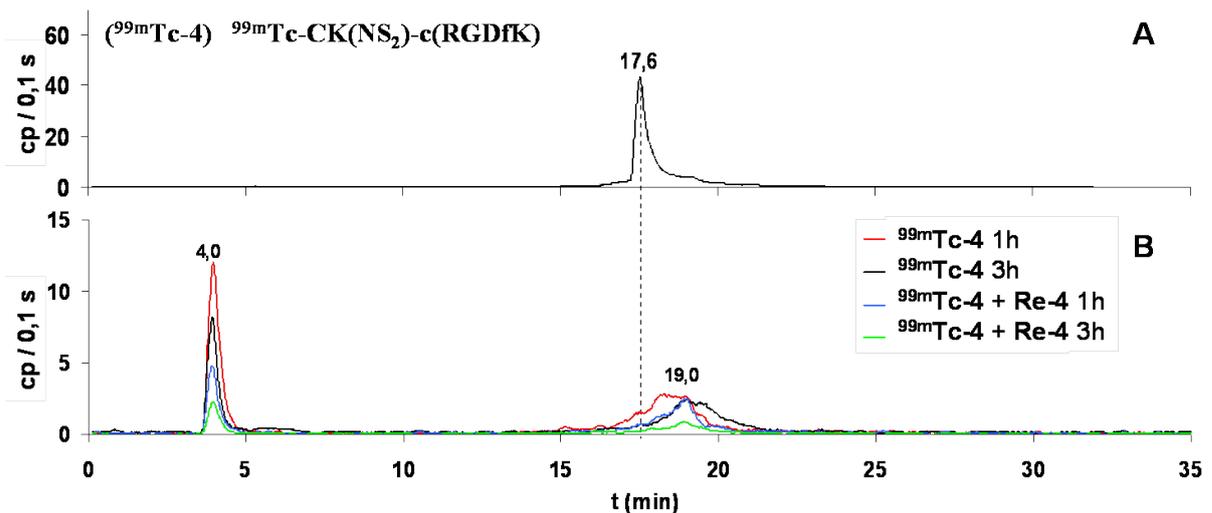
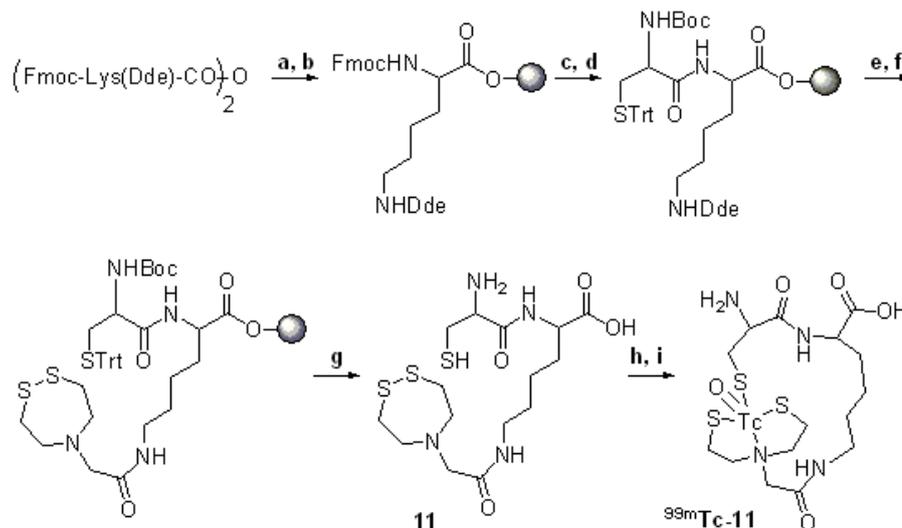


FIG. II.17 – Radio-chromatogrammes de $^{99m}\text{Tc-4}$ (A) et analyse de 500 μL des extraits de tumeurs (B). L'intensité est corrigée de la décroissance radioactive. HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.

TAB. II.5 – Pourcentages, calculés sur les aires HPLC (aire pic/aire totale), des différentes espèces présentes (t_R) dans les extraits de tumeurs après injection *in vivo* de $^{99m}\text{Tc-4}$.

		4,0 min	massif à 19,0 min
$^{99m}\text{Tc-4}$	1h	42,3	57,7
	3h	33,5	66,5
$^{99m}\text{Tc-4}$ + Re-4	1h	31,9	68,1
	3h	36,4	63,6

Ce résultat suggère la formation de nouvelles espèces, probablement par métabolisation du traceur. L'une des dégradations possibles pourrait provenir de la coupure de la liaison amide au niveau de la chaîne latérale de la lysine (coupure de type endoprotéasique), conduisant au relargage du c(RGDfK) d'une part et de $^{99m}\text{Tc-CK(NS}_2)$ ($^{99m}\text{Tc-11}$) d'autre part (Fig. II.18). Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons synthétisé le ligand **11** et l'avons cyclisé par coordination du technétium.



a) résine Wang, DMAP, DMF ; b) capping : C-Bzl, DIPEA, DMF ; c) pipéridine/DMF 1/4 ;
d) Boc-Cys(Trt)-OH, HATU, DIPEA, DMF ; e) hydrazine/DMF 2/98 ; f) **10**, HATU, DIPEA,
DMF ; g) TFA/TIPS/H₂O 95/2.5/2.5 ; h) PBU₃ 10% MeOH ; i) ^{99m}Tc -gluconate.

FIG. II.18 – Synthèse du fragment **CK(NS₂)** et complexation par le ^{99m}Tc .

La synthèse de **11** a été réalisée sur une résine Wang (Fig. II.18). La Fmoc-Lys(Dde)-OH activée sous forme d'anhydride symétrique a tout d'abord été greffée sur la résine, puis la Boc-Cys(Trt)-OH a été couplée en présence d'HATU. La déprotection de la chaîne latérale de la lysine a permis d'introduire le précurseur de NS₂ **10**. Le fragment **11** a finalement été obtenu par traitement en milieu acide et purifié par HPLC préparative. Après réduction du disulfure et dilution dans du tampon PBS, le fragment a été complexé

au ^{99m}Tc par transchélation de l'intermédiaire gluconate, avec une incubation de 15 min à 90°C ou de 30 min à 50°C. Dans les deux cas, nous avons observé un massif avec entre autres deux pics distincts à 17,1 et 18,3 min, suggérant la présence d'au moins 2 diastéréomères et reflétant sans doute la relative flexibilité du cycle (Fig. II.19). Le massif obtenu se superpose en partie avec celui observé lors de l'étude *in vivo*. La formation de ce petit complexe cyclique, obtenu par dégradation de type trypsique du complexe $^{99m}\text{Tc-4}$ pourrait donc expliquer ces résultats.

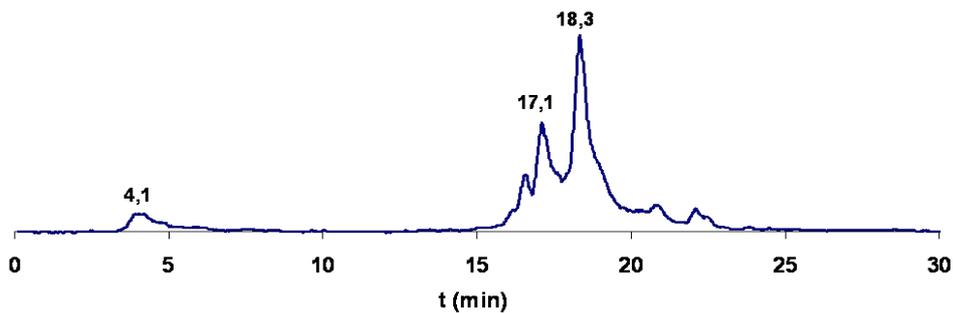


FIG. II.19 – Radio-chromatogramme de $^{99m}\text{Tc-11}$, HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.

Les tests *in vivo* de $^{99m}\text{Tc-3}$ et $^{99m}\text{Tc-4}$ nous ont donc permis de valider la méthode d'extraction de tumeur. Nous avons pu identifier les produits injectés *in vivo* dans les extraits de tumeur et nous avons mis en évidence la formation de technétium libre réduit dans les deux cas. Par ailleurs, des produits de dégradation peuvent également être identifiés par cette approche analytique.

Deux essais *in vivo* ont été réalisés pour le $^{99m}\text{Tc-5}$ mais n'ont donné qu'un pic à 3,9 min (^{99m}Tc libre réduit) lors de l'analyse des extraits de tumeurs et le produit attendu $^{99m}\text{Tc-5}$ n'a pu être mis en évidence (Fig. II.20 B). Lors des radio-HPLC de contrôle des solutions injectées, réalisées 4 à 5 h après la synthèse des complexes, seul le dimère Cys- $^{99m}\text{TcO-Cys}$ a pu être identifié (Fig. II.20 A). Le délai entre la synthèse et l'analyse de la solution utilisée *in vivo* pourrait avoir contribué à favoriser la formation de Cys- $^{99m}\text{TcO-Cys}$ aux dépens de $^{99m}\text{Tc-5}$. Les contraintes de temps des tests *in vivo* et la durée des analyses HPLC ne nous ont pas permis d'analyser les solutions juste avant leur injection, ce qui aurait permis de trancher sur la présence de $^{99m}\text{Tc-5}$. Par ailleurs, nous ne pouvons exclure que le complexe bimoléculaire $^{99m}\text{Tc-5}$ soit instable et qu'il se soit dégradé *in vivo* ou lors de l'extraction des tumeurs. Nous reviendrons sur la stabilité des complexes bimoléculaires dans le chapitre III.

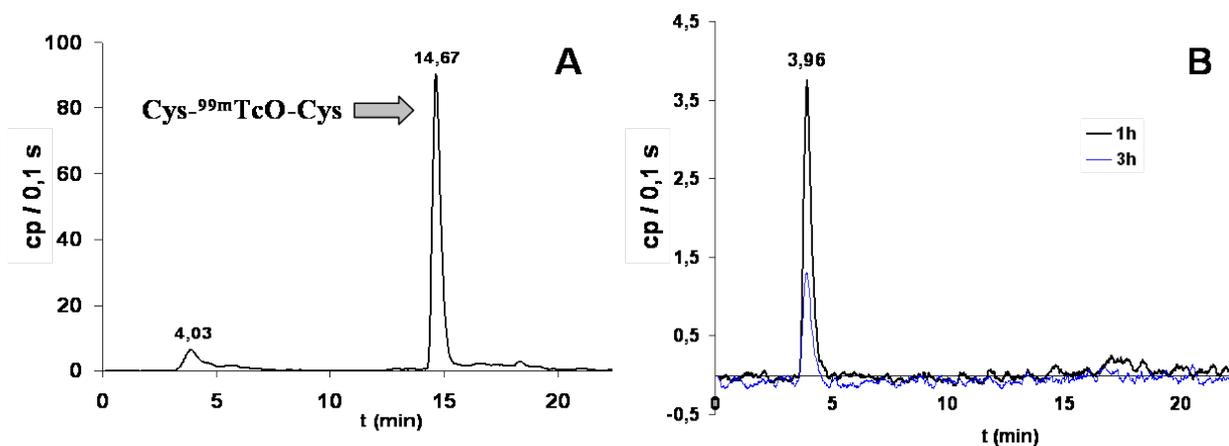


FIG. II.20 – Radio-chromatogramme de la solution de $^{99m}\text{Tc-5}$, réalisé 4 h après le marquage (A), et analyse de 450 μL des extraits de tumeur prélevées 1 h ou 3 h après injection (B). L'intensité est corrigée de la décroissance radioactive. HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.

Conclusion

En vue d'études *in vivo*, nous avons choisi comme modèle tumoral des souris nude portant des tumeurs U87-MG. A l'aide du composé tritié $^3\text{H-1}$, nous avons mis en évidence l'existence de sites saturables. D'autre part, la compétition avec un autre antagoniste de $\alpha_V\beta_3$, **c(RGDyV) 2**, suggère que l'interaction est bien spécifique de cette intégrine.

Le devenir *in vivo* du pertechnétate $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et de l'intermédiaire ^{99m}TcO -gluconate a été étudié. Nous avons montré que ces deux produits sont retrouvés sous forme de technétium libre réduit et qu'ils ne peuvent être distingués dans les extraits de tumeurs.

Nous avons validé le test d'extraction des tumeurs et d'identification des produits s'y étant accumulé à l'aide de traceurs modèles. Le $^{99m}\text{Tc-3}$, connu pour cibler l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, a servi de base pour la conception du $^{99m}\text{Tc-4}$ qui constitue un modèle des complexes cycliques intramoléculaires que nous souhaitons développer. Le $^{99m}\text{Tc-3}$ a pu être clairement identifié dans l'extrait de tumeur et le $^{99m}\text{Tc-4}$ a été retrouvé majoritairement sous la forme d'un produit de clivage, $^{99m}\text{Tc-11}$. Dans les deux cas, du technétium libre réduit a également été identifié, traduisant le relargage de technétium par dégradation d'une partie des traceurs. Cette dégradation peut avoir eu lieu *in vivo* ou lors de l'extraction des tumeurs au cours de laquelle certaines cellules sont endommagées. Les différences structurales entre $^{99m}\text{Tc-4}$ et les traceurs cycliques faisant l'objet de ce projet, notamment une plus grande flexibilité, pourraient expliquer l'instabilité apparente de $^{99m}\text{Tc-4}$. La sensibilité de $^{99m}\text{Tc-4}$ à la coupure protéolytique n'est cependant pas significative d'une instabilité métabolique des peptides cyclo-RGD puisqu'il semble bien qu'elle intervienne au niveau d'une liaison amide acyclique.

Un modèle des complexes bimoléculaires envisagés dans notre projet a également été testé ($^{99m}\text{Tc-5}$). L'analyse des extraits de tumeurs n'a pas permis de mettre en évidence une accumulation tumorale de ce composé puisque seul du technétium libre réduit a été identifié. Des difficultés de marquage ont été rencontrées pour ce traceur, et la formation simultanée de Cys-TcO-Cys a été observée.

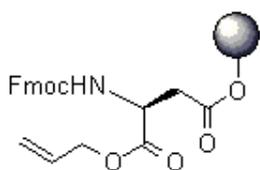
L'ensemble de ces résultats suggère qu'une méthode d'identification directe (extraction puis analyse HPLC) pourrait être envisagée pour les composé cycliques et que la déconvolution sera préférable pour identifier d'éventuels traceurs acycliques actifs.

Partie expérimentale - Chapitre II

Les procédures courantes sont présentées dans l'annexe générale, en particulier les généralités sur la synthèse sur support solide ainsi que les méthodes HPLC.

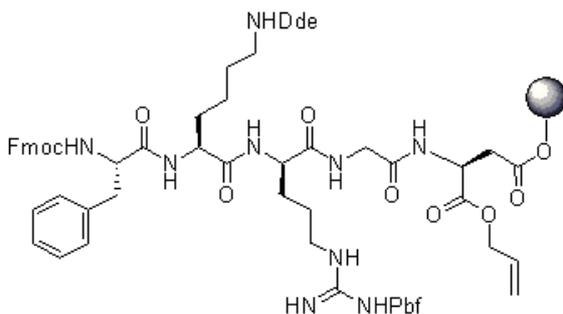
Synthèses

Synthèse de la résine Wang-c(RGDfK)



Greffage de Fmoc-Asp-OAll sur résine Wang. Le Fmoc-Asp-OAll (1,19 g, 3 mmol, 6 eq.) est dissous dans 10 mL de DCM avec de la DCC (309 mg, 1,5 mmol, 3 eq.). Le mélange est agité à 0°C pendant 10 min formant un précipité. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut est repris dans de la DMF (6 mL). La dicyclohexylurée insoluble est éliminée par filtration sur fritté. De la DMAP (6,1 mg, 0,05 mmol, 0,1 eq.) est ajoutée à la résine Wang conditionnée dans de la DMF (833 mg de résine à 0,6 mmol/g, 0,5 mmol, 1 eq. de fonctions réactives) suivie du filtrat contenant l'anhydride symétrique. Le mélange est agité pendant une nuit puis la résine est lavée et séchée selon la procédure standard. Le rendement de couplage, déterminé par dosage Fmoc, est quantitatif.

Capping. La résine est suspendue dans de la DMF (10 mL). De la DIPEA (870 μ L, 5 mmol, 10 eq.) puis du chlorure de benzyle (290 μ L, 2,5 mmol, 5 eq.) sont ajoutés et le mélange est agité pendant 1 h.



Couplages. Les étapes classiques de déprotection du groupement Fmoc, lavages et couplages ont permis d'ajouter la Fmoc-Gly-OH, la Fmoc-Arg(Pbf)-OH, la Fmoc-Lys(Dde)-OH et la Fmoc-D-Phe-OH.

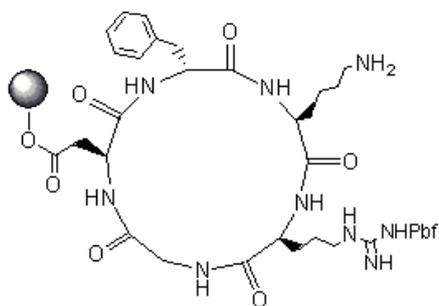
Les acides aminés Fmoc-X-OH (1 mmol, 2 eq.) sont mélangés pendant 2 min avec du HATU (380 mg, 1 mmol, 2 eq.) en présence de DIPEA (348 μ L, 2 mmol, 4 eq.) dans de

la DMF (5 mL). Ce mélange est ajouté à la résine après déprotection du groupement Fmoc, suivi de 5 mL de DMF. L'ensemble est agité pendant 30 min. Un double couplage est réalisé avec une agitation pendant 1 h. Après chaque couplage et chaque déprotection, des tests de Kaiser et au TNBS sont réalisés afin d'évaluer l'avancement de la réaction.

Déprotection de l'allyl. La déprotection de l'allyl a été réalisée d'après le protocole décrit par Kates *et al.* et amélioré par Delforge *et al.* [Kates 93, Delforge 96]. Le tetrakis-triphénylphosphine palladium(0) (1,73 g, 1,5 mmol, 3 eq.) est ajouté à la résine dans un mélange $\text{CHCl}_3/\text{AcOH}/\text{NMM}$ 92,5/5/2,5 et l'ensemble est agité pendant 2 h. Le processus de lavage est spécifique et fait appel successivement aux solvants suivants :

- DIPEA 0,5% dans de la DMF ,
- diéthylthiocarbamate de sodium 0,5% dans de la DMF,
- DMF,
- DIPEA 8% dans du DCM,
- DMF,
- DCM.

Comme dans la procédure classique, chaque étape est répétée 3 fois et dure 1 min.



Cyclisation et déprotection du groupement

Dde. Après déprotection du groupement Fmoc, du HATU (380 mg, 1 mmol, 2 eq.) et de la DIPEA (348 μL , 2 mmol, 4 eq.) sont ajoutées à la résine dans de la DMF (10 mL). Le mélange est agité pendant une nuit.

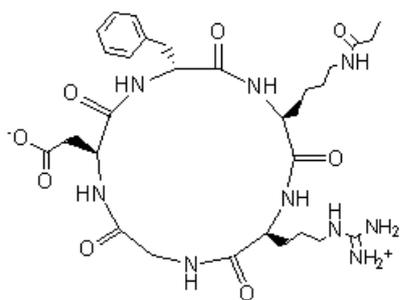
La résine est agitée pendant 3 min dans un mélange hydrazine/DMF 2-98. Cette étape est répétée deux fois. Après les étapes classiques de lavage, la substitution (S) en c(RGDfK) de la résine est déterminée

par un test de Kaiser quantitatif. Les différentes synthèses réalisées ont conduit à $S = 0,11$ à $0,18$ mmol/g ($S_{th} = 0,4$ mmol/g). Des aliquots de résine ont également été décrochés et déprotégés avec le mélange TFA/TIPS/ H_2O 95/2,5/2,5. Le produit brut formé a été analysé en ES^+/MS et correspond bien au c(RGDfK) ($m/z = 604,3$, $\text{M} + \text{H}^+$).

La résine substituée par le c(RGDfK), Wang-c(RGDfK), a été conservée à -20°C .

Synthèse des dérivés du c(RGDfK)

Les composés **1**, $^3\text{H-1}$ et **2** ont été synthétisés sur la résine Wang-c(RGDfK), le peptide c(R(Pbf)GDfK) étant greffé sur la résine par la chaîne latérale de l'acide aspartique.



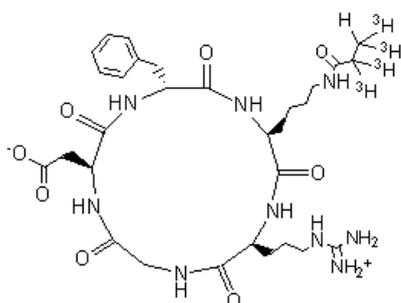
Propionyl-c(RGDfK) 1. La résine **Wang-c(RGDfK)** (210 mg de résine à 0,175 mmol/g, 37 μmol , 1 eq. de fonctions réactives) est suspendue dans de la DMF (1 mL). De la DIPEA (32 μL , 184 μmol , 5 eq.) est ajoutée, suivie de chlorure de propionyle (16 μL , 184 μmol , 5 eq.). Le mélange est agité pendant 30 min et le couplage est contrôlé par des tests de Kaiser et au TNSB. Après lavage, la résine est agitée pendant 1 h dans un mélange TFA/TIPS/ H_2O

95/2,5/2,5, puis la solution est filtrée. Cette étape est répétée deux fois. Les filtrats sont rassemblés, le solvant est évaporé sous vide et le mélange est précipité au *tert*-butylméthyl éther. Le précipité est lyophilisé, puis purifié par HPLC préparative (HPLC Varian) avec un gradient 15-30% B en 30 min ($t_R = 16,5$ min). Un solide blanc est obtenu après lyophilisation. $m = 7,2$ mg, Rdt = 30%.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 18,1$ min ;

LC-MS : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 20,5$ min, m/z 660,2 ($M + \text{H}^+$) ;

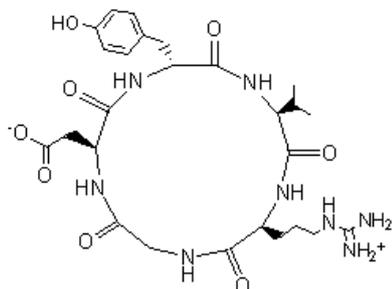
ES/MS (ionisation positive) : m/z 660,29 ($M + \text{H}^+$), 330,72 ($M + 2\text{H}^+$).



[^3H]-propionyl-c(RGDfK) ^3H -1. Une solution (S1) contenant du *N*-propionyl-succinimide (NPS) froid (7,5 mg, 45 μmol) et de la DIPEA (43 μL , 250 μmol) est préparée dans de la DMF anhydre (5 mL). La résine **Wang-c(RGDfK)** (6,25 mg de résine à 0,16 mmol/g, 1 μmol , 1 eq. de fonctions réactives) est suspendue dans de la DMF anhydre (1 mL) et conditionnée pendant 1 h. Après élimination du solvant, du NPS tritié (10 mCi, environ 0,4 μmol , $> 0,1$ eq., RAS = 77 Ci/mmol avec 1/3 de NPS)

en solution dans de la DMF (400 μL) est ajouté, immédiatement suivi de la solution S1 (100 μL , 0,9 μmol de NPS froid, 0,9 eq. et 5 μmol de DIPEA, 5 eq.). Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. Une solution (S2) contenant du NPS froid (1,7 mg, 10 μmol) et de la DIPEA (3,5 μL , 20 μmol) est préparée dans de la DMF anhydre (1 mL). Sans éliminer le mélange réactionnel précédent, la solution S2 (500 μL , 5 μmol de NPS froid, 5 eq. et 10 μmol de DIPEA, 10 eq.) est ajoutée et l'ensemble est agité pendant 2 h. Le solvant est éliminé et la résine est abondamment rincée avec de la DMF pour éliminer le maximum de radioactivité non fixée. De la solution S2 (500 μL) est ajoutée et le mélange est agité pendant 2 h. Le solvant est éliminé et la résine rincée avec 1 mL de DMF (3×4 min) puis 1 mL de DCM (3×4 min) et enfin 1 mL de MeOH (3×4 min). Le décrochage est réalisé en ajoutant successivement 25 μL d'eau, 25 μL de TIPS et 950 μL de TFA. Le mélange est agité pendant 1 h puis le surnageant est filtré. La même opération est répétée pendant 15 min. Les filtrats sont rassemblés et évaporés. Le produit

brut est repris dans un mélange H₂O/AcN 1/1 (1 mL) puis purifié par HPLC sur une colonne analytique (Waters, Atlantis dC18, 5 μ m 4,6 \times 250 mm) avec une détection en UV (220 nm) et radioactivité (liquide scintillant : Ultima Flo-AP), gradient linéaire passant de 0 à 100% B de 0 à 30 min, puis système isocratique à 100 % B de 30 à 40 min suivi d'une ré-équilibration de la colonne (A : H₂O + 0,1% d'acide formique, B : H₂O/AcN 1/9 + 0,1% d'acide formique), $t_R = 13,5$ min. La HPLC utilisée est une Gilson Dynamic Mixer 811, équipée d'un détecteur UV 117, de pompes 302 et reliée à un détecteur de radioactivité Berthold LB 507A.



c(RGDyV) 2. Le composé **2** a été synthétisé dans les mêmes conditions que la résine **Wang-c(RGDfK)**. La Fmoc-Lys(Dde)-OH et la Fmoc-*D*-Phe-OH sont remplacées respectivement par la Fmoc-Val-OH et la Fmoc-*D*-Tyr(OtBu)-OH. Après cyclisation du peptide et lavage, la résine est agitée pendant 1,5 h dans un mélange TFA/TIPS/H₂O 95/2,5/2,5 puis la solution est filtrée. Cette étape est répétée pendant 30 min. Les filtrats sont rassemblés, le solvant est évaporé sous vide et le mélange

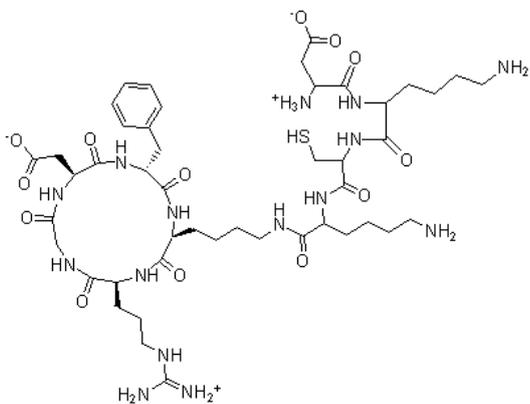
est précipité au *tert*-butylméthyl éther. Le précipité est lyophilisé, puis purifié par HPLC préparative (HPLC Waters-3) avec un gradient 0-100% B en 30 min ($t_R = 17,1$ min) sur une colonne préparative Varian. Un solide blanc est obtenu après lyophilisation. $m = 127$ mg, Rdt = 43%.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 16,4$ min ;

LC-MS : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 19,2$ min, m/z 591,3 ($M + H^+$) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 591,3 ($M + H^+$).

Synthèse des ligands modèles

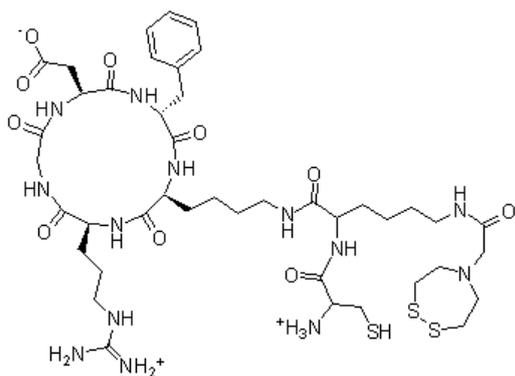


DKCK-c(RGDfK) 3. Les étapes classiques de déprotection du groupement Fmoc, lavages et couplages ont permis d'ajouter successivement la Fmoc-Lys(Boc)-OH, la Fmoc-Cys(Trt)-OH, la Fmoc-Lys(Boc)-OH et le Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH sur la résine **Wang-c(RGDfK)** au niveau de la chaîne latérale de la lysine. La synthèse a été réalisée sur 400 mg de résine **Wang-c(RGDfK)** (0,175 mmol/g, 70 μ mol, 1 eq. de fonctions réactives). L'acide aminé Fmoc-X-OH (0,7 mmol, 10 eq.), la DCC (144 mg, 0,7 mmol, 10 eq.) et

la HOBt (95 mg, 0,7 mmol, 10 eq.) sont dissous dans de la DMF (4 mL) et ajoutés à la résine, suivis de la DIPEA (122 μ L, 0,7 mmol, 10 eq.). Le mélange est agité pendant 1,5 h. Après chaque couplage et chaque déprotection, des tests de Kaiser et au TNBS sont réalisés afin d'évaluer l'avancement de la réaction. La résine est agitée pendant 1,5 h dans un mélange TFA/TIPS/H₂O 95/2,5/2,5 (10 mL) puis la solution est filtrée. Cette étape est répétée deux fois. Les filtrats sont rassemblés, le solvant est évaporé sous vide et le mélange est précipité au *tert*-butylméthyl éther. Le précipité est lyophilisé, puis purifié par HPLC préparative (HPLC Varian) avec un gradient 0-15% B en 30 min ($t_R = 28,0$ min). Un solide blanc est obtenu après lyophilisation, correspondant au **dimère de 3**. $m = 4,7$ mg, Rdt = 6,2%.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 14,4$ min ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 2154,88 ($M + H^+$), 718,90 ($M + 3H^+$), 539,64 ($M + 4H^+$), 431,93 ($M + 5H^+$).



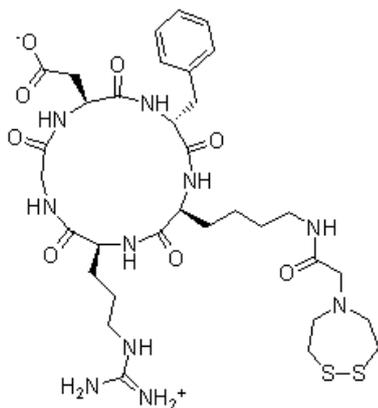
CK(NS₂)-c(RGDfK) 4. Les étapes classiques de déprotection Fmoc, lavages et couplages ont permis d'ajouter successivement la Fmoc-Lys(Dde)-OH et la Boc-Cys(Trt)-OH sur la résine **Wang-c(RGDfK)** au niveau de la chaîne latérale de la lysine. La synthèse a été réalisée sur 400 mg de résine **Wang-c(RGDfK)** (0,175 mmol/g, 70 μ mol, 1 eq. de fonctions réactives). L'acide aminé Fmoc-X-OH (0,7 mmol, 10 eq.), la DCC (144 mg, 0,7 mmol, 10 eq.) et la HOBt (95

mg, 0,7 mmol, 10 eq.) sont dissous dans de la DMF (4 mL) et ajoutés à la résine, suivis de la DIPEA (122 μ L, 0,7 mmol, 10 eq.). Le mélange est agité pendant 1,5 h. Après chaque couplage et chaque déprotection, des tests de Kaiser et au TNBS sont réalisés afin d'évaluer l'avancement de la réaction.. La déprotection du groupement Dde est réalisée par agitatiton de la résine, pendant 3 min, dans un mélange hydrazine/DMF 2-98. Cette étape est répétée deux fois. Le disulfure de *N*-bis-(thioéthyl)glycine **10** (32 mg, 0,14 mmol, 2 eq.) est mélangé pendant 2 min avec du HATU (53 mg, 0,14 mmol, 2 eq.), en présence de DIPEA (49 μ L, 0,28 mmol, 4 eq.) dans de la DMF (4 mL). Ce mélange est ajouté à la résine et l'ensemble est agité pendant 2 h. La résine est ensuite clivée par agitation pendant 1 h dans un mélange TFA/TIPS/H₂O 95/2,5/2,5 (10 mL) puis la solution est filtrée. Cette étape est répétée deux fois. Les filtrats sont rassemblés, le solvant est évaporé sous vide et le mélange est précipité au *tert*-butylméthyl éther. Le précipité est lyophilisé, puis purifié par HPLC préparative (HPLC Varian) avec un gradient 0-50% B en 30 min ($t_R = 19,8$ min). Un solide blanc est obtenu après lyophilisation, correspondant au **dimère de 4**. $m = 2,7$ mg, Rdt = 4%.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 17,5$ min ;

LC-MS : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 19,1$ min, m/z 1010,5 ($M + H^+$) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 1009,8 ($M + 2H^+$), 673,6 ($M + 3H^+$), 505,5 ($M + 4H^+$), 404,5 ($M + 5H^+$).



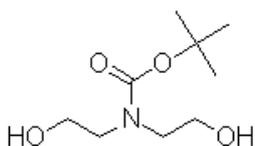
(NS₂)-c(RGDfK) 5. Le composé **10** (18,4 mg, 0,08 mmol, 7 eq.) est mélangé pendant 2 min avec du HATU (30,4 mg, 0,08 mmol, 7 eq.) en présence de DIPEA (28 μ L, 0,16 mmol, 14 eq.) dans 2 mL de DMF. Ce mélange est ajouté à 100 mg de résine **Wang-c(RGDfK)** (0,112 mmol/g, 11 μ mol, 1 eq. de fonctions réactives) et l'ensemble est agité pendant 2,5 h. La résine est ensuite clivée par agitation pendant 1 h dans un mélange TFA/TIPS/H₂O 95/2,5/2,5 (10 mL), puis la solution est filtrée. Cette étape est répétée deux fois. Les filtrats sont rassemblés, le solvant est évaporé sous vide et le mélange est précipité au *tert*-butylméthyl éther. Le

précipité est lyophilisé, puis purifié par HPLC préparative (HPLC Varian) avec un gradient 0-50% B en 30 min ($t_R = 22,4$ min). Un solide blanc est obtenu après lyophilisation. $m = 1,2$ mg, Rdt = 14%.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 18,1$ min ;

LC-MS : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 20,7$ min, m/z 779,3 ($M + H^+$).

Synthèse du précurseur de NS₂

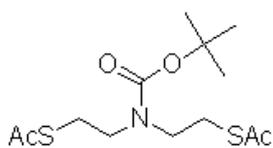


N-*tert*-butyloxycarbonyl-diéthanamine 6. De la diéthanoline (19,2 mL, 200 mmol, 1 eq.) est solubilisée dans du MeOH (250 mL) et du di-*tert*-butyloxycarbonyl (Boc₂O) (44 g, 200 mmol, 1 eq.) est ajouté par portions, suivi de DIPEA (70 mL, 400 mmol, 2 eq.).

Le mélange est agité une nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est reprise dans de l'AcOEt, la phase organique est lavée avec une solution d'acide citrique à 10%. La phase aqueuse est extraite à l'AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de NaCl, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 10/90), conduisant à une huile jaune pâle. $m = 36$ g, Rdt = 88%.

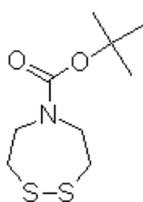
CCM : Rf = 0,55 (DCM/MeOH 9/1), révélation : acide phosphomolybdique ;

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) : δ 4,33 (bs, 2H, 2 \times OH), 3,73 (m, 4H, 2 \times CH₂-N), 3,38 (m, 4H, 2 \times CH₂-O), 1,42 (s, 9H, 3 \times CH₃).



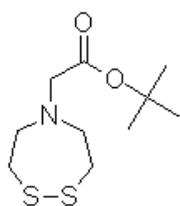
***N*-tert-butyloxycarbonyl-bis(thioacetoéthyl)amine 7.** Du diisopropylazodicarboxylate (25 mL, 120 mmol, 3 eq.) est ajouté goutte à goutte à une solution de tributylphosphine (31,5 g, 120 mmol, 3 eq.) dans du THF sec (250 mL), à 0°C, sous atmosphère d'argon. Un précipité jaune laiteux apparaît et le mélange est agité pendant 30 min. Une solution de **6** (8,2 g, 40 mmol, 1 eq.) dans du THF sec (40 mL) est ensuite ajoutée. Le mélange prend une coloration rouge. De l'acide thiolacétique (9 mL, 120 mmol, 3 eq.) est ensuite additionné et le mélange prend une coloration vert opaque. L'ensemble est agité à 0°C pendant 1 h, puis à température ambiante pendant une nuit. Le mélange présente finalement une coloration rouge sombre translucide. Le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile brune obtenue est reprise dans de l'AcOEt, la phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique à 10%. La phase aqueuse est extraite à l'AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de NaHCO₃, puis avec une solution saturée de NaCl, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Une huile brune prenant en masse est obtenue. Le mélange est mis en suspension dans de l'hexane et est filtré sur fritté pour éliminer l'oxyde de triphénylphosphine. Après évaporation, le filtrat est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 90/10), conduisant à une huile jaune. m = 11,8 g, Rdt = 92%. **CCM** : Rf = 0,25 (hexane/AcOEt 90/10), révélation : UV , acide phosphomolybdique, DTNB ;

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) : δ 3,35 (t, J = 6,8 Hz, 4H, 2 × CH₂-N), 3,01 (t, J = 6,8 Hz, 4H, 2 × CH₂-S), 2,32 (s, 6H, 2 × CH₃ Ac), 1,45 (s, 9H, 3 × CH₃ tBu).



Disulfure de *N*-tert-butyloxycarbonyl-bis(thioéthyl)amine 8. Du méthanolate de sodium (3,36 g, 62 mmol, 2 eq.) est ajouté à une solution de composé **7** (10 g, 31 mmol, 1 eq.) dans du MeOH (200 mL). Le mélange est agité vigoureusement à température ambiante, sous garde à CaCl₂, pendant 5 jours. Le solvant est évaporé sous pression réduite, du toluène est chassé deux fois. Le produit brut est repris dans de l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution d'acide citrique à 10%. La phase aqueuse est extraite à l'AcOEt. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de NaHCO₃, puis avec une solution saturée de NaCl, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 80/20), conduisant à une huile jaune pâle qui se solidifie en un solide blanc. m = 6,3 g, Rdt = 87%.

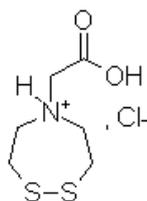
CCM : Rf = 0,59 (hexane/AcOEt 80/20), révélation : UV et acide phosphomolybdique ; **RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz)** : δ 3,71 (2d, J = 5,5 Hz, 4H, 2 × CH₂-N), 2,97 (2t, J = 5,5 Hz, 4H, 2 × CH₂-S), 1,47 (s, 9H, 3 × CH₃).



Disulfure de *N*-*tert*-butyloxycarbonyl-bis(thioéthyl)glycine 9. Le composé **8** (6,3 g, 27 mmol, 1 eq.) est déprotégé dans un mélange TFA/DCM 1/1 (200 mL) pendant 30 min. Le solvant est évaporé sous pression réduite, du toluène est chassé deux fois. L'huile brune obtenue est séchée sur une pompe à palettes. Le résidu est repris dans du DCM

(170 mL), la solution est neutralisée à la DIPEA. De la DIPEA (7 mL, 40 mmol, 1,5 eq.) et du bromoacétate de *tert*-butyle (5,8 mL, 40 mmol, 1,5 eq.) sont ajoutés. Le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 90/10), conduisant à une huile jaune pâle. $m = 6,3$ g, Rdt = 93%.

CCM : Rf = 0,19 (hexane/AcOEt 95/5), révélation : UV et acide phosphomolybdique ;
RMN ^1H (CDCl₃, 250 MHz) : δ 3,65 (s, 2H, N-CH₂-CO), 3,53 (m, 4H, 2 \times CH₂-N), 3,00 (m, 4H, 2 \times CH₂-S), 1,50 (s, 9H, 3 \times CH₃ tBu).



Hydrochlorure du disulfure de *N*-bis-(2-thioéthyl)glycine 10. Le composé **9** est dissous dans de l'acétonitrile (10 mL/mmol). Une solution 1N de HCl (10 mL/mmol) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Un solide blanc est obtenu avec un rendement quantitatif.

RMN ^1H (D₂O, 250 MHz) : δ 4,14 (s, 2H, N-CH₂-CO), 3,87 (t, J = 5,7 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N), 3,23 (t, J = 5,7 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S) ;

RMN ^{13}C (D₂O, 62,5 MHz) : δ 169,0 (C=O), 59,9 (N-CH₂-CO et CH₂-N), 34,7 (CH₂-S) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 192,9 (M + H⁺).

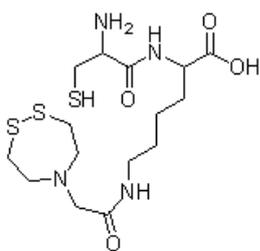
Synthèse du fragment CK(NS₂) 11

Greffage de Fmoc-Lys(Dde)-OH sur résine Wang. La Fmoc-Lys(Dde)-OH (1,06 g, 2 mmol, 4 eq.) est dissoute dans du DCM (6 mL) avec de la DCC (206 mg, 1,0 mmol, 2 eq.). Le mélange est agité à 0°C pendant 10 min jusqu'à la formation d'un précipité. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut est repris dans de la DMF (6 mL). La dicyclohexylurée insoluble est éliminée par filtration sur fritté. De la DMAP (6,1 mg, 0,05 mmol, 0,1 eq.) est ajoutée à de la résine Wang conditionnée dans de la DMF (833 mg de résine à 0,6 mmol/g, 0,5 mmol, 1 eq. de fonctions réactives), suivie du filtrat contenant l'anhydride symétrique. Le mélange est agité pendant une nuit, puis la résine est lavée et séchée selon la procédure standard. Le rendement de couplage, déterminé par dosage Fmoc, est quantitatif.

Capping. La résine est suspendue dans 10 mL de DMF. De la DIPEA (870 μL , 5 mmol, 10 eq.) et du chlorure de benzyle (290 μL , 2,5 mmol, 5 eq.) sont ajoutés et le mélange est agité pendant 1 h.

Couplage de la Bos-Cys(Trt)-OH. La Boc-Cys(Trt)-OH (464 mg, 1 mmol, 2 eq.) est agitée pendant 2 min avec du HATU (380 mg, 1 mmol, 2 eq.), en présence de DIPEA (348 μL , 2 mmol, 4 eq.) dans de la DMF (5 mL). Après déprotection des groupements Fmoc, le mélange précédent est ajouté, suivi de DMF (5 mL). L'ensemble est agité pendant 30 min, puis le couplage est recommencé pendant 1 h. Un test de Kaiser et un test au TNBS sont réalisés afin d'évaluer l'avancement de la réaction.

Déprotection du groupement Dde et couplage du précurseur de NS₂. La résine est agitée pendant 4 min dans un mélange hydrazine monohydrate/DMF 2/98. Cette étape est répétée deux fois. Le précurseur de NS₂ **10** (230 mg, 1 mmol, 2 eq.) est agité pendant 2 min avec du HATU (380 mg, 1 mmol, 1 eq.), en présence de DIPEA (348 μL , 2 mmol, 4 eq.) dans de la DMF (5 mL). Après les étapes classiques de lavage de la résine, le mélange est ajouté, suivi de DMF (5 mL). L'ensemble est agité pendant 2 h et l'efficacité du couplage est déterminée par des tests de Kaiser et au TNBS.



Déprotection et clivage. La résine est conditionnée dans du DMC, puis un mélange TFA/TIPS/H₂O 95/2,5/2,5 (10 mL) est ajouté. Le mélange est agité pendant 1 h, puis le filtrat est récupéré et l'opération recommencée. Les filtrats sont rassemblés, évaporés et le produit brut est précipité dans du *tert*-butylméthyl éther. Le précipité est repris dans un mélange H₂O/AcN 1/1 et lyophilisé, puis purifié par HPLC préparative (HPLC Varian) avec un gradient 10-20% B en 30 min ($t_R = 17,3$ min), conduisant à un solide blanc.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 16,6$ min ;

RMN ¹H (D₂O + 1 goutte de CD₃CN, 250 MHz) : δ 4,14 (t, J = 6,2 Hz, 1H, CH α Lys), 3,96 (t, J = 6,5 Hz, 1H, CH α Cys), 3,80 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3,34 (t, J = 5,5 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3,23 (t, J = 6,6 Hz, 2H, CH₂-N Lys), 3,05-2,88 (m, 6H, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂ β Cys), 1,87-1,50 (m, 6H, 3 \times CH₂ Lys) ;

RMN ¹³C (D₂O + 1 goutte de CD₃CN, 62,5 MHz) : δ 181,1 (C=O), 178,0 (C=O), 173,7 (C=O), 57,8 (C α Cys), 56,7 (2C, 2 \times CH₂-N NS₂), 56,3 (CH₂ NS₂), 53,1 (C α Lys), 39,5 (CH₂-N Lys), 38,9 (2C, 2 \times CH₂-S NS₂), 35,9-32,5-30,5-28,9 (4C, 3 \times CH₂ Lys et C β Cys) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 425,2 (M + H⁺).

Complexations

Les solvants utilisés pour la réduction des ligands et pour la complexation sont dégazés à l'argon avant usage.

Complexations au rhénium

Re-DKCK-c(RGDfK) Re-3. La complexation a été réalisée selon le protocole décrit par R. Haubner [Haubner 04b]. Un aliquot de **3** (3 μmol , 1 eq.) et du SnCl_2 (3,8 mg, 20 μmol , 6,67 eq.) sont dissous dans une solution de tartrate de sodium et de potassium 10,4 mM (1 mL) et l'ensemble est lyophilisé. Le perrhénate NaReO_4 (2 μmol , 0,67 eq.) est dissous dans une solution saline à 0,9% (100 μL) et le mélange est ajouté au lyophilisat. L'ensemble est chauffé pendant 15 min à 90°C et passe d'une coloration verte à violette. Après retour à température ambiante, le mélange est centrifugé et le culot est repris dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}$ 1/1, avec une goutte de MeOH, pour être purifié par HPLC sur colonne analytique (HPLC Varian) avec un gradient 0-15% B en 30 min. Un solide blanc est obtenu après lyophilisation, correspondant à un mélange de deux isomères du complexe. $m = 0,27$ mg.

HPLC analytique : gradient 0-15% B en 30 min, $t_R = 33,9$ et 34,3 min ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 1277,80 ($\text{M} + \text{H}^+$), 639,71 ($\text{M} + 2\text{H}^+$), 426,96 ($\text{M} + 3\text{H}^+$).

Re-CK(NS₂)-c(RGDfK) Re-4. Un aliquot de **4** (2 μmol , 1 eq.) est dissous dans du MeOH dégazé (100 μL) et une solution de tributylphosphine à 10% dans le MeOH (7,5 μL , 3 μmol , 1,5 eq.) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante. Le tétrabutylammonium de trétrachloroxorhénate (1,2 mg, 2 μmol , 1 eq.) est ajouté en solution dans du MeOH (25 μL). De la triéthylamine (2,2 μL , 16 μmol , 8 eq.) est ajouté pour que la solution atteigne un pH basique. Un précipité brun se forme et la solution est agitée pendant 1,25 h. Après centrifugation, le culot est séparé du surnageant et séché sur pompe à palettes. Le culot est repris dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}$ 1/1 et soniqué. Le mélange est centrifugé et le surnageant est lyophilisé. L'analyse LC-MS d'un échantillon du lyophilisat a mis en évidence l'existence de différents isomères du complexe attendu. Une poudre verte a été obtenue, contenant les différents isomères. $m = 2,1$ mg.

HPLC analytique : gradient 0-50% B en 30 min, $t_R = 21,7$; 22,3 et 22,7 min ;

LC-MS : gradient 0-50% B en 30 min, $t_R = 21,5$ et 25,0 min, m/z 1212,2 ($\text{M} + \text{H}^+$), 606,7 ($\text{M} + 2\text{H}^+$).

Co-marquage au $^{99g}\text{Tc}/^{99m}\text{Tc}$

$^{99g}\text{Tc-DKCK-c(RGDfK)}$ $^{99g}\text{Tc-3}$. Un aliquot de **3** (0,01 μmol , 1 eq.) est repris dans du tampon PBS (10 μL) puis la solution de $^{99g/99m}\text{TcO-gluconate}$ (10 μL), obtenue comme décrit dans l'annexe générale, est ajoutée. Le mélange est agité pendant 5 min puis centrifugé. Le surnageant est analysé par LC-MS et par HPLC.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 15,5$ min ;

LC-MS : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 17,9$ min, m/z 1184,3 (M + H⁺).

$^{99g}\text{Tc-CK(NS}_2\text{)-c(RGDfK)}$ $^{99g}\text{Tc-4}$. Un aliquot de **4** (0,05 μmol , 1 eq.) est repris dans du MeOH (10 μL) et une solution de PBU₃ à 1% dans le MeOH (5 μL) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante. La solution de $^{99g/99m}\text{TcO-gluconate}$ (10 μL), obtenue comme décrit dans l'annexe générale, est alors ajoutée et le mélange est agité pendant 5 min puis centrifugé. Le surnageant est analysé par LC-MS et par HPLC.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 17,5$ min ;

LC-MS : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 19,6$ min, m/z 1125,0 (M + H⁺).

Cys- $^{99g}\text{Tc-(NS}_2\text{)-c(RGDfK)}$ $^{99g}\text{Tc-5}$. Un aliquot de **5** (0,05 μmol , 1 eq.) est repris dans du MeOH (10 μL) et une solution de PBU₃ à 1% dans le MeOH (5 μL) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante. La solution de $^{99g/99m}\text{TcO-gluconate}$ (10 μL), obtenue comme décrit dans l'annexe générale, est alors ajoutée, suivi d'une solution de cystéine (5 μL , 0,1 μmol dans 10 μL de tampon PBS). Le mélange prend une coloration verte et est agité pendant 5 min puis centrifugé. Le surnageant est analysé par LC-MS et par HPLC.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $^{99g}\text{Tc-5}$: $t_R = 18,3$ min et Cys- $^{99g}\text{TcO-Cys}$: $t_R = 14,8$ min ;

LC-MS : gradient 0-100% B en 30 min, $^{99g}\text{Tc-5}$: $t_R = 20,5$ min, m/z 1014,0 (M + H⁺) et Cys- $^{99g}\text{TcO-Cys}$: $t_R = 17,7$ min, m/z 354,7 (M + H⁺).

Marquage au ^{99m}Tc

$^{99m}\text{Tc-DKCK-c(RGDfK)}$ $^{99m}\text{Tc-3}$. La complexation a été réalisée en adaptant le protocole décrit par R. Haubner [Haubner 04b]. Un aliquot de **3** (0,01 μmol , 1 eq.) est dissous dans une solution aqueuse de SnCl₂ à 2 mg/mL (19 μL , 0,2 μmol) et une solution aqueuse 10,4 mM de tartrate de sodium et de potassium (1 mL, 10,4 μmol) est ajoutée. Ce mélange est lyophilisé. Le marquage est réalisé en ajoutant 110 μL de solution saline de [$^{99m}\text{TcO}_4^-$], élue d'un générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, puis en incubant le mélange pendant 15 min à 90°C.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 15,5$ min.

$^{99m}\text{Tc-CK}(\text{NS}_2)\text{-c}(\text{RGDfK})$ $^{99m}\text{Tc-4}$. Un aliquot de **4** (0,025 μmol , 1 eq.) est repris dans de l'EtOH (10 μL) et une solution de PBU_3 à 1% dans l'EtOH (2,5 μL) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante, puis la solution de ligand réduit est diluée en ajoutant 37,5 μL de tampon PBS (solution 500 μM). Le marquage est réalisé en ajoutant 50 μL de solution d'intermédiaire $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ (cf. annexe générale) sur la solution de ligand réduit. Le mélange est incubé pendant 30 min à 90°C.
HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 17,6$ min.

Cys- $^{99m}\text{Tc}(\text{NS}_2)\text{-c}(\text{RGDfK})$ $^{99m}\text{Tc-5}$. Un aliquot de **5** (0,03 μmol , 1 eq.) est repris dans de l'EtOH (60 μL) et une solution de PBU_3 à 1% dans l'EtOH (7,5 μL) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante, puis le solvant est évaporé sous flux d'argon. Le ligand réduit est repris dans 45 μL de tampon PBS. Le marquage est réalisé en ajoutant 60 μL de solution d'intermédiaire $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ (cf. annexe générale), suivi de 15 μL d'une solution de cystéine (0,1 μmol dans 10 μL de tampon PBS). Le mélange est incubé pendant 15 min à 90°C.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $^{99m}\text{Tc-5}$: $t_R = 18,5$ min et Cys- $^{99m}\text{TcO-Cys}$: $t_R = 14,8$ min.

$^{99m}\text{Tc-CK}(\text{NS}_2)$ $^{99m}\text{Tc-11}$. Le ligand **11** (1 mg, 2,4 mmol, 1 eq.) est repris dans du MeOH dégazé (30 μL) et une solution de PBU_3 à 10% dans le MeOH (8,8 μL) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante puis le solvant est évaporé sous flux d'argon. Le ligand réduit est repris dans du tampon PBS (1,57 mL) pour donner une solution à 1,5 mM. Une solution 0,5 mM est obtenue en diluant 170 μL de la solution précédente avec 330 μL de tampon PBS. Le marquage est réalisé en ajoutant 100 μL de solution d'intermédiaire $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ (cf. annexe générale) à 100 μL de la solution de ligand réduit 0,5 mM. Le mélange est incubé pendant 15 min à 90°C ou pendant 30 min à 50°C.

Tests *in vivo*

Les protocoles de culture cellulaire, d'implantation des tumeurs ainsi que les conditions générales des études *in vivo* sont détaillés dans l'annexe générale.

Tests avec $^3\text{H-1}$

Imagerie β^- . Une solution de $^3\text{H-1}$ (~ 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$), dans du tampon PBS, est préparée juste avant le test. Une injection de 100 μL (~ 100 μCi) est réalisée dans la veine de la queue de 2 souris vigiles ayant développé une tumeur U87-MG. Les animaux sont sacrifiés après 1 ou 6 h par décervication. Les animaux sont congelés et découpés au microtome

(coupes de 20 μm). Des coupes sont analysées au β -imager (beta imager 2000, Biospace).

Compétition 1/ ^3H -1. Une solution de ^3H -1 ($\sim 0,9 \mu\text{Ci}/\mu\text{L}$), dans du tampon PBS, est préparée juste avant le test. Le produit froid **1** (500 μg) est repris dans 95 μL ($\sim 85 \mu\text{Ci}$) de cette solution et le mélange est injecté dans la veine de la queue d'une souris vigile ayant développé une tumeur U87-MG. Une injection de 95 μL de la solution de ^3H -1 ($\sim 85 \mu\text{Ci}$) est également réalisée sur un autre animal comme contrôle. Les animaux sont sacrifiés après 6 h par décervication. Les tumeurs ont été prélevées et congelées à -20°C . Le lendemain, elles sont décongelées et extraites avec un mélange MeOH/PBS 8/2 (1,2 mL). L'homogénat de tumeur est transvasé dans un ependorf et centrifugé. Le surnageant est ensuite analysé (500 μL) par HPLC (HPLC Waters-3) avec un gradient 0-100% B en 30 min sur une colonne analytique Varian. La sortie d'HPLC est collectée par tranches de 0,5 min et les fractions sont comptées en présence de 10 mL de liquide scintillant (Lumac-LSC Aqualuma Plus) sur un compteur Packard Tri-Carb 2100TR.

Compétition 2/ ^3H -1. Une solution de ^3H -1 ($\sim 1 \mu\text{Ci}/\mu\text{L}$), dans du tampon PBS, est préparée juste avant le test. Le produit **2** (200 μg) est repris dans 100 μL ($\sim 100 \mu\text{Ci}$) de cette solution et le mélange est injecté dans la veine de la queue d'une souris vigile ayant développé une tumeur U87-MG. Une injection de 100 μL de la solution de ^3H -1 ($\sim 100 \mu\text{Ci}$) est également réalisée sur un autre animal comme contrôle. Les animaux sont sacrifiés après 6 h par décervication. Les tumeurs ont été prélevées et congelées à -20°C puis conservées à -80°C pendant 2 jours. Elles sont alors décongelées et extraites avec un mélange MeOH/PBS 8/2 (1 mL). La suite du protocole est identique à celui utilisé pour **1/ ^3H -1**.

Tests avec $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et ^{99m}TcO -gluconate

$^{99m}\text{TcO}_4^-$. Deux souris ayant développé une tumeur U87-MG sont injectées avec 50 μL de solution saline de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, directement éluee d'un générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. La première injection a permis d'administrer $\sim 74 \text{ MBq}$, la seconde a posé problème et seuls 30 μL ont réellement été injectés ($\sim 45 \text{ MBq}$). Les animaux sont sacrifiés après 1 h et 3 h respectivement. Les tumeurs sont prélevées et comptées. Elles sont ensuite extraites avec un mélange MeOH/PBS 8/2 (1 mL). L'homogénat de tumeur est transvasé dans un ependorf, compté puis centrifugé. Le surnageant est prélevé, compté, de même que le culot. Le surnageant est ensuite analysé (450 μL) par radio-HPLC (HPLC Varian) avec un gradient 0-100% B en 30 min.

^{99m}TcO -gluconate. L'intermédiaire gluconate est obtenu d'après le protocole décrit dans l'annexe générale. Deux souris ayant développé une tumeur U87-MG sont injectées avec

100 μL de solution saline de $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ (~ 68 MBq). La suite du protocole est identique à celui décrit pour $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Tests avec les composés modèles $^{99m}\text{Tc-3}$, $^{99m}\text{Tc-4}$ et $^{99m}\text{Tc-5}$

$^{99m}\text{Tc-3}$ et compétition $\text{Re-3}/^{99m}\text{Tc-3}$. Le complexe $^{99m}\text{Tc-3}$ est marqué selon le protocole décrit précédemment, sur 4 aliquots de ligand **3**. Deux des solutions sont directement injectées (100 μL) par voie intraveineuse à 2 souris vigiles ayant développé une tumeur U87-MG. Les animaux sont sacrifiés après 1 h et 3 h. Les deux autres solutions de complexe sont utilisées pour reprendre 250 μg de complexe **Re-3** puis sont injectées (100 μL) à deux autres animaux qui sont sacrifiés après 1 h et 3 h. Les 4 tumeurs sont prélevées et comptées. Elles sont extraites avec un mélange MeOH/PBS 8/2 (1 mL). L'homogénat de tumeur est transvasé dans un ependorf, compté puis centrifugé. Le surnageant est prélevé, compté, de même que le culot. Le surnageant est ensuite analysé (500 μL) par radio-HPLC (HPLC Varian) avec un gradient 0-100% B en 30 min.

$^{99m}\text{Tc-4}$ et compétition $\text{Re-4}/^{99m}\text{Tc-4}$. Le complexe $^{99m}\text{Tc-4}$ est marqué selon le protocole décrit précédemment, sur 4 aliquots de ligand **4**. Deux des solutions sont directement injectées (100 μL) par voie intraveineuse à 2 souris vigiles ayant développé une tumeur U87-MG. Les souris sont sacrifiées après 1 h et 3 h. Les deux autres solutions de complexe sont utilisées pour reprendre 250 μg de complexe **Re-4** puis sont injectées (80 μL) à deux autres animaux qui sont sacrifiés après 1 h et 3 h. Lors de la seconde injection, seuls 50 μL ont pu être réellement administrés. Nous avons observé une mauvaise tolérance des injections, probablement en raison la présence de 10% d'EtOH dans les mélanges. Les 4 tumeurs sont prélevées et traitées comme précédemment.

$^{99m}\text{Tc-5}$. Le complexe $^{99m}\text{Tc-5}$ est marqué selon le protocole décrit précédemment, sur 3 aliquots de ligand **5**. Deux solutions ont été obtenues avec une incubation de 30 min à 50°C et ont été injectées (100 μL) à deux souris vigiles ayant développé une tumeur U87-MG. Les souris ont été sacrifiées après 1 h et 3 h. Un second test a été réalisé avec une solution marquée avec une incubation de 15 min à 90°C, injectée (100 μL) à une souris vigile qui a été sacrifiée après 1,5 h. L'injection est également mal supportée, sûrement pour les mêmes raisons que lors du test de $^{99m}\text{Tc-4}$. Les 3 tumeurs sont prélevées et comptées. Elles sont extraites avec un mélange MeOH/PBS 8/2 (1 à 1,5 mL en fonction de leur taille). L'homogénat de tumeur est transvasé dans un ependorf, compté puis centrifugé. Le surnageant est prélevé, compté, de même que le culot. Le surnageant est ensuite analysé (450 μL) par radio-HPLC (HPLC Varian) avec un gradient 0-100% B en 30 min.

Chapitre III

Analogues de la séquence RGD, assemblés par coordination de TcO^{3+}

III.1 Principe et choix des sous-chimiothèques

III.1.1 Assemblage combinatoire

La coordination d'un métal, notamment par un peptide, permet de structurer la molécule et d'améliorer sa stabilité tout en conservant ses propriétés biologiques. Le complexe formé peut conduire à un produit utilisable en radiothérapie vectorisée ou en l'imagerie moléculaire [Albrecht 05, Farrell 02, Thompson 06]. La coordination du métal peut entraîner la cyclisation du peptide et sa rigidification selon une conformation particulière, comme nous le verrons au chapitre IV. Des approches de structuration acyclique ou d'assemblage de fragments ont également été proposées. Différentes stratégies sont envisageables, elles sont schématisées dans la Figure III.1 :



FIG. III.1 – *Stratégies de métallation acyclique de peptides : en rouge le métal et en bleu le motif de chélation.*

La méthode **3** s'apparente à celle employée dans l'approche BFCA (bifunctional chelating agent) utilisée pour les radiopharmaceutiques, alors que les méthodes **1** et **2** sont de type intégrée (cf. I.1.1.d). Comme nous l'avons décrit au paragraphe I.3, nous avons cherché à développer une approche de type **1** pour obtenir une chimiothèque de traceurs assemblés par coordination de ^{99m}Tc et mimant la séquence peptidique RGD reconnue par l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.

Cette approche a été développée au laboratoire sur la cyclophiline hCyp-18, selon une stratégie d'assemblage combinatoire de sous-chimiothèques capables de coordonner un cœur métallique de manière complémentaire [Clavaud 06b]. Ainsi, deux chimiothèques de 112 et 176 complexes de rhénium ont été synthétisées comme analogues du peptide substrat de référence Suc-AAPF-pNA de la cyclophiline hCyp-18 (Fig. III.2). Le cœur métallique (ReO^{3+}) est coordonné par le motif de chélation NS_2/S , porté par deux sous-chimiothèques complémentaires : **A** (NS_2) et **B** (S). Le criblage biochimique des chimiothèques de traceurs bimoléculaires a permis de sélectionner deux ligands dont l'affinité a été améliorée d'un ordre de grandeur par rapport au substrat de référence. Par ailleurs, C. Clavaud a montré que l'assemblage pouvait être réalisé avec le cœur $^{99\text{m}}\text{TcO}^{3+}$ [Clavaud 06c]. Elle a aussi montré que l'assemblage combinatoire était réalisable en mélange à partir de plusieurs modules **A** et **B**, par coordination du cœur métallique ReO^{3+} [Clavaud 06a].

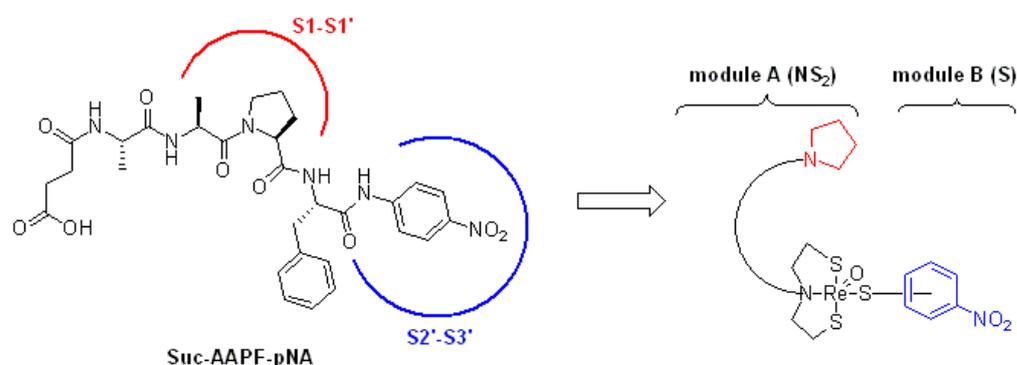


FIG. III.2 – Substrat de référence (Suc-AAPF-pNA) de hCyp18 avec la représentation des sous-sites de reconnaissance (S1-S1' et S2'-S3') et représentation schématique des chimiothèques de complexes rhéniés.

Des études de chimie combinatoire dynamique (CCD) ont également été menées par notre équipe grâce à cette approche [Clavaud 08]. En CCD, la chimiothèque évolue au cours du temps sous l'effet d'une pression de sélection qui favorise les composés se liant à la macromolécule cible avec la meilleure affinité (Fig. III.3 (i)). Une étape réversible a donc été ajoutée à la coordination du cœur oxorhénium qui s'effectue principalement sous contrôle cinétique (Fig. III.3 (ii)). L'introduction de glutathion (GSH) permet de substituer de façon réversible le module **B**, et d'exercer une pression de sélection par dissociation des complexes n'interagissant pas avec hCyp-18. Une série de 192 complexes potentiels a ainsi été testée et trois composés ont été sélectionnés comme ligands de la cyclophiline, dont deux avec des IC_{50} submicromolaires, c'est-à-dire avec des affinités améliorées de plus de trois ordres de grandeur par rapport au substrat modèle.

En se basant sur les études menées au laboratoire, nous avons adapté la technique d'assemblage combinatoire à la synthèse de traceurs marqués au $^{99\text{m}}\text{Tc}$, mimant la séquence peptidique RGD reconnue par l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.

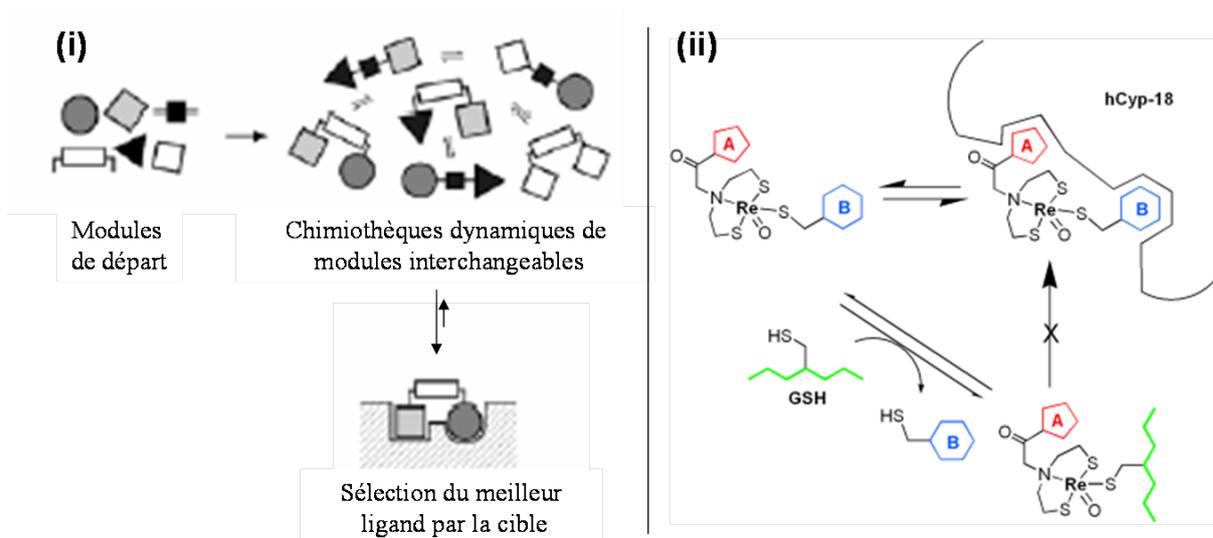


FIG. III.3 – (i) Représentation schématique de la synthèse et du criblage d'une chimiothèque combinatoire dynamique (CCD) à deux modules, (ii) Principe de sélection de complexes de ReO_3^+ ligands de hCyp 18 par CCD.

III.1.2 Choix des modules A (NS_2) et B (S)

La conception des complexes bimoléculaires a été effectuée en s'inspirant d'antagonistes non-peptidiques décrits dans la littérature. Des études de docking et de relations structure-activité ont montré que les antagonistes de $\alpha_V\beta_3$ doivent nécessairement présenter un mème d'arginine et un mème d'acide aspartique pour avoir une bonne affinité [Cacciari 05]. La distance entre les groupements guanidinium et aspartate doit être d'environ 6,5 à 7 Å. La sélectivité pour $\alpha_V\beta_3$ est liée à la conformation du motif analogue du tripeptide RGD ainsi qu'à la nature du mème d'arginine utilisé, qui doit comporter un groupement -NH libre. De nombreuses molécules ont été développées en tant qu'antagonistes de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ et certaines présentent une excellente affinité et une bonne sélectivité par rapport à $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fig. I.29 et III.4). En particulier, l'équipe de H. Kessler, a étudié une chimiothèque de mèmes de RGD, constitués d'un squelette aza-peptidique ou azacarba-peptidique (**E** et **F**). De la diversité a été introduite en variant le mème de guanidinium ainsi que l'espaceur (aliphatique ou aromatique). En se basant sur des études antérieures, divers groupements aromatiques ont été introduits à proximité du carboxylate afin d'augmenter la lipophilie de ces molécules ainsi que leur affinité pour $\alpha_V\beta_3$. Trois composés de cette chimiothèque sont prometteurs, avec des IC_{50} subnanomolaires (**E**, avec X = NH et R = 4-Cl, IC_{50} = 0,3 nM; **F**, avec X = NH, X_1 = NH_2 et R = 4-Cl, IC_{50} = 0,1 nM; **F**, avec X = CH_2 , X_1 = NH_2 et R = 4-phényl, IC_{50} = 0,7 nM).

Le choix des modules **A** et **B** constituant nos sous-chimiothèques a été effectué en prenant en compte diverses contraintes. En effet, comme nous l'avons déjà précisé, il ne nous était pas possible, au début de ce projet, de recourir à une évaluation structurale *ab*

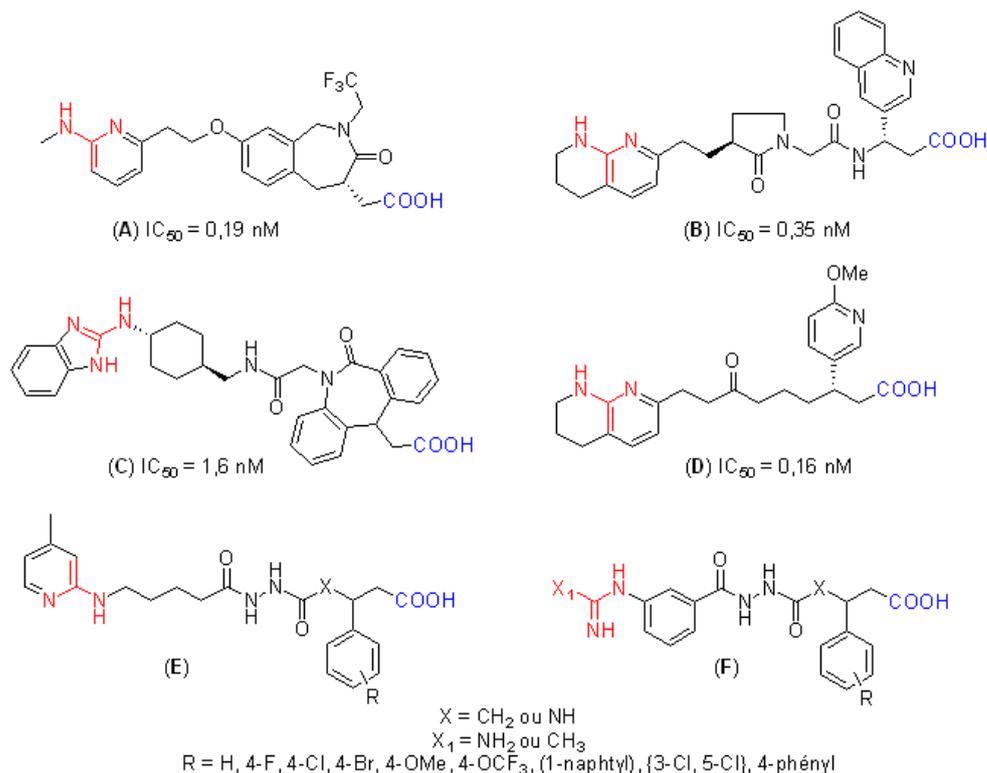


FIG. III.4 – Antagonistes non-peptidiques de $\alpha_V\beta_3$ et leur IC_{50} (déterminée selon diverses méthodes). (A) [Miller 00, Raboisson 06], (B) [Meissner 02], (C) [Kling 02], (D) [Zartman 05], (E et F) [Sulyok 01].

initio, les méthodes de calcul pour les composés technétiés n'étant pas au point. Ainsi, nous choisissons que les modules **A** portent le motif de chélation NS_2 ainsi qu'un analogue d'acide aspartique alors que les modules **B** portent un thiol et un analogue d'arginine, l'assemblage de ces deux sous-chimiothèques (A- ^{99m}TcO -B) conduisant à un analogue de la séquence RGD (Fig. III.5). De plus, nous nous sommes imposés pour cette étude prospective que les modules puissent être facilement synthétisables, si possible par une approche combinatoire, sans nécessiter une mise au point trop longue.

Nous avons choisi, dans un premier temps, d'introduire le mime d'acide aspartique dans les modules **A** à l'aide des acides aminés D/L-acide aspartique (d/D) et D/L-acide glutamique (e/E). De la diversité a été introduite en ajoutant des amines aromatiques diversement substituées, permettant d'introduire un groupement lipophile en s'inspirant notamment des travaux de H. Kessler. Au total, 24 composés ont été synthétisés dans la série **A** (Fig. III.5). Pour la série complémentaire **B**, nous nous sommes limités à des motifs aliphatiques présentant un thiol et un guanidinium espacés de 2, 3 ou 4 groupes méthyles. Les combinaisons de ces différents modules **A** ($\times 24$) et **B** ($\times 3$) permettent donc d'envisager la formation de 72 complexes analogues de la séquence RGD par assemblage combinatoire.

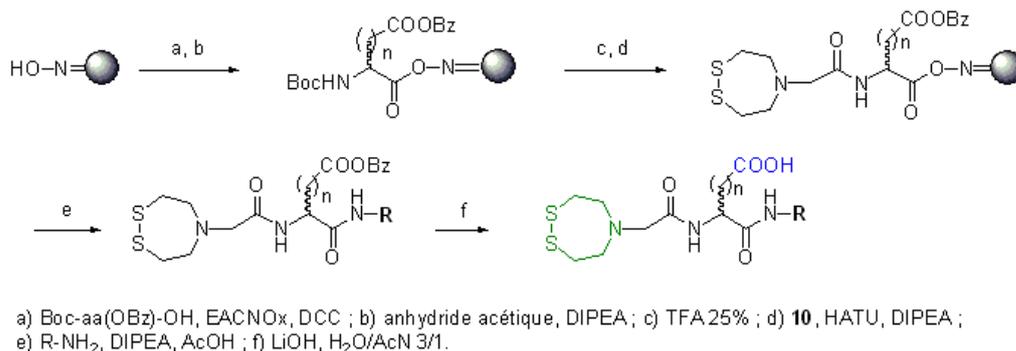


FIG. III.7 – Synthèse sur résine oxime des modules A.

 R =		n = 1				n = 2	
		L-Asp (D)	D-Asp (d)	L-Glu (E)	D-Glu (e)		
1		D1	-	d1	d1a	E1	e1
2		D2	D2a	d2	d2a	E2	e2
3		D3	-	d3	d3a	E3	e3
4		D4	-	d4	-	E4	e4
5		D5	-	d5	d5a	E5	e5
6		D6	D6a	d6	d6a	E6	e6

FIG. III.8 – Nomenclature des modules A (isomères L en majuscule et isomères D en minuscule).

capping des sites n'ayant éventuellement pas réagi a été réalisé avec de l'anhydride acétique. Après acidolyse douce du groupement protecteur Boc, le précurseur du motif NS₂ **10** a été couplé en présence de HATU et de DIPEA. Après séchage, chacun des quatre lots de résines a été subdivisé en 6 lots pour permettre le déplacement par les différentes amines R-NH₂. Le déplacement de la résine en présence de DIPEA, d'acide acétique et de l'amine R-NH₂ a permis d'obtenir les produits bruts sous forme d'esters de benzyle. La durée de cette étape a été optimisée et a donné les meilleurs résultats après trois jours de réaction. L'utilisation d'acide acétique lors du clivage permet de réduire le risque de racémisation [DeGrado 82]. Le traitement à la lithine dans un mélange eau-acétonitrile 3/1 a permis l'élimination du groupement protecteur benzyle et les 24 produits ont été purifiés

par HPLC préparative ou par chromatographie flash. La nomenclature des modules **A** est décrite dans la figure III.8.

Dans le cas des composés contenant l'acide aspartique, nous avons parfois isolé deux produits isomériques, séparables en CCM, et donnant des spectres RMN différents. Ce résultat supposait qu'une transamidation pouvait avoir eu lieu lors de la déprotection à la lithine (Fig. III.9 **A**). Cette hypothèse a été confirmée par la synthèse en solution des composés **D2** et **D2a**, selon la figure III.9 **B**.

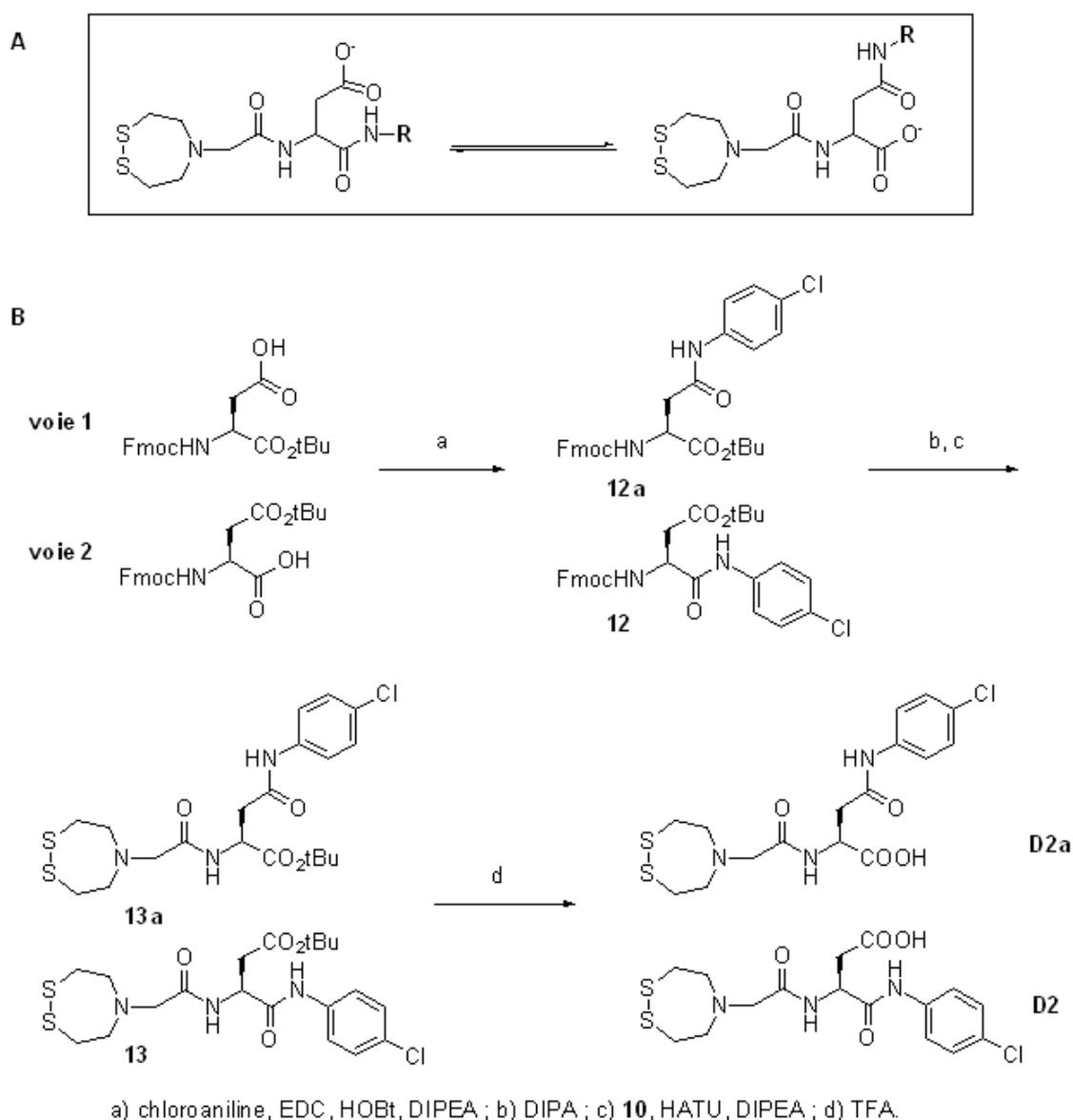


FIG. III.9 – (**A**) Hypothèse de transamidation. (**B**) Synthèse en solution de **D2** et du produit de transamidation **D2a**.

III.2.2 Synthèse en solution des modules B

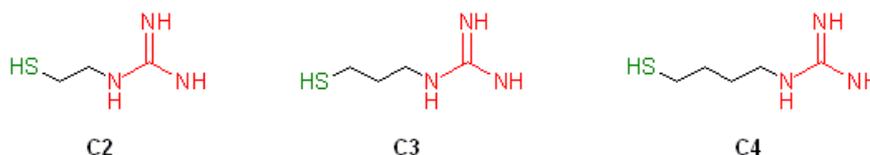


FIG. III.10 – Structure des modules **B**.

La synthèse des trois modules **B** aliphatiques thiol-guanidyl a été réalisée en solution (Fig. III.10). Nous avons travaillé à partir des disulfures des aminothiols correspondants, la cystamine (disulfure -S-CH₂-CH₂-NH₂) étant la seule à être commerciale.

Pour le composé en C₃, nous avons tout d'abord cherché à obtenir l'homocystamine en passant par un sel de Bunte à partir de la 3-chloropropylamine (Fig. III.11) [Hamacher 89]. Dans le protocole décrit par K. Hamacher, l'étape d'oxydation est très longue (10 jours) et le produit doit être isolé par extraction liquide-liquide eau/AcOEt, à chaud, en continu. Cette procédure ne nous a permis d'obtenir que des traces du disulfure attendu, la majorité du produit restant en phase aqueuse. Après évaporation d'une partie de la phase aqueuse, nous avons cherché à protéger, dans un mélange eau/THF, l'amine par un groupement di-*tert*-butyloxycarbonyl pour faciliter l'isolement du produit. Toutefois, seule une très faible quantité de produit a pu être isolée après purification (Rdt < 3%).

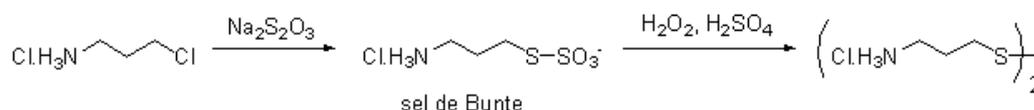
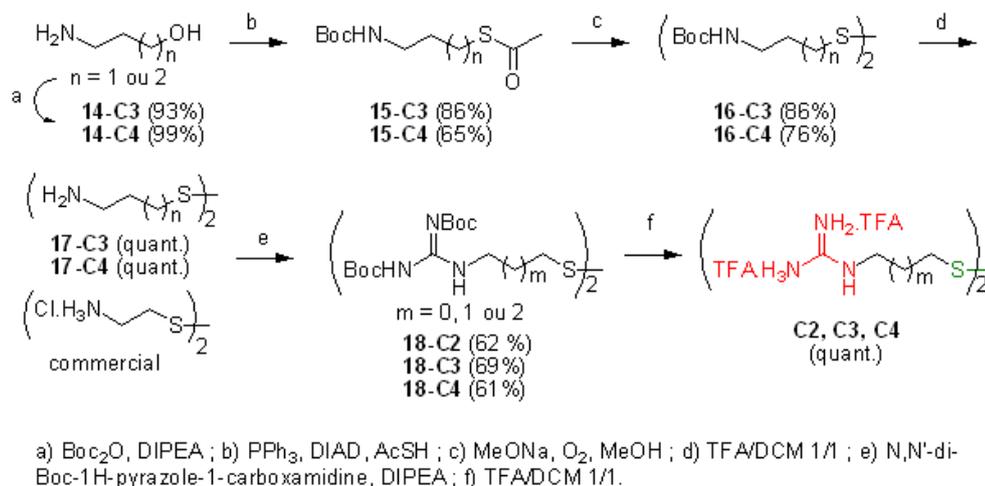


FIG. III.11 – Synthèse de l'homocystamine via un sel de Bunte.

Cette approche ne donnant pas de résultats satisfaisants, nous avons cherché à adapter la synthèse du précurseur de NS₂ **10** (cf. Chap II), bien connue au laboratoire, à la synthèse de l'homocystamine et de son homologue en C₄, en mettant à profit la réaction de Mitsunobu (Fig. III.12) [Clavaud 06c]. Ainsi, la synthèse des trois composés de la série **B** a été réalisée en solution en partant soit du dihydrochlorure de cystamine commercial pour le composé **C2**, soit à partir du 3-aminopropan-1-ol ou du 4-aminobutan-1-ol pour les composés **C3** et **C4** pour donner les disulfures des produits présentés ci-dessus (Fig. III.10).

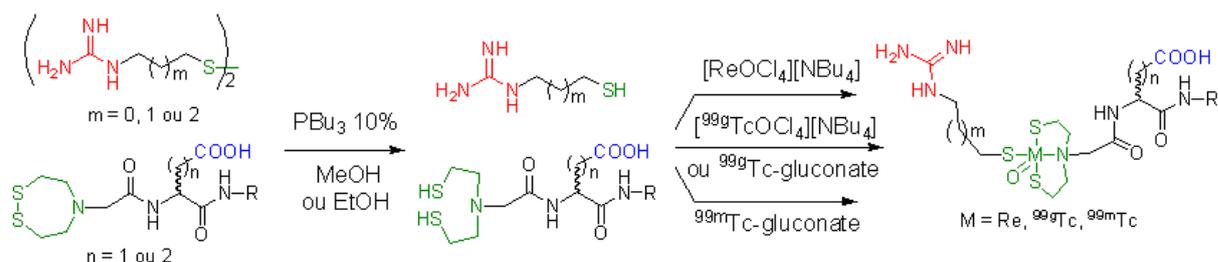
L'amine de l'amino-alcool en C₃ ou C₄ a tout d'abord été protégée à l'aide d'un groupement Boc, puis l'alcool a été thioacétylé par une réaction de type Mitsunobu. Une méthanolyse suivie d'une oxydation à l'air a conduit au disulfure et l'amine a été déprotégée en milieu acide. L'ajout de l'agent de guanidylation (N,N'-di-Boc-1H-pyrazole-1-carboxamide) [Bernatowicz 93] sur les composés précédents ou sur le dihydrochlorure de

FIG. III.12 – Synthèse des modules *B* : *C2*, *C3* et *C4*.

cystamine a permis d'obtenir les composés attendus après déprotection des groupements Boc en milieu acide. Les disulfures **C2**, **C3** et **C4** ont été obtenus sous la forme de sels de TFA. Les produits sont conservés sous forme oxydée, la réduction du disulfure étant réalisée juste avant l'étape de complexation de Re ou de Tc.

III.3 Assemblage par complexation

III.3.1 Complexation par Re et ^{99g}Tc

FIG. III.13 – Réduction des modules *A* et *B* et assemblage par coordination d'un cœur métallique.

L'assemblage des modules **A** et **B** par coordination d'un cœur métallique est réalisé en deux étapes (Fig. III.13). La première consiste à réduire les ponts disulfure aussi bien au niveau du motif NS₂ des modules **A** que du thiol des modules **B**. La réduction a été effectuée à l'aide de tributylphosphine dans le méthanol. La seconde étape est la coordination du cœur métallique par les deux parties du motif de chélation NS₂+S, situées respectivement sur le module **A** et le module **B**, conduisant à la formation du complexe

A-ReO-B. L'assemblage a été réalisé avec du $^{185/187}Re$, du ^{99g}Tc ou du ^{99m}Tc afin de valider le protocole de complexation.

Des essais préliminaires ont permis d'obtenir trois complexes rhéniés modèles : **C2-Re-D1**, **C2-Re-D2** et **C2-Re-E1**. Pour chacun des complexes, les ligands **A** et **B** correspondants ont été réduits en mélange avant l'introduction du rhénium à partir du précurseur tétrabutylammonium de tétrachlorooxorhénate $[ReOCl_4][NBu_4]$. Après purification HPLC et analyse LC-MS, il est apparu que plusieurs fractions présentaient la masse attendue, suggérant la formation d'isomères *syn* et *anti* (cf. Fig. I.11).

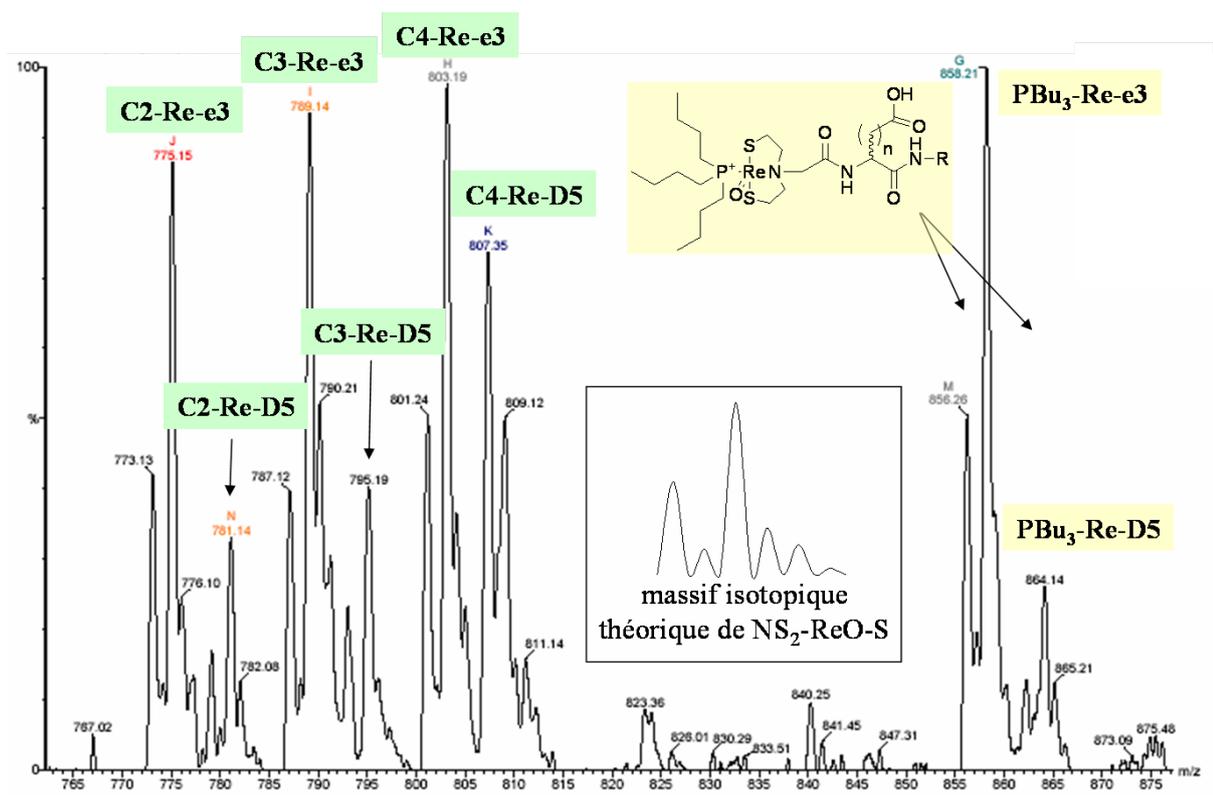


FIG. III.14 – Spectre ES/MS du mélange brut lors de la complexation en mélange de **D5** et **e3** avec **C2**, **C3** et **C4**.

Un test de complexation en mélange a été réalisé à partir de 2 modules **A** (**D5** et **e3**) et des 3 modules **B**, permettant d'obtenir les 6 complexes correspondants (Fig. III.14). Les complexes ont été identifiés par spectrométrie de masse ainsi que deux produits secondaires résultant de la complexation des modules **A** avec le PBu_3 résiduel. Nous avons ainsi démontré que l'assemblage combinatoire est possible en mélange pour obtenir des composés rhéniés.

L'assemblage a également été réalisé à l'aide de ^{99g}Tc pour disposer d'une référence technétée, identifiée par LC-MS. Dans ce cas, les modules **A** et **B** ont été réduits sé-

parément avant d'être successivement ajoutés au cœur métallique. Le technétium a été introduit soit à partir du précurseur $[^{99g}\text{TcOCl}_4][\text{NBu}_4]$ tétrabutylammonium tétrachlorooxotechnétate, soit à partir de l'intermédiaire ^{99g}TcO -gluconate. Le premier mode de marquage s'apparente à celui utilisé en rhénium, alors que le second correspond à celui employé avec le ^{99m}Tc . Dans les deux cas, le composé **C2- $^{99g}\text{Tc-E3}$** a été obtenu et identifié par LC-MS.

III.3.2 Complexation au ^{99m}Tc

Le marquage au ^{99m}Tc a nécessité une mise au point portant sur les conditions de réduction des ligands, sur leur concentration, ainsi que sur le temps et la température de réaction. Des essais de marquage ont été réalisés à partir de l'intermédiaire tartrate décrit précédemment (II.3.1.b), mais n'ont pas donné de résultats concluants puisque le complexe attendu n'a pas pu être mis en évidence. Nous avons donc choisi d'utiliser l'intermédiaire ^{99m}TcO -gluconate pour l'ensemble de l'optimisation qui a été réalisée avec le complexe **C2- $^{99m}\text{Tc-E3}$** .

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer quel mode de réduction des ligands **A** et **B** était le plus efficace entre une réduction séparée et une réduction en mélange. Ainsi, après une réduction en mélange des deux ligands dans de l'éthanol, le milieu réactionnel a été dilué pour donner une solution 500 μM en **C2** et en **E3** dans du tampon PBS. Cette solution a été ajoutée à volume égal à une solution de ^{99m}TcO -gluconate et l'ensemble a été incubé 30 min à 50°C. Parallèlement, **C2** et **E3** ont été réduits séparément dans de l'éthanol et ont été dilués pour conduire à des solutions 1 mM. Un mélange **C2/E3**/ ^{99m}TcO -gluconate 1/1/2 a alors été incubé dans les mêmes conditions que précédemment. Les chromatogrammes obtenus pour les deux mélanges réactionnels sont représentés dans la figure III.15 (**A**).

Le complexe **C2- $^{99m}\text{Tc-E3}$** a pu être identifié par comparaison avec les chromatogrammes HPLC de son équivalent marqué au ^{99g}Tc . Ce test met clairement en évidence la supériorité du mode de réduction séparée pour la formation du complexe ($t_R = 25,3$ min), l'intensité des chromatogrammes représentés étant pondérée pour correspondre à une même activité injectée en HPLC. Afin d'attribuer le pic observé à 29,4 min (Fig. III.15 **A**), nous avons incubé, dans les mêmes conditions que précédemment, le ^{99m}TcO -gluconate en présence uniquement de **C2** réduit ou uniquement de **E3** réduit (Fig. III.15 **B**). Le composé de $t_R = 29,4$ min semble donc correspondre à un complexe avec uniquement le ligand **E3**, le gluconate pouvant occuper le quatrième site de chélation. Compte tenu de ces résultats, tous les essais suivants ont été réalisés à partir des ligands réduits séparément.

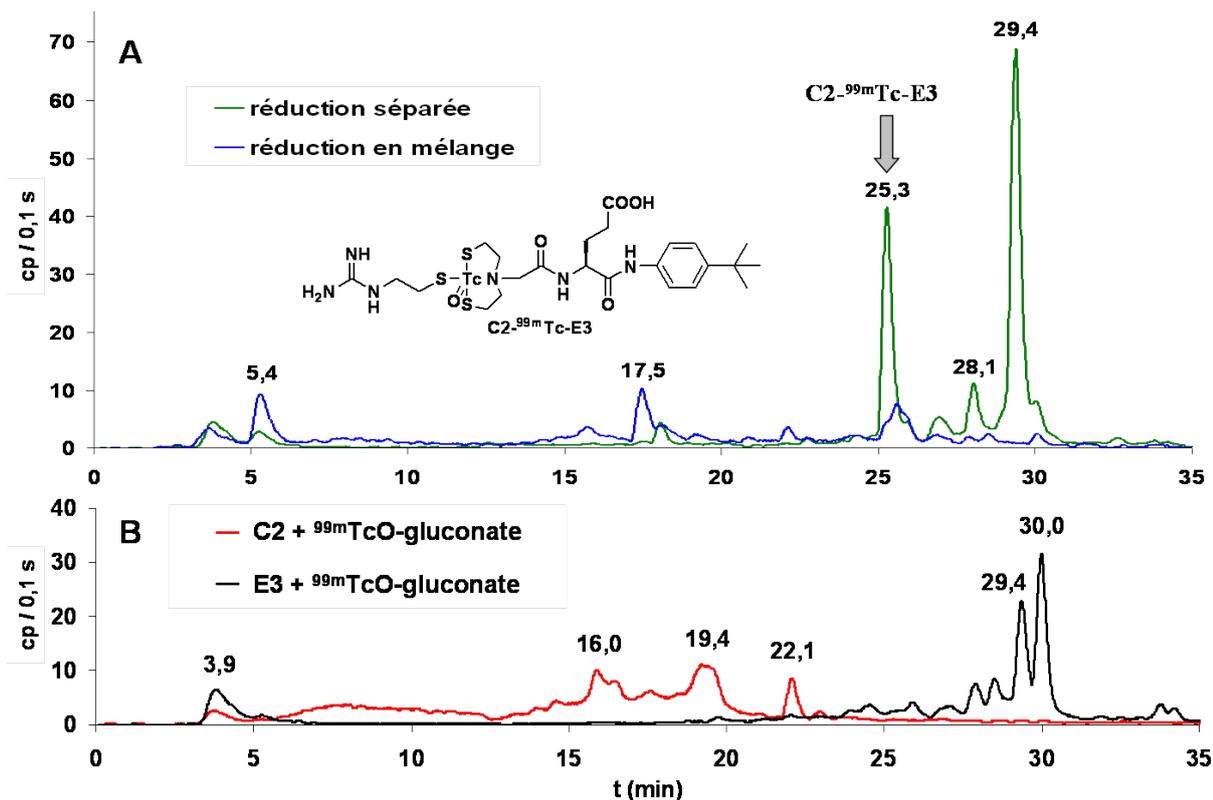


FIG. III.15 – (A) Radio-chromatogrammes des mélanges réactionnels obtenus après réduction séparée ou en mélange de **C2** et **E3**. (B) Radio-chromatogrammes des mélanges réactionnels après incubation de **C2** réduit ou de **E3** réduit avec du ^{99m}TcO -gluconate. HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.

Nous avons ensuite cherché à déterminer la concentration optimale en ligand dans le milieu de complexation. Le protocole précédent a donc été appliqué avec des solutions de ligands réduits de concentrations 3, 2, 1, 0,2 et 0,1 mM pour conduire à des concentrations finales dans le mélange réactionnel de 750, 500, 250, 50 et 25 μM respectivement. Les radiochromatogrammes obtenus pour ces 5 tests sont représentés dans la figure III.16. Dans le cas des plus faibles concentrations (25 et 50 μM), aucune trace du complexe attendu à $t_R = 25,2$ min n'a été observée. Pour les concentrations supérieures, la formation du complexe avec uniquement le ligand **E3** ($t_R = 29,3$ min), est maximale pour 500 μM et nettement moins importante à 750 μM . Deux autres produits secondaires sont présents à 26,9 et 28,0 min et une concentration de 250 μM semble la plus appropriée pour limiter leur formation tout en permettant d'obtenir le maximum de $C2-^{99m}Tc-E3$. Nous avons donc choisi cette concentration pour la suite des essais afin de limiter la formation des produits secondaires.

Un essai a ensuite été réalisé en doublant le volume dans lequel la réduction des ligands était réalisée. En effet, travaillant sur de très faibles quantités (1 à 2 mg), les volumes employés sont par conséquent réduits et nous souhaitons nous assurer que l'agitation

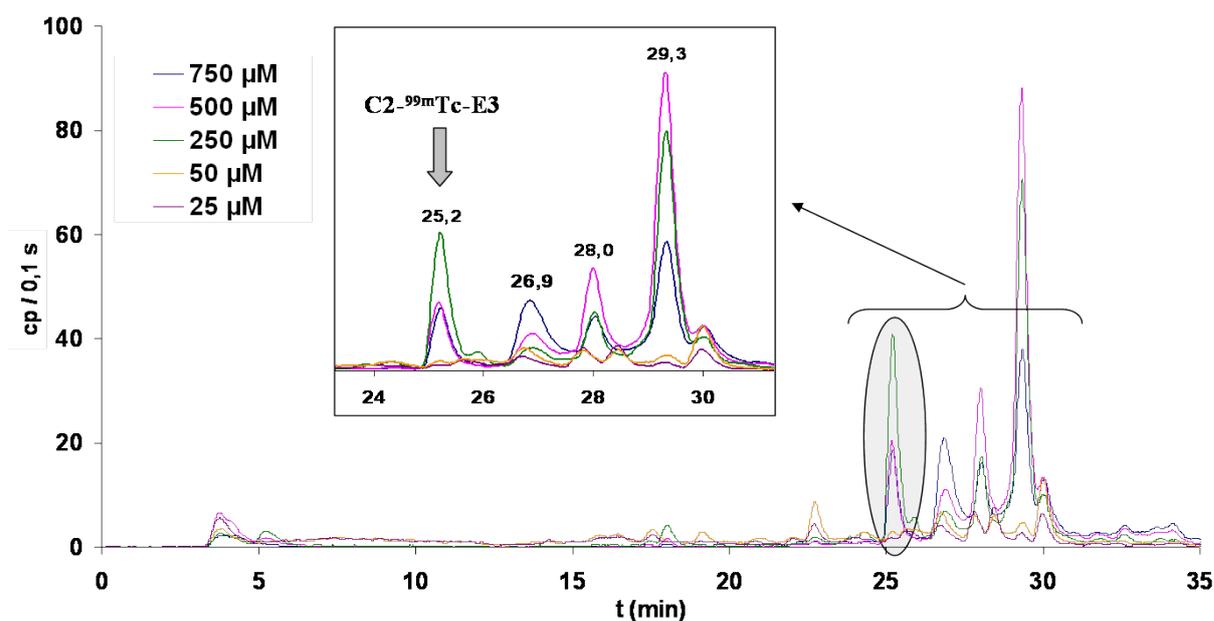


FIG. III.16 – Radio-chromatogrammes des mélanges réactionnels obtenus après incubation de $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ en présence de **C2** et **E3** réduits à diverses concentrations. HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min - intensité corrigée pour correspondre à une même activité injectée en HPLC.

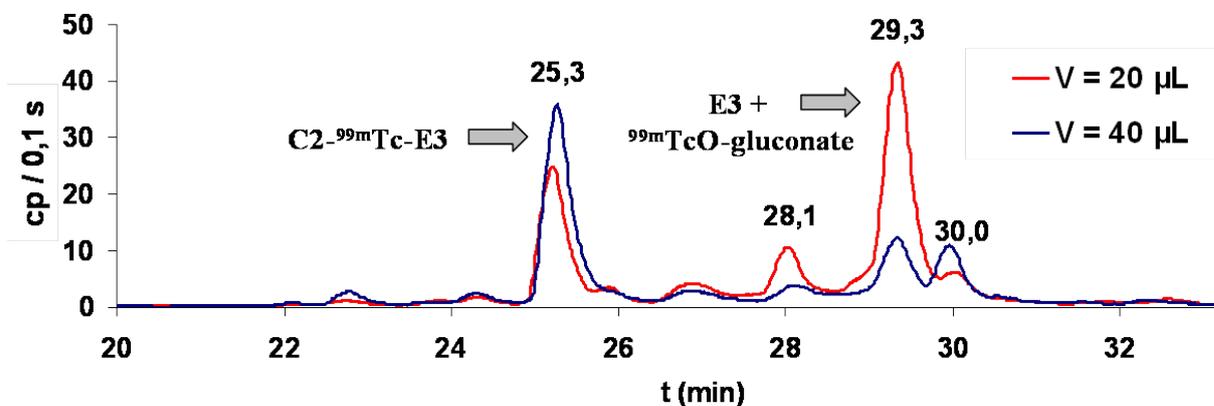


FIG. III.17 – Radio-chromatogrammes des mélanges réactionnels obtenus après incubation de $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ en présence de **C2** et **E3** réduits dans différents volumes d'EtOH. HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min - intensité corrigée pour correspondre à une même activité injectée en HPLC.

du milieu réactionnel était suffisante pour que la réduction soit réalisée dans de bonnes conditions. En doublant le volume (de 20 à 40 μL), on observe une nette amélioration de la formation du complexe **C2- $^{99m}\text{Tc-E3}$** . Les chromatogrammes représentés à la figure III.17 montrent ainsi que, en augmentant le volume de solvant lors de l'étape de réduction,

le mélange réactionnel de marquage présente une plus grande proportion de complexe et que la formation du produit secondaire à 29,3 min est minimisée. Cette variation confirme l'amélioration de la réduction des ligands grâce à l'augmentation de volume qui assure une meilleure solubilisation des produits. Lors du marquage, seul le composé **E3** réduit participe à la formation du complexe **C2- ^{99m}Tc -E3**. Dans le cas où la réduction préalable de **E3** est plus efficace, la formation des produits secondaires serait limitée, en particulier le complexe gluconate- ^{99m}Tc -**E3**, qui pourrait se former à la suite de la réduction tardive de **E3** par le chlorure d'étain présent dans le milieu. Les études suivantes ont été conduites en prenant en compte cette modification du volume du milieu de réduction.

Nous avons ensuite cherché à déterminer l'influence du temps d'incubation sur la formation du complexe bimoléculaire. L'étude a tout d'abord été menée à 50°C, avec un temps de réaction de 30 min à 2 h (Fig. III.18, **A**). Les chromatogrammes sont là encore normalisés pour correspondre à une même quantité de radioactivité injectée en HPLC. La proportion relative du complexe **C2- ^{99m}Tc -E3** à 25,3 min par rapport au produit secondaire à 29,6 min augmente avec l'allongement de la durée d'incubation. Toutefois, la période du ^{99m}Tc étant de 6 h, l'augmentation d'efficacité de synthèse ne permet pas de compenser la perte de matériel par désintégration.

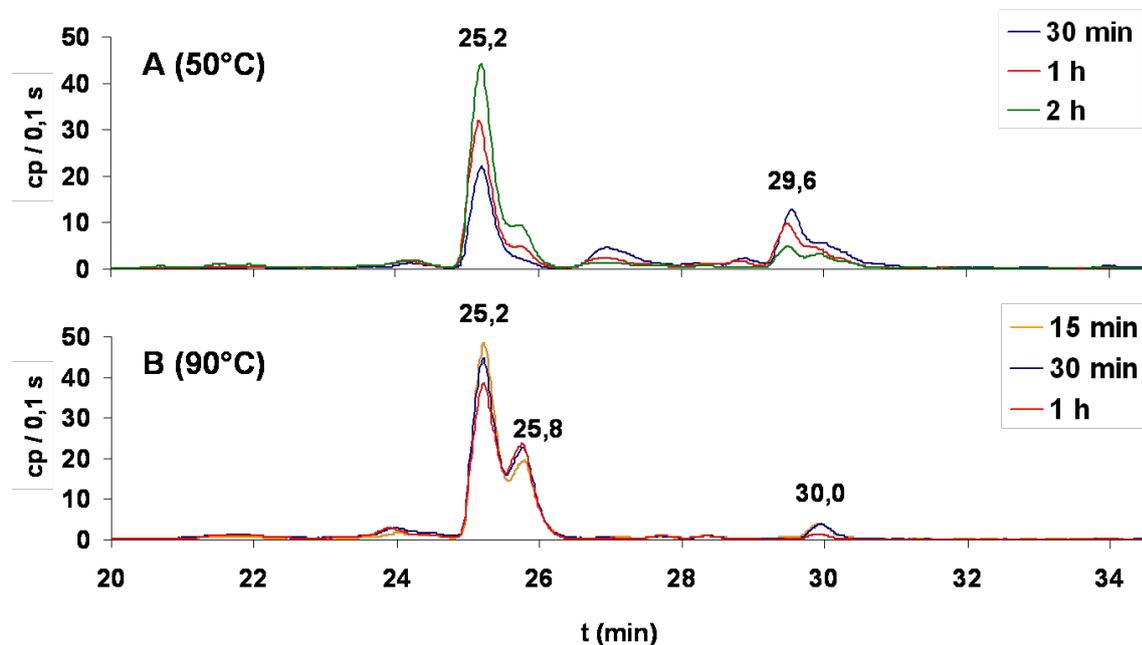


FIG. III.18 – Radio-chromatogrammes des mélanges réactionnels obtenus après incubation de ^{99m}TcO -gluconate en présence de **C2** et **E3** à 50°C pendant 30 min, 1 h, ou 2 h (**A**) et à 90°C pendant 15 min, 30 min ou 1 h (**B**). HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min - intensité corrigée pour correspondre à une même activité injectée en HPLC.

Nous nous sommes donc intéressé à un effet de l'augmentation de la température d'incubation sur la formation du complexe. Le mélange réactionnel a alors été incubé à 90 °C de 15 min à 1 h (Fig. III.18, **B**). Il apparait que dans ce cas, le produit secondaire à 29,6 min est presque totalement absent. Le pic attendu présente un dédoublement ($t_R = 25,2$ et 25,8 min), comme cela était déjà visible après 2 h à 50°C. Plus le temps d'incubation à 90°C augmente, plus la proportion de ce composé est importante. L'apparition de ce pic étant liée à une augmentation soit de la température, soit du temps de réaction, nous avons supposé qu'il s'agit d'un isomère, comme cela avait été observé dans le cas des composés rhéniés. La variation de la température et du temps d'incubation permettrait donc de jouer sur les proportions d'isomères formés, mais sans qu'un contrôle prévisible de la composition du mélange soit possible.

Deux protocoles d'incubation ont été utilisés par la suite et présentent chacun des avantages et inconvénients :

- **2 h à 50°C** : cette méthode permet d'obtenir un bon ratio entre le complexe et le produit secondaire à 29,6 min, mais la durée de cette étape est longue et conduit à une perte d'activité ;

- **15 min à 90°C** : cette approche permet de réduire considérablement le temps de préparation du complexe et donc de conserver une forte activité, toutefois la formation d'isomères ou de produits de dégradation peut compliquer les interprétations.

Les différentes étapes de cette mise au point, menée sur **C2-^{99m}Tc-E3**, nous ont permis de sélectionner les meilleures conditions pour la formation de ce complexe (réduction séparée, 250 μM en ligands, incubation 2 h à 50°C ou 15 min à 90°C). Nous avons souhaité valider et généraliser ce mode opératoire en l'appliquant à un plus grand nombre de composés. La combinaison des modules **E3**, **D3**, **d4** et **d6** avec les trois thiols **C2**, **C3** et **C4** a effectivement conduit à la formation de 12 complexes (Fig. III.19). Dans chaque cas, l'analyse radio-HPLC met en évidence un pic majoritaire, ayant un temps de rétention proche de celui observé pour le complexe modèle **C2-^{99m}Tc-E3**, et qui semble correspondre au complexe bimoléculaire attendu. Par ailleurs, la superposition des chromatogrammes obtenus pour ces différents complexes a permis de mettre en évidence des pics superposables pour chaque type de module **A**, suggérant la formation de produits secondaires. Afin d'identifier ces produits, chacun des modules **A** a été incubé avec l'intermédiaire gluconate. L'analyse des milieux réactionnels par radio-HPLC nous a permis de confirmer l'hypothèse de la formation de complexes gluconate-^{99m}Tc-**A**, comme cela a été proposé précédemment. Le mode opératoire général utilisé dans ce test ne permet donc pas de s'affranchir totalement de ces produits secondaires. Toutefois, leur proportion reste toujours inférieure à celle du complexe et ils sont facilement identifiables. Nous avons donc choisi de conserver ce mode opératoire général de marquage pour les études de stabilité

que nous souhaitons mener, en envisageant de l'améliorer dans un second temps, pour chacun des traceurs qui présenteraient des propriétés biologiques intéressantes.

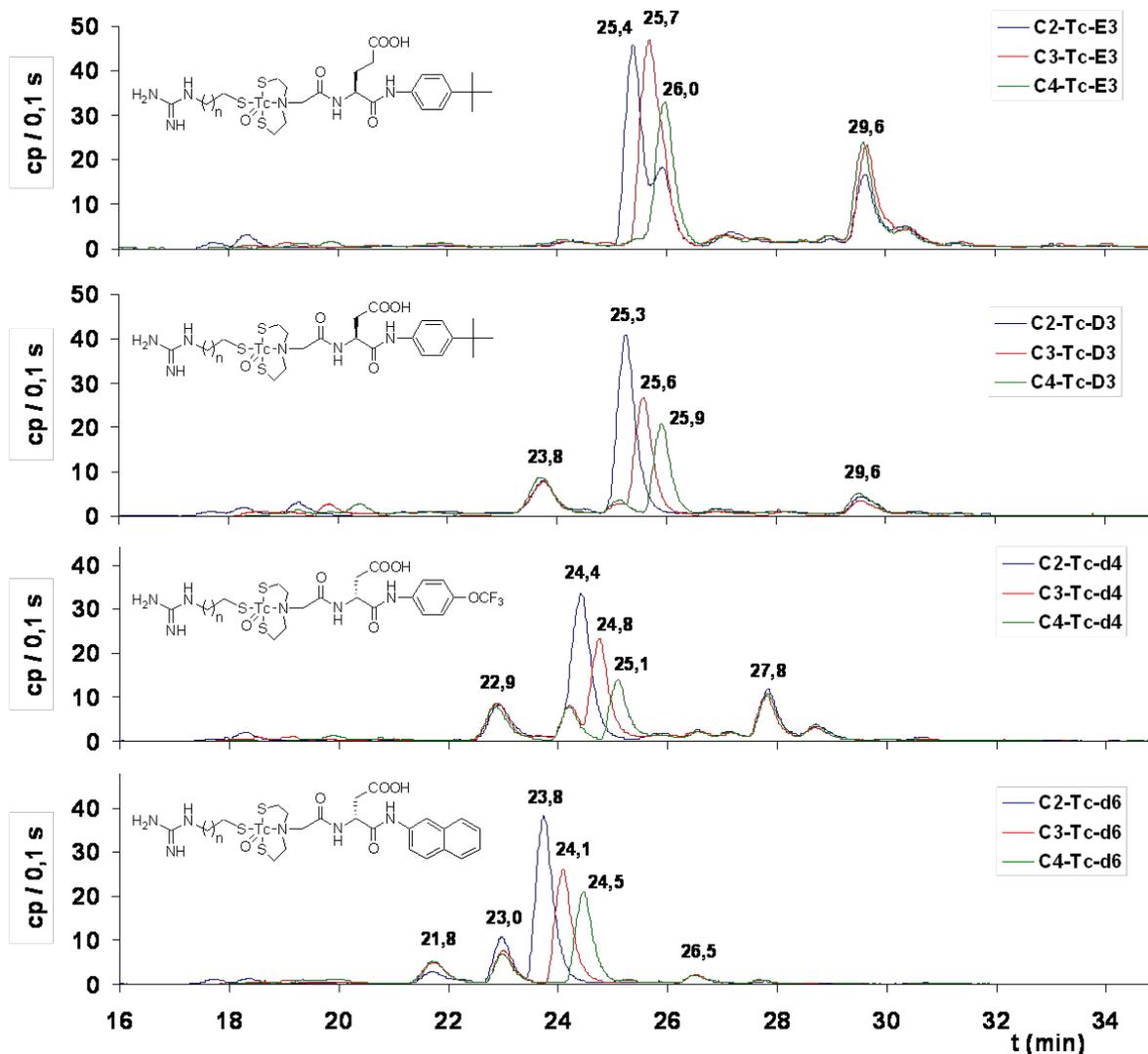


FIG. III.19 – Radio-chromatogrammes des 12 mélanges réactionnels obtenus après incubation à $50^{\circ}C$ pendant 2 h ($n = 1, 2, 3$, correspondant à **C2**, **C3**, **C4**). HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min - intensité corrigée pour correspondre à une même activité injectée en HPLC.

III.4 Etudes de stabilité des complexes bimoléculaires

III.4.1 Stabilité au glutathion

La stabilité des complexes bimoléculaires a été évaluée en présence de glutathion. En effet, les complexes de type $\text{MO}[\text{NS}_2/\text{S}]$ ($\text{M} = \text{Tc}$ ou Re) sont connus pour être potentiellement sensibles à une attaque par substitution nucléophile *in vitro* comme *in vivo*, en présence d'un excès de thiol [Pelecanou 98, Syhre 98, Nock 00]. *In vivo*, dans le milieu circulant, les traceurs peuvent également être en contact avec des protéines présentant de nombreux thiols à leur surface, telle la sérum albumine, et dans les tissus, le glutathion (GSH) qui est le thiol le plus abondant. Peu présent dans le sang, le GSH est principalement localisé dans le cytosol des cellules (0,5-12 mM) et dans le cerveau (2 mM) [Nock 99, Gupta 01, Pietzsch 03]. Le groupement thiol du GSH, très nucléophile, est susceptible de dissocier les complexes par réaction de compétition $\text{NS}_2\text{-TcO-S} \rightarrow \text{NS}_2\text{-TcO-S-GSH}$. Ce principe a d'ailleurs été utilisé récemment au laboratoire en chimie combinatoire dynamique comme cela a été exposé au début de ce chapitre [Clavaud 08]. Dans la perspective de réaliser un screening *in vivo*, avec identification des composés par analyse des extraits des tumeurs, il nous a semblé important de tester la stabilité des traceurs au glutathion. En effet, l'étape d'extraction peut conduire à la lyse cellulaire et, par conséquent, au relargage de GSH qui pourrait dissocier les complexes et contrarier leur identification.

La stabilité des complexes **C2-^{99m}Tc-E3** et **C3-^{99m}Tc-d6** a été étudiée en milieu tamponné (HEPES 35 mM, pH 7,8), en présence de glutathion (1 mM), à température ambiante. Nous avons tout d'abord réalisé la complexation avec une incubation de 15 min à 90°C pour conserver un maximum d'activité dans les échantillons et ainsi disposer d'une meilleure sensibilité pour les analyses radio-HPLC. Le tampon utilisé dans ces tests étant différent de celui employé pour la mise au point de la complexation au ^{99m}Tc, nous avons modifié le mode opératoire pour effectuer les dilutions des solutions de ligands réduits dans du tampon HEPES au lieu de PBS. Les chromatogrammes HPLC des traceurs obtenus dans ces conditions sont comparables aux résultats obtenus dans le PBS pour **C3-^{99m}Tc-d6** (Fig. III.21 A). Pour **C2-^{99m}Tc-E3**, la proportion du produit de $t_R = 25,8$ min, que nous supposons être un isomère du complexe, est plus importante que celle observée lors de la mise au point à 90°C (Fig. III.22 A et Fig. III.18 B)). Il semble donc que le changement de solvant ait une influence sur la formation des isomères du complexe, si ce produit est bien un isomère, sans qu'un mécanisme simple puisse être proposé.

Une fois les complexes synthétisés, du glutathion réduit (thiol libre) a été ajouté pour donner une concentration finale de 1 mM et l'ensemble a été laissé à température ambiante. Des aliquots ont été régulièrement prélevés, dilués dans de l'eau et analysés par radio-HPLC. Les aires HPLC des différents pics ont été corrigées de la décroissance et rapportées en pourcentage de l'aire totale (Fig. III.20).

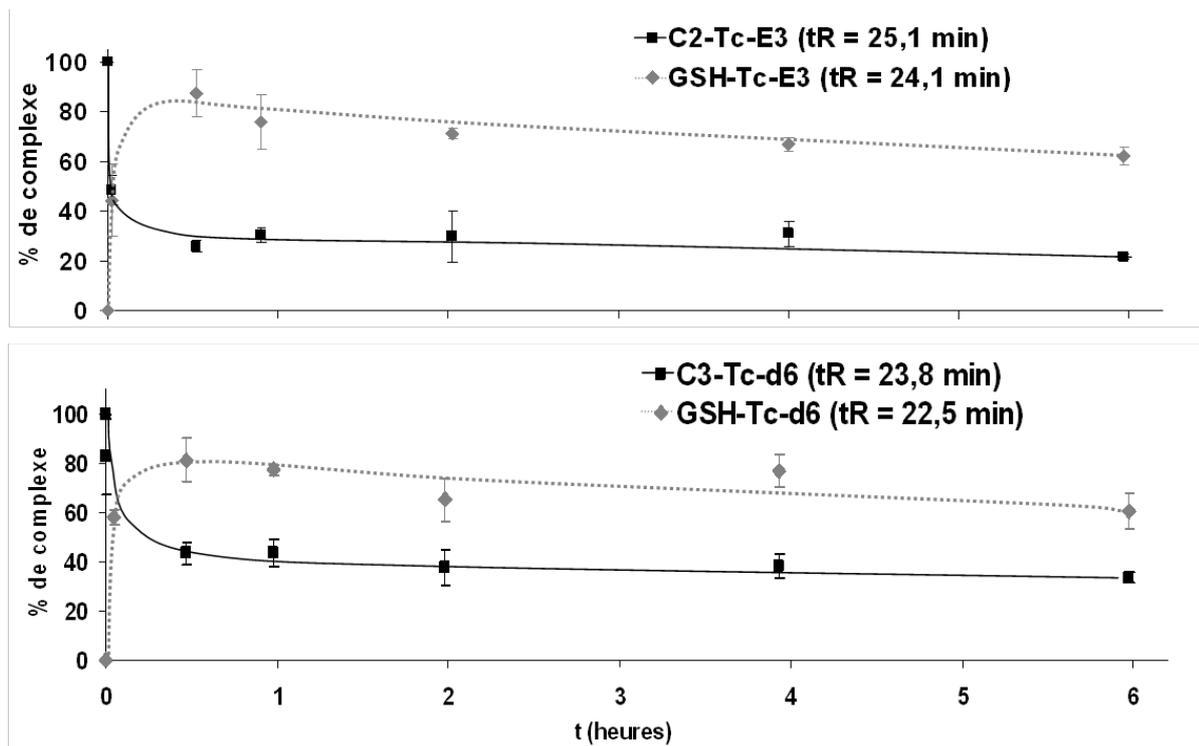


FIG. III.20 – Test de stabilité au GSH de $C2\text{-}^{99m}\text{Tc-E3}$ (A) et $C3\text{-}^{99m}\text{Tc-d6}$ (B).

Pour les deux complexes, nous avons observé l'apparition d'un nouveau composé dès l'ajout du glutathion (Fig. III.22 et III.21 : B). Afin de l'identifier, du $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ a été incubé en présence de GSH et avec chacun des ligands réduits utilisés (Fig. III.22 et III.21 : C, D, E). Les mélanges $^{99m}\text{TcO-gluconate/GSH/(E3 ou d6)}$ donnent respectivement un pic à $t_R = 24,1$ et $22,7$ min qui correspondent à $\text{GSH-}^{99m}\text{Tc-E3}$ et $\text{GSH-}^{99m}\text{Tc-d6}$. L'apparition de ces produits est rapide, puisque dès 30 min leur proportion atteint près de 80% de la quantité totale de complexes présents dans les milieux réactionnels (Fig. III.20). Cette proportion reste ensuite relativement constante sur 6 heures, ce qui pourrait suggérer l'existence d'un autre isomère non séparé et plus résistant à la substitution.

Notons enfin que l'aire des pics des autres produits secondaires présents dans les mélanges reste constante, en particulier celle du composé à $t_R = 25,8$ min, un possible isomère du complexe $C2\text{-}^{99m}\text{Tc-E3}$. Le test au GSH ne permet donc pas de trancher sur la nature de ce composé.

Les tests de stabilité au glutathion ont donc conduit, comme nous l'avions prévu, à la formation des complexes de substitution du module B par le GSH. Cette sensibilité au GSH ne devrait pas être un obstacle à l'utilisation *in vivo* de ces composés car ce thiol est peu présent dans le milieu circulant. Par contre, elle pourrait contrarier l'identification par analyse radio-HPLC des extraits de tumeurs. En effet, comme cela a déjà été mentionné, le

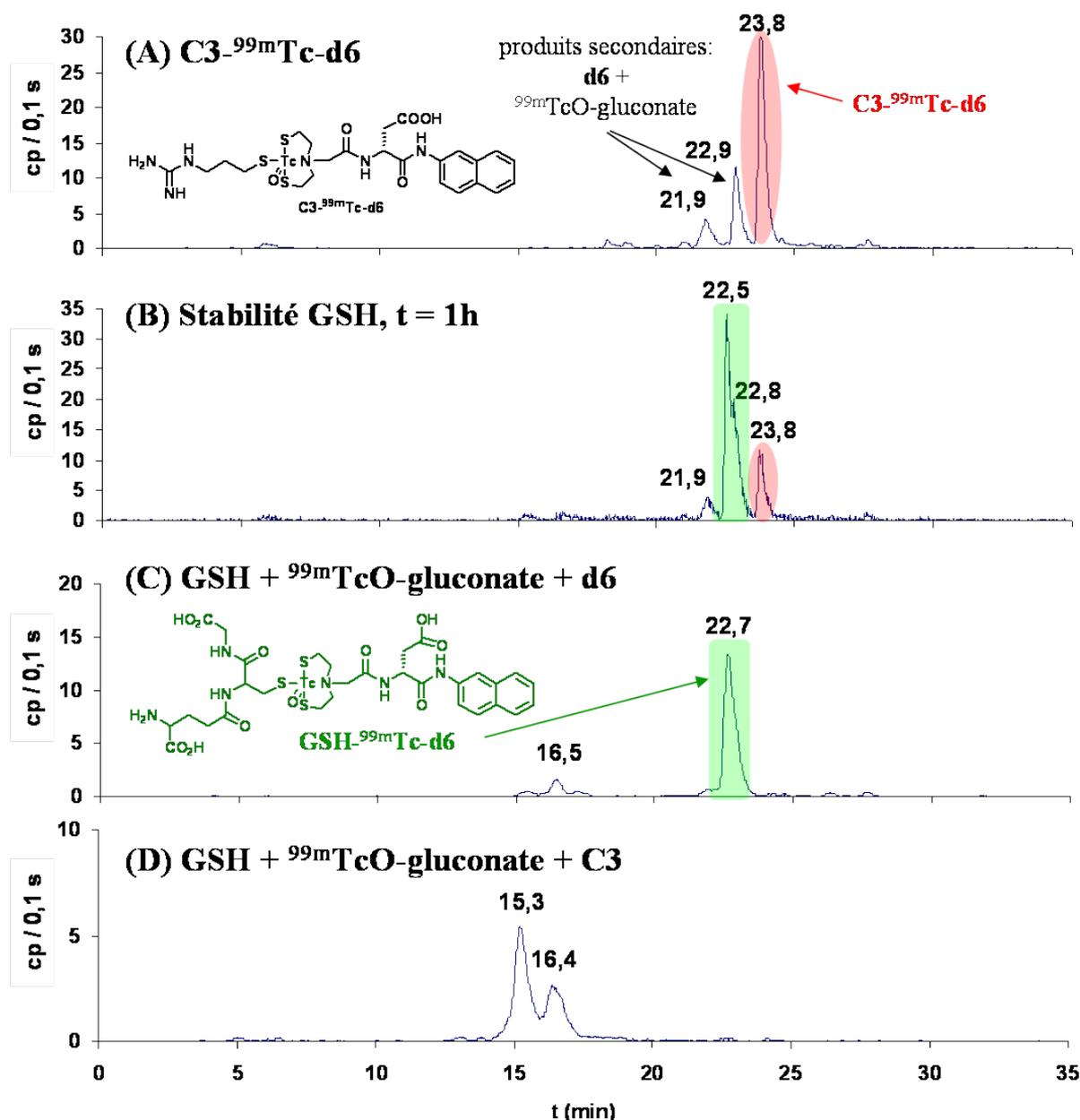


FIG. III.21 – Etude de stabilité au GSH de C3-^{99m}Tc-d6. Radio-chromatogramme de C3-Tc-d6 - dilution dans l'HEPES (A) et analyse après 1 h en présence de GSH (B). Radio-HPLC des mélanges ^{99m}TcO-gluconate/GSH/d6 (C) et ^{99m}TcO-gluconate/GSH/C3 (D). HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min - intensité corrigée pour correspondre à une même activité injectée en HPLC.

broyage des tumeurs peut entraîner une lyse cellulaire partielle qui conduit au relargage de GSH et d'autres thiols. Il sera cependant possible d'identifier indirectement les composés actifs par déconvolution, même si cette méthode est nettement plus lourde qu'une analyse directe.

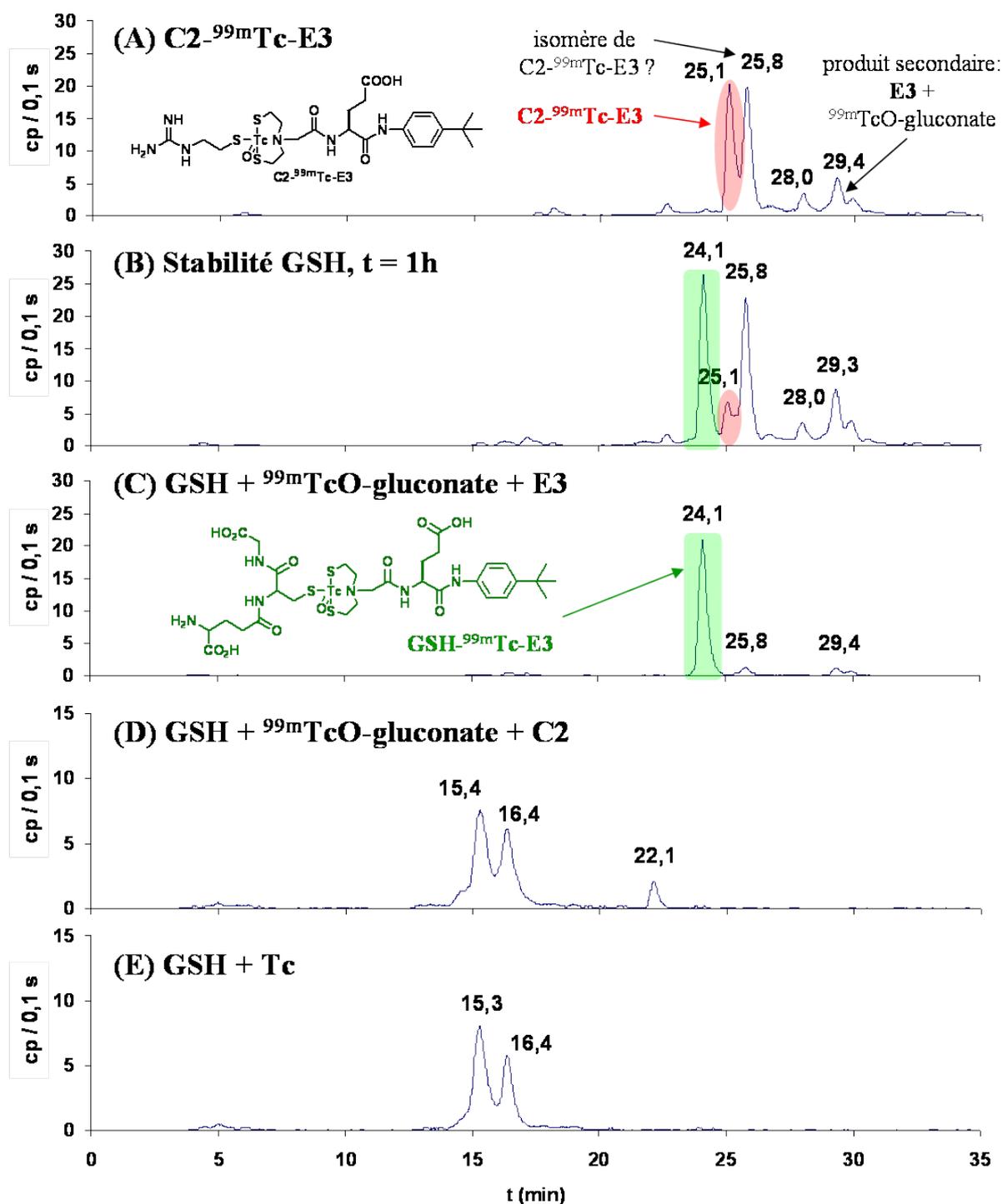


FIG. III.22 – Etude de stabilité au GSH de C2-^{99m}Tc-E3. Radio-chromatogramme de C2-Tc-E3 - dilution dans l'HEPES (A) et analyse après 1 h en présence de GSH 1 mM (B). Radio-HPLC des mélanges ^{99m}TcO-gluconate/GSH/E3 (C), ^{99m}TcO-gluconate/GSH/C2 (D) et ^{99m}TcO-gluconate/GSH (E). HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min - intensité corrigée pour correspondre à une même activité injectée en HPLC.

III.4.2 Stabilité dans du plasma murin

La stabilité des complexes bimoléculaires de ^{99m}Tc a été évaluée dans du plasma murin. Les tests ont été menés sur les complexes **C2- $^{99m}\text{Tc-E3}$** et **C3- $^{99m}\text{Tc-d6}$** , synthétisés comme précédemment. La solution de complexe a été ajoutée au plasma en proportion 1/5 ($V_{tot} = 180 \mu\text{L}$, 7 à 11 MBq/mL). Après homogénéisation, le mélange a été incubé à 37°C et des aliquots ont régulièrement été prélevés. Les protéines du plasma ont été précipitées au méthanol et le surnageant a été analysé par radio-HPLC. Pour les deux complexes, l'aire totale des radiochromatogrammes, corrigée de la décroissance, reste constante au cours de l'étude.

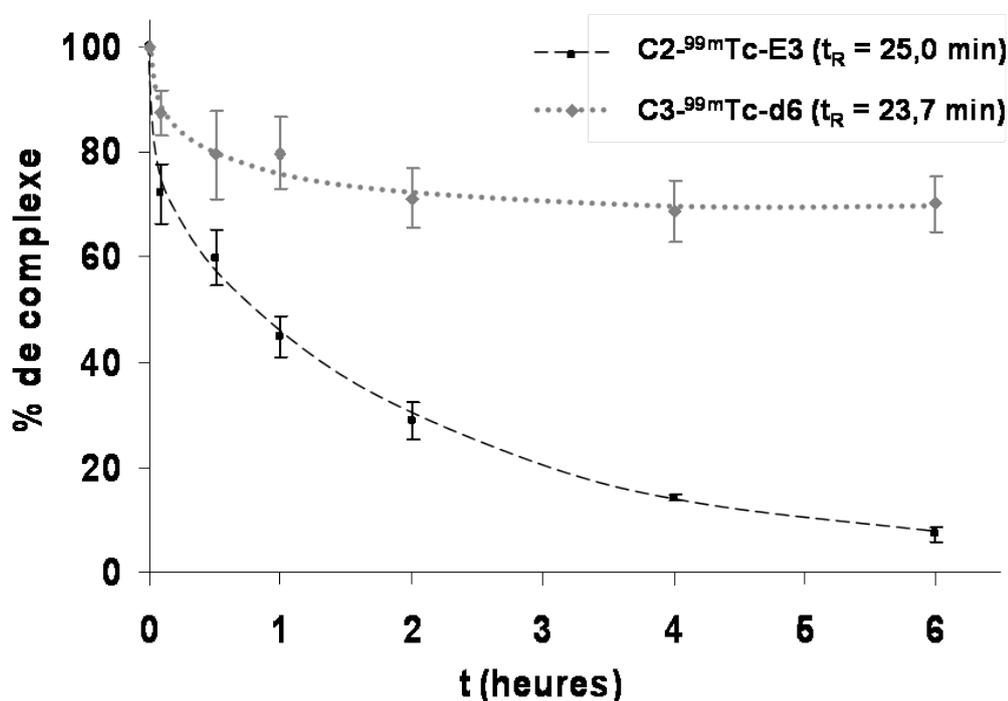


FIG. III.23 – Test de stabilité dans le plasma, à 37°C , de **C2- $^{99m}\text{Tc-E3}$** et **C3- $^{99m}\text{Tc-d6}$** .

Dans le cas de **C3- $^{99m}\text{Tc-d6}$** , l'activité du surnageant représente en moyenne les 2/3 de l'activité totale de l'aliquot de plasma prélevé. Les aires des pics des produits secondaires restent constantes sur la période étudiée (Fig. III.25 C et D). L'aire du pic correspondant au complexe ($t_R = 23,8 \text{ min}$) se stabilise, après une heure, à 70% de sa valeur initiale (Fig III.23). Ce complexe semble donc relativement stable vis-à-vis des constituants du plasma.

Dans le cas de **C2- $^{99m}\text{Tc-E3}$** , la proportion de radioactivité dans le surnageant représente les 3/5 l'activité totale de l'aliquot de plasma, ce qui pourrait suggérer un piégeage du complexe par les protéines plasmatiques. La proportion de complexe **C2- $^{99m}\text{Tc-E3}$** ($t_R = 25,1 \text{ min}$) présent dans le surnageant diminue fortement puisque, après 6 h, l'aire

du pic passe à moins de 10% de sa valeur initiale (Fig. III.23). Cette disparition du complexe dans le surnageant conduit à différents produits secondaires (Fig. III.25 A et B). Il s'agit, d'une part, des complexes observés lors de l'incubation du ^{99m}TcO -gluconate avec uniquement **E3** ($t_R = 18,2$ et $29,4$ min) ainsi que du composé à $t_R = 25,8$ min. Lors de l'incubation dans le plasma, une dissociation partielle de **C2- ^{99m}Tc -E3** et une isomérisation ont pu conduire à augmenter la proportion de ces produits secondaires. D'autre part, de nouveaux produits sont également apparus ($t_R = 14,9$ et $16,8$ min), mais n'ont pas pu être identifiés. Il semble donc que **C2- ^{99m}Tc -E3** se dissocie selon un mécanisme relativement complexe, conduisant à un mélange multi-espèces. Notons qu'aucune trace de technétium libre réduit n'est observée. De plus, le technétium hydrolysé réduit n'est probablement pas formé puisque l'aire totale des radiochromatogrammes reste constante, alors que cette espèce est connue pour être retenue en tête de colonne. Quoiqu'il en soit, il apparaît que ce complexe n'a pas une bonne stabilité dans le plasma au delà d'une heure.

Les différences de stabilité dans le plasma observées entre **C2- ^{99m}Tc -E3** et **C3- ^{99m}Tc -d6** sont difficiles à expliquer compte tenu de leur nature chimique proche. On peut cependant supposer que la stéréochimie des constituants oriente la formation de tel ou tel isomère du centre chiral $NS_2-TcO-S$, les diastéréomères *syn* et *anti* présentant de nettes différences de stabilité. On peut également envisager une fragilisation du complexe par une interaction du carboxylate de la chaîne latérale, qui serait favorisée dans le cas d'un acide glutamique par rapport à un acide aspartique (Fig. III.24).

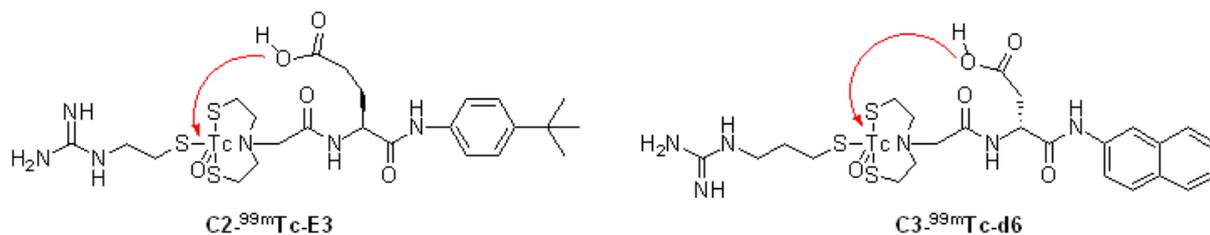


FIG. III.24 – Proposition d'un mécanisme d'action de la chaîne latérale de l'acide aspartique ou glutamique, pouvant entraîner une destabilisation du cœur oxotechnétium.

Ainsi, les résultats des études de stabilité dans le plasma sont contrastés et montrent que la résistance des complexes dépend fortement de leur nature chimique. Il serait nécessaire de systématiser cette étude à divers composés afin d'évaluer la stabilité des complexes dans chacune des séries. Cependant, nous n'avons pas cherché à tester d'autres assemblages dans cette partie exploratoire compte tenu de la relative lourdeur des expériences en ^{99m}Tc . Nous envisageons de réaliser ces tests uniquement sur les composés sélectionnés comme traceurs qui feront l'objet d'une étude plus approfondie.

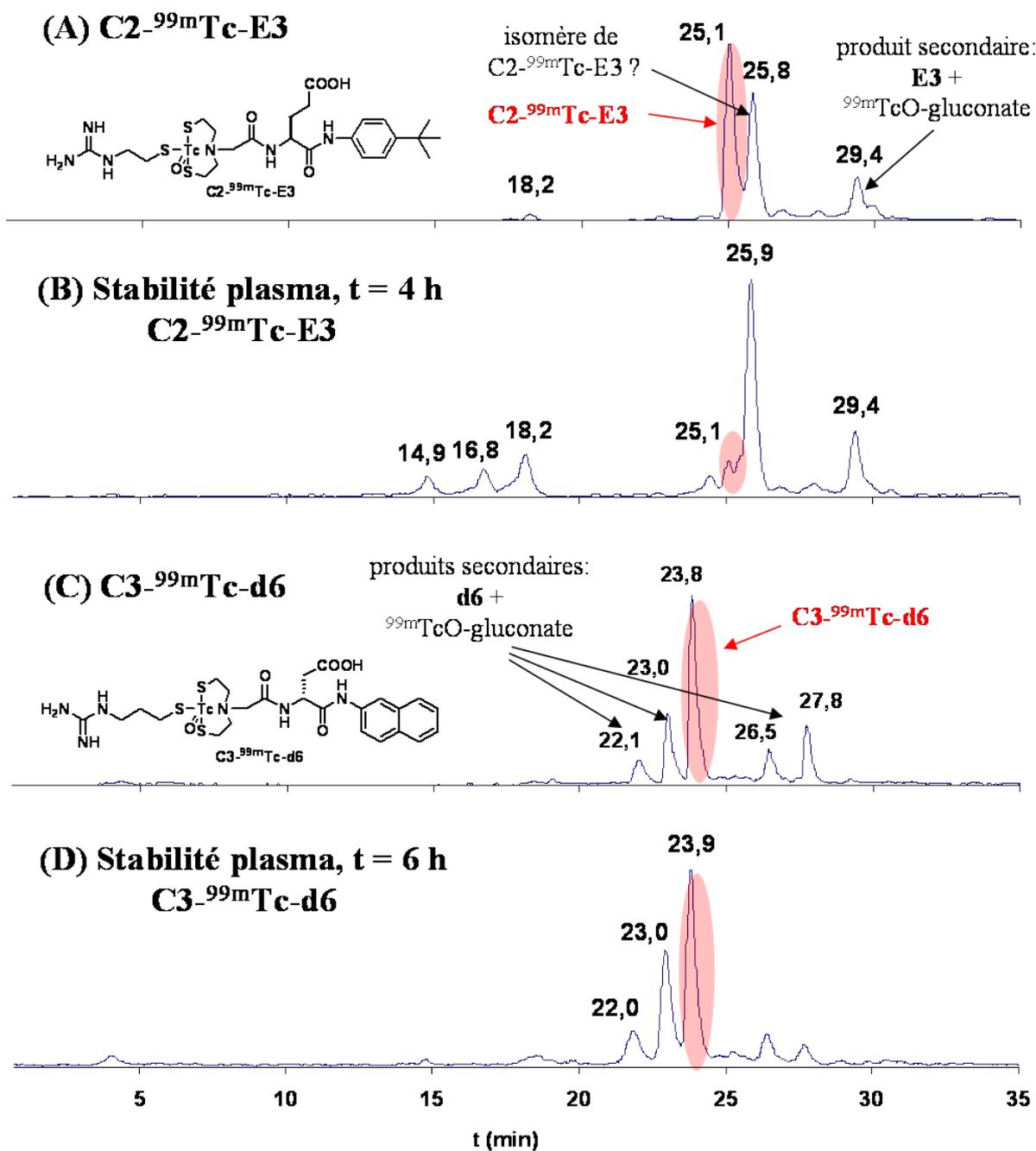


FIG. III.25 – Etude de stabilité dans la plasma de C2-^{99m}Tc-E3 et C3-^{99m}Tc-d6. Radiochromatogramme de C2-Tc-E3(A) et analyse après 4 h dans le plasma (B), de C3-Tc-d6 (C) et analyse après 6 h dans le plasma (D). HPLC Varian, colonne C18 analytique, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min - échelles non standardisées.

Conclusion

L'une des approches de notre projet fait appel au développement de complexes bimoléculaires obtenus par assemblage combinatoire de modules complémentaires par coordination d'un cœur oxotechnétium. Afin d'explorer les potentialités de cette voie, nous avons synthétisé un premier jeu de modules **A** (NS_2) et **B** (**S**) présentant respectivement un mime de l'acide aspartique et un mime du guanidinium de l'arginine. Les 24 modules **A** ont été obtenus par synthèse combinatoire sur support solide et les trois modules **B** par synthèse en solution. Aucune des synthèses ne présente de difficulté particulière. L'assemblage des ces modules par coordination d'un cœur métallique a permis de reconstituer un analogue potentiel de la séquence peptidique RGD. L'assemblage a été réalisé avec du rhénium pour trois complexes modèles, ainsi qu'en mélange pour obtenir 6 produits. Un complexe au ^{99g}Tc a permis de disposer d'une référence, caractérisée par LC-MS, pour la mise au point de la complexation au ^{99m}Tc . L'optimisation des conditions de marquage au ^{99m}Tc a permis d'obtenir une méthode assez générale qui a été appliquée à la synthèse de 12 traceurs. La formation de produits secondaires issus de la complexation entre l'intermédiaire ^{99m}TcO -gluconate et le module **A** a été mise en évidence et rendra nécessaire une optimisation du protocole pour les traceurs présentant un intérêt. Des améliorations pourront être apportées en faisant varier la concentration en ligands, le temps et la température de réaction. Une purification par radio-HPLC pourrait être nécessaire, mais cette méthode nécessite d'éliminer ensuite le solvant d'élution.

Des tests de stabilité au glutathion et dans le plasma ont été réalisés sur les complexes **C2- $^{99m}\text{Tc-E3}$** et **C3- $^{99m}\text{Tc-d6}$** . Les résultats des tests dans le plasma sont contrastés puisque **C3- $^{99m}\text{Tc-d6}$** est relativement stable (il reste plus de 70% de complexe après 6 h), alors que **C2- $^{99m}\text{Tc-E3}$** s'est avéré beaucoup moins résistant (10% après 6 h). Ces complexes étant chimiquement proches, il est difficile de trouver une explication simple à ce phénomène. Il est clair que des études structurales de ces complexes (rayons X) ou une évaluation *in silico* permettraient de mieux comprendre les préférences structurales et les interactions moléculaires mises en jeu. Les tests de stabilité au glutathion ont conduit à la formation des complexes de substitution du module **B** par le GSH, conformément aux études déjà menées au laboratoire et aux données de la littérature. Comme nous l'avons mentionné précédemment, le glutathion est peu présent dans le milieu circulant et ne devrait donc pas dégrader les traceurs *in vivo*. Toutefois, des protéines contenant de nombreux thiols à leur surface, comme la sérum albumine, sont présentes dans le sang et pourraient avoir un effet délétère. La sensibilité au glutathion est par contre problématique dans la perspective d'une identification *ex vivo* par extraction de tumeur puisque du GSH peut être relargué lors de cette étape. De plus, il faut prendre en compte une éventuelle internalisation des complexes qui les confronterait au milieu intracellulaire, pouvant

entraîner leur dégradation. Il faudra certainement mettre en œuvre d'autres approches d'identification des produits ciblant la tumeur, comme par exemple une déconvolution des banques injectées.

Compte tenu des difficultés rencontrées et que nous envisageons pour le criblage *in vivo* de ces produits, nous avons choisi d'abandonner provisoirement cette approche bimoléculaire. La faisabilité du criblage *in vivo* a donc été évaluée sur les complexes cycliques que nous avons développé parallèlement et qui semblaient plus propices à cette approche (Chap. IV).

Partie expérimentale - Chapitre III

Les procédures courantes sont présentées dans l'annexe générale, en particulier les généralités sur la synthèse sur support solide ainsi que les méthodes d'analyse et de purification par HPLC.

Synthèses

Synthèse sur résine des modules A

Greffage de Boc-Asp(OBz)-OH ou de Boc-Glu(OBz)-OH sur résine oxime. Le greffage a été réalisé à l'échelle de 0,5 à 2,1 mmol de fonctions réactives sur la résine. La résine oxime (résine à 0,56 mmol/g ou 0,85 mmol/g, 1 eq.) est conditionnée 30 min dans le DCM, puis lavée deux fois au DCM. Le Boc-aa(OBzl)-OH (2 eq.) est ajouté, suivi d'éthyl-2-(hydroxyimino)-2-cyanoacétate (EACNOx) (4 eq.) et de DCM (5 mL/mmol). Une solution 0,5 M de DCC dans le DCM (1,1 eq.) est ajoutée et le mélange est agité pendant 20 h. La résine est lavée trois fois au DCM puis un double couplage est réalisé dans les mêmes conditions. L'agitation est maintenue pendant une nuit. La résine est lavée trois fois au DCM, trois fois avec un mélange EtOH/DCM 1/2 puis trois fois à l'EtOH. Deux aliquots de résine sont prélevés et soumis au test de Kaiser. Le test doit être négatif sur le premier aliquot non traité et positif avec le second traité par du TFA à 25% dans le DCM.

Capping et déprotection. La résine est reconditionnée dans le DCM et lavée deux fois au DCM. De l'anhydride acétique (1,3 eq.) et de la DIPEA (1,3 eq.) sont ajoutés et le mélange est agité pendant 1 à 2 h. La résine est lavée trois fois au DCM. La résine est pré-acidifiée par un lavage avec une solution de TFA à 25% dans le DCM, puis déprotégée pendant 30 min par cette solution. La résine est lavée trois fois au DCM, trois fois avec un mélange EtOH/DCM 1/2 puis trois fois à l'EtOH. La déprotection est contrôlée par un test de Kaiser. La résine est lavée trois fois au DCM, puis neutralisée par trois lavages avec une solution de DIPEA à 1% dans le DCM et lavée trois fois au DCM.

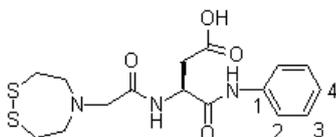
Couplage du précurseur de NS₂. Le composé **10** (1 eq.), le HATU (1,5 eq.) et la DIPEA (1,5 eq.) sont agités dans du DCM (4 mL/mmol) pendant 2 à 3 min. Le mélange

réactionnel est ajouté à la résine avec du DCM (4 mL/mmol) et l'ensemble est agité pendant une nuit. La résine est lavée trois fois au DCM, trois fois avec un mélange EtOH/DCM 1/2 puis trois fois à l'EtOH. Un test de Kaiser permet de contrôler l'efficacité du couplage.

Déplacement par les amines. Des lots des résines précédentes (0,35 mmol, 1 eq.) sont conditionnés dans du DCM pendant 30 minutes et lavés deux fois au DCM. L'amine (2 eq.) est ajoutée dans 3 mL de DCM, suivie de DIPEA (2 eq.) et d'acide acétique (2 eq.). L'ensemble est agité pendant 3 jours. Le déplacement est suivi par HPLC analytique (HPLC Waters-2) avec un gradient 0-100% B en 30 min. La solution est filtrée puis la résine est lavée deux fois au DCM et deux fois au MeOH. Les filtrats rassemblés sont évaporés, le produit brut est repris dans du DCM (20 mL). La phase organique est lavée avec d'une solution aqueuse d'acide citrique 10% (2×40 mL). Après extraction des phases aqueuses au DCM (20 mL), les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de l'eau (2×40 mL). La phase aqueuse est réextraite avec du DCM (20 mL), les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution saturée de NaCl (2×40 mL). La phase aqueuse est extraite avec du DCM (20 mL), les phases organiques sont rassemblées, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées.

Saponification des esters benzyliques. Chaque produit brut obtenu précédemment est dissous dans de l'acétonitrile (1 mL) et de l'eau (2,9 mL) est ajoutée, conduisant à une suspension laiteuse. Une solution 1 M de LiOH (1,1 eq.) fraîchement préparée est ajoutée. Après une dizaine de minutes, le mélange devient transparent. L'ensemble est agité de 2 h à 1 nuit avec un suivi par CCM et HPLC analytique dans les mêmes conditions que précédemment. Le solvant est évaporé à sec et les produits sont purifiés par HPLC semi-préparative ou par chromatographie flash, conduisant à des solides blancs après lyophilisation. Les détails concernant la purifications sont précisés pour chaque produit. D'une manière générale, l'analyse par CCM des produits contenant l'acide aspartique (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 8/2 + 0,1% d'acide acétique), conduit à un $R_f = 0,5-0,6$ pour le produit attendu et de $R_f = 0,2-0,3$ pour le produit de transamidation. Pour les produits contenant l'acide glutamique, le R_f est de 0,5-0,6 (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 9/1 + 0,1% d'acide acétique).

Analyses des produits de la série A



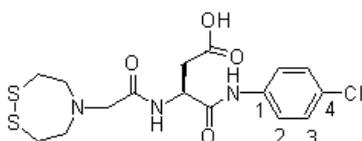
D1. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 15-30% B en 30 min. $m = 17,0$ mg, $R_{dt} = 44\%$.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,38 (bs, 1H, NH-arom), 8,50 (m, 1H, NH-Asp), 7,57 (m, 2H, arom H2), 7,30 (m, 2H, arom H3), 7,10-7,08 (m, 1H, arom

H4), 4,88 (m, 1H, CH α Asp), 3,64 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3,47 (m, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3,01-2,82 (m, 6H, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂ Asp);

RMN ¹³C (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 62,5 MHz) : δ 173,0 (C=O Asp), 168,9 (C=O NS₂), 137,9 (arom C1), 128,9 (2C, 2 \times arom C3), 124,5 (arom C4), 120,0 (2C, 2 \times arom C2), 58,0 (CH₂ NS₂), 57,1 (2C, 2 \times CH₂-N NS₂), 50,2 (C α Asp), 38,6 (2C, 2 \times CH₂-S NS₂), 37,5 (CH₂ Asp);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 384,00 (M + H⁺, 100%).

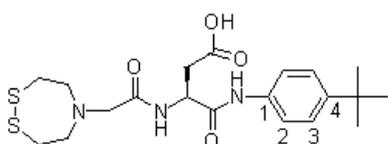


D2. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 0-100% B en 30 min. $m = 15,3$ mg, Rdt = 37%.

RMN ¹H (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 400 MHz) : δ 9,43 (bs, 1H, NH-arom), 8,51 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, NH-Asp), 7,48 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H, arom H3), 7,22 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H, arom H2), 4,87 (m, 1H, CH α Asp), 3,88 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3,57 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3,05-2,98 (m, 6H, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂ Asp);

RMN ¹³C (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 62,5 MHz) : δ 172,9 (C=O Asp), 168,9 (C=O NS₂), 136,6 (arom C4), 129,4 (arom C1), 128,9 (2C, 2 \times arom C2), 121,2 (2C, 2 \times arom C3), 58,0 (CH₂ NS₂), 57,2 (2C, 2 \times CH₂-N NS₂), 49,5 (C α Asp), 34,4 (CH₂ Asp), 29,5 (2C, 2 \times CH₂-S NS₂);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 418,00 (M + H⁺, 100%); 420,02 (M + H⁺, 43,7%).



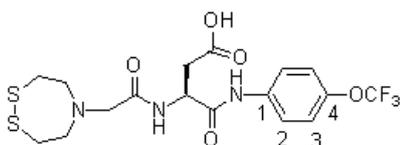
D3. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 30-55% B en 30 min ou par chromatographie flash (éluant : CHCl₃/MeOH 90/10 + 0,1% AcOH). $m = 24,4$ mg, Rdt = 37%.

RMN ¹H (D₂O + 1 goutte d'AcN, 250 MHz) : δ 8,45 (bs, 1H, NH-Asp), 7,51 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, arom H3), 7,41 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, arom H2), 3,75 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3,46 (t, $J = 5,5$ Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3,05 (t, $J = 5,5$ Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2,82-2,70 (m, 2H, CH₂ Asp), 1,19 (s, 9H, 3 \times CH₃ tBu). (le C α Asp est masqué par le pic de l'eau);

RMN ¹H (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 400 MHz) : δ 9,34 (bs, 1H, NH-arom), 8,58 (m, 1H, NH-Asp), 7,43 (m, 2H, arom H3), 7,28 (m, 2H, arom H2), 4,89 (m, 1H, CH α Asp), 4,01 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3,60 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 2,99 (m, 2H, CH₂ Asp), 2,95 (m, 4H, CH₂-S NS₂), 1,23 (s, 9H, 3 \times CH₃ tBu);

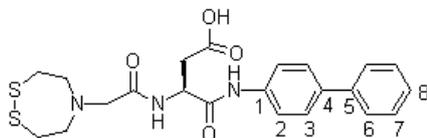
RMN ¹³C (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 62,5 MHz) : δ 173,3 (C=O Asp), 169,0 (C=O NS₂), 147,7 (arom C1), 135,2 (arom C4), 125,8 (2C, 2 \times arom C2), 120,1 (2C, 2 \times arom C3), 57,2 (CH₂ NS₂), 57,1 (2C, 2 \times CH₂-N NS₂), 49,8 (C α Asp), 38,4 (2C, 2 \times CH₂-S NS₂), 35,4 (CH₂ Asp), 34,4 (tBu), 31,4 (3C, 3 \times CH₃ tBu);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 440,13 (M + H⁺, 100%).



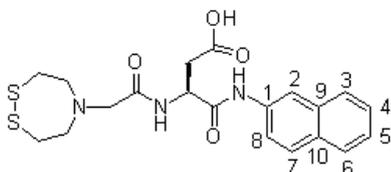
D4. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 30-55% B en 30 min ou par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90/10 + 0,1% AcOH). $m = 18,2$ mg, Rdt = 26%.

RMN ^1H (D_2O + 1 goutte d'AcN, 250 MHz) : δ 8,42 (bs, 1H, NH-Asp), 7,50 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, arom H3), 7,33 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, arom H2), 3,66 (s, 2H, CH_2 NS₂), 3,38 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H, 2 \times CH_2 -N NS₂), 2,99 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H, 2 \times CH_2 -S NS₂), 2,79-2,68 (m, 2H, CH_2 Asp). (C α Asp masqué par le pic de l'eau);
RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,48 (bs, 1H, NH-arom), 8,50 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, NH-Asp), 7,58 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, arom H3), 7,11 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, arom H2), 4,91 (m, 1H, CH α Asp), 3,96 (s, 2H, CH_2 NS₂), 3,60 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H, 2 \times CH_2 -N NS₂), 3,00-2,91 (m, 6H, CH_2 Asp et 2 \times CH_2 -S NS₂);
RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 173,4 (C=O Asp), 169,2 (C=O NS₂), 145,4 (arom C1), 136,6 (arom C4), 121,8 et 121,3 (2 \times 2C, 2 \times arom C3 et 2 \times arom C2), 58,1 (CH_2 NS₂), 57,3 (2C, 2 \times CH_2 -N NS₂), 49,8 (C α Asp), 38,5 (2C, 2 \times CH_2 -S NS₂), 36,2 (CH_2 Asp). (Rq : le quadruplet de OCF₃ n'est pas entièrement visible);
ES/MS (ionisation positive) : m/z 468,04 (M + H⁺, 100%).



D5. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 0-100% B en 30 min ou par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90/10 + 0,1% AcOH). $m = 88,3$ mg, Rdt = 55%.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,56 (bs, 1H, NH-arom), 8,52 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, NH-Asp), 7,34-7,32 (m, 2H, arom H2), 7,28-7,24 (m, 4H, arom H3 et H6), 7,16-7,12 (m, 2H, arom H7), 7,08-7,05 (m, 1H, arom H8), 4,73-4,69 (m, 1H, CH α Asp), 3,95 (s, 2H, CH_2 NS₂), 3,48 (m, 4H, 2 \times CH_2 -N NS₂), 2,85-2,77 (m, 6H, CH_2 Asp et 2 \times CH_2 -S NS₂);
RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 175,3 (C=O Asp), 169,1 (C=O NS₂), 140,0 (arom C1), 137,3 et 136,9 (2 \times 1C, arom C4 et C5), 128,7 (2C, 2 \times arom C7), 127,3 (2C, 2 \times arom C3), 127,2 (arom C8), 126,6 (2C, 2 \times arom C6), 120,6 (2C, 2 \times arom C2), 57,7 (CH_2 NS₂), 57,2 (2C, 2 \times CH_2 -N NS₂), 49,6 (C α Asp), 38,1 (2C, 2 \times CH_2 -S NS₂), 33,6 (CH_2 Asp);
ES/MS (ionisation positive) : m/z 460,08 (M + H⁺, 100%).



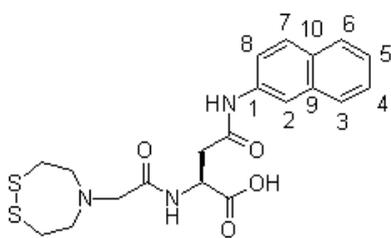
D6. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 30-55% B en 30 min ou par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90/10 + 0,1% AcOH). $m = 59,8$ mg, Rdt = 39%.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 250

MHz) : δ 9,73 (bs, 1H, NH-arom), 8,45 (bs, 1H, NH-Asp), 8,21 (m, 1H, arom), 7,75 (m, 3H, arom), 7,51-7,36 (m, 3H, arom), 5,03 (m, 1H, CH α Asp), 3,41 (m, 4H, 2 \times CH $_2$ -N NS $_2$), 3,26 (2H, s, CH $_2$ NS $_2$), 2,90-2,84 (m, 6H, CH $_2$ Asp et 2 \times CH $_2$ -S NS $_2$);

RMN ^{13}C (CDCl $_3$ + 1 goutte de CD $_3$ OD, 62,5 MHz) : δ 135,2 (arom C1), 133,8 (arom C9), 130,7 (arom C7), 128,8-127,7-127,6 et 126,5 (arom C6, C10, C4 et C3), 125,1 (arom C5), 119,9 (arom C8), 116,8 (arom C2), 57,9 (CH $_2$ NS $_2$), 56,7 (2C, 2 \times CH $_2$ -N NS $_2$), 50,4 (C α Asp), 39,3 (2C, 2 \times CH $_2$ -S NS $_2$), 29,7 (CH $_2$ Asp);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 434,11 (M + H $^+$, 100%).



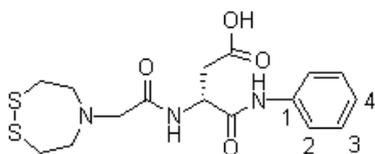
D6a. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 30-55% B en 30 min ou par chromatographie flash (éluant : CHCl $_3$ /MeOH 90/10 + 0,1% AcOH). m = 14,9 mg, Rdt = 9,8%.

RMN ^1H (CDCl $_3$ + 1 goutte de CD $_3$ OD, 250 MHz) : δ 9,63 (bs, 1H, NH-arom), 8,50 (bs, 1H, 2H, NH-Asp), 8,21 (s, 1H, arom), 7,67 (m, 3H, arom), 7,51-7,31

(m, 3H, arom), 4,78 (m, 1H, CH α Asp), 3,42 (s, CH $_2$ NS $_2$), 3,18 (m, 6H, 2 \times CH $_2$ -N NS $_2$ et CH $_2$ Asp), 2,75 (m, 4H, 2 \times CH $_2$ -S NS $_2$);

RMN ^{13}C (CDCl $_3$ + 1 goutte de CD $_3$ OD, 62,5 MHz) : δ 174,4 (C=O Asp), 172,3 (C=O NS $_2$), 135,5 (arom C1), 133,7 (arom C9), 130,5 (arom C7), 128,5-127,5-127,4 et 126,4 (arom C6, C10, C4 et C3), 124,9 (arom C5), 119,7 (arom C8), 116,5 (arom C2), 57,7 (CH $_2$ NS $_2$), 56,4 (2C, 2 \times CH $_2$ -N NS $_2$), 49,7 (C α Asp), 38,9 (2C, 2 \times CH $_2$ -S NS $_2$), 39,6 (CH $_2$ Asp);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 434,11 (M + H $^+$, 100%).



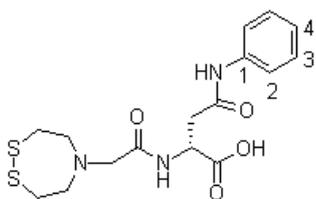
d1. Purification par chromatographie flash (éluant : CHCl $_3$ /MeOH 90/10 + 0,1% AcOH).

RMN ^1H (CDCl $_3$ + 1 goutte de CD $_3$ OD, 400 MHz) : δ 9,45 (bs, 1H, NH-arom), 8,59-8,56 (bs, 1H, NH-Asp), 7,49 (d, J = 7,8 Hz, 2H, arom H2), 7,31-7,21 (m, 2H, arom H3), 7,05 (t, J = 7,1 Hz, 2H, arom H4), 5,00-4,80 (m, 1H, CH α

Asp), 3,83 (s, 2H, CH $_2$ NS $_2$), 3,55-3,42 (m, 4H, 2 \times CH $_2$ -N NS $_2$), 3,02-2,90 (m, 4H, 2 \times CH $_2$ -S NS $_2$), 2,86-2,82 (m, 2H, CH $_2$ Asp);

RMN ^{13}C (CDCl $_3$ + 1 goutte de CD $_3$ OD, 62,5 MHz) : δ 168,8 (C=O NS $_2$), 137,5 (arom C1), 128,9 (2C, 2 \times arom C3), 124,8 (arom C4), 120,36 (2C, 2 \times arom C2), 58,1 (CH $_2$ NS $_2$), 57,2 (2C, 2 \times CH $_2$ -N NS $_2$), 50,4 (C α Asp), 36,3 (2C, 2 \times CH $_2$ -S NS $_2$), 29,7 (CH $_2$ Asp);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 384,17 (M + H $^+$, 100%).



d1a. Purification par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 90/10 + 0,1% AcOH). $m = 48,2$ mg, Rdt = 36%.

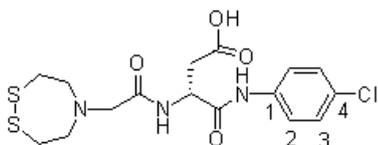
RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) :
 δ 9,65 (bs, 1H, NH-arom), 8,33 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, NH-Asp),
 7,47 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, arom H2), 7,21-7,16 (m, 2H, arom H3),
 7,01-6,98 (m, 2H, arom H4), 4,57 (m, 1H, CH_α Asp), 3,28 (s,

2H, CH_2 NS_2), 3,13-3,10 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 2,90 (m, 2H, CH_2 Asp), 2,77-2,65 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$) ;

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 173,0 (C=O Asp), 170,1 (C=O NS_2), 137,9 (arom C1), 128,7 (2C, $2 \times$ arom C3), 124,2 (arom C4), 119,7 (2C, $2 \times$ arom C2), 57,7 (CH_2 NS_2), 56,9 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 51,59 (C_α Asp), 38,9 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 36,6 (CH_2 Asp) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 384,06 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100%).

d2. Purification par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 80/20 + 0,1% AcOH). $m = 11$ mg, Rdt = 8%.



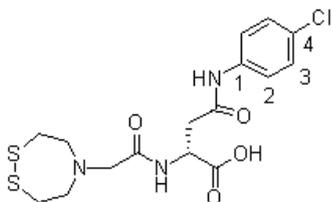
RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) :
 δ 10,12 (bs, 1H, NH-arom), 8,37 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, NH-Asp),
 7,46 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, arom H3), 7,17 (d, $J = 8,4$

Hz, 2H, arom H2), 4,96 (m, 1H, CH_α Asp), 3,29 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,20 (t, $J = 5,4$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 2,92-2,79 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 2,75-2,48 (m, 2H, CH_2 Asp) ;

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 169,8 (C=O NS_2), 136,5 (arom C4), 129,2 (arom C1), 128,9 (2C, $2 \times$ arom C2), 121,2 (2C, $2 \times$ arom C3), 57,3 (CH_2 NS_2), 56,5 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 50,1 (C_α Asp), 39,2 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 29,7 (CH_2 Asp) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 418,03 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100%) ; 419,98 ($\text{M} + \text{H}_+$, 44,1%).

d2a. Purification par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 80/20 + 0,1% AcOH). $m = 73$ mg, Rdt = 50%.



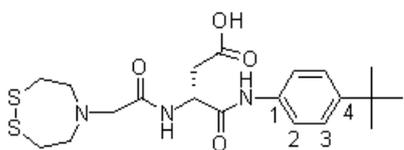
RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) :
 δ 9,81 (bs, 1H, NH-arom), 8,32 (M, 1H, NH-Asp), 7,44 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, arom H3), 7,14 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, arom H2),
 4,56 (m, 1H, CH_α Asp), 3,34 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,12 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 2,89 (m, 2H, CH_2 Asp), 2,76-2,69 (m, 4H, $2 \times$

$\text{CH}_2\text{-S NS}_2$) ;

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 178,0 (COOH Asp), 173,0 (C=O Asp), 170,3 (C=O NS_2), 136,8 (arom C4), 129,1 (arom C1), 128,8 (2C, $2 \times$ arom C2), 121,1 (2C, $2 \times$ arom C3), 57,3 (CH_2 NS_2), 56,2 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 51,6 (C_α

Asp), 39,1 (2C, 2 × CH₂-S NS₂), 29,7 (CH₂ Asp);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 418,03 (M + H⁺, 100%); 420,04 (M + H⁺, 44,1%).



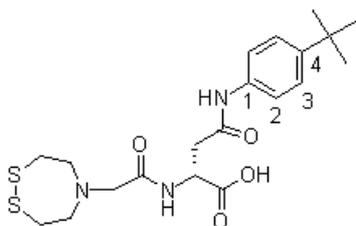
d3. Purification par chromatographie flash (éluant : CHCl₃/MeOH 80/20 + 0,1% AcOH).

RMN ¹H (CDCl₃, 2500 MHz) : δ 9,35 (bs, 1H, NH-arom), 8,45 (bs, 1H, NH-Asp), 7,44 (d, J = 7,8 Hz, 2H, arom H3), 7,26 (m, 2H, arom H2), 5,11 (m, 1H, CH_α Asp), 3,38 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3,21 (m, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 2,83

(m, 6H, CH₂ Asp et 2 × CH₂-S NS₂), 1,25 (s, 9H, 3 × CH₃ tBu);

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz) : δ 147,7 (arom C1), 135,2 (arom C4), 125,9 (2C, 2 × arom C2), 120,0 (2C, 2 × arom C3), 56,7 (3C, CH₂ NS₂ et 2 × CH₂-N NS₂), 39,2 (2C, 2 × CH₂-S NS₂), 32,0 (tBu), 31,5 (3C, 3 × CH₃ tBu), 29,8 (CH₂ Asp). (Rq. il manque C_α Asp);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 440,14 (M + H⁺, 100%).



d3a. Purification par chromatographie flash (éluant : CHCl₃/MeOH 80/20 + 0,1% AcOH). *m* = 76 mg, Rdt = 49%.

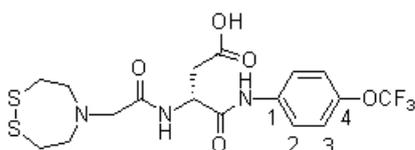
RMN ¹H (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 400 MHz) : δ 9,56 (bs, 1H, NH-arom), 8,19 (d, J = 6,8 Hz, 1H, NH-Asp), 7,29 (d, J = 8,8 Hz, 2H, arom H3), 7,12 (d, J = 8,8 Hz, 2H, arom H2), 4,43 (m, 1H, CH_α Asp), 3,20 (s, 2H, CH₂ NS₂),

3,05 (t, J = 5,4 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 2,81-2,80 (m, 2H, CH₂ Asp), 2,69-2,57 (m, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 1,11 (s, 9H, 3 × CH₃ tBu);

RMN ¹³C (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 100 MHz) : δ 172,3 (C=O Asp), 169,8 (C=O NS₂), 146,9 (arom C1), 135,1 (arom C4), 125,2 (2C, 2 × arom C2), 119,3 (2C, 2 × arom C3), 56,6 (CH₂ NS₂), 55,8 (2C, 2 × CH₂-N NS₂), 51,2 (C_α Asp), 38,8 (2C, 2 × CH₂-S NS₂), 33,9 (tBu), 30,9 (3C, 3 × CH₃ tBu), 29,3 (CH₂ Asp);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 440,08 (M + H⁺, 100%).

d4. Purification par chromatographie flash (éluant : CHCl₃/MeOH 80/20 + 0,1% AcOH).

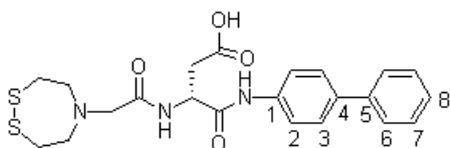


RMN ¹H (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 400 MHz) : δ 10,04 (bs, 1H, NH-arom), 8,40 (d, J = 8,4 Hz, 1H, NH-Asp), 7,54 (d, J = 8,8 Hz, 2H, arom H3), 7,07 (d, J = 8,8 Hz, 2H, arom H2), 4,98-4,96 (m, 1H, CH_α Asp), 3,31 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3,21 (t, J = 5,4 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 2,93-2,76

(m, 6H, CH₂ Asp et 2 × CH₂-S NS₂);

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 177,7 (COOH Asp), 172,7 (C=O Asp), 169,6 (C=O NS_2), 145,3 (arom C1), 136,6 (arom C4), 121,7 et 121,1 (2 \times 2C, arom C3 et C2), 57,8 (CH_2 NS_2), 56,6 (2C, 2 \times CH_2 -N NS_2), 50,6 ($\text{C}\alpha$ Asp), 39,2 (2C, 2 \times CH_2 -S NS_2), 31,0 (CH_2 Asp). (Rq : le quadruplet de OCF_3 n'est pas entièrement visible) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 468,09 (M + H^+ , 100%).



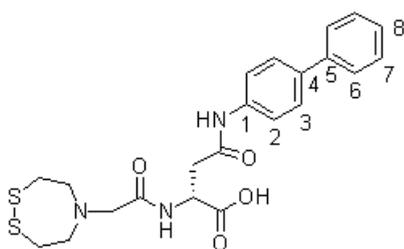
d5. Purification par chromatographie flash (éluant : CHCl_3 / MeOH 80/20 + 0,1% AcOH).

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,71 (bs, 1H, NH-arom), 8,46 (d, J = 8,0 Hz, 1H, NH-Asp), 7,58 (d, J = 8,0 Hz, 2H, arom H2), 7,46-7,42 (m, 4H, arom H3 et H6), 7,36-7,32 (m, 2H, arom H7), 7,29-7,25 (m, 1H, arom H8), 5,08 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Asp), 3,35 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,17-3,16 (m, 4H, 2 \times CH_2 -N NS_2), 2,92-2,73 (m, 6H, CH_2 Asp et 2 \times CH_2 -S NS_2) ;

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 172,8 (C=O Asp), 169,3 (C=O NS_2), 140,2 (arom C1), 137,4 et 137,1 (2 \times 1C, arom C4 et C5), 128,9 (2C, 2 \times arom C7), 127,6 (2C, 2 \times arom C3), 127,3 (arom C8), 126,8 (2C, 2 \times arom C6), 120,5 et 120,4 (2C, 2 \times arom C2), 57,7 (CH_2 NS_2), 56,7 (2C, 2 \times CH_2 -N NS_2), 50,7 ($\text{C}\alpha$ Asp), 39,0 (2C, 2 \times CH_2 -S NS_2), 29,9 (CH_2 Asp) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 460,09 (M + H^+ , 100%).

d5a. Purification par chromatographie flash (éluant : CHCl_3 /MeOH 80/20 + 0,1% AcOH).

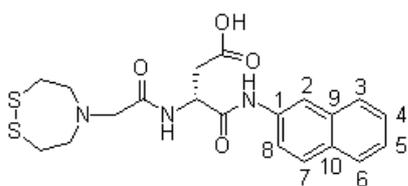


RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,85 (bs, 1H, NH-arom), 8,39 (bs, 1H, NH-Asp), 7,58 (d, J = 7,6 Hz, 2H, arom H2), 7,43-7,40 (m, 4H, arom H3 et H6), 7,33-7,29 (m, 2H, arom H7), 7,25-7,19 (m, 1H, arom H8), 4,68 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Asp), 3,31 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,12 (m, 4H, 2 \times CH_2 -N NS_2), 2,99 (m,

2H, CH_2 Asp), 2,72 (m, 4H, 2 \times CH_2 -S NS_2) ;

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 180,2 (COOH Asp), 172,9 (C=O Asp), 170,3 (C=O NS_2), 140,1 (arom C1), 137,4 et 136,9 (2 \times 1C, arom C4 et C5), 128,8 (2C, 2 \times arom C7), 127,3 (2C, 2 \times arom C3), 127,1 (arom C8), 126,6 (2C, 2 \times arom C6), 120,1 (2C, 2 \times arom C2), 56,9 (CH_2 NS_2), 56,1 (2C, 2 \times CH_2 -N NS_2), 51,7 ($\text{C}\alpha$ Asp), 39,1 (2C, 2 \times CH_2 -S NS_2), 23,6 (CH_2 Asp) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 460,06 (M + H^+ , 100%).



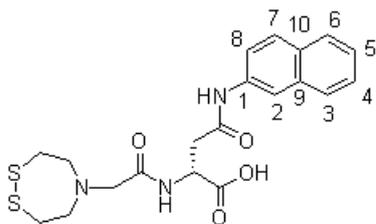
d6. Purification par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 80/20 + 0,1% AcOH).

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 10,02 (bs, 1H, NH-arom), 8,41 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, NH-Asp), 8,16 (bs, 1H, arom), 7,69-7,64 (m, 3H, arom), 7,46-7,44 (m, 1H, arom), 7,36-7,31 (m, 2H, arom),

5,05 (m, 1H, CH_α Asp), 3,28 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,14 (t, $J = 5,0$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 2,84-2,71 (m, 6H, CH_2 Asp et $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$);

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 172,7 (C=O Asp), 169,6 (C=O NS_2), 135,3 (arom C1), 133,7 (arom C9), 130,6 (arom C7), 128,7-127,6-127,5 et 126,5 (arom C6, C10, C4 et C3), 125,1 (arom C5), 119,9 (arom C8), 116,8 (arom C2), 57,3 (CH_2 NS_2), 56,4 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 50,6 (C_α Asp), 39,2 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 29,7 (CH_2 Asp);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 434,04 (M + H^+ , 100%).



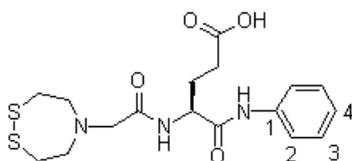
d6a. Purification par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 80/20 + 0,1% AcOH).

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,91 (bs, 1H, NH-arom), 8,37-8,36 (bs, 1H, NH-Asp), 8,12 (bs, 1H, arom), 7,64-7,59 (m, 3H, arom), 7,46-7,44 (m, 1H, arom), 7,31-7,29 (m, 2H, arom), 4,65 (m, 1H, CH_α Asp), 3,33 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,05-2,91 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$

et CH_2 Asp), 2,65-2,63 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$);

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 100 MHz) : δ 179,1 (COOH Asp), 172,9 (C=O Asp), 170,4 (C=O NS_2), 135,4 (arom C1), 133,6 (arom C9), 130,4 (arom C7), 128,5-127,4-127,4 et 126,3 (arom C6, C10, C4 et C3), 124,9 (arom C5), 119,8 (arom C8), 116,5 (arom C2), 57,1 (CH_2 NS_2), 56,0 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 51,8 (C_α Asp), 39,0 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 23,0 (CH_2 Asp);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 434,04 (M + H^+ , 100%).



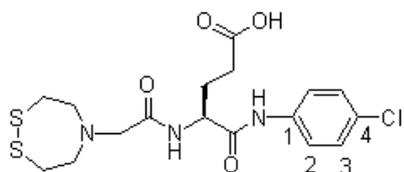
E1. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 15-30% B en 30 min. $m = 9,2$ mg, Rdt = 23%.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,45 (bs, 1H, NH-arom), 8,26 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, NH-Glu), 7,51 (dd, $J = 7,5$ et 1,2 Hz, 2H, arom H2), 7,28 (dd, $J = 7,5$ et 7,8 Hz, 2H, arom H3), 7,08 (tt, $J = 1,2$ et 7,8 Hz, 2H, arom

H4), 4,57-4,54 (m, 1H, CH_α Glu), 3,59 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,43 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 3,03-2,91 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 2,49-2,34 (m, 2H, $\text{CH}_2\gamma$ Glu), 2,25-1,92 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta$ Glu);

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 192,9 (C=O acide), 175,4 (C=O Glu), 169,4 (C=O NS_2), 137,7 (arom C1), 128,9 (2C, 2 \times arom C3), 124,4 (arom C4), 119,9 (2C, 2 \times arom C2), 57,9 (CH_2 NS_2), 57,0 (2C, 2 \times CH_2 -N NS_2), 52,6 ($\text{C}\alpha$ Glu), 37,6 (2C, 2 \times CH_2 -S NS_2), 30,1 ($\text{C}\gamma$ Glu), 27,9 ($\text{C}\beta$ Glu);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 398,10 (M + H^+ , 100%).



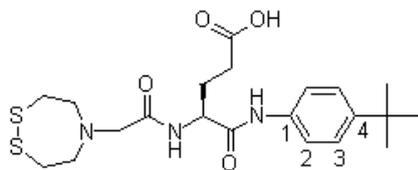
E2. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 0-100% B en 30 min. m = 6,9 mg, Rdt = 16%.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,59 (bs, 1H, NH-arom), 8,29 (d, J = 8,4 Hz, 1H, NH-Glu), 7,48 (d, J = 9,0 Hz, 2H, arom H3), 7,23

(dt, J = 9,0 Hz, 2H, arom H2), 4,57-4,54 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Glu), 3,61 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,43 (t, J = 5,6 Hz, 4H, 2 \times CH_2 -N NS_2), 3,04-2,91 (m, 4H, 2 \times CH_2 -S NS_2), 2,48-2,35 (m, 2H, $\text{CH}_2\gamma$ Glu), 2,24-1,92 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta$ Glu);

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 175,5 (C=O Glu), 169,5 (C=O NS_2), 136,4 (arom C4), 129,3 (arom C1), 128,9 (2C, 2 \times arom C2), 121,1 (2C, 2 \times arom C3), 58,0 (CH_2 NS_2), 57,1 (2C, 2 \times CH_2 -N NS_2), 52,6 ($\text{C}\alpha$ Glu), 37,6 (2C, 2 \times CH_2 -S NS_2), 30,1 ($\text{C}\gamma$ Glu), 27,9 ($\text{C}\beta$ Glu);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 431,97 (M + H^+ , 100%); 433,99 (M + H^+ , 44,1%).



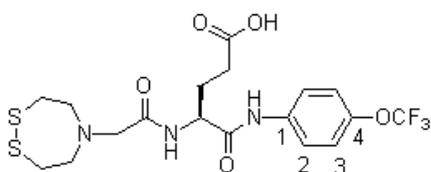
E3. Purification par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95/5 + 0,1% AcOH). m = 70 mg, Rdt = 44%.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,42 (bs, 1H, NH-arom), 8,17 (d, J = 8,8 Hz, 1H, NH-Glu), 7,43 (d, J = 8,4 Hz, 2H, arom H3),

7,27 (d, J = 8,4 Hz, 2H, arom H2), 4,65-4,63 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Glu), 3,37 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,26 (t, J = 5,6 Hz, 4H, 2 \times CH_2 -N NS_2), 2,96-2,81 (m, 4H, 2 \times CH_2 -S NS_2), 2,46-2,37 (m, 2H, $\text{CH}_2\gamma$ Glu), 2,25-1,94 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta$ Glu), 1,24 (s, 9H, 3 \times CH_3 tBu);

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 100 MHz) : δ 175,3 (C=O acide), 172,5 (C=O Glu), 169,3 (C=O NS_2), 147,3 (arom C1), 135,0 (arom C4), 125,58 (2C, 2 \times arom C2), 119,6 (2C, 2 \times arom C3), 57,6 (CH_2 NS_2), 56,6 (2C, 2 \times CH_2 -N NS_2), 52,1 ($\text{C}\alpha$ Glu), 39,1 (2C, 2 \times CH_2 -S NS_2), 34,2 (tBu), 31,1 (3C, 3 \times CH_3 tBu), 29,9 ($\text{C}\gamma$ Glu), 28,0 ($\text{C}\beta$ Glu);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 454,16 (M + H^+ , 100%).

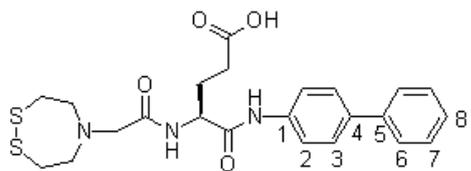


E4. Purification par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95/5 + 0,1% AcOH). $m = 44$ mg, Rdt = 26%.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ 9,60 (bs, 1H, NH-arom), 8,36 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, NH-Glu), 7,59 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, arom H3), 7,08 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, arom H2), 4,92-4,86 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Glu), 3,44 (s, 2H, CH_2 NS₂), 3,28 (t, $J = 5,8$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N}$ NS₂), 2,99 et 2,88 (2 dt, $J = 5,8$ Hz et 13,6 Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S}$ NS₂), 2,60-2,44 (m, 2H, $\text{CH}_2\gamma$ Glu), 2,37-2,04 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta$ Glu) ;

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ 175,8 (C=O acide), 173,1 (C=O Glu), 169,3 (C=O NS₂), 145,3 (arom C1), 136,5 (arom C4), 121,6 et 120,8 ($2 \times 2\text{C}$, arom C3 et C2), 59,2 (CH_2 NS₂), 57,3 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-N}$ NS₂), 52,4 (C α Glu), 39,4 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-S}$ NS₂), 30,1 (C γ Glu), 27,8 (C β Glu). (Rq : il manque le quadruplet de OCF_3) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 482,06 (M + H⁺, 100%).

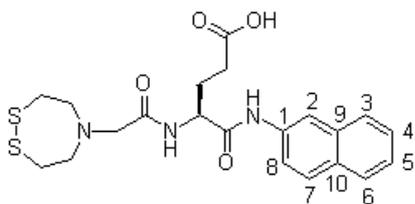


E5. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 30-55% B en 30 min. $m = 5,1$ mg, Rdt = 7,2%.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,58 (bs, 1H, NH-arom), 8,35 (m, 1H, NH-Glu), 7,60 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, arom H2), 7,53-7,50 (m, 4H, arom H3 et H6), 7,40-7,36 (m, 2H, arom H7), 7,29 (tt, $J = 7,3$ et 1,7 Hz, 1H, arom H8), 4,59-4,56 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Glu), 3,61 (s, 2H, CH_2 NS₂), 3,45 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N}$ NS₂), 3,05-2,92 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S}$ NS₂), 2,50-2,36 (m, 2H, $\text{CH}_2\gamma$ Glu), 2,27-1,95 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta$ Glu) ;

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 175,3 (C=O Glu), 169,5 (C=O NS₂), 140,4 (arom C1), 137,2 et 137,0 ($2 \times 1\text{C}$, arom C4 et C5), 128,7 (2C, $2 \times$ arom C7), 127,5 (2C, $2 \times$ arom C3), 127,1 (arom C8), 126,8 (2C, $2 \times$ arom C6), 120,2 (2C, $2 \times$ arom C2), 57,9 (CH_2 NS₂), 57,0 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-N}$ NS₂), 52,7 (C α Glu), 37,6 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-S}$ NS₂), 30,1 (C γ Glu), 27,9 (C β Glu) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 474,13 (M + H⁺, 100%).



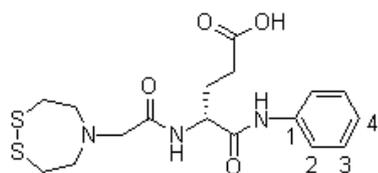
E6. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 30-55% B en 30 min. $m = 19$ mg, Rdt = 28%.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,66 (bs, 1H, NH-arom), 8,35 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, NH-Glu), 8,19-8,18 (m, 1H, arom), 7,74-7,72 (m, 3H, arom), 7,52-7,34 (m, 3H, arom), 4,65-4,61 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Glu), 3,65 (s, 2H, CH_2 NS₂), 3,46 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H, $2 \times$

CH₂-N NS₂), 3,04-2,92 (m, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 2,56-2,34 (m, 2H, CH₂γ Glu), 2,22-1,97 (m, 2H, CH₂β Glu) ;

RMN ¹³C (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 100 MHz) : δ 175,4 (C=O Glu), 169,7 (C=O NS₂), 135,1 (arom C1), 133,6 (arom C9), 130,6 (arom C7), 128,5-127,5-127,4 et 126,3 (arom C6, C10, C4 et C3), 125,0 (arom C5), 119,8 (arom C8), 116,9 (arom C2), 57,9 (CH₂ NS₂), 57,1 (2C, 2 × CH₂-N NS₂), 53,1 (Cα Glu), 36,3 (2C, 2 × CH₂-S NS₂), 30,1 (Cγ Glu), 27,6 (Cβ Glu) ;

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 448,04 (M + H⁺, 100%).



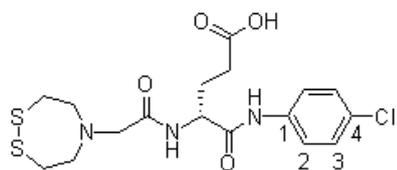
e1. Purification HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2), gradient 20-35% B en 30 min. *m* = 22 mg, Rdt = 16%.

RMN ¹H (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 400 MHz) : δ 9,45 (bs, 1H, NH-arom), 8,41 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, NH-Glu), 7,52-7,39 (m, 2H, arom H2), 7,25-7,17 (m, 2H, arom H3), 7,01-6,98 (m, 2H, arom H4), 4,51-4,47 (m, 1H, CHα Glu),

3,82 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3,53 (t, *J* = 5,6 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3,01-2,90 (m, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 2,43-2,29 (m, 2H, CH₂γ Glu), 2,18-1,87 (m, 2H, CH₂β Glu) ;

RMN ¹³C (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 62,5 MHz) : δ 175,4 (C=O Glu), 169,3 (C=O NS₂), 128,9 (2C, 2 × arom C3), 124,5 (arom C4), 119,9 (2C, 2 × arom C2), 57,9 (CH₂ NS₂), 57,2 (2C, 2 × CH₂-N NS₂), 53,2 (Cα Glu), 35,8 (2C, 2 × CH₂-S NS₂), 30,1 (Cγ Glu), 27,5 (Cβ Glu) ;

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 398,16 (M + H₊, 100%).



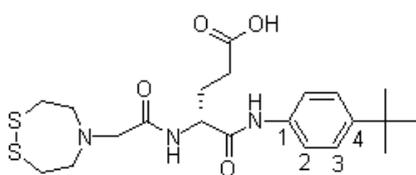
e2. Purification par chromatographie flash (éluant : CHCl₃/MeOH 95/5 + 0,1% AcOH). *m* = 46 mg, Rdt = 30%.

RMN ¹H (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 400 MHz) : δ 9,50 (bs, 1H, NH-arom), 8,31 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, NH-Glu), 7,48 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, arom H3), 7,19 (d,

J = 8,8 Hz, 2H, arom H2), 4,88-4,82 (m, 1H, CHα Glu), 3,41 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3,27 (t, *J* = 5,4 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 2,96 et 2,86 (2 dt, *J* = 5,4 et 13,6 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 2,47 (m, 2H, CH₂γ Glu), 2,32-1,99 (m, 2H, CH₂β Glu) ;

RMN ¹³C (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 100 MHz) : δ 175,2 (C=O acide), 172,6 (C=O Glu), 169,5 (C=O NS₂), 136,4 (arom C4), 129,1 (arom C1), 128,8 (2C, 2 × arom C2), 121,1 (2C, 2 × arom C3), 57,9 (CH₂ NS₂), 56,6 (2C, 2 × CH₂-N NS₂), 52,2 (Cα Glu), 39,2 (2C, 2 × CH₂-S NS₂), 28,2 (Cγ Glu), 25,3 (Cβ Glu) ;

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 432,04 (M + H⁺, 100%) ; 434,05 (M + H⁺, 44,1%).



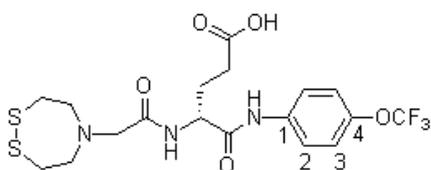
e3. Purification par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95/5 + 0,1% AcOH). $m = 67$ mg, Rdt = 42%.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,45 (bs, 1H, NH-arom), 8,15 (d, $J = 8,8$

Hz, 1H, NH-Glu), 7,43 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, arom H3), 7,27 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, arom H2), 4,64-4,61 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Glu), 3,36 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,25 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 2,92 et 2,83 (2 dt, $J = 5,6$ et 13,6 Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 2,79-2,39 (m, 2H, $\text{CH}_2\gamma$ Glu), 2,23-1,94 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta$ Glu), 1,23 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$ tBu) ;

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 100 MHz) : δ 175,5 (C=O acide), 172,5 (C=O Glu), 169,2 (C=O NS_2), 147,3 (arom C1), 135,0 (arom C4), 125,6 (2C, $2 \times$ arom C2), 119,6 (2C, $2 \times$ arom C3), 57,6 (CH_2 NS_2), 56,6 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 52,2 ($\text{C}\alpha$ Glu), 39,2 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 34,2 (tBu), 31,2 (3C, $3 \times \text{CH}_3$ tBu), 30,0 ($\text{C}\gamma$ Glu), 28,1 ($\text{C}\beta$ Glu) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 454,16 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100%).



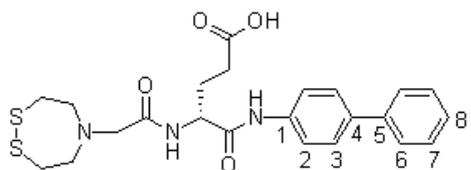
e4. Purification par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95/5 + 0,1% AcOH). $m = 53$ mg, Rdt = 31%.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,62 (bs, 1H, NH-arom), 8,37 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, NH-Glu), 7,59 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, arom H3), 7,08

(d, $J = 8,4$ Hz, 2H, arom H2), 4,93-4,86 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Glu), 3,44 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,29 (t, $J = 5,6$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 2,98 et 2,88 (2 dt, $J = 5,6$ et 14,0 Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 2,60-2,45 (m, 2H, $\text{CH}_2\gamma$ Glu), 2,36-2,05 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta$ Glu) ;

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 100 MHz) : δ 175,8 (C=O acide), 173,1 (C=O Glu), 169,3 (C=O NS_2), 145,2 (arom C1), 136,5 (arom C4), 121,6 (2C, $2 \times$ arom C3), 120,8 (2C, $2 \times$ arom C2), 59,1 (CH_2 NS_2), 57,3 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 52,4 ($\text{C}\alpha$ Glu), 39,3 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 30,1 ($\text{C}\gamma$ Glu), 27,9 ($\text{C}\beta$ Glu). (Rq : il manque le quadruplet de OCF_3) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 482,07 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100%).



e5. Purification par chromatographie flash (éluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 95/5 + 0,1% AcOH). $m = 59$ mg, Rdt = 36%.

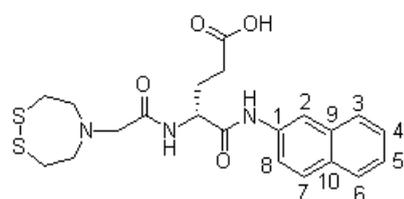
RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 9,52 (bs, 1H, NH-arom), 8,36 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, NH-Glu), 7,64 (d, $J_{2-3} = 8,4$ Hz, 2H, arom

H2), 7,48-7,45 (m, 4H, arom H3 et H6), 7,37-7,34 (m, 2H, arom H7), 7,31-7,27 (m, 1H,

arom H8), 5,01-4,95 (m, 1H, CH α Glu), 3,46 (s, 2H, CH $_2$ NS $_2$), 3,30 (t, J = 5,4 Hz, 4H, 2 \times CH $_2$ -N NS $_2$), 2,99 et 2,88 (2 dt, J = 5,4 et 14,0 Hz, 4H, 2 \times CH $_2$ -S NS $_2$), 2,62-2,55 (m, 2H, CH $_2\gamma$ Glu), 2,40-2,07 (m, 2H, CH $_2\beta$ Glu);

RMN ^{13}C (CDCl $_3$ + 1 goutte de CD $_3$ OD, 100 MHz) : δ 175,8 (C=O acide), 172,9 (C=O Glu), 169,3 (C=O NS $_2$), 140,3 (arom C1), 137,2 et 137,0 (2 \times 1C, arom C4 et C5), 128,7 (2C, 2 \times arom C7), 127,4 (2C, 2 \times arom C3), 127,0 (arom C8), 126,7 (2C, 2 \times arom C6), 120,1 (2C, 2 \times arom C2), 58,6 (CH $_2$ NS $_2$), 57,1 (2C, 2 \times CH $_2$ -N NS $_2$), 52,5 (C α Glu), 39,3 (2C, 2 \times CH $_2$ -S NS $_2$), 30,2 (C γ Glu), 28,2 (C β Glu);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 474,13 (M + H $^+$, 100%).



e6. Purification par chromatographie flash (éluant : CHCl $_3$ /MeOH 95/5 + 0,1% AcOH). m = 34 mg, Rdt = 22%.

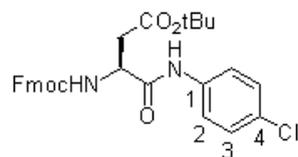
RMN ^1H (CDCl $_3$ + 1 goutte de CD $_3$ OD, 400 MHz) : δ 9,71 (bs, 1H, NH-arom), 8,40 (m, 1H, NH-Glu), 8,20 (m, 1H, arom), 7,73-7,70 (m, 3H, arom), 7,47-7,45 (m, 1H, arom), 7,41-7,32 (m, 2H, arom), 4,70-4,66

(m, 1H, CH α Glu), 3,39 (s, 2H, CH $_2$ NS $_2$), 3,27 (t, J = 5,6 Hz, 4H, 2 \times CH $_2$ -N NS $_2$), 2,94 et 2,85 (2 dt, J = 5,6 et 13,6 Hz, 4H, 2 \times CH $_2$ -S NS $_2$), 2,51-2,38 (m, 2H, CH $_2\gamma$ Glu), 2,30-1,97 (m, 2H, CH $_2\beta$ Glu);

RMN ^{13}C (CDCl $_3$ + 1 goutte de CD $_3$ OD, 100 MHz) : δ 175,6 (C=O acide), 172,6 (C=O Glu), 169,5 (C=O NS $_2$), 135,1 (arom C1), 133,6 (arom C9), 130,5 (arom C7), 128,6-127,5-127,4 et 126,3 (arom C6, C10, C4 et C3), 124,9 (arom C5), 119,7 (arom C8), 116,6 (arom C2), 57,8 (CH $_2$ NS $_2$), 56,6 (2C, 2 \times CH $_2$ -N NS $_2$), 52,3 (C α Glu), 39,2 (2C, 2 \times CH $_2$ -S NS $_2$), 30,0 (C γ Glu), 28,2 (C β Glu);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 448,11 (M + H $^+$, 100%).

Synthèse en solution de D2 et D2a



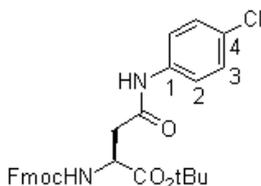
Composé 12. Le Fmoc-Asp(OtBu)-OH (411 mg, 1mmol, 1 eq.) est dissous dans du CHCl $_3$ (10 mL), suivi de HOBt (203 mg, 1,5 mmol, 1,5 eq.) et de EDC (288 mg, 1,5 mmol, 1 eq.). La 4-chloroaniline (127 mg, 1 mmol, 1 eq.) est ajoutée, suivie de DIPEA (522 μL , 3 mmol, 3eq.). Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10%.

La phase aqueuse est extraite avec du CHCl $_3$. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaHCO $_3$, puis de NaCl, séchées sur Na $_2$ SO $_4$, filtrées et évaporées. Le mélange est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 8/2), conduisant à un solide blanc. m = 105 mg, Rdt

= 20%.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ 8,56 (bs, 1H, NH-arom), 7,77 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, arom Fmoc), 7,58 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, arom Fmoc), 7,45-7,38 (m, 4H, arom Fmoc et arom H2), 7,32-7,27 (m, 4H, arom Fmoc et arom H3), 6,06 (bs, 1H, NH Fmoc), 4,63 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Asp), 4,48 (d, $J = 6,7$ Hz, 2H, CH_2 Fmoc), 4,23 (t, $J = 6,7$ Hz, 1H, CH Fmoc), 2,99-2,94 et 2,70-2,64 (2m, 2H, CH_2 Asp), 1,46 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$ tBu) ;

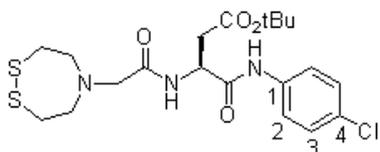
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) : δ 183,3 (C=O tBu), 168,5 (C=O Asp), 143,5 (2C, arom Fmoc), 141,3 (2C, arom Fmoc), 129,5 (arom C1), 128,9 (2C, $2 \times$ arom C2), 127,8 (2C, arom Fmoc), 127,1 (2C, arom Fmoc), 124,9 (2C, arom Fmoc), 121,1 (2C, $2 \times$ arom C3), 120,1 (2C, arom Fmoc), 82,4 (tBu), 67,3 (CH_2 Fmoc), 47,1 (CH Fmoc), 28,0 (3C, $3 \times \text{CH}_3$ tBu). (les signaux $\text{C}\alpha$ et CH_2 de Asp ne sont pas visibles).



Composé 12a. Le Fmoc-Asp-OtBu (411 mg, 1mmol, 1 eq.) est dissous dans du CHCl_3 (10 mL), suivi de HOBt (203 mg, 1,5 mmol, 1,5 eq.) et de EDC (288 mg, 1,5 mmol, 1 eq.). La 4-chloroaniline (127 mg, 1 mmol, 1 eq.) est ajoutée, suivie de DIPEA (522 μL , 3 mmol, 3eq.). Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse

d'acide citrique 10%. La phase aqueuse est extraite avec du CHCl_3 . Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaHCO_3 , puis de NaCl , séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées. Le mélange est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 7/3), conduisant à un solide blanc. $m = 236$ mg, Rdt = 45%.

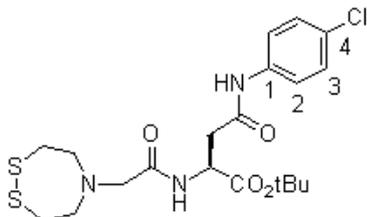
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ 7,74 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, arom Fmoc), 7,63 (bs, 1H, NH-arom), 7,56 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, arom Fmoc), 7,44 (m, 2H, arom Fmoc), 7,38 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, arom H2), 7,29-7,25 (m, 4H, arom Fmoc et arom H3), 6,00 (bs, 1H, NH Fmoc), 4,53 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Asp), 4,38 (m, 2H, CH_2 Fmoc), 4,21 (t, $J = 7,07$ Hz, 1H, CH Fmoc), 3,04 et 2,92 (2m, 2H, CH_2 Asp), 1,48 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$ tBu).



Composé 13. Le composé **12** (93 mg, 0,18 mmol, 1 eq.) est dissous dans de la DMF (1 mL). De la DIPA (252 μL , 1,8 mmol, 10 eq.) est ajoutée et le mélange est agité à température ambiante pendant 2,5 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le composé **10** (41 mg, 0,18 mmol, 1 eq.) est préactivé en présence de HATU (68 mg, 0,18 mmol, 1

eq.) et de DIPEA (62 μL , 0,36 mmol, 2 eq.) dans du DCM (2 mL) pendant 3 min. Le mélange est ajouté à l'amine déprotégée et l'ensemble est agité pendant 1 nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 7/3 puis 1/1), conduisant à un solide blanc. $m = 64$ mg, Rdt = 75%.

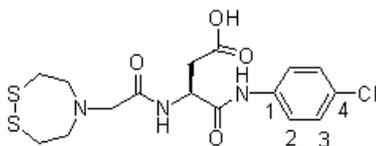
RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 7,43 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, arom H2), 7,20 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, arom H3), 4,78 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H, $\text{CH}\alpha$ Asp), 3,41 (bs, 2H, CH_2 NS_2), 3,31-2,94 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 2,90-2,83 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 2,81-2,66 (m, 2H, CH_2 Asp), 1,37 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$ tBu).



Composé 13a. Le composé **12a** (221 mg, 0,43 mmol, 1 eq.) est dissous dans de la DMF (2,4 mL). De la DIPA (603 μL , 4,3 mmol, 10 eq.) est ajoutée et le mélange est agité à température ambiante pendant 4 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le composé **10** (99 mg, 0,43 mmol, 1 eq.) est préactivé en présence de HATU (163 mg, 0,43 mmol, 1 eq.) et de DIPEA (150 μL , 0,86 mmol, 2 eq.) dans du DCM

(3 mL) pendant 3 min. Le mélange est ajouté à l'amine déprotégée et l'ensemble est agité pendant 1 nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 1/1 puis 3/7), conduisant à un solide blanc. $m = 228$ mg, Rdt quantitatif.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 7,45 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, arom H2), 7,20 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, arom H3), 4,63 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H, $\text{CH}\alpha$ Asp), 3,40 (bs, 2H, CH_2 NS_2), 3,26 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 2,86-2,83 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 2,97-2,76 (m, 2H, CH_2 Asp), 1,42 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$ tBu).

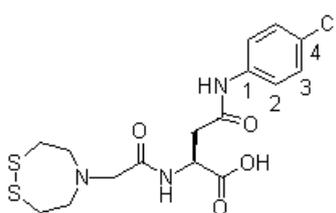


D2. Le composé **13** (49 mg, 0,104 mmol, 1 eq.) est repris dans un mélange TFA/TIPS/ H_2O 95/2,5/2,5 (3 mL) et l'ensemble est agité pendant 30 min à température ambiante. Après évaporation sous pression réduite, du toluène est chassé trois fois et le produit est séché sur pompe à palettes, conduisant à un solide blanc.

RMN ^1H (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 400 MHz) : δ 8,66 (bs, 1H, NH), 7,48 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, arom H3), 7,21 (m, 2H, arom H2), 4,90 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Asp), 4,06 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3,67 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 3,06 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 2,87 (m, 2H, CH_2 Asp) ;

RMN ^{13}C (CDCl_3 + 1 goutte de CD_3OD , 100 MHz) : δ 173,3 (C=O Asp), 168,8 (C=O NS_2), 136,1 (arom C4), 129,6 (arom C1), 128,9 (2C, $2 \times$ arom C2), 121,6 (2C, $2 \times$ arom C3), 57,9 (CH_2 NS_2), 57,3 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 50,5 (C α Asp), 34,7 (CH_2 Asp), 29,6 (2C, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 418,05 (M + H^+ , 100%) ; 420,01 (M + H^+ , 43,7%).



D2a. Le composé **13a** (215 mg, 0,454 mmol, 1 eq.) est repris dans un mélange TFA/TIPS/H₂O 95/2,5/2,5 (10 mL) et l'ensemble est agité pendant 30 min à température ambiante. Après évaporation sous pression réduite, du toluène est chassé trois fois et le produit est séché sur pompe à palettes, conduisant à un solide blanc.

RMN ¹H (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 400 MHz) : δ 7,41 (d, J = 8,8 Hz, 2H, arom H3), 7,15 (m, 2H, arom H2), 4,77 (m, 1H, CH_α Asp), 3,82 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3,53 (t, J = 5,6 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 2,96 (m, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 2,88 (d, J = 5,9 Hz, 2H, CH₂ Asp) ;

RMN ¹³C (CDCl₃ + 1 goutte de CD₃OD, 62,5 MHz) : δ 173,6 (C=O Asp), 168,5 (C=O NS₂), 136,5 (arom C4), 128,9 (arom C1), 128,8 (2C, 2 × arom C2), 120,9 (2C, 2 × arom C3), 58,1 (CH₂ NS₂), 57,2 (2C, 2 × CH₂-N NS₂), 49,1 (C_α Asp), 38,3 (2C, 2 × CH₂-S NS₂), 35,3 (CH₂ Asp) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 417,99 (M + H⁺, 100%) ; 420,01 (M + H⁺, 43,7%).

Synthèse des modules B : C2, C3 et C4

Synthèse du disulfure C2

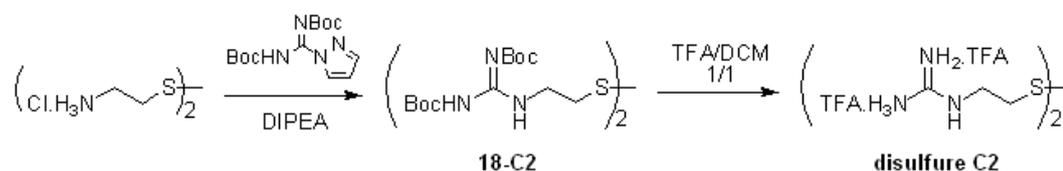
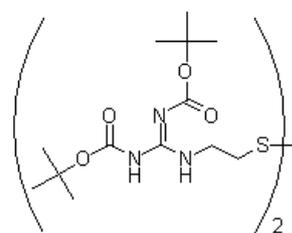


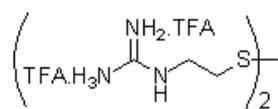
FIG. III.26 – Voie de synthèse de C2.



18-C2. Le dihydrochlorure de cystamine (1,13 g, 5 mmol, 1 eq.) est mis en suspension dans du DCM (50 mL). De la DIPEA est ajoutée jusqu'à l'obtention d'un pH basique puis 1,74 mL (10 mmol, 2 eq.) de DIPEA sont ajoutés, suivis de N,N'-di-Boc-1H-pyrazole-1-carboxamide (3,26 g, 10,5 mmol, 2,1 eq.). Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 8/2 amené progressivement à 5/5 puis CH₂Cl₂ pur). Du pyrazole étant encore identifié en RMN, le produit est repris dans du DCM et lavé avec une solution aqueuse d'acide citrique à 10%. Le produit pur ainsi obtenu est directement engagé dans l'étape suivante.

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) : δ 11,56 (s, 2H, 2 × NH-(Boc)), 8,64 (s, 2H, 2 × NH), 3,77 (m, 4H, 2 × CH₂-N), 2,88 (m, 4H, 2 × CH₂-S), 1,50 (s, 36H, 4 × tBu) ;

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,5 MHz) : δ 163,6 (2C, C=O), 156,3 (2C, C=N), 153,3 (2C, C=O), 83,4 (2C, tBu), 79,5 (2C, tBu), 39,2 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 37,1 (2C, $\text{CH}_2\text{-S}$), 28,4 (6C, tBu), 28,2 (6C, tBu).



Disulfure C2. Le produit **18-C2** est dissous dans du DCM (50 mL) et du TFA (50 mL) est ajouté. Le mélange est agité pendant 1 h, le solvant est évaporé, du toluène est chassé trois fois et le produit est séché sur pompe à palettes. Un solide beige est obtenu correspondant au produit attendu sous forme de sel de TFA. $m =$

1,44 g, Rdt global = 62%.

RMN ^1H (CD_3OD , 250 MHz) : δ 3,54 (t, $J = 6,4$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N}$), 2,90 (t, $J = 6,4$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S}$);

RMN ^{13}C (CD_3OD , 62,5 MHz) : δ 158,6 (2C, C=N), 41,0 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 37,3 (2C, $\text{CH}_2\text{-S}$);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 237,06 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100%).

Synthèse du disulfure C3

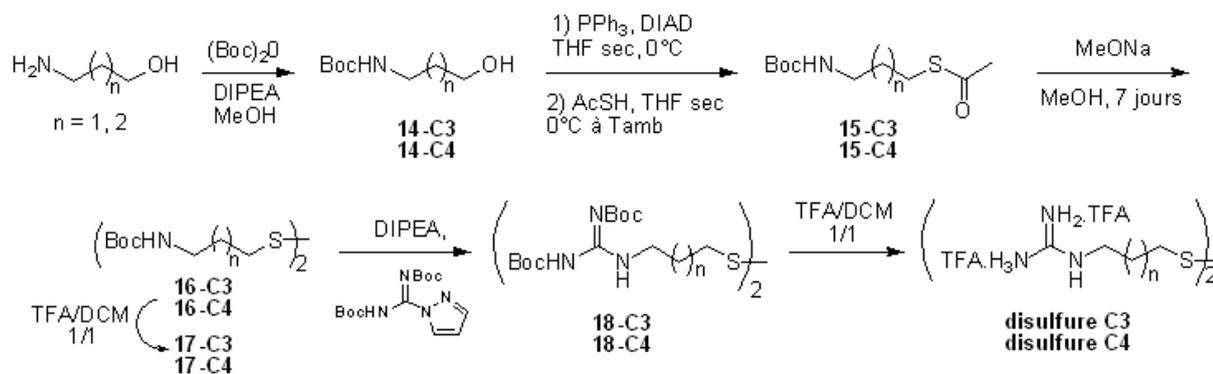
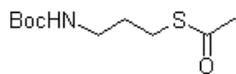


FIG. III.27 – Voie de synthèse des disulfures C3 et C4.

14-C3. Le 3-aminopropan-1-ol (2,3 mL, 30 mmol, 1 eq.) est dissous dans du MeOH (30 mL). Le di-*tert*-butyl dicarbonate (6,54 g, 30 mmol, 1 eq.) puis de de la DIPEA (10,5 mL, 60 mmol, 2 eq.) sont ajoutés. Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé à sec, le produit brut est repris dans de l'AcOEt (50 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10% (3×50 mL). Les phases aqueuses rassemblées sont extraites avec de l'AcOEt (2×50 mL). Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaCl (2×50 mL), séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées. Une huile jaune pâle pure est obtenue. $m = 4,9$ g, Rdt = 93%.

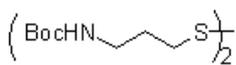
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) : δ 4,76 (bs, 1H, NH), 3,65 (t, $J = 5,6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$),

3,29-3,27 (m, 2H, CH₂-N), 1,69-1,63 (m, 2H, NC-CH₂-CO), 1,45 (s, 9H, tBu).



15-C3. La triphénylphosphine (10,2 g, 39 mmol, 1,4 eq.) est introduite dans un tricol purgé à l'argon, refroidi dans un bain de glace. Du THF anhydre (90 mL) est ajouté, suivi du diisopropyl azodicarboxylate (7,7 mL, 39 mmol, 1,4 eq.). Le mélange est agité pendant 30 min à 0°C : un précipité beige se forme. Le produit **14-C3** (4,9 g, 28 mmol, 1 eq.), dissous dans du THF anhydre (10 mL), est ajouté (coloration orange). L'acide thiolacétique (2,79 mL, 39 mmol, 1,4 eq.) est ajouté et le mélange est agité 1 h à 0°C (coloration orange opaque) puis une nuit à température ambiante (coloration rouge). Le solvant est évaporé, le produit brut est repris dans de l'AcOEt (100 mL) et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10%. Les phases aqueuses rassemblées sont extraites avec de l'AcOEt. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaHCO₃ puis de NaCl, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées. L'oxyde de triphénylphosphine est partiellement éliminé par filtration après avoir repris le produit dans l'hexane. Le mélange est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 9/1), conduisant à une huile jaune pâle. m = 5,2 g, Rdt = 86%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ 4,78 (bs, 1H, NH), 3,18-3,13 (m, 2H, CH₂-N), 2,90 (t, J = 7,0 Hz, 2H, CH₂-S), 2,34 (s, 3H, CH₃-CO), 1,79-1,72 (m, 2H, NC-CH₂-CS), 1,44 (s, 9H, tBu).



16-C3. Le produit **15-C3** (5,2 g, 22 mmol, 1 eq.) est dissous dans du MeOH (100 mL). Le méthanolate de sodium (1,25 g, 23,1 mmol, 1,05 eq.) est ajouté par portions, la solution devient rouge. Le mélange est agité vigoureusement avec une garde à CaCl₂ pendant 7 jours à température ambiante. La révélation au DTNB des plaques CCM montre qu'il reste des traces de thiol. Le solvant est évaporé, du toluène est chassé deux fois. Le brut est repris dans de l'AcOEt (100 mL), la phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10%. Les phases aqueuses rassemblées sont extraites avec de l'AcOEt. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaHCO₃ puis de NaCl. Les phases aqueuses sont rassemblées et extraites avec de l'AcOEt. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées. Le mélange est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 8/2) permettant d'isoler le thiol correspondant (m = 62 mg) ainsi que le disulfure attendu (m = 3,4 g, Rdt = 86%) sous la forme d'un solide blanc.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ 4,67 (bs, 2H, 2 × NH), 3,25-3,20 (m, 4H, 2 × CH₂-N), 2,70 (t, J = 7,2 Hz, 4H, 2 × CH₂-S), 1,88 (tt, J = 6,6 et 7,2 Hz, 4H, 2 × NC-CH₂-CS), 1,44 (s, 18H, 2 × tBu) ;

RMN ¹H (CD₃OD, 250 MHz) : δ 3,05 (t, J = 6,7 Hz, 4H, 2 × CH₂-N), 2,62 (t, J =

7,2 Hz, 4H, 2 × CH₂-S), 1,76 (tt, J = 6,7 et 7,2 Hz, 4H, 2 × NC-CH₂-CS), 1,35 (s, 18H, 2 × tBu);

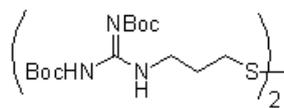
RMN ¹³C (CD₃OD, 62,5 MHz) : δ 173,8 (2C, C=O), 79,9 (2C, tBu), 40,0 (2C, CH₂-N), 36,7 (2C, CH₂-S), 30,5 (2C, NC-CH₂-CS), 28,8 (6C, tBu);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 381,02 (M + H⁺, 100%).



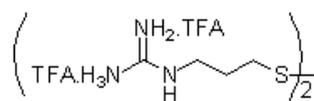
17-C3. Le disulfure **16-C3** (2,95 g, 7,8 mmol) est dissous dans du DCM (30 mL). Du TFA (30 mL) est ajouté et le mélange est agité pendant 30 min. Le solvant est évaporé, du toluène est chassé trois fois et le solvant restant est évaporé sur une pompe à palettes. Le produit est directement utilisé dans l'étape suivante.

RMN ¹H (CD₃OD, 250 MHz) : δ 3,01 (t, J = 7,6 Hz, 4H, 2 × CH₂-N), 2,77 (t, J = 7,1 Hz, 4H, 2 × CH₂-S), 2,06 (tt, J = 7,6 et 7,1 Hz, 4H, 2 × NC-CH₂-CS).



18-C3. L'homocystamine **17-C3** (7,8 mmol, 1 eq.) est dissoute dans du DCM (50 mL). Le pH est basifié à la DIPEA puis 2,7 mL (15,6 mmol, 2 eq.) de DIPEA sont ajoutés, suivis de N,N'-di-Boc-1H-pyrazole-1-carboxamide (5 g, 16,4 mmol, 2,1 eq.). Le mélange est agité pendant une nuit. Le solvant est évaporé et le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : chloroforme), conduisant à un solide blanc. *m* = 3,6 g, Rdt = 69%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ 11,49 (s, 2H, 2 × NH-Boc), 8,38 (t, J = 5,0 Hz, 2H, 2 × NH), 3,52 (td, J = 5,0 et 7,1 Hz, 4H, 2 × CH₂-N), 2,71 (t, J = 7,3 Hz, 4H, 2 × CH₂-S), 1,99 (tt, J = 7,1 et 7,3 Hz, 4H, 2 × NC-CH₂-CS), 1,49 (s, 36H, 4 × tBu).



Disulfure C3. Le disulfure **18-C3** (3,6 g, 5,4 mmol) est dissous dans du DCM (50 mL). Du TFA (50 mL) est ajouté et le mélange est agité pendant 1,5 h. Le solvant est évaporé, du toluène est chassé trois fois et le reste de solvant est évaporé sur une pompe à palettes. L'huile beige obtenue correspond au sel de TFA. *m*

= 2,7 g, Rdt quantitatif.

RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) : δ 3,24 (t, J = 6,8 Hz, 4H, 2 × CH₂-N), 2,72 (t, J = 7,1 Hz, 4H, 2 × CH₂-S), 1,95 (tt, J = 6,8 et 7,1 Hz, 4H, 2 × NC-CH₂-CS);

RMN ¹³C (CD₃OD, 62,5 MHz) : δ 158,8 (2C, C=N), 40,9 (2C, CH₂-N), 35,8 (2C, CH₂-S), 29,2 (2C, NC-CH₂-CS);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 264,95 (M + H⁺, 100%).

Synthèse du disulfure C4



14-C4. Le 4-aminobutan-1-ol (2,8 mL, 30 mmol, 1 eq.) est dissous dans du MeOH (30 mL). Le di-*tert*-butyl dicarbonate (6,54 g, 30 mmol, 1 eq.) puis de la DIPEA (10,5 mL, 60 mmol, 2 eq.) sont ajoutés. Le mélange est agité une nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé à sec, le produit brut est repris dans de l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10%. Les phases aqueuses rassemblées sont extraites avec de l'AcOEt. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaCl, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées. Une huile jaune pâle pure est obtenue. m = 5,6 g, Rdt = 99%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ 4,63 (bs, 1H, NH), 3,67 (t, J = 6,0 Hz, 2H, CH₂-O), 3,15 (m, 2H, CH₂-N), 1,60-1,52 (m, 4H, NC-CH₂-CH₂-CO), 1,44 (s, 9H, tBu).



15-C4. La triphénylphosphine (11,8 g, 45 mmol, 1,5 eq.) est introduite dans un tricol purgé à l'argon, refroidi dans un bain de glace. Du THF anhydre (90 mL) est ajouté, suivis du diisopropyl azodicarboxylate (8,9 mL, 45 mmol, 1,5 eq.). Le mélange est agité pendant 30 min à 0°C, un précipité beige se forme. Le produit **14-C4** (5,6 g, 30 mmol, 1 eq.) dissous dans du THF anhydre (10 mL) est ajouté 1 heure à 0°C (coloration vert opaque) puis une nuit à température ambiante (coloration jaune). Le solvant est évaporé, le produit brut est repris dans de l'AcOEt et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10%. Les phases aqueuses rassemblées sont extraites avec de l'AcOEt. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaHCO₃ puis de NaCl, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées. L'oxyde de triphénylphosphine est partiellement éliminé par filtration après avoir repris le produit dans l'hexane. Le mélange est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 9/1), conduisant à une huile jaune pâle. m = 4,8 g, Rdt = 65%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ 4,55 (bs, 1H, NH), 3,15-3,10 (m, 2H, CH₂-N), 2,87 (t, J = 7,0 Hz, 2H, CH₂-S), 2,32 (s, 3H, CH₃-CO), 1,64-1,50 (m, 4H, NC-CH₂-CH₂-CS), 1,43 (s, 9H, tBu) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 248,03 (M + H⁺, 100%).

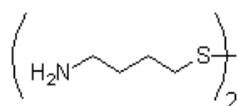


16-C4. Le produit **15-C4** (4,8 g, 19,4 mmol, 1 eq.) est dissous dans du MeOH (100 mL). Le méthanolate de sodium (1,1 g, 20,4 mmol, 1,05 eq.) est ajouté par portions, la solution devient jaunorange. Le mélange est agité pendant 4 jours à température ambiante (traces de thiol d'après révélation au DTNB des plaques CCM). Le solvant est évaporé, du toluène est chassé deux fois. Le brut est repris dans de l'AcOEt, la phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10%. Les phases aqueuses

rassemblées sont extraites avec de l'AcOEt. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaHCO₃ puis de NaCl. Ces phases aqueuses sont rassemblées et extraites avec de l'AcOEt. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées. Le mélange est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 8/2) permettant d'isoler le thiol correspondant (m = 0,99 g) ainsi que le disulfure attendu (m = 3,2 g, Rdt = 76%) sous la forme d'un solide blanc.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ 4,60 (bs, 2H, 2 × NH), 3,16-3,12 (m, 4H, 2 × CH₂-N), 2,68 (t, J = 7,2 Hz, 4H, 2 × CH₂-S), 1,75-1,69 et 1,67-1,54 (2m, 8H, 2 × NC-CH₂-CH₂-CS), 1,44 (s, 18H, 2 × tBu) ;

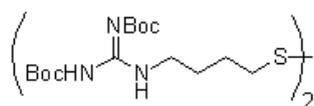
ES/MS (ionisation positive) : m/z 409,08 (M + H⁺, 100%).



17-C4. Le disulfure **16-C4** (4,1 g, 10 mmol) est dissous dans du DCM (35 mL). Du TFA (35 mL) est ajouté et le mélange est agité pendant 45 min. Le solvant est évaporé, du toluène est chassé trois fois et le solvant restant est évaporé sur une pompe à palettes. L'huile jaune obtenue correspond au sel de TFA. m = 4,5 g, Rdt quantitatif.

RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) : δ 2,95 (t, J = 7,0 Hz, 4H, 2 × CH₂-N), 2,75 (t, J = 6,6 Hz, 4H, 2 × CH₂-S), 1,83-1,72 (m, 8H, 2 × NC-CH₂-CH₂-CS) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 208,96 (M + H⁺, 100%).

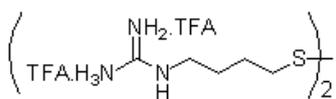


18-C4. Le sel **17-C4** (1,6 g, 4 mmol, 1eq.) est dissous dans du DCM (25 mL). Le pH est basifié à la DIPEA puis 1,4 mL (8 mmol, 2 eq.) de DIPEA sont ajoutés, suivis de N,N'-di-Boc-1H-pyrazole-1-carboximidine (2,6 g, 8,4 mmol, 2,1 eq.). Le mélange est agité pendant une nuit. Le solvant est évaporé, le produit

brut est repris dans du DCM, la phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique 10%. Les phases aqueuses rassemblées sont extraites avec du DCM. Les phases organiques rassemblées sont lavées avec une solution saturée de NaCl. Ces phases aqueuses sont rassemblées et extraite avec du DCM. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées. Le mélange est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 9/1), conduisant à un solide blanc. m = 1,7 g, Rdt = 61%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ 11,50 (s, 2H, 2 × NH-Boc), 8,33 (t, J = 4,6 Hz, 2H, 2 × NH), 3,44 (td, J = 4,6 et 7,0 Hz, 4H, 2 × CH₂-N), 2,70 (t, J = 6,8 Hz, 4H, 2 × CH₂-S), 1,79-1,66 (m, 8H, 2 × NC-CH₂-CH₂-CS), 1,50 (s, 18H, 2 × tBu), 1,49 (s, 18H, 2 × tBu) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 693,32 (M + H⁺, 100%).



Disulfure C4. Le disulfure **18-C4** (1,7 g, 2,5 mmol) est dissous dans du DCM (25 mL). Du TFA (25 mL) est ajouté et le mélange est agité pendant 1 h. Le solvant est évaporé, du toluène est chassé trois fois et le solvant restant est évaporé

sur une pompe à palettes. L'huile jaune pâle obtenue correspond au sel de TFA. $m = 1,3$ g, Rdt quantitatif.

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) : δ 3,16 (t, $J = 6,8$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N}$), 2,69 (t, $J = 6,9$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S}$), 1,77-1,69 et 1,68-1,61 (2m, 8H, $2 \times \text{NC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CS}$).

RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) : δ 158,6 (2C, C=N), 42,0 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}$), 38,7 (2C, $\text{CH}_2\text{-S}$), 28,6 et 27,2 (4C, $\text{NC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CS}$);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 293,15 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100%).

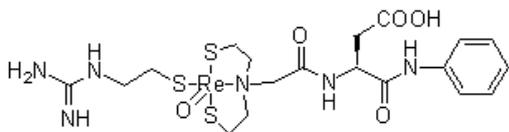
Complexations

Les solvants utilisés pour la réduction des ligands et pour la complexation sont dégazés à l'argon avant usage.

Complexation au rhénium

Mono-assemblage

Les synthèses ont été réalisées à l'échelle de 10 à 16 μmol . Le module **A** (1 eq.) et le disulfure **C2** (0,5 eq.) sont dissous, sous atmosphère d'argon, dans du MeOH (15 $\mu\text{L}/\mu\text{mol}$) dégazé à l'argon. Une solution de tributylphosphine à 10% dans le MeOH (1,5 eq.) est ajoutée et le mélange est agité pendant 1,5 h. Le tétrabutylammonium de tétrachloroxorhénate (1 eq.) est ajouté en solution dans du MeOH (15 $\mu\text{L}/\mu\text{mol}$). De la triéthylamine (3 eq.) est ajoutée pour que la solution atteigne un pH basique. Un précipité vert se forme et la solution est agitée pendant 2,5 h. Après centrifugation, le culot est séparé du surnageant et séché sur pompe à palettes. Le culot est pré-purifié sur Sep-Pak (voir procédure générale en annexe), les fractions contenant du complexe sont rassemblées et purifiées par HPLC analytique (HPLC Waters-1 ou HPLC Waters-2) avec un gradient 0-100% B en 30 min.

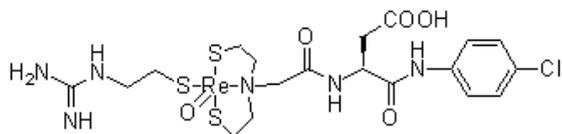


C2-Re-D1. Trois fractions présentant la masse attendue ont été isolées, correspondant à des isomères du complexe.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 20,5$ min, 21,4 min et 21,8 min ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z isomère à 20,5 min : 705,09 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100% pour ^{187}Re) et 703,07 ($\text{M} + \text{H}^+$, 55% pour ^{185}Re); isomère à 21,4 min : 705,09 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100%

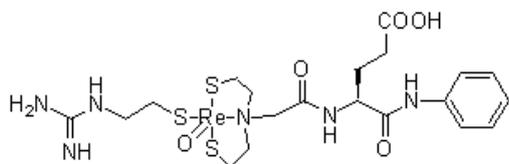
pour ^{187}Re) et 703,07 ($M + \text{H}^+$, 51% pour ^{185}Re); isomère à 21,8 min : 705,09 ($M + \text{H}^+$, 100% pour ^{187}Re) et 703,07 ($M + \text{H}^+$, 48% pour ^{185}Re).



C2-Re-D2. Deux fractions présentant la masse attendue ont été isolées, correspondant à des isomères du complexe.

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 22,1$ min et 23,0 min ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z isomère à 22,1 min : 738,99 ($M + \text{H}^+$, 100% pour $^{187}\text{Re}/^{35}\text{Cl}$ ou $^{185}\text{Re}/^{37}\text{Cl}$), 737,03 ($M + \text{H}^+$, 42% pour $^{185}\text{Re}/^{35}\text{Cl}$) et 741,00 ($M + \text{H}^+$, 36% pour $^{187}\text{Re}/^{37}\text{Cl}$); isomère à 23,0 min : 739,05 ($M + \text{H}^+$, 100% pour $^{187}\text{Re}/^{35}\text{Cl}$ ou $^{185}\text{Re}/^{37}\text{Cl}$), 737,03 ($M + \text{H}^+$, 46% pour $^{185}\text{Re}/^{35}\text{Cl}$) et 741,00 ($M + \text{H}^+$, 40% pour $^{187}\text{Re}/^{37}\text{Cl}$).



C2-Re-E1. Deux fractions présentant la masse attendue ont été isolées, correspondant à des isomères du complexe..

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, $t_R = 20,9$ min et 23,0 min ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z isomère à 20,9 min : 719,15 ($M + \text{H}^+$, 100% pour ^{187}Re) et 717,13 ($M + \text{H}^+$, 48% pour ^{185}Re); isomère à 23,0 min : 719,08 ($M + \text{H}^+$, 100% pour ^{187}Re) et 717,13 ($M + \text{H}^+$, 52% pour ^{185}Re).

Assemblage en mélange

L'assemblage en mélange a été réalisé sur 6 complexes, à l'échelle de 10 μmol par complexe, avec 2 modules **A** et 3 modules **B**. Les modules **e3** (13,6 mg, 30 μmol , 3 eq.) et **D5** (13,8 mg, 30 μmol , 3 eq.) ainsi que les disulfures **C2** (1,2 mg, 10 μmol , 1 eq.), **C3** (1,3 mg, 10 μmol , 1 eq.) et **C4** (1,5 mg, 10 μmol , 1 eq.) sont dissous sous atmosphère d'argon dans du MeOH dégazé (600 μL). Une solution de tributylphosphine à 10% dans le MeOH (220 μL , 90 μmol , 9 eq.) est ajoutée et le mélange est agité pendant 1,5 h. Le tétrabutylammonium de trétrachloroxorhénate (35 mg, 60 μmol , 6 eq.) est ajouté en solution dans du MeOH (400 μL). De la triéthylamine (17,2 μL , 120 μmol , 12 eq.) est ajoutée pour que la solution atteigne un pH basique. Un précipité vert se forme et la solution est agitée pendant 2 h. Après centrifugation, le culot est séparé du surnageant et séché sur pompe à palettes. Le culot brut a été analysé par spectrométrie de masse et tous les complexes attendus ont été identifiés ainsi que deux produits correspondant aux complexes entre **e3** ou **D5** et PBU_3 : **PBU₃-Re-e3** et **PBU₃-Re-D5**.

ES/MS (ionisation positive) : Tab.III.1.

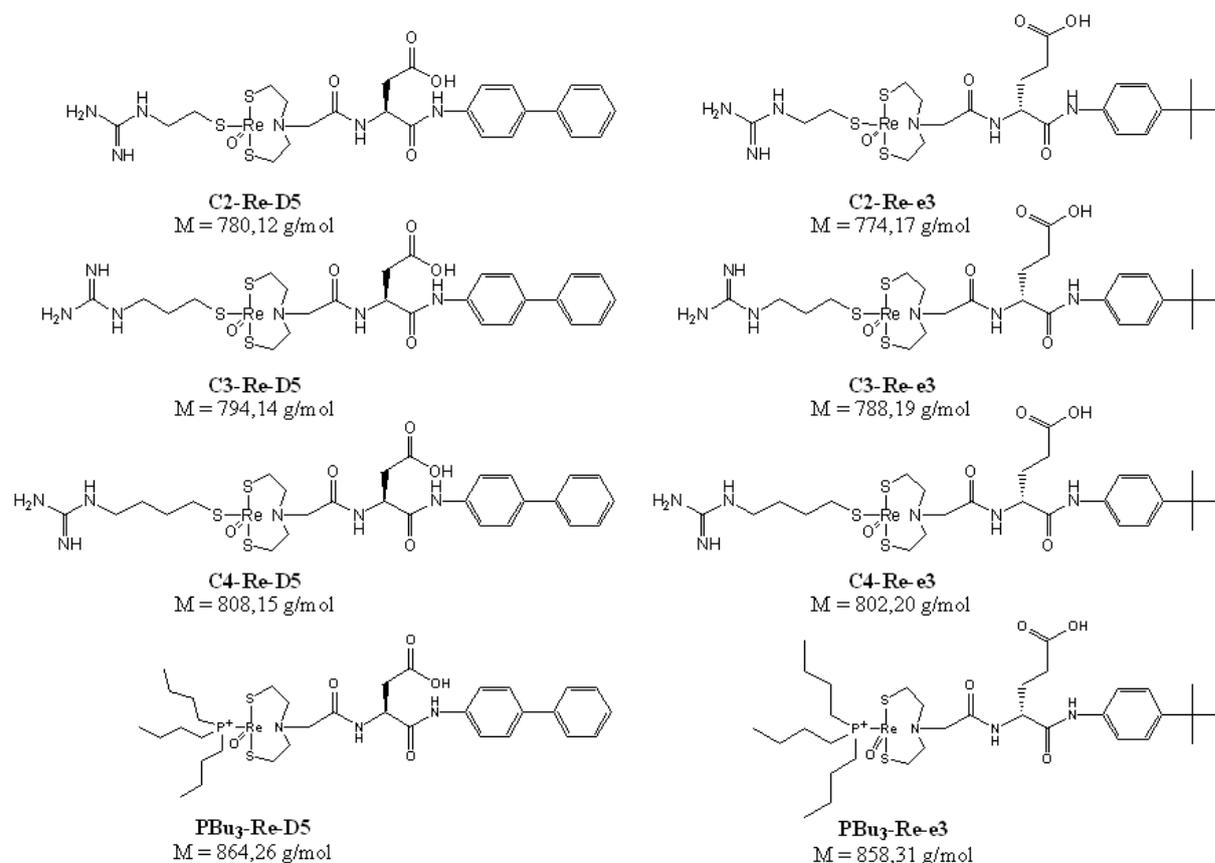
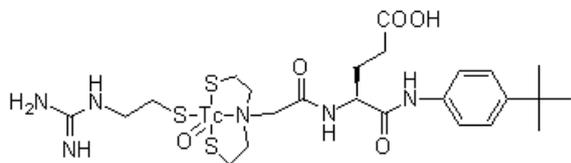


FIG. III.28 – Complexes de rhénium synthétisés en mélange.

TAB. III.1 – Analyse ES/MS des complexes obtenus par assemblage en mélange.

Complexes	m/z pour ^{187}Re		m/z pour ^{185}Re	
	M + H ⁺	%	M + H ⁺	%
C2-Re-e3	775,15	100	773,13	48
C2-Re-D5	781,14	100	779,18	51
C3-Re-e3	789,14	100	787,12	42
C3-Re-D5	795,19	100	793,05	58
C4-Re-e3	803,19	100	801,24	52
C4-Re-D5	809,12	68	807,35	100
PBu₃-Re-e3	858,21	100	856,26	50
PBu₃-Re-D5	864,14	100	862,16	48

Complexation au ^{99g}Tc



C2- ^{99g}Tc -E3. La réduction des disulfures est réalisée séparément dans l'EtOH. Le composé **E3** (2 mg, 4,4 μmol , 1 eq.) est dissous dans de l'EtOH dégazé (30 μL) et une solution de tributylphosphine à 10% dans l'EtOH (11 μL , 4,4 μmol , 1 eq.) est ajoutée. Parallèlement, le

disulfure **C2** (1 mg, 2,2 μmol , 0,5 eq.) est dissous dans de l'EtOH dégazé (20 μL) et une solution de tributylphosphine à 10% dans l'EtOH (5,5 μL , 2,2 μmol , 1,5 eq.) est ajoutée. Les mélanges sont agités pendant 1 h.

Le ^{99g}Tc est introduit soit (a) à partir de l'intermédiaire tétrabutylammonium de tré-trachloroxotechnétate [$^{99g}\text{TcOCl}_4$][NBu₄], soit (b) à partir du précurseur ^{99g}TcO -gluconate formé juste avant la complexation à partir de pertechnétate [$^{99g}\text{TcO}_4$][NH₄] :

(a) La solution de **C2** réduit (+ 10 μL d'EtOH pour rincer) est ajoutée à celle de **E3**, suivie de [$^{99g}\text{TcOCl}_4$][NBu₄] (2,2 mg, 4,4 μmol , 1 eq.) dans 40 μL d'EtOH (+ 10 μL pour rincer). Un précipité marron se forme et l'ensemble est agité pendant 30 min, conduisant à une redissolution du précipité pour donner une solution brune.

(b) L'intermédiaire ^{99g}TcO -gluconate est formé dans les conditions décrites dans l'annexe générale. La solution de **C2** réduit (+ 10 μL d'EtOH pour rincer) est ajoutée à celle de **E3**, suivie de 88 μL de la solution de ^{99g}TcO -gluconate (4,4 μmol , 1 eq.). Un précipité vert se forme et l'ensemble est agité pendant 10 min. Après centrifugation, le culot est séparé du surnageant (poudre brune). Une partie du culot est repris dans du DMSO et analysé par LC-MS. Le complexe **C2- ^{99g}Tc -E3** est observé ainsi que le composé **E3**.

L'analyse HPLC (HPLC Varian) de la solution (a), du surnageant (b) et du culot (b) repris dans du DMSO a permis d'identifier le pic du complexe **C2- ^{99g}Tc -E3** par comparaison avec les résultats de LC-MS.

LC-MS : gradient 0-100% B en 30 min, **C2- ^{99g}Tc -E3** : $t_R = 23,6$ min, m/z 687,1 (M + H⁺); **E3** : $t_R = 24,4$ min, m/z 454,1 (M + H⁺);

HPLC analytique : gradient 0-100% B en 30 min, **C2- ^{99g}Tc -E3** $t_R = 24,7$ min; **E3** $t_R = 25,1$ min.

Complexation au ^{99m}Tc

Réduction des ligands - Le module **A** (2,2 μmol , 1 eq.) est dissous dans de l'EtOH dégazé (40 μL) et une solution de tributylphosphine à 10% dans l'EtOH (6 μL , 2,2 μmol , 1 eq.) est ajoutée. Le mélange est agité 1 h à température ambiante (sans barreau aimanté). Cette étape de réduction est parallèlement menée sur le module **B** (2,2 μmol , 1 eq.). La solution de **A** réduit (2,2 μmol) est diluée avec 750 μL de tampon PBS (pH 7,4) et celle de thiol **B** (4,4 μmol) avec 1,5 mL de PBS, pour conduire à une concentration de 3 mM

en ligand réduit. Ces solutions sont ensuite diluées au 1/3 par du PBS. Pour les études de stabilité, les solutions sont réalisées dans du tampon HEPES (35 mM pH 7,8).

Marquage - Un volume V d'intermédiaire ^{99m}Tc -gluconate est obtenu d'après le mode opératoire décrit en annexe. Un volume $V/2$ de solution 1 mM de **A** est ensuite ajouté, suivi de $V/2$ de solution 1 mM de **B**. Le mélange est incubé soit 2 h à 50°C, soit 15 min à 90°C. Le mélange réactionnel est analysé par radio-HPLC analytique (HPLC Varian), avec un gradient de 0-100% B en 30 min.

Tests de stabilité

Stabilité au glutathion (GSH)

Les complexes sont obtenus à partir des ligands réduits, en solution dans du tampon HEPES, avec $V = 100 \mu\text{L}$ de ^{99m}Tc -gluconate et avec une incubation de 15 min à 90°C.

Une solution de GSH 10 mM est préparée juste avant utilisation à partir de GSH réduit (6,2 mg, 20 μmol) dissous dans 2 mL de tampon HEPES (35 mM, pH 7,8).

Le test est réalisé en ajoutant 25 μL de HEPES aux 200 μL de complexe, suivis de 25 μL de solution 10 mM de GSH. Après homogénéisation, le mélange est laissé à température ambiante. Le blanc est obtenu en ajoutant 50 μL de HEPES aux 200 μL de complexe. Les solutions sont préalablement dégazées et les réactions sont réalisées dans des eppendorfs. Des aliquots de 5 ou 10 μL sont prélevés à $t = 0, 0,5, 1, 2, 4$ et 6 h et sont dilués avec de l'eau pour donner un volume total de 1 mL avant analyse par radio-HPLC analytique (HPLC Varian), avec un gradient 0-100% B en 30 min. Le choix du volume de l'aliquot ainsi que du volume injecté en HPLC dépendent de l'activité disponible et doivent permettre une détection suffisante par le détecteur γ .

Stabilité dans le plasma

Les complexes sont obtenus à partir des ligands réduits, en solution dans du tampon HEPES, avec $V = 100 \mu\text{L}$ de ^{99m}Tc -gluconate et avec une incubation de 15 min à 90°C. Le plasma utilisé dans les tests a été prélevé quelques jours avant et conservé à -80°C.

Le plasma et la solution de complexe sont amenés à 37°C dans un bain-marie. Le complexe (30 μL) est ajouté au plasma (150 μL) et le mélange est placé à 37°C après homogénéisation. Des aliquots de 11 μL sont régulièrement prélevés ($t = 0, 0,5, 1, 2, 4$ et 6 h) et les protéines du plasma sont précipitées avec 99 μL de MeOH (plasma/MeOH 1/9). Après comptage du total et centrifugation (1 min), le culot et le surnageant sont séparés et comptés. Le surnageant (100 μL) est analysé par radio-HPLC analytique (HPLC Varian), avec un gradient 0-100% B en 30 min.

Chapitre IV

Analogues de la séquence RGD, cyclisés par coordination de TcO^{3+}

IV.1 Métallopeptides cycliques

La coordination de métaux par des peptides est une stratégie attractive pour induire certaines topologies qui leur donnent des propriétés particulières : activité biochimique, modification de perméabilité, résistance à la protéolyse, *etc.* En effet, il est établi que la fonction des peptides dépend en grande partie de la conformation qu'ils adoptent. Cette structuration conduit à une orientation des chaînes latérales les unes par rapport aux autres. Les conformations sont stabilisées par un ensemble d'interactions inter- et intramoléculaires. Les structures les plus couramment rencontrées dans les peptides sont les hélices α , les feuillets β , ainsi que des α -, β - ou γ -turns.

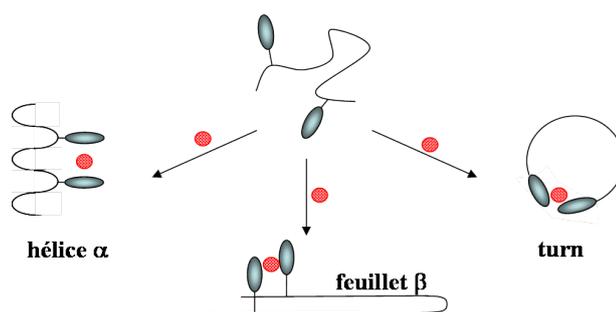


FIG. IV.1 – Topologies induites sur un peptide par la coordination d'un métal (en rouge) par deux groupements chélatants (adapté de [Albrecht 05]).

La plupart des structures secondaires peut ainsi être induite par la coordination d'un métal dans le squelette peptidique [Albrecht 05]. Le principe général des interactions métal-peptide conduisant à des hélices, feuillets ou turns est présenté dans la figure IV.1.

Les sites de liaison du métal, dans les protéines endogènes ou dans les peptides synthétiques, peuvent se situer sur les chaînes latérales des acides aminés (histidine, cystéine, acide aspartique ou glutamique, lysine, sérine, tyrosine, arginine) ou même utiliser les fonctions amides du squelette peptidique. Des sites non-naturels peuvent aussi être introduits dans la structure peptidique : pyridines, bipyridines, phosphanes, catecholates, aminodiacétates, éthers couronnes, *etc.*

Par ailleurs, les peptides sont en général rapidement éliminés *in vivo* et peuvent être immunogènes. Outre les modifications connues pour réduire ces limitations (ajout de polymères PEG pour augmenter la demi-vie dans la circulation, modifications chimiques pour réduire l'immunogénicité), la coordination d'un métal peut permettre d'améliorer ces propriétés. Nous nous intéressons ici plus particulièrement à la cyclisation de peptides par la coordination d'un cœur métallique.

De nombreux métaux ont été utilisés pour cycliser des peptides, en particulier Fe [Constable 03], Co [Gokhale 06], Cu [Gokhale 06, Shullenberger 93], Mo [Albrecht 04] et Pd [Kelso 04].

L'introduction de domaines complexants non-naturels a largement été étudiée pour former des cyclométallopeptides. Ainsi, Constable *et al.* ont introduit, aux extrémités N- et C-terminales d'un undecapeptide, des groupements terpyridines. La séquence peptidique, contrainte par une proline, a été cyclisée avec du fer(II) (Fig.IV.2 A). Albrecht *et al.* ont utilisé des ligands dicatéchols pour cycliser des tripeptides par coordination de molybdène. Les unités dicatéchols ont été introduites en N- et C-terminal des séquences tripeptidiques RGD (Fig.IV.2 B) et WKY (séquence active de l'urotensine II).

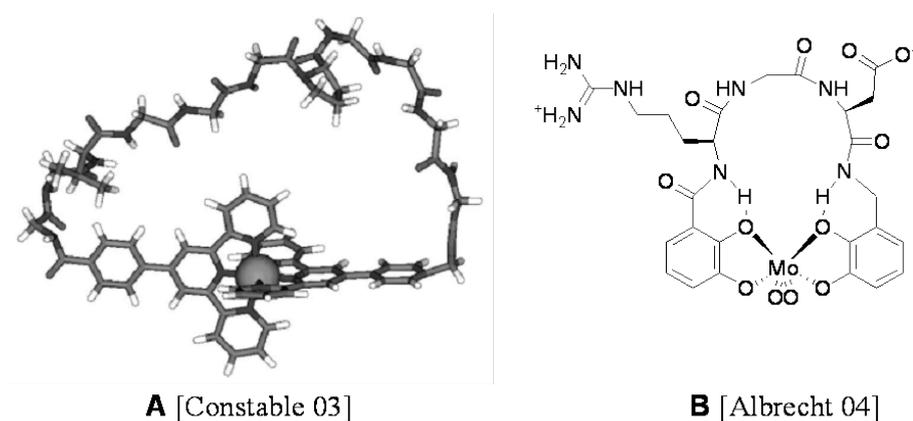


FIG. IV.2 – Exemples de métallo-cyclopeptides.

Le rhénium et le technétium ont également été utilisés soit pour ponter [Wei 07] ou cycliser [Sharma 01, Barda 04, Fridkin 05, Clavaud 06c] des peptides bioactifs.

A titre d'exemple pour ces métaux, on peut citer les travaux de Wei *et al.* portant

sur un analogue peptidique de l' α -MSH, cyclisé au rhénium et marqué au ^{64}Cu (Fig.IV.3 C). L' α -MSH et ses analogues sont connus pour cibler le récepteur MC1R exprimé sur les mélanomes métastatiques. Des analogues linéaires de ce tridécapéptide ont montré une forte accumulation et un temps de rétention important sur des modèles murins porteurs de mélanome. L'incorporation de rhénium dans la structure du peptide, conduisant à sa cyclisation, a permis d'obtenir un produit dont l'accumulation rénale est limitée. Le marquage de ce cyclométallopeptide avec du ^{64}Cu via un cyclam ponté (CB-TE2A) a permis d'obtenir un traceur efficace et présentant une biodisponibilité satisfaisante.

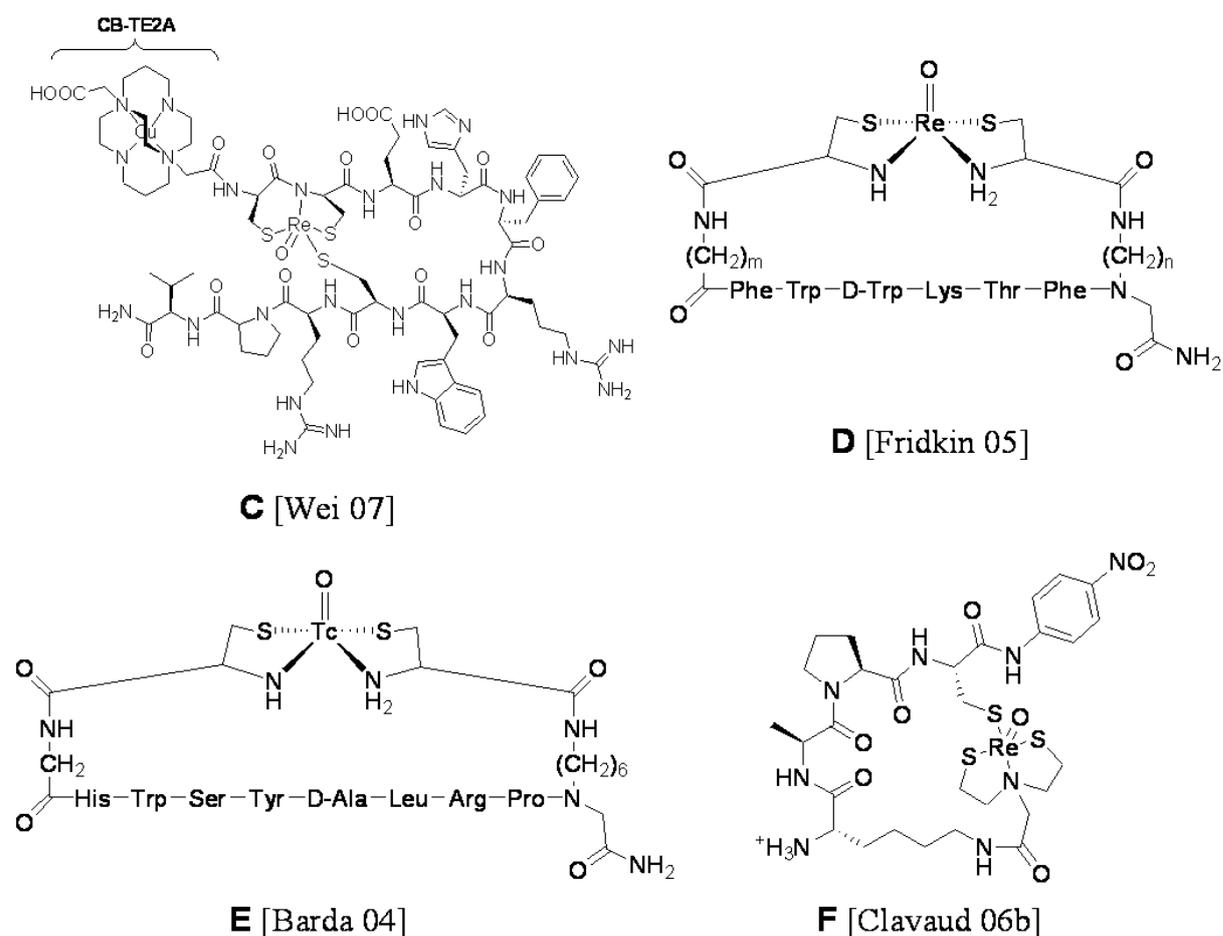


FIG. IV.3 – Exemples de peptides cyclisés par coordination de rhénium ou de technétium.

L'équipe de Barda *et al.* a également utilisé la cyclisation d'un squelette peptidique pour mettre au point un analogue de la GnRH (gonadotropin-releasing hormone) comme agent potentiel d'imagerie de tumeurs (Fig.IV.3 E). En effet, des récepteurs spécifiques de la GnRH sont surexprimés dans des tumeurs du sein, de la prostate et de l'ovaire. Un analogue cyclique de ce décapeptide a donc été obtenu par coordination de ^{99m}Tc , via deux groupements hémichélatants présents aux deux extrémités du peptide. L'affinité de

ce cyclométallopeptide est comparable à celle de la GnRH.

Cette approche "BMC" (backbone metal cyclisation) permet simultanément de radio-marquer un peptide tout en le structurant par cyclisation de son squelette. Cette technique avait été décrite par Fridkin *et al.* dans une approche combinatoire pour obtenir une banque de 48 analogues de la somatostatine, cyclisés par du rhénium (Fig.IV.3 D) [Fridkin 05].

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction bibliographique, cette approche a également été développée au laboratoire par C. Clavaud et a permis d'obtenir un peptide cyclisé par le rhénium liant la cyclophiline humaine (Fig.IV.3 F). Ce composé présente une affinité comparable à celle de peptides substrats de référence [Clavaud 06c].

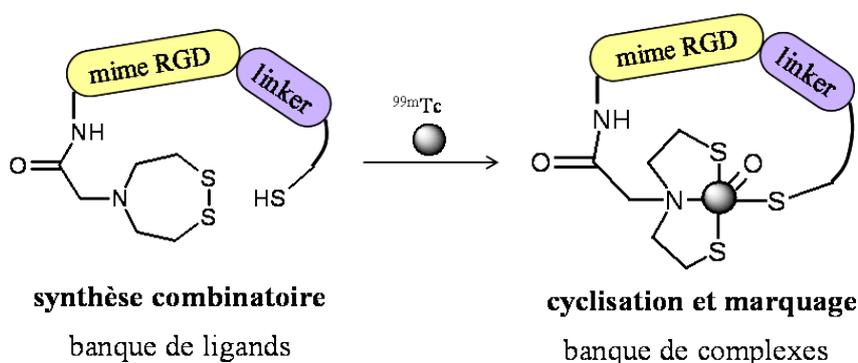


FIG. IV.4 – Principe de la cyclisation d'un analogue de la séquence RGD par coordination d'un cœur oxorhénium ou oxotechnétium.

Ainsi, la coordination de métaux permet de structurer les peptides et d'améliorer leur stabilité tout en conduisant à des métallopeptides ciblant, utilisables en thérapie ou en l'imagerie moléculaire. Divers métaux ont été utilisés pour la cyclisation de peptides, en particuliers des radioéléments pour la formations de radiotraceurs utilisables en imagerie. Dans ce projet, nous avons cherché à mettre a profit ces caractéristiques en développant des traceurs marqués au ^{99m}Tc , mimant la séquence peptidique RGD reconnue par certaines intégrines. Nous avons vu dans l'introduction bibliographique que la structure de la séquence RGD détermine la sélectivité d'un ligand pour une intégrine donnée. Nous avons donc cherché à utiliser le technétium, non seulement comme marqueur, mais aussi comme agent structurant des séquences analogues de RGD. Dans cette optique, nous avons cherché à développer des traceurs cyclisés par coordination du technétium à l'aide du motif NS_2/S (Fig. IV.4).

IV.2 Principe et choix des chimiothèques

IV.2.1 Cilengitide et dérivés

Nous avons cherché à développer une chimiothèque de traceurs cyclisés par coordination de ^{99m}Tc , mimant la séquence RGD, en nous inspirant des antagonistes cycliques qui ont été décrits pour cibler l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (Fig. IV.5 et IV.6). Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction bibliographique (I.2.6.b), le Cilengitide (**A**) est le plus abouti de cette classe de produits puisqu'il est maintenant en phase III de développement clinique.

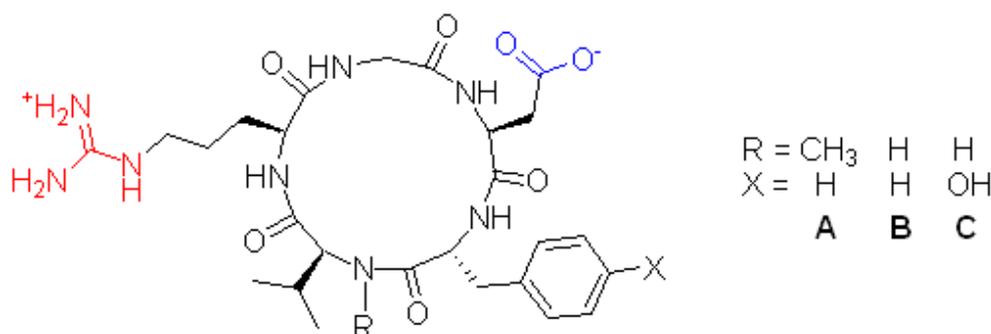


FIG. IV.5 – Exemples d'antagonistes cycliques, analogues de RGD : **A** Cilengitide [Smith 03], **B** c(RGDfV), **C** c(RGDyV) [Haubner 99].

Le Cilengitide résulte de travaux initiés au début des années 90 par l'équipe de H. Kessler, portant sur l'incorporation du motif RGD au sein de séquences contraintes cyclopenta- ou cyclohexapeptidiques [Aumailley 91, Gurrath 92]. Les tests de liaison du cyclopentapeptide c(RGDfV) ont démontré que ce composé présentait une préférence pour $\alpha_V\beta_3$ ($\text{IC}_{50} = 50$ nM pour l'intégrine purifiée) par rapport à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ($\text{IC}_{50} = 290$ nM). Cette affinité est comparable à celle du ligand endogène de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, la vitronectine ($\text{IC}_{50} = 25$ nM) [Pfaff 94]. Des études de relation structure-activité ont été réalisées par Haubner *et al.* et ont permis une meilleure compréhension des interactions entre les régions pharmacophoriques et l'intégrine [Haubner 96a]. Deschansreiter *et al.* ont synthétisé tous les dérivés N-méthylés du c(RGDfV) et des tests d'affinité et de sélectivité ont été réalisés. Le composé c[RGDf(N-Me)V] s'est avéré le plus intéressant, avec une IC_{50} pour $\alpha_V\beta_3$ de 0,58 nM et une bonne sélectivité par rapport à $\alpha_{IIb}\beta_3$ ($\text{IC}_{50} = 0,86$ μM) [Dechantsreiter 99]. Cette amélioration de l'affinité semble s'expliquer par le blocage d'une liaison hydrogène intramoléculaire (entre NH de Arg et CO de Asp) par le N-méthyl de la valine. Ceci favorise une conformation interagissant préférentiellement avec $\alpha_V\beta_3$. Goodman *et al.* ont montré que le c[RGDf(N-Me)V] présentait également une bonne affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ ($\text{IC}_{50} = 37$ nM) [Goodman 02]. Cette molécule, c[RGDf(N-Me)V], est aujourd'hui développée par Merck sous le nom de Cilengitide.

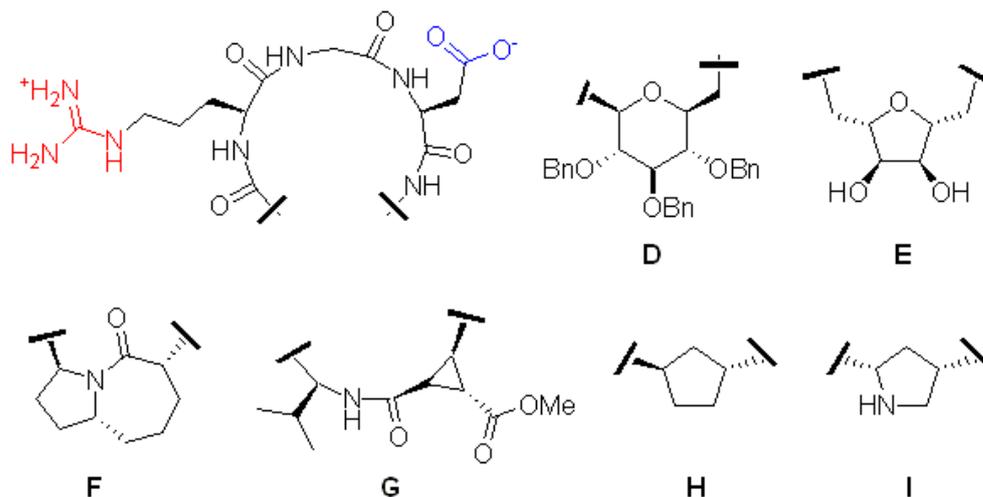


FIG. IV.6 – Exemples d'antagonistes cycliques, analogues de RGD : **D** dérivé pyranne [Lohof 00], **E** dérivé furane [van Well 03] et autres dérivés **F** [Belvisi 06], **G** [Urman 07], **H** [Casiraghi 05], **I** [Zanardi 08].

Les études de relation structure activité ont montré que les groupements carboxylate et guanidinium étaient essentiels à la reconnaissance de ces cyclopentapeptides par $\alpha_V\beta_3$ et que le groupement aromatique en configuration D jouait un rôle majeur dans la structuration du cyclopeptide et dans sa liaison aux intégrines. Au contraire, la valine peut être remplacée par différents acides aminés (Lys, Tyr), comme nous l'avons mis en œuvre dans la validation du modèle tumoral au laboratoire avec les composés 3H -1, ^{99m}Tc -3/4/5 (II.1.2). Le remplacement de D-Phe-Val par le β -amino acide D- β -HPhe n'affecte pas l'affinité pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ ($IC_{50} = 63$ nM) [Schumann 00] comparé au c(RGDfV) ($IC_{50} = 50$ nM) [Pfaff 94] et confère au peptide une excellente sélectivité pour $\alpha_V\beta_3$ par rapport à $\alpha_{IIb}\beta_3$. Le remplacement de D-Phe-Val par des SAA, "sugar amino acid", a conduit à des antagonistes (**D** et **E**) ayant des affinités micromolaires ou submicromolaires mais de faibles sélectivités par rapport à $\alpha_{IIb}\beta_3$. D'autres dérivés ont été proposés (**F** à **I**), avec des résultats prometteurs. En particulier, le composé **I** ainsi que des dérivés de **I** N-alkylés ont permis d'obtenir une sélectivité certes modérée, mais cependant significative pour $\alpha_V\beta_3$ ($IC_{50}(\mathbf{I}) = 4,4$ nM) par rapport à $\alpha_V\beta_5$ ($IC_{50}(\mathbf{I}) = 80,2$ nM).

IV.2.2 Conception des chimiothèques

Nous nous sommes basés sur le cyclopentapeptide c(RGDfV) pour concevoir les traceurs de notre chimiothèque de complexes cycliques du technétium (Fig. IV.7). Nous avons introduit le cœur métallique à la place du motif f-V, à l'opposé de la séquence RGD, et nous avons fait varier divers motifs de la séquence RGD ainsi que le linker C-terminal. Nous avons choisi de nous limiter dans un premier temps à une chimiothèque restreinte,

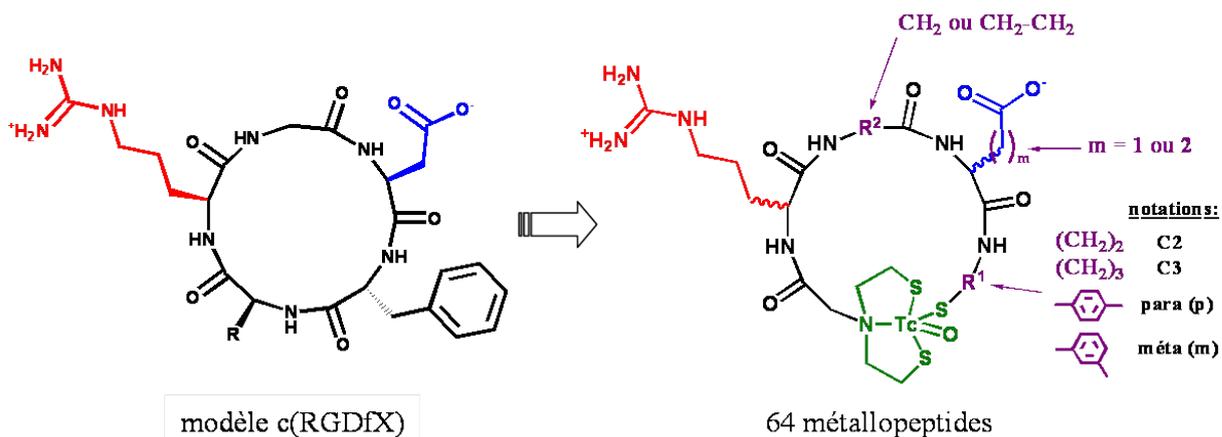


FIG. IV.7 – Conception de la chimiothèque de traceurs cyclisés au ^{99m}Tc à partir de cyclopentapeptides $c(\text{RGDfX})$.

nous permettant de mettre au point une méthode de synthèse des ligands généralisable. Dans cette série, le motif de chélation NS_2 est introduit à l'extrémité N-terminale et le thiol à l'extrémité C-terminale grâce à un linker aliphatique ou aromatique. Ces linkers ont permis de faire varier le nombre de chaînons du cycle ainsi que sa rigidité. Pour cette étude prospective, nous avons choisi de ne faire varier que la stéréochimie de l'arginine. Le groupement carboxylate est positionné en utilisant l'acide aspartique ou l'acide glutamique, sous leurs formes D ou L, permettant ainsi de faire varier la distance entre le guanidinium et le carboxylate. L'introduction de la β -alanine à la place de la glycine a également permis de jouer sur cette distance, ainsi que sur la taille du cycle formé après complexation du métal. La combinaison de ces quelques variations nous a permis de concevoir une chimiothèque de 64 composés, avec des cycles de 16 à 19 membres.

Comme nous l'avons précisé dans l'introduction, il n'existait pas de méthode prédictive fiable de la structure de ces complexes de technétium lorsque nous avons débuté ce travail. Depuis, M. Masella a développé une méthode de calcul *ab initio* qui a vu le jour en 2008 et a été utilisée *a posteriori* pour tenter d'expliquer certains de nos résultats.

La notation des ligands dans la suite de ce chapitre sera du type $\text{NS}_2\text{-X}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{-X}$ comme indiqué dans la figure IV.8, avec une distinction suivant l'état du pont disulfure du motif NS_2 : nous noterons NS_2 lorsque les thiols seront sous la forme oxydée de disulfure, et $\text{N}(\text{SH})_2$ pour la forme dithiol. Pour une notation plus courte, nous avons également défini une nomenclature à trois caractères s'appliquant aux ligands et dans le cas des complexes, nous ajouterons le type de métal utilisé, par exemple **1A1** pour le ligand $\text{NS}_2\text{-RGD-C}_2$ et $^{99m}\text{Tc-1A1}$ pour son équivalent cyclisé par le ^{99m}Tc (Tab. IV.1).

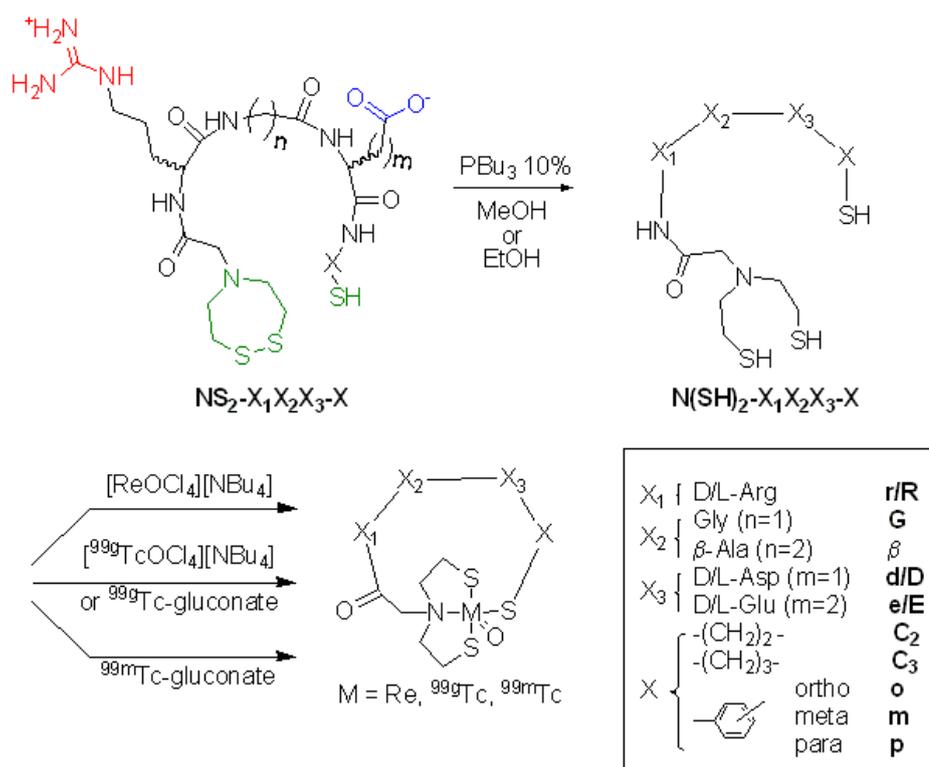


FIG. IV.8 – Nomenclature des ligands tripeptidiques fonctionnalisés et méthodes de complexation couramment utilisées.

TAB. IV.1 – Nomenclature des ligands tripeptidiques fonctionnalisés.

$X_1X_2X_3$	X			
	C_2	C_3	m	p
RGD	1A1	1A2	1A3	1A4
$R\beta D$	1B1	1B2	1B3	1B4
RGE	1C1	1C2	1C3	1C4
$R\beta E$	1D1	1D2	1D3	1D4
rGd	2A1	2A2	2A3	2A4
$r\beta d$	2B1	2B2	2B3	2B4
rGe	2C1	2C2	2C3	2C4
$r\beta e$	2D1	2D2	2D3	2D4
RGd	3A1	3A2	3A3	3A4
$R\beta d$	3B1	3B2	3B3	3B4
RGe	3C1	3C2	3C3	3C4
$R\beta e$	3D1	3D2	3D3	3D4
rGD	4A1	4A2	4A3	4A4
$r\beta D$	4B1	4B2	4B3	4B4
rGE	4C1	4C2	4C3	4C4
$r\beta E$	4D1	4D2	4D3	4D4

IV.3 Synthèse des ligands linéaires

IV.3.1 Résine sulfamylbutyryl

Une voie de synthèse attractive pour les peptides modifiés en position C-terminale repose sur l'utilisation des supports sensibles aux nucléophiles comme les résines oximes ou sulfamylbutyryl qui permettent l'introduction directe d'espèces en C-terminal. Contrairement à la synthèse des modules **A** de notre approche acyclique (Chap. III), la résine oxime n'a pas été utilisée ici. En effet, la stratégie Boc n'est pas compatible avec des groupements protecteurs simples des carboxylates, comme le groupement *tert*-butyl, généralement utilisés pour protéger les chaînes latérales des glutamates et des aspartates.

Au contraire, la résine sulfamyl-butyl permet le déplacement nucléophile du peptide après activation du groupement sulfonamide par l'iodoacétonitrile alors qu'elle reste stable en synthèse Boc ou Fmoc avant cette étape [Backes 99]. Le décrochage du peptide peut normalement être effectué à l'aide de divers nucléophiles [Clavaud 06a], mais demeure limité à des molécules de petite taille. Ainsi, les différents essais que nous avons effectués ne nous ont pas permis d'obtenir les ligands attendus.

IV.3.2 Résine Wang

IV.3.2.a Résine Wang - Voie 1

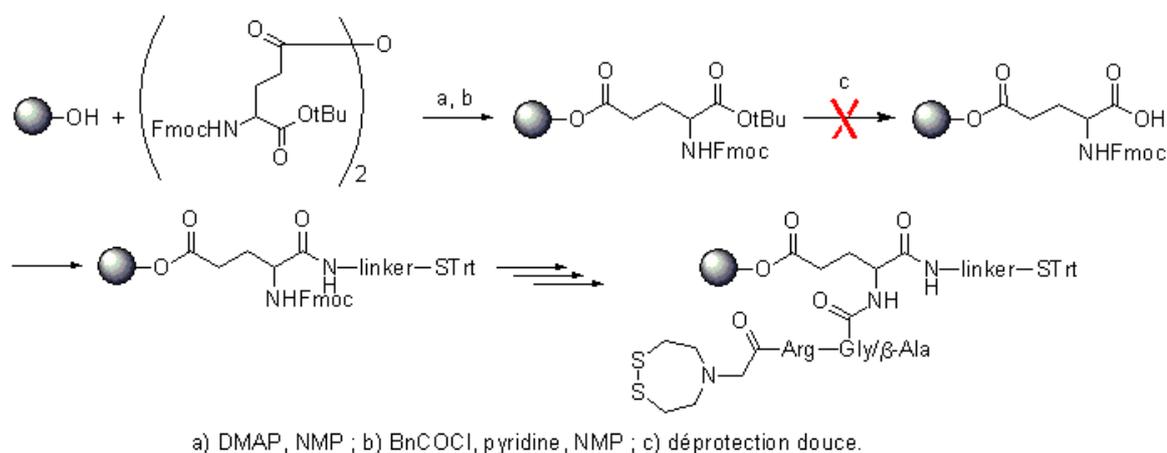


FIG. IV.9 – Synthèse sur résine Wang - voie 1.

Nous nous sommes ensuite tournés vers l'utilisation d'une résine Wang. En effet, les peptides cycliques, en particulier le c(RGDfK), peuvent être obtenus sur ce type de résine avec un accrochage par la chaîne latérale de l'acide aspartique [McCusker 02]. Nous avons testé une première stratégie dans laquelle le linker C-terminal devait être introduit après déprotection de la fonction acide de la chaîne principale (Fig. IV.9). Nous n'avons pas

souhaité utiliser une protection allyl de la fonction acide comme nous l'avions fait pour la synthèse des composés $c(RGDfK)$. En effet, le tétrakistriphénylphosphine palladium, utilisé pour la déprotection du groupe allyl, est d'usage délicat, ce qui est difficilement compatible avec une approche combinatoire.

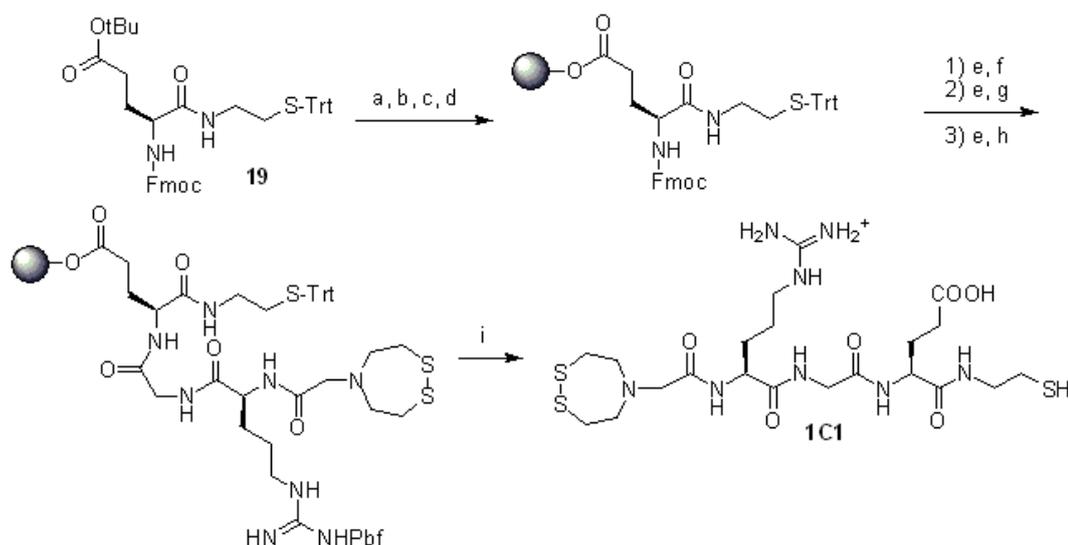
C'est pourquoi, après greffage sur une résine Wang du Fmoc-Glu-OtBu, nous avons testé diverses conditions de déprotection douce du groupement *tert*-butyl et avons déterminé le taux de décrochage de la résine dans ces conditions, par dosage Fmoc. Les résultats reportés dans le tableau IV.2 montrent que, dans tous les cas, une partie plus ou moins importante de l'acide aminé est décrochée de la résine. L'essai avec l'acide formique à 5% donnant les meilleurs résultats (seulement 26% de décrochage), nous avons souhaité déterminer si la déprotection avait réellement eu lieu. A cet effet, nous avons réalisé le couplage du linker aliphatique en C_2 , sous la forme $H_2N-(CH_2)_2-S\text{Trt}$, puis un aliquot de résine a été hydrolysé et analysé par HPLC. Nous n'avons pas pu identifier le produit de couplage attendu par comparaison avec le chromatogramme de ce produit obtenu en solution. Il semble donc que le traitement à l'acide formique 5% n'ait pas permis la déprotection préférentielle de l'acide. Cette voie a donc été abandonnée.

TAB. IV.2 – Taux de décrochage de la résine lors d'une déprotection en conditions "douces".

Conditions de déprotection	taux de décrochage (%)
TFA 10% dans DCM	93
HCOOH 5% dans DCM	26
HCL 4N dioxane	64

IV.3.2.b Résine Wang - Voie 2

Compte tenu des difficultés rencontrées pour introduire le linker sur le diacide greffé sur la résine Wang, nous avons testé une seconde voie. Pour cela, nous avons directement greffé le composé Fmoc-Glu-O-NH- $(CH_2)_2-S\text{Trt}$ (Fig. IV.10). Ce dérivé d'acide glutamique est issu de la déprotection du groupement *tert*-butyl du composé **19**, obtenu par couplage en solution du triphénylméthyl-2-aminoéthanthiol avec le Fmoc-Glu(OtBu)-OH, à l'aide de DCC/Cl-HOBt. Une fois déprotégé, ce dérivé a été greffé après activation sous forme d'anhydride symétrique. Le composé $NS_2-RGE-C_2$ **1C1** a été obtenu après élongation du peptide en stratégie Fmoc classique et un clivage en milieu acide. Cependant, la procédure n'a pas pu être appliquée avec succès à la synthèse de $NS_2-R/\beta E-C_2$ **1D1**. De plus, le taux de greffage du premier acide aminé est assez médiocre (28%) et cette approche nécessite la synthèse en solution des 20 synthons correspondants au couplage de chaque linker (C_2 ,



a) DCM/TFA 1/1 ; b) DCC, DCM ; c) résine Wang, DMAP, NMP ; d) pyridine, chlorure de benzyle, NMP ; e) pipéridine/NMP 1/4 ; f) Fmoc-Gly-OH, Cl-HOBt, DCC, DIPEA, NMP ; g) Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Cl-HOBt, DCC, DIPEA, NMP ; h) composé **10**, HATU, DIPEA, DCM ; i) TFA/TIPS/H₂O 95/2,5/2,5.

FIG. IV.10 – Synthèse sur résine Wang (voie 2) de **1C1**.

C₃, o, m, p) sur les acides D/L-aspartique et D/L-glutamique. Cette voie assez laborieuse a donc été abandonnée elle aussi.

IV.3.3 Résine Rink

Nous avons ensuite cherché à immobiliser le linker sur une résine, via un pont disulfure, celui-ci pouvant être réduit en fin de synthèse afin de libérer le peptide (Fig. IV.11). A cet effet, nous avons greffé une cystéine protégée sur une résine Rink amide afin de l'engager par la suite dans la formation d'un pont disulfure mixte avec les linkers. Bien que les taux de greffages soient habituellement très élevés sur les résines Rink amide, les essais de dérivatisation de la cystéine réalisés dans notre cas se sont avérés peu encourageants et nous ont conduits à greffer directement le disulfure mixte (Fig. IV.11).

L'amine du chlorhydrate de (Cys-tBu)₂ a donc tout d'abord été protégée sous forme de carbamate de benzyle (**20**) avant déprotection de la fonction acide et réduction du disulfure à l'aide de tributylphosphine. La fonction thiol ainsi obtenue a été activée à l'Aldrithiol-2 pour donner le composé **21** et le Fmoc-aminoéthanethiol **22** a été introduit par déplacement nucléophile du groupement activant. Le composé **23** formé a été greffé sur une résine Rink déprotégée, avec un taux de couplage de 95%. Nous avons réalisé l'élongation du peptide en stratégie Fmoc classique avec DCC/HOBt comme agents d'activation, permettant d'introduire successivement X₃, X₂ et X₁. Le motif NS₂ **10** a été ajouté après activation par HATU/DIPEA. La réduction du pont disulfure entre le linker et le bras de couplage par la tributylphosphine a permis le décrochage du peptide. La

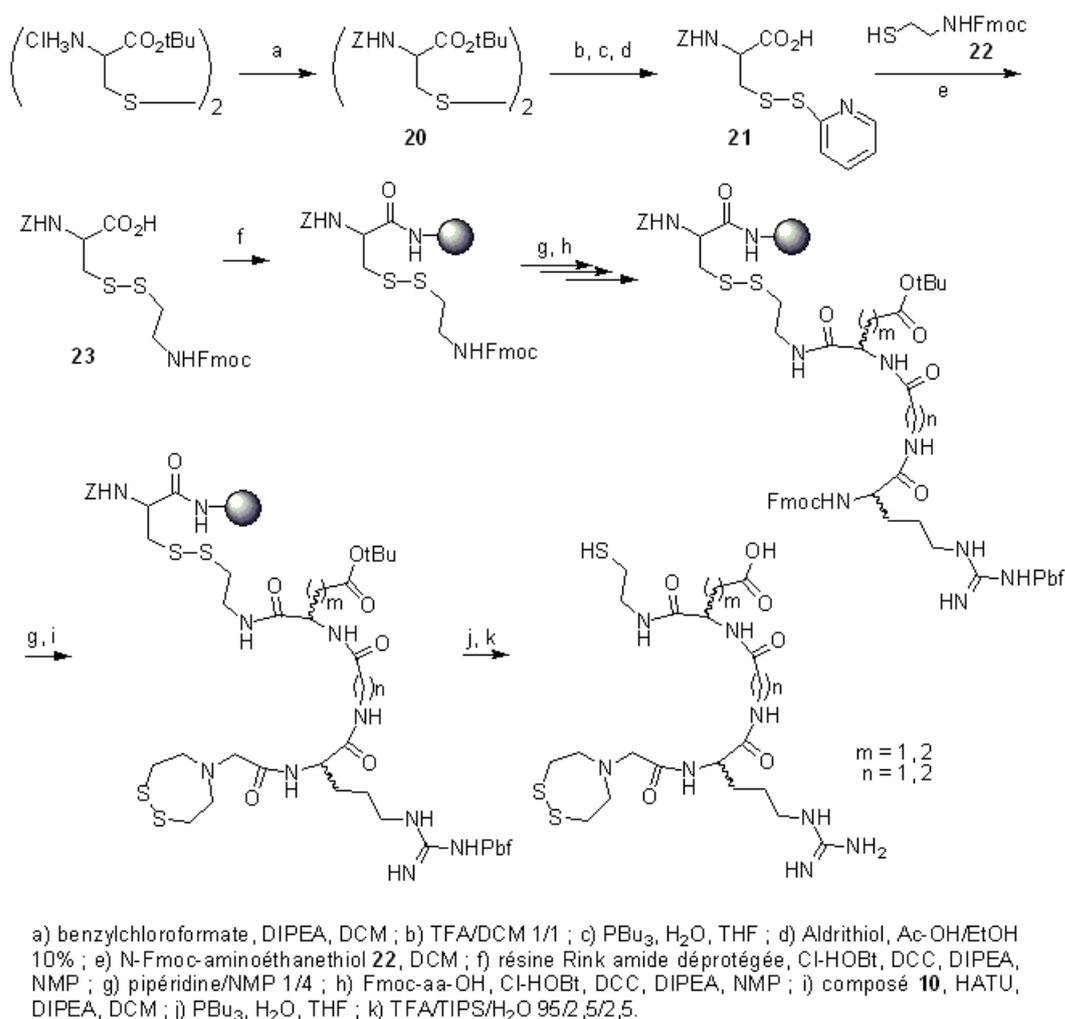


FIG. IV.11 – Synthèse en solution d'un bras de couplage et synthèse sur résine Rink des tripeptides fonctionnalisés par un linker C_2 .

déprotection des chaînes latérales du peptide a été réalisée par traitement en milieu acide en solution et nous avons obtenu les produits après purification par HPLC.

Cette approche nous a permis d'obtenir 11 tripeptides présentant un linker C_2 , par divisions successives de lots de résine (Fig IV.12 et **1B1**). Les produits ont été obtenus sous la forme d'un mélange de thiols et de disulfures. En effet, le décrochage du peptide de la résine, par réduction du pont disulfure, entraîne également la réduction du motif NS_2 qui peut ensuite se réoxyder lentement à l'air, y compris à l'état lyophilisé. Cette méthode n'a toutefois pas pu être appliquée au linker en série aromatique ortho.

Nous n'avons pas cherché à optimiser ces synthèses sur résine Rink amide car, même si les tripeptides portant le linker C_2 ont été obtenus de façon satisfaisante, cette méthode présente l'inconvénient de nécessiter une phase de synthèse en solution trop contraignante pour une approche combinatoire visant à produire, par la suite, un plus grand nombre de peptides.

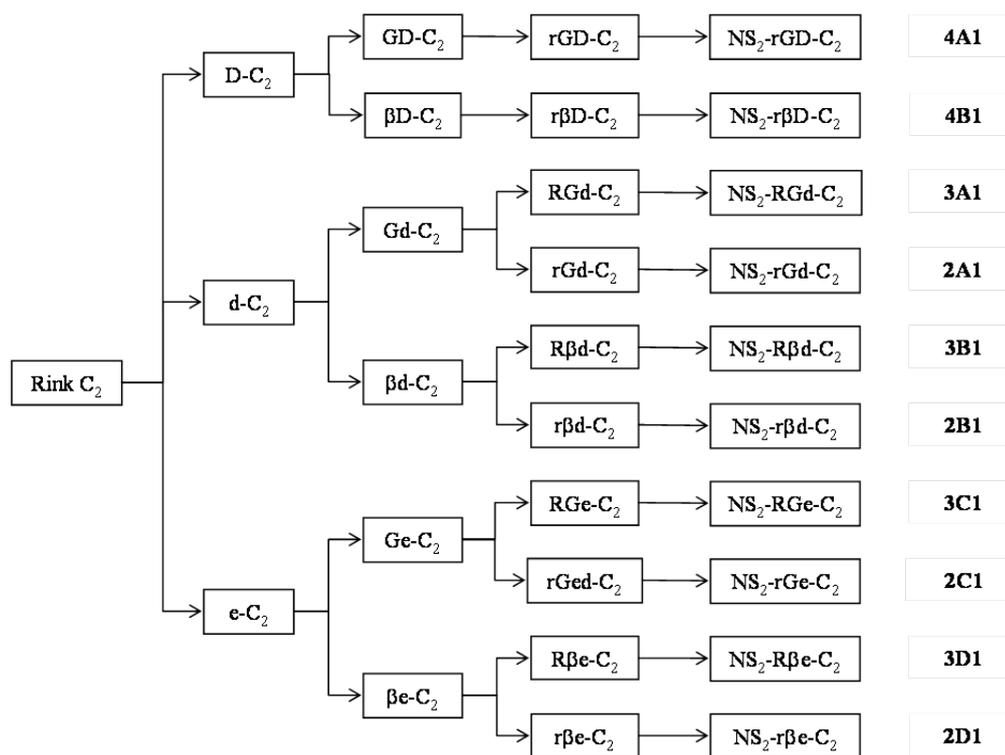


FIG. IV.12 – Synthèse, par division de lots, de 10 tripeptides sur résine Rink dérivatisée.

IV.3.4 Résine Mmt

Parallèlement aux essais de synthèse présentés ci-dessus, nous nous sommes intéressés à une approche faisant appel à une résine chlorométhoxytrityl, avec un greffage par l'extrémité thiol des différents linkers aliphatiques et aromatiques envisagés (Fig. IV.13). Cette approche s'est avérée la plus versatile.

La résine portant le linker C₂ (résine 3-aminoéthanthiol 4-méthoxytrityl) est commerciale. Les aminothiophénols ortho, méta et para sont également disponibles et ont été greffés sur la résine sans protection préalable de la fonction amine [Mourtas 01]. L'aminopropanethiol n'était pas disponible commercialement. Nous avons cherché à utiliser le disulfure **17-C3**, synthétisé précédemment (Chap. III), après réduction à l'aide de tributylphosphine, cependant le taux de couplage déterminé par un test de Kaiser quantitatif est faible (19%). Nous avons alors protégé les amines de **17-C3** par un groupement Fmoc pour donner le composé **24**. L'homodisulfure a été réduit juste avant le greffage sur la résine [Mourtas 03] et le taux de couplage, déterminé par un dosage Fmoc, s'est avéré satisfaisant (90 %). L'élongation des peptides a été réalisée de façon classique en stratégie Fmoc, avec DCC/HOBt comme agents de couplage. Le motif NS₂ **10** a été couplé comme précédemment. Un traitement en milieu acide a permis le décrochage de la résine et la déprotection des chaînes latérales, puis les produits ont été purifiés par HPLC.

Les tripeptides fonctionnalisés ont été obtenus sous la forme de thiols et/ou de disul-

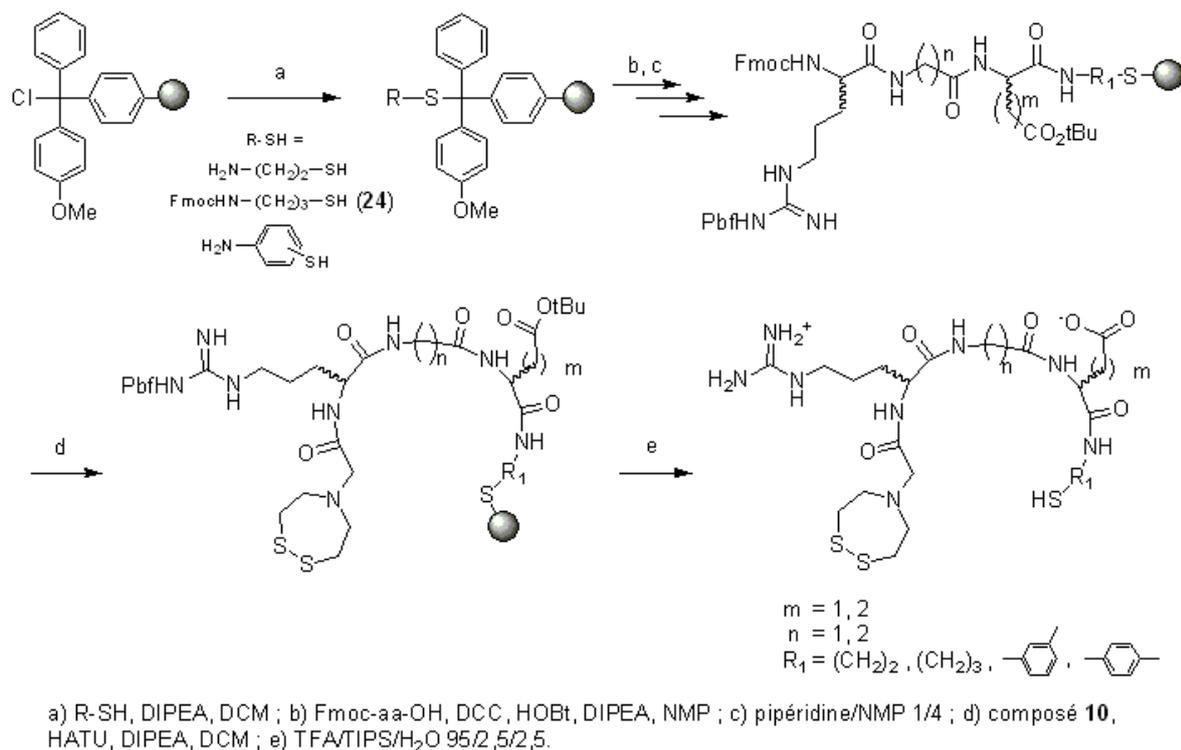
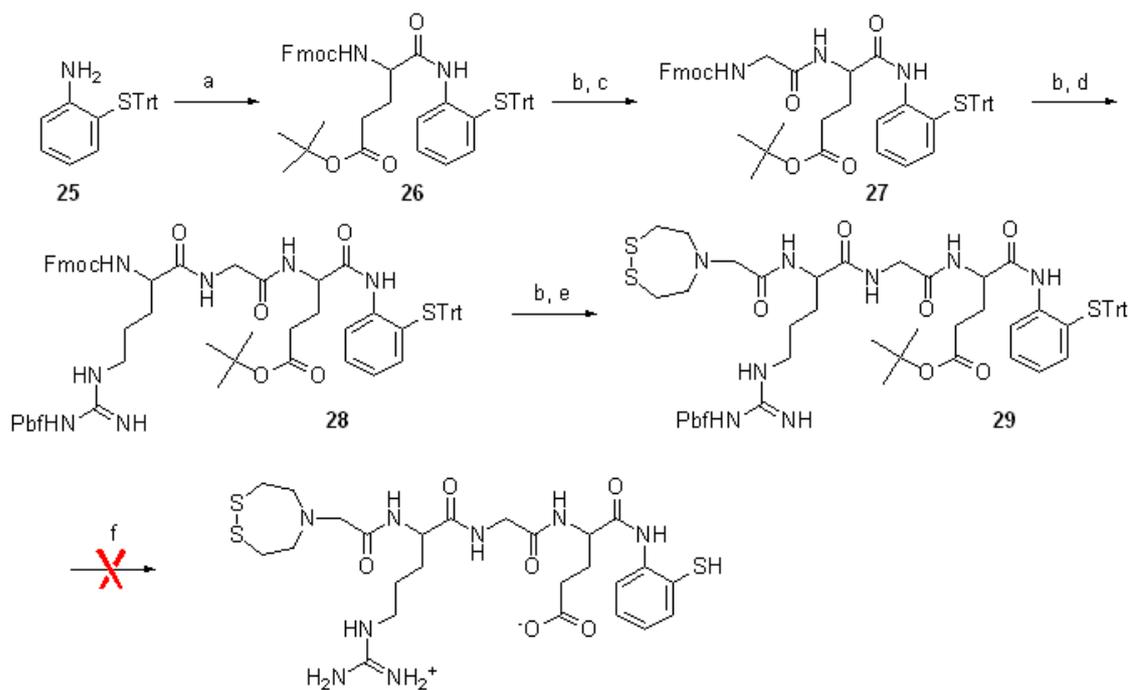


FIG. IV.13 – Synthèse sur résine Cl-Mmt.

fures homodimères au niveau C-terminal.

Les peptides portant le linker 2-aminothiophénol (série ortho) n'ont pas pu être isolés après acidolyse et ont conduit exclusivement à la formation des produits imidiques. La synthèse des composés NS₂-RGE-ortho et NS₂-R/βE-ortho a en effet été tentée sur une résine Mmt greffée avec le 2-aminothiophénol, sans que les produits attendus puissent être mis en évidence. Toutefois, nous avons pu identifier par ES-MS des composés de masse $m/z = 625,13$ et $639,18$ respectivement, $[M - H_2O + H^+]$, correspondant à une cyclisation interne au niveau de la chaîne latérale de l'acide glutamique. Afin de déterminer l'étape à laquelle la formation de l'imide pouvait avoir lieu, nous avons réalisé la synthèse en solution du composé NS₂-RGE-ortho (Fig. IV.14).

Les couplages en solution ont été réalisés avec HATU/DIPEA comme agent d'activation et la diisopropylamine a été utilisée pour la déprotection des groupements Fmoc. Les différents produits intermédiaires ont été caractérisés et correspondent bien aux composés attendus. Lors de la dernière étape, nous avons mis en évidence la formation d'un composé dont la masse correspond à $[M - H_2O + H^+]$. La cyclisation intramoléculaire se produit donc lors du traitement en milieu acide permettant la déprotection des chaînes latérales et le clivage de la résine. De même, le composé **30**, traité avec le même mélange TFA/TIPS/H₂O (95/2,5/2,5), conduit à l'acide **31** de façon très minoritaire par rapport au glutarimide **32** (Fig. IV.15).



a) Fmoc-Glu(tBu)-OH, HATU, DIPEA ; b) DIPADDMF 1/4 ; c) Fmoc-Gly-OH, HATU, DIPEA ; d) Fmoc-Arg(Pbf)-OH, HATU, DIPEA ; e) **10**, HATU, DIPEA ; f) TFA/TIPS/H₂O 95/2.5/2.5.

FIG. IV.14 – Essai de synthèse en solution du composé NS₂-RGE-ortho.

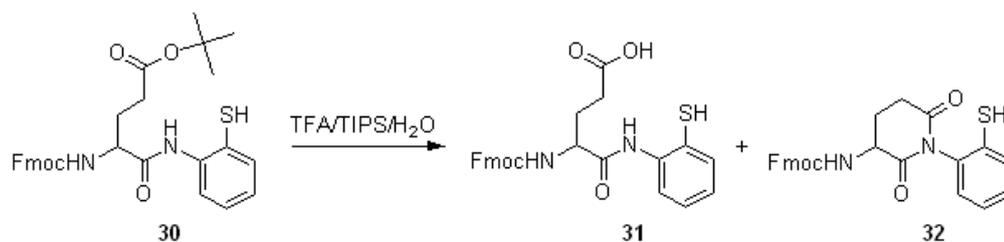


FIG. IV.15 – Vérification de l'hypothèse de formation du glutarimide.

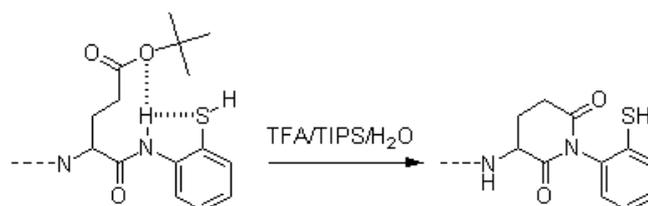


FIG. IV.16 – Hypothèse de formation du glutarimide lors de la déprotection du peptide en milieu acide.

Ce type de déshydratation intramoléculaire est bien connu dans le cas des dérivés contenant un acide aspartique suivi d'un autre acide aminé, en particulier la glycine [Chan 00, Yang 94, Nicolas 89]. Dans le cas de l'acide glutamique, peu d'exemples ont été décrits [Zhu 07, Feinberg 75]. Dans notre cas, nous proposons que la déshydratation observée est favorisée par la présence de la fonction thiol sur le groupement aromatique, les doublets électroniques du soufre contractant une liaison hydrogène intramoléculaire avec l'amide, dont l'azote est ainsi plus disponible (Fig. IV.16).

En résumé

La synthèse de la chimiothèque de tripeptides fonctionnalisés a été envisagée selon une approche combinatoire sur support solide. Les premiers essais menés sur des résines sulfamylbutyryl ou Wang n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Après diverses tentatives, une méthode faisant appel à un bras de couplage greffé sur une résine Rink amide a permis de synthétiser les composés de la série C_2 . Toutefois, cette approche s'est avérée difficile à mettre en œuvre pour les séries aromatiques. Une voie de synthèse plus générale a finalement été mise au point en utilisant une résine méthoxytrityl. Cette méthode nous a permis d'obtenir 64 composés dans les séries C_2 , C_3 , méta et para. Nous avons mis en évidence la formation d'un glutarimide dans la série aromatique ortho, ce qui nous a conduit à éliminer ces produits de nos chimiothèques. Le principal inconvénient de cette approche sur résine Mmt est la nécessité de purifier les peptides par HPLC à l'issue de la synthèse. Toutefois, la taille de la chimiothèque de ligands synthétisée nous a paru suffisante pour réaliser une première évaluation des traceurs après cyclisation par coordination d'un cœur oxotechnétium ou oxorhénium.

IV.4 Complexes cycliques de rhénium

IV.4.1 Cyclisation par coordination de ReO^{3+}

Quel que soit le métal (Re , ^{99g}Tc ou ^{99m}Tc) employé pour la complexation des ligands, la réduction préalable du pont disulfure du motif NS_2 a été réalisée à l'aide de tributylphosphine dans le méthanol (Fig. IV.17).

La complexation au rhénium des tripeptides analogues de RGD a été réalisée à partir de l'intermédiaire tétrabutylammonium tétrachlorooxorhénate $[ReOCl_4][NBu_4]$ commercial. Les synthèses ont été effectuées à l'échelle de 10 μ mol pour un échantillon représentatif des différentes séquences. Ainsi, l'effet du type de séquence (RGD/R β D/RGE/R β E) sur la complexation a été testé avec **Re-1A1**, **Re-1B1**, **Re-1C1** et **Re-1D1**. L'effet de la configuration (D/L) des acides aminés a également été pris en compte avec la synthèse de **Re-1A1**, **Re-2A1**, **Re-3A1** et **Re-4A1** et l'effet du linker ($C_2/C_3/m/p$) a été testé avec **Re-1A2**, **Re-2B2**, **Re-1C3**, **Re-4D3**, **Re-1C4** et **Re-2A4**. Dans tous les cas, le

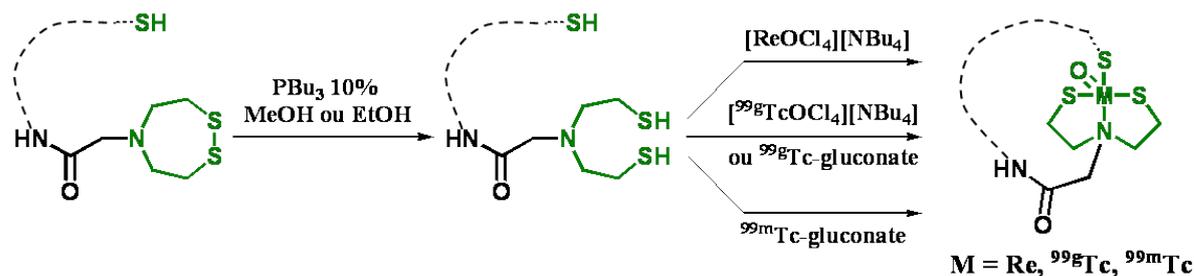


FIG. IV.17 – Principe général de la cyclisation des peptides par coordination d'un cœur oxométallique, après réduction du motif NS_2 .

complexe attendu a pu être mis en évidence par analyse de spectrométrie de masse. Dans certains cas, notamment pour **Re-1A1**, plusieurs fractions issues de la purification des produits bruts de complexation ont été identifiées comme correspondant au complexe. Ceci suggère la coexistence de diastéréomères issus de combinaisons des configurations *syn/anti* (pour $-\text{S}-\text{Re}-\text{N}-\text{CH}_2$) et *up/down* (pour $\text{Re}=\text{O}$), telles que celles représentées dans la figure IV.18 [Papadopoulos 96, Pelecanou 00, Seifert 06].

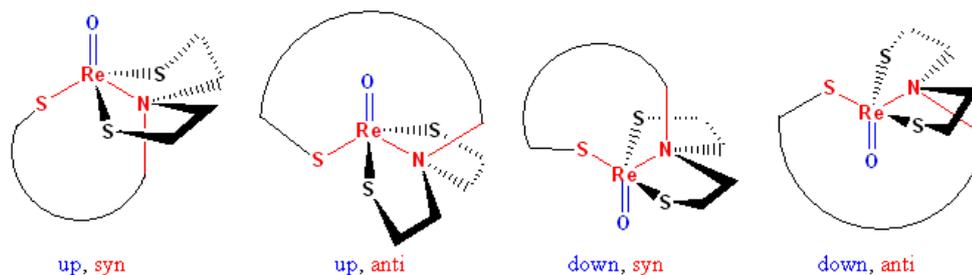


FIG. IV.18 – Représentation schématique de diastéréomères issus de combinaisons *syn/anti* et *up/down* pour des complexes cycliques.

Afin d'étudier plus en détail cet aspect, le complexe **Re-1A1** a été synthétisé à plus grande échelle et a été soumis diverses conditions de solvant, température et pH. Nous détaillerons les résultats de ces études de plasticité en IV.4.2. Notons dès à présent que différents diastéréomères monomériques et homodimériques de **Re-1A1** ont été identifiés (Fig. IV.19). Tous présentent des motifs isotopiques caractéristiques du motif $\text{NS}_2\text{-ReO-S}$ identiques aux profils théoriques.

Afin d'évaluer la faisabilité d'une préparation des complexes en mélange, un test de complexation du cœur oxorhénium a été réalisé sur un mélange des ligands **1D1**, **1D2** et **1D3**, conduisant aux complexes correspondants. Les ligands ont été réduits en mélange avant d'ajouter le rhénium et les produits ont été identifiés par LC-MS (Fig. IV.20). Tous les composés ont été observés sous la forme de mélanges de complexes monomériques et homodimériques.

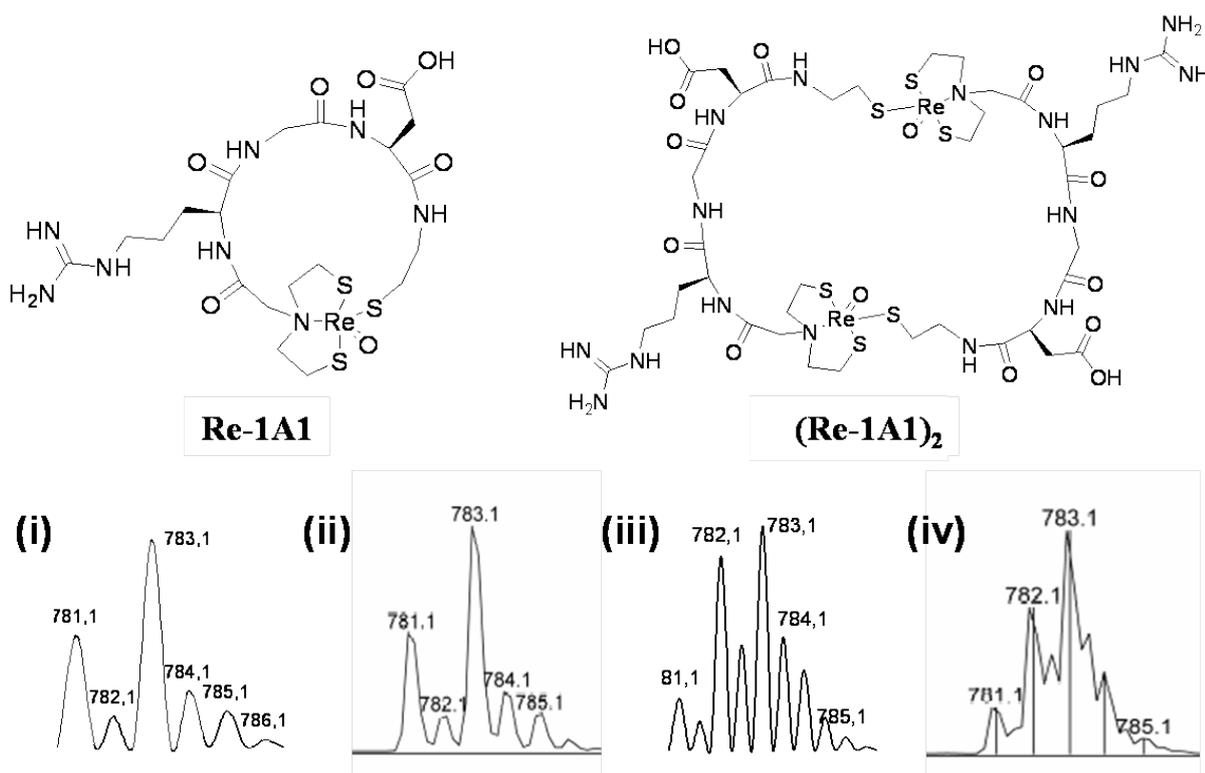


FIG. IV.19 – Massifs isotopiques (m/z) théoriques (i, iii) et observés (ii, iv) des complexes **Re-1A1** monomérique $[M + H^+]$ (i, ii) et homodimérique $[M + 2H^+]$ (iii, iv).

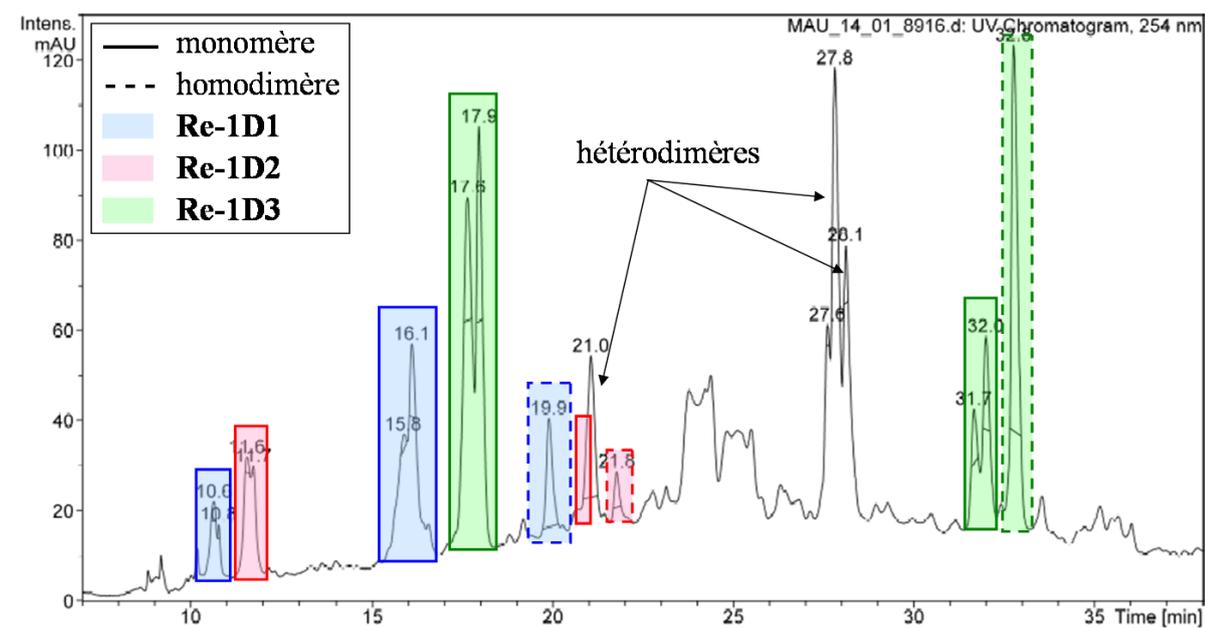


FIG. IV.20 – Analyse LC-MS (chromatogramme UV, 254 nm) du mélange brut après complexation en mélange par Re de **1D1**, **1D2** et **1D3**. Colonne C18 analytique Varian, détection UV, gradient 15-30% B en 30 min.

Comme attendu, plusieurs diastéréomères ont été identifiés pour les complexes monomériques. Les trois hétérodimères possibles ont également été obtenus dans ces conditions. Pour les complexes dimériques, un seul pic a été observé en LC-MS, ce qui suggère que les diastéréomères, plus flexibles, pourraient ne pas être séparés dans les conditions d'élution employées.

IV.4.2 Etudes de plasticité du complexe **Re-1A1**

IV.4.2.a Isomères de **Re-1A1** et homodimère

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, les complexes de rhénium synthétisés ont souvent été obtenus sous la forme de mélanges de diastéréomères de monomères ou d'homodimères. Afin d'étudier le comportement de ces espèces dans différentes conditions, nous avons synthétisé **Re-1A1** à l'échelle de 100 μmol . Le complexe brut, repris dans de l'eau, a été aliquoté, les échantillons ont été lyophilisés et conservés à -20°C avant d'être utilisés pour les études de plasticité. L'analyse par LC-MS de **Re-1A1** brut, dissous dans de l'eau à pH 7, a donné le chromatogramme présenté dans la figure IV.21. Deux isomères du complexe monomérique **Re-1A1** ont été identifiés pour $t_R = 10,1$ et $13,9$ min (notés **a** et **b** respectivement). Les pics à $16,1$ et $20,5$ min (**c** et **d**) correspondent à l'homodimère $(\text{Re-1A1})_2$, d'après le massif isotopique observé (Fig. IV.19). La proportion de dimères est nettement inférieure à celle des monomères d'après les chromatogrammes UV et l'isomère **b** semble majoritaire dans ces conditions.

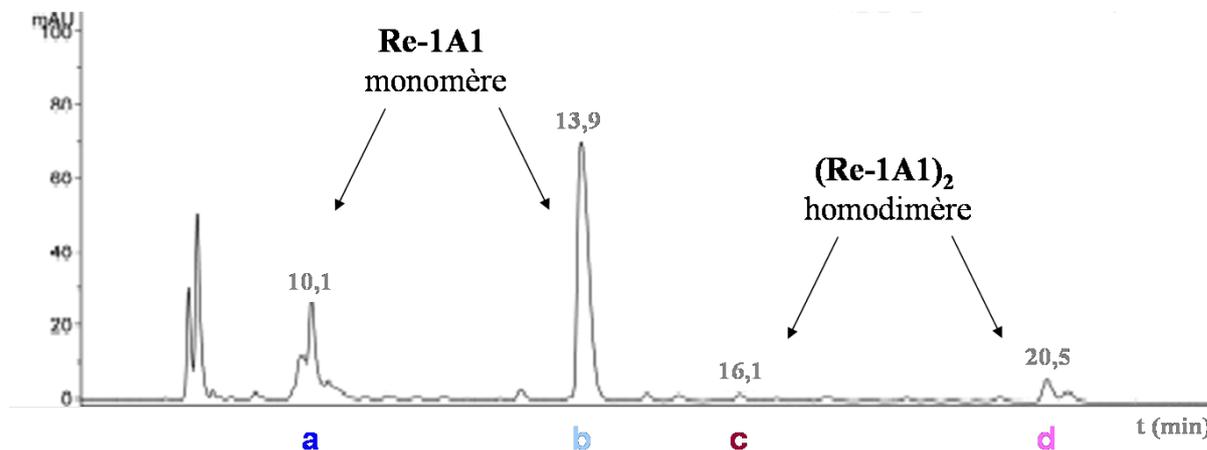


FIG. IV.21 – Analyse LC-MS (chromatogramme UV, 254 nm) de **Re-1A1** brut, après 3 h à température ambiante dans de l'eau (pH 7). Colonne C18 analytique Varian, détection UV, gradient 15-30% B en 30 min.

Nous avons cherché à déterminer l'évolution de ce mélange en fonction du pH et de la température. De plus, nous avons pu isoler les monomères **a** et **b** par purification HPLC préparative en quantités suffisantes pour étudier le comportement de chacun de ces deux

isomères dans les mêmes conditions de pH et température. Ces quantités étaient toutefois trop faibles pour obtenir des spectres RMN avec une résolution suffisante.

IV.4.2.b Effet du pH sur les différentes espèces de **Re-1A1**

Nous avons tout d'abord voulu nous assurer de la stabilité chimique des différents complexes en solution aqueuse à pH 7, à l'échelle de plusieurs heures, puis dans différentes conditions de pH à température ambiante.

Le mélange brut de complexe **Re-1A1** contenant les espèces **a**, **b**, **c** et **d** a été dissous dans de l'eau à pH 7 et laissé à température ambiante. La composition du mélange a alors été déterminée par intégration des pics observés en détection UV en LC-MS et rapportée en pourcentage du total des quatre espèces (Fig. IV.22). Les résultats obtenus montrent que la composition du mélange reste stable sur 6 h.

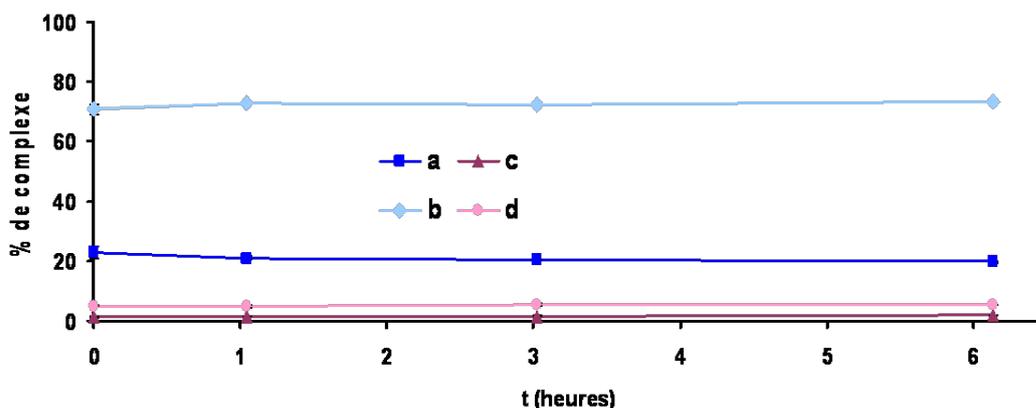


FIG. IV.22 – Répartition des espèces **a**, **b**, **c** et **d** du mélange brut de **Re-1A1** à pH 7 en fonction du temps. Pourcentages déterminés sur les aires UV (254 nm) des chromatogrammes LC-MS.

Des tests préliminaires nous avaient montré que le pH pouvait influencer sur la solubilité des complexes qui était par exemple nettement améliorée à pH basique. Nous avons donc étudié la composition du mélange brut après 3 h d'incubation à température ambiante dans des solutions aqueuses à pH 3, 7 et 11,5. Les aliquots ont également été analysés par LC-MS (Fig. IV.23). Les proportions des différentes espèces monomériques et homodimériques sont identiques à pH 3 et 7. A pH 11,5 la proportion des monomères diminue légèrement au profit des dimères, probablement en raison des concentrations relativement élevées en complexe (concentration totale ~ 25 mM). Nous avons proposé un mécanisme dans lequel les ions OH^- viennent ouvrir le complexe pour former un intermédiaire qui peut, soit se refermer par une cyclisation intramoléculaire, avec possibilité d'isomérisation, soit former un dimère (Fig. IV.24).

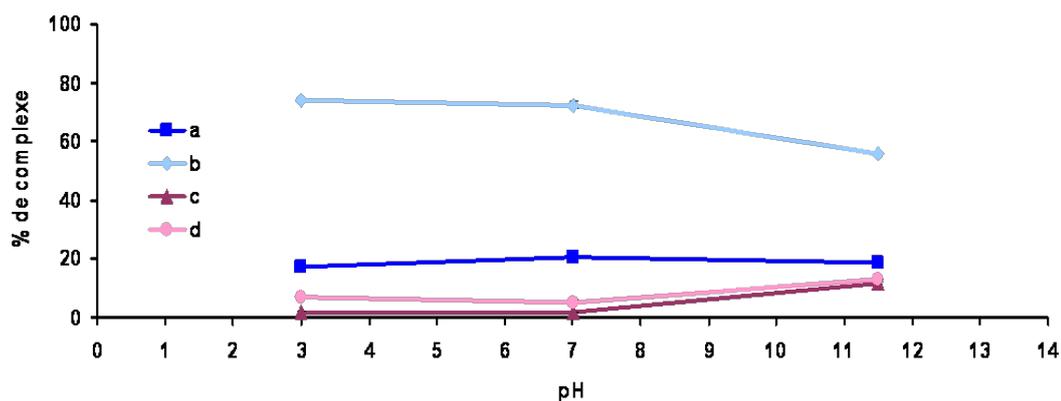


FIG. IV.23 – Répartition des espèces **a**, **b**, **c** et **d** du mélange brut **Re-1A1** en fonction du pH, 3 h après dissolution. Pourcentages déterminés sur les aires UV (254 nm) des chromatogrammes LC-MS.

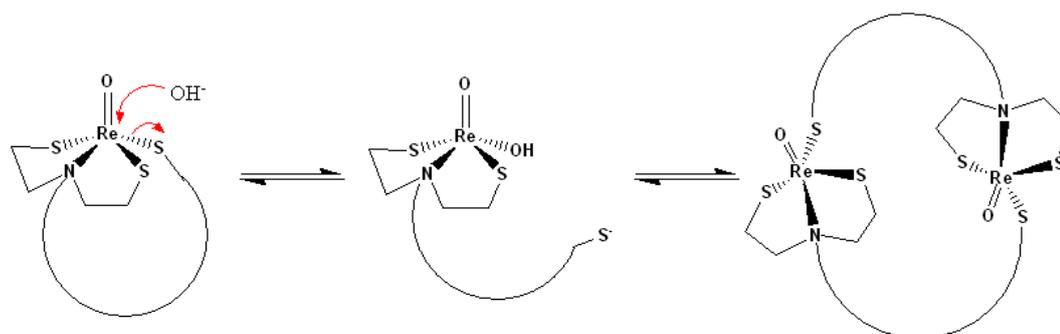


FIG. IV.24 – Mécanisme d'isomérisation et de dimérisation possible à pH basique.

Nous avons également étudié le comportement des complexes monomériques **a** et **b** purifiés, dans les mêmes conditions de pH. La dissolution de l'isomère **a** dans des solutions aqueuses à pH 3 et 7 conduit à la formation marginale des trois formes **b**, **c** et **d** (< 5%) (Fig. IV.25 (i)). A pH 11,5, la proportion d'isomère **a** diminue fortement (- 45%) au profit de l'isomère **b**. L'isomère **b** isolé donne des résultats similaires à **a** avec une composition stable à pH 3 et 7, et la formation de **a** aux dépens de **b** à pH 11,5 (Fig. IV.25 (ii)). Les variations importantes observées avec les isomères séparés mettent en évidence la réversibilité du phénomène, beaucoup moins visible en mélange.

Ainsi, un pH basique favoriserait l'isomérisation des monomères du complexe **Re-1A1**, alors qu'à pH neutre ou acide les différents espèces semblent être stables ou se compenser.

Les complexes de rhénium peuvent servir de modèles pour les traceurs marqués au ^{99m}Tc . Les complexes que nous étudions étant destinés à être utilisés *in vivo*, par voie intraveineuse, ils seront donc confrontés à un pH physiologique, aussi bien dans la solution injectée, qu'*in vivo*. Bien que les complexes obtenus en Re présentent une excellente

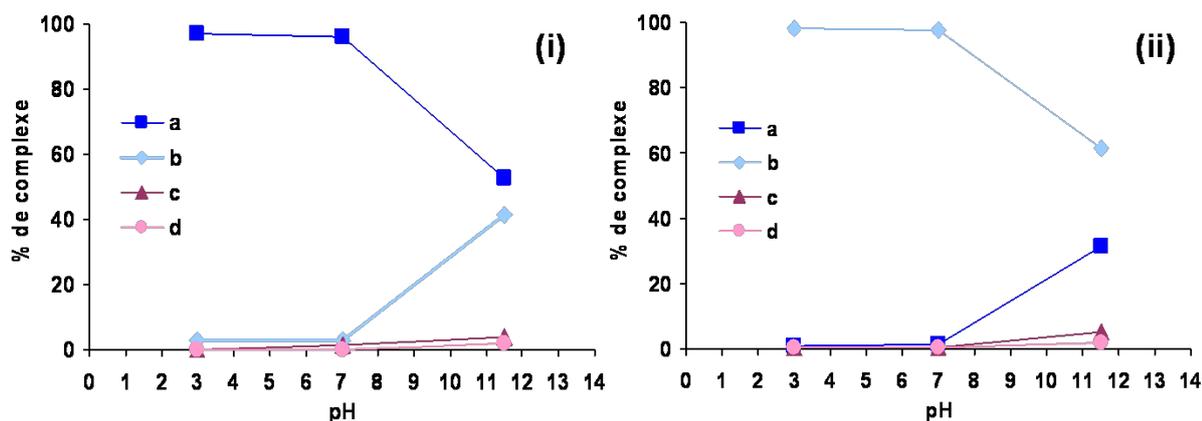


FIG. IV.25 – Evolution en fonction du pH des espèces **Re-1A1 a** (i) et **Re-1A1 b** (ii), 3h après dissolution. Pourcentages déterminés sur les aires UV (254 nm) des chromatogrammes LC-MS.

stabilité à pH 7, il faut être conscient que les échelles de concentration utilisées sont élevées et peuvent conduire à des résultats différents de ceux qui seraient observés pour des complexes de ^{99m}Tc , manipulés à l'état de traces.

IV.4.2.c Effet de la température sur les différentes espèces de **Re-1A1**

Nous avons également étudié l'effet de la température sur l'interconversion des isomères de **Re-1A1**. Le mélange brut a été dissous dans du tampon PBS (pH 7,4) puis placé à 37°C et analysé par LC-MS. La composition du mélange en espèces **a**, **b**, **c** et **d** varie peu au cours du temps (Fig. IV.26). Ainsi, les isomères monomériques et dimériques de **Re-1A1** sont stables dans des conditions de température et de pH physiologiques.

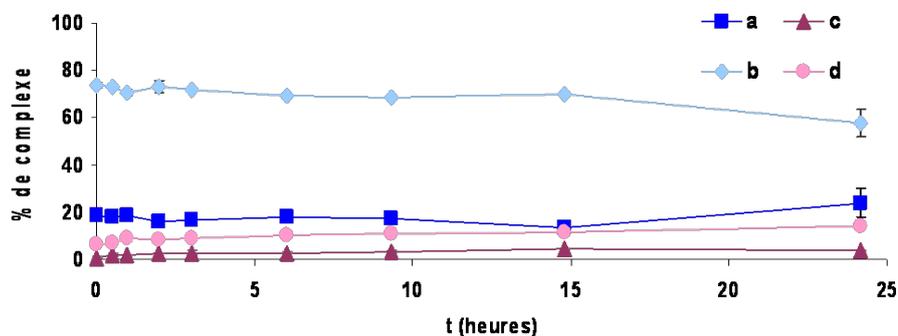


FIG. IV.26 – Répartition des espèces **a**, **b**, **c** et **d** du mélange brut **Re-1A1** dans du tampon PBS, à 37 °C, en fonction du temps. Pourcentages déterminés sur les aires UV (254 nm) des chromatogrammes LC-MS.

Les expériences de complexation en ^{99m}Tc peuvent nécessiter un chauffage en raison des hautes dilutions utilisées. Nous avons donc étudié l'effet d'une augmentation de la température sur la composition du mélange de **Re-1A1**, afin d'essayer de prévoir le comportement des dérivés technétiés correspondants. Pour cela, une solution de mélange brut dans le PBS à 20°C a été soumise à des paliers de température à 37, 60 et 90°C, suivis d'un retour à température ambiante. Chaque palier a été maintenu pendant 1 h et le passage à la température supérieure a été réalisé en 5 min. A la fin de chaque palier, un aliquot a été prélevé et analysé par LC-MS. Il s'avère que la composition du mélange varie peu jusqu'à 60°C. A 90°C, l'isomère **a** diminue au profit des dimères **c** et **d** (Fig. IV.27 (i)). Après retour à température ambiante, les proportions sont identiques à celles observées à 90°C. Ainsi, il semble que la dimérisation soit plutôt favorisée pour des températures élevées.

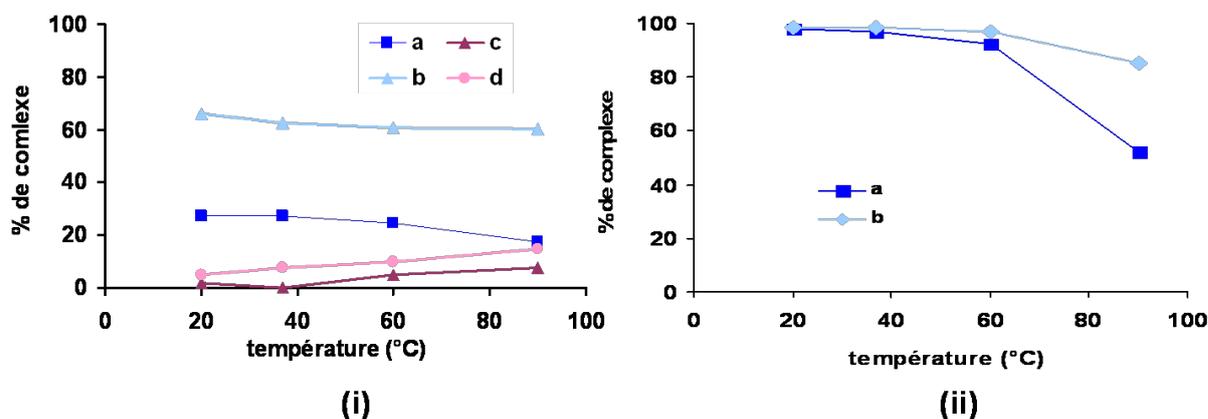


FIG. IV.27 – (i) Répartition des espèces **a**, **b**, **c** et **d** du mélange brut **Re-1A1** dans du tampon PBS lors d'une montée en température. (ii) Evolution lors d'une montée en température des espèces **Re-1A1 a** et **Re-1A1 b** isolées, dissoutes dans du tampon PBS. Pourcentages déterminés sur les aires UV (254 nm) des chromatogrammes LC-MS.

Nous avons réalisé le même type de montée en température sur les isomères **a** et **b** purifiés (Fig. IV.27 (ii)). Les variations de composition ne sont sensibles qu'à partir de 60°C et se font au profit de l'isomère monomérique **b** dans le cas du test sur **a** et inversement pour le test sur **b**. L'isomère **a** semble le plus sensible à la température. Un retour à température ambiante ne s'accompagne pas d'une rééquilibration du mélange.

Ainsi, la formation des homodimères semble favorisée par une élévation de la température, suggérant la nécessité de dépasser une barrière d'énergie d'activation assez élevée. En revanche, dans des conditions de pH et de température physiologiques, les différentes espèces semblent stables.

IV.4.2.d Stabilité dans le plasma de l'isomère monomérique **b** de **Re-1A1**

L'isomère monomérique **b** de **Re-1A1** étant majoritaire, nous avons cherché à déterminer sa stabilité dans du plasma murin pour estimer son comportement *in vivo*. Une solution de complexe **b** 20 mM dans le DMSO a été diluée dans du plasma (concentration finale de 2 mM). Le mélange a été incubé à température ambiante et des aliquots régulièrement prélevés et analysés par HPLC. L'aire du pic correspondant à l'isomère **b** a été rapportée en pourcentage de son aire initiale (Fig. IV.28). La quantité de **b** diminue au cours de temps (- 30% en 8 h) au profit d'un nouveau produit qui a été identifié par LC-MS comme étant l'isomère **d** homodimérique (**Re-1A1**)₂.

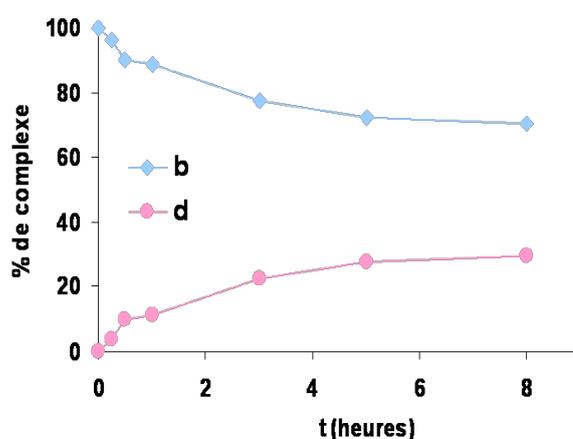


FIG. IV.28 – Stabilité dans le plasma de l'isomère monomérique **b** de **Re-1A1** à 37°C. Pourcentages déterminés sur les aires UV (254 nm) des chromatogrammes HPLC.

Ainsi, il semble que dans le plasma, la formation de dimère soit possible à partir du complexe monomérique. Cette interconversion inattendue pourrait être expliquée par la présence de protéines présentant des thiols libres (sérum albumine par exemple) pouvant substituer le thiol du motif de complexation NS_2/S . Ces intermédiaires instables conduiraient ainsi à la formation de dimère au lieu d'une cyclisation intramoléculaire. A partir de ce test en rhénium, il est toutefois difficile d'extrapoler pour le technétium. En effet, la formation effective de dimère de Tc semble improbable *in vivo* en raison de la forte dilution du complexe dans l'organisme.

IV.4.2.e Tests *in vitro* préliminaires des complexes de rhénium

Comme nous l'avons déjà mentionné, la mise au point de tests de liaison *in vitro* a eu lieu tardivement au cours de ce projet. Depuis le printemps 2008, M. Gonera a validé ces tests sur les intégrines $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$. Elle a montré que l' [¹²⁵I]-iodoéchistatine peut être déplacée par le ligand modèle **c(RGDyV)** **2** qui présente une IC_{50} de 67 nM pour $\alpha_V\beta_3$, ce qui est conforme aux résultats décrits dans la littérature (Tab. IV.3).

TAB. IV.3 – IC_{50} ($nM \pm SD$, $n = 3$) des expériences de compétition entre l' [^{125}I] - iodoéchistatine et les isomères monomériques (**a** et **b**) et homodimérique (**d**) de **Re-1A1**.

Produit	produits d'isomérisation	$\alpha_V\beta_3$	$\alpha_{IIb}\beta_3$
c(RGDyV) 2	-	67 ± 35	675 ± 60
1A1	(1A1)₂ (100%)	360 ± 220	930 ± 85
Re-1A1, a	Re-1A1, b (5%)	930 ± 65	3270 ± 440
Re-1A1, b	-	86 ± 26	1120 ± 365
(Re-1A1)₂, c	NT	NT	NT
(Re-1A1)₂, d	Re-1A1, a (traces), Re-1A1, b (25%), (Re-1A1)₂, c (20%)	210 ± 70	4500 ± 430

NT : non testé

Les premiers tests réalisés pour **Re-1A1** ont donné des résultats prometteurs sur $\alpha_V\beta_3$. En effet, les isomères monomériques **a** et **b**, ainsi que l'homodimère **d** ont été purifiés en quantités suffisantes pour mener des tests de liaison sur ces différentes espèces. L'isomère **Re-1A1 b** inhibe la liaison de l' [^{125}I] - iodoéchistatine sur $\alpha_V\beta_3$ avec une IC_{50} de 86 nM, qui est du même ordre de grandeur que pour le composé **c(RGDyV)** (Tab. IV.3). Au contraire, l'isomère **a** présente une affinité plus faible ($IC_{50} = 930$ nM). L'homodimère **d** a également une affinité intéressante, bien que la dimérisation tende à diminuer l'affinité pour $\alpha_V\beta_3$ par rapport au monomère **b**. Ce résultat suggère que la relaxation des contraintes dans le complexe dimérique diminue son affinité pour $\alpha_V\beta_3$. Cette hypothèse semble confirmée par le peptide **1A1** qui présente une IC_{50} de 360 nM pour $\alpha_V\beta_3$. D'une manière générale, l'ensemble des composés testés a une préférence intéressante pour $\alpha_V\beta_3$ par rapport à $\alpha_{IIb}\beta_3$, en particulier **Re-1A1 b**, avec un rapport des IC_{50} supérieur à 10.

Afin de vérifier l'intégrité des complexes lors des essais, nous avons analysé, par LC-MS, les solutions de complexes utilisées pour les tests de liaison. En effet, le tampon employé pour ces tests contient 1% de BSA (bovin serum albumin), protéine qui présente de nombreux thiols libres à sa surface, et pouvant donc dégrader les complexes. Les chromatogrammes obtenus montrent que le monomère **b** est parfaitement stable puisque aucun produit secondaire n'a pu être identifié. Au contraire, l'isomère **a** tend à s'isomériser en **b** (5%). De la même manière, le dimère **d** s'isomériser pour donner un mélange de monomères **a** (traces) et **b** (25 %) et de dimère **c** (20 %). Ces résultats doivent être pris en compte pour interpréter les IC_{50} calculées dans les tests de liaison. En effet, l'affinité apparente de **a** et **d** peut être reliée à la proportion de **b** présent dans les solutions. Dans ces conditions, il est difficile de conclure quant à l'activité biochimique réelle du monomère **a** et du dimère **d** dont les contributions pourraient sembler négligeables. En revanche, **Re-1A1 b** présente une bonne affinité pour $\alpha_V\beta_3$. Ce résultat suggère que la

cyclisation par coordination d'un cœur oxorhénium contraint la séquence RGD dans une conformation favorable à l'interaction avec cette intégrine et que le positionnement du cœur oxorhénium à proximité immédiate du site de liaison ne perturbe pas la reconnaissance du tripeptide par l'intégrine.

Suite à ces tests sur les isomères de **Re-1A1**, M. Gonera a débuté le criblage de la chimiothèque de complexes cyclisés par le rhénium. Les premiers tests ont été réalisés sur les complexes à linker C_2 ou C_3 , non purifiés. Les résultats préliminaires sont présentés dans la figure IV.29 et correspondent au pourcentage de $[^{125}I]$ -iodoéchistatine déplacée par les complexes en concentration $10 \mu M$.

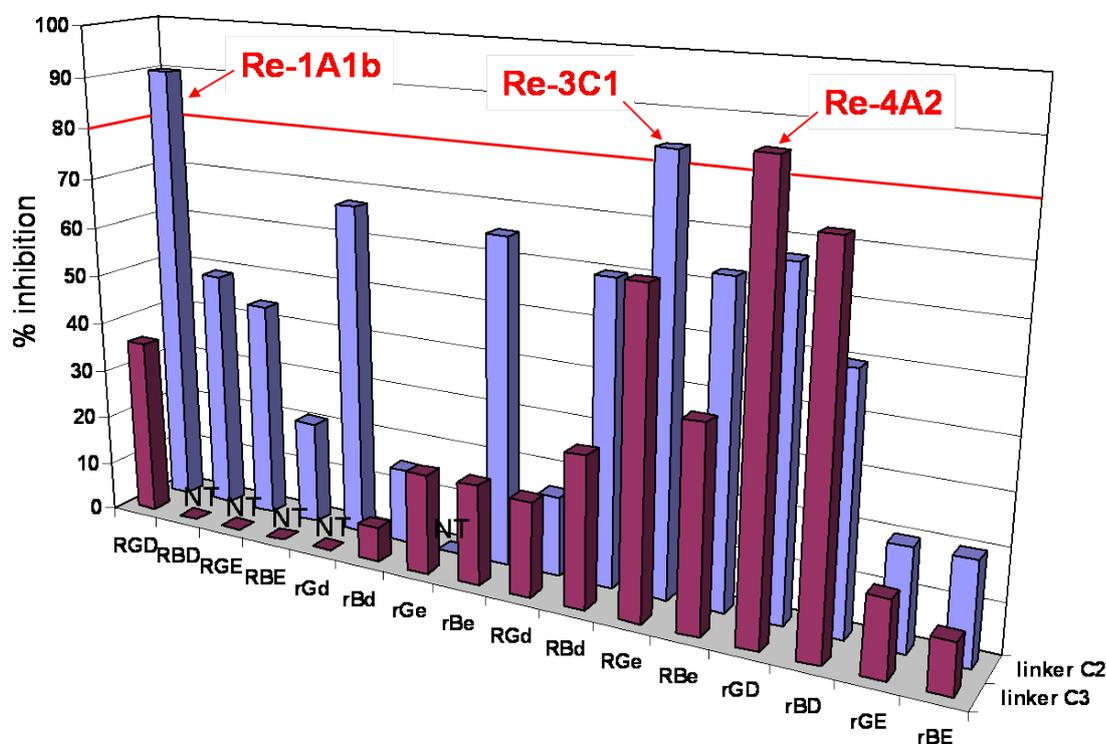


FIG. IV.29 – Criblage *in vitro* des complexes rhéniés présentant un linker C_2 ou C_3 : représentation du pourcentage de $[^{125}I]$ -iodoéchistatine déplacée pour une concentration en complexe de $10 \mu M$. (NT : non testé)

Parmi ces premiers résultats, deux autres complexes présentent une activité intéressante. Il s'agit de **Re-3C1** et de **Re-4A2**. Ces deux composés vont faire l'objet d'études plus approfondies, mais les pourcentages d'inhibition obtenus à 10 et $1 \mu M$ permettent d'ores et déjà d'estimer qu'ils ont des IC_{50} nettement inférieures à $1 \mu M$. Ces composés feront donc également l'objet d'études *in vivo* sous leur forme technétée.

En résumé

La formation d'isomères monomériques et homodimérique a été observée lors de la complexation au rhénium des ligands tripeptidiques. Les interconversions semblent avoir lieu plus facilement à des températures élevées ou à pH basique. Dans des conditions de pH et de température physiologiques, les isomères monomériques sont majoritaires et semblent stables. En revanche, la formation d'homodimère, à partir d'un monomère, a été mise en évidence dans du plasma. Ce résultat pourrait s'expliquer par la présence de thiols à la surface de certaines protéines plasmatiques qui catalyseraient l'interconversion.

L'ensemble de ces résultats obtenus sur des complexes de rhénium sont à relativiser puisque les traceurs seront marqués au ^{99m}Tc . Les différences de cinétiques de complexation et les conditions de dilutions employées en Tc peuvent en effet conduire à des résultats différents.

Enfin, les premiers tests de liaison réalisés sur les intégrines purifiées $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$ ont donné des résultats encourageants pour l'isomère monomérique **b** de **Re-1A1** ainsi que pour **Re-3C1** et **Re-4A2**. Des essais sur d'autres intégrines, ainsi que le criblage de l'ensemble de la chimiothèque de complexes rhéniés sont en cours.

IV.5 Complexes cycliques de technétium

IV.5.1 Complexation au ^{99g}Tc

Comme dans les chapitres précédents, le marquage au ^{99g}Tc des complexes cyclisés par coordination d'un cœur oxométallique a été réalisée afin de pouvoir disposer de références lors de la mise au point de la complexation au ^{99m}Tc . Trois composés représentatifs de la chimiothèque ont été étudiés : $^{99g}\text{Tc-1A1}$, $^{99g}\text{Tc-2B2}$ et $^{99g}\text{Tc-4D3}$. Les complexes de ^{99g}Tc ont été obtenus soit à partir de l'intermédiaire $^{99g}\text{TcOCl}_4[\text{NBu}_4]$, soit à partir du ^{99g}TcO -gluconate.

Pour $^{99g}\text{Tc-1A1}$, nous avons observé la formation de l'homodimère $(^{99g}\text{T-1A1})_2$, identifié par son massif isotopique, lors de la complexation avec $^{99g}\text{TcOCl}_4$ ainsi que le monomère correspondant. En revanche, avec ^{99g}TcO -gluconate, seul le monomère est présent (Fig. IV.30). On notera que ce monomère, également formé en ^{99m}Tc , correspond très probablement à l'isomère **Re-1A1 b**, c'est-à-dire celui qui présentait une bonne affinité pour $\alpha_V\beta_3$. Pour $^{99g}\text{Tc-2B2}$, plusieurs diastéréomères ont été mis en évidence lors de la complexation via l'intermédiaire gluconate (Fig. IV.31). Un résultat analogue a été observé pour $^{99g}\text{Tc-4D3}$ dont les diastéréomères présentent une grande différence de polarité ($t_R = 21,9$ et $34,5$ min) (Fig. IV.32).

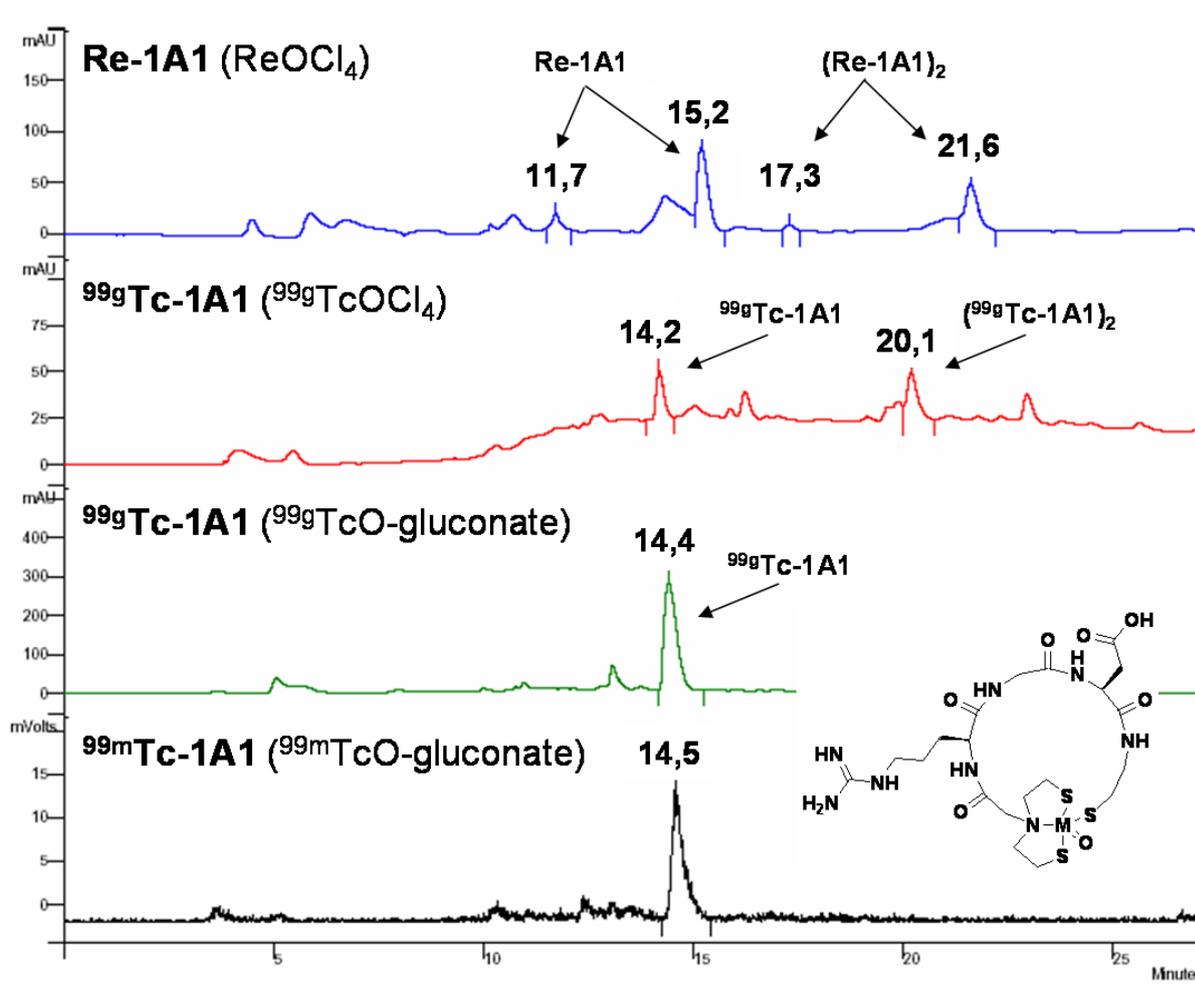


FIG. IV.30 – Chromatogrammes HPLC de *Re-1A1*, $^{99g}Tc-1A1$ et $^{99m}Tc-1A1$. HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection UV à 254 nm ou γ , gradient 15-30% B en 30 min.

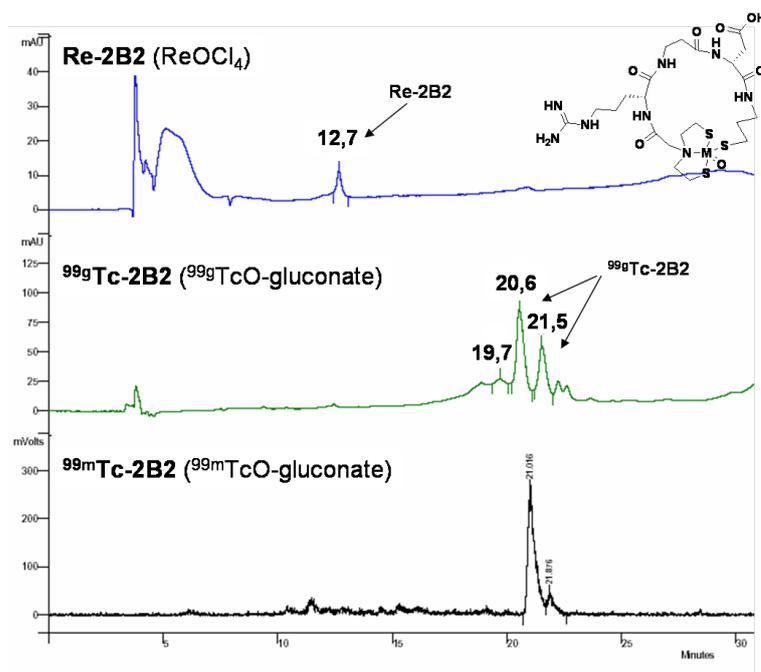


FIG. IV.31 – Chromatogrammes HPLC de *Re-2B2*, $^{99g}\text{Tc-2B2}$ et $^{99m}\text{Tc-2B2}$. HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection UV à 254 nm ou γ , gradient 15-30% B en 30 min.

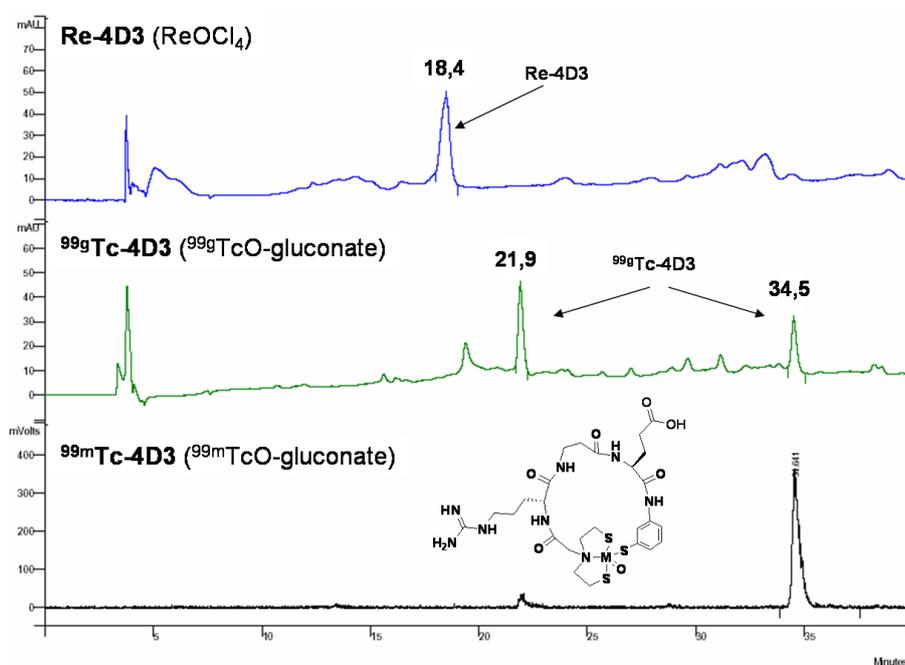


FIG. IV.32 – Chromatogrammes HPLC de *Re-4D3*, $^{99g}\text{Tc-4D3}$ et $^{99m}\text{Tc-4D3}$. HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection UV à 254 nm ou γ , gradient 15-30% B en 30 min.

IV.5.2 Complexation au ^{99m}Tc

Le marquage au ^{99m}Tc a nécessité une mise au point portant sur les conditions de réduction des ligands, sur leur concentration ainsi que sur le temps et la température de réaction. Des essais de marquage ont été réalisés sur **1A1** à partir de l'intermédiaire tartrate décrit précédemment et, même si le complexe $^{99m}Tc-1A1$ a pu être identifié, un important bruit de fond a été observé sur les chromatogrammes. Nous avons donc choisi d'utiliser l'intermédiaire ^{99m}TcO -gluconate pour l'ensemble de l'optimisation. Elle a tout d'abord été menée avec le ligand **1A1**, puis des améliorations ponctuelles ont été apportées pour la formation de $^{99m}Tc-2B2$ et $^{99m}Tc-4D3$ qui servent de composés modèles de la chimiothèque. Enfin, le mode opératoire optimisé a été adapté selon les besoins lors de la synthèses des chimiothèques destinées aux tests *in vivo*.

IV.5.2.a Optimisation du marquage de **1A1**, **2B2** et **4D3**

Un premier essai de marquage a été réalisé après avoir réduit le ligand **1A1** dans du méthanol à l'aide d'une solution de tributylphosphine à 10% dans le MeOH. La solution de ligand réduit a été évaporée sous un flux d'argon et reprise dans du tampon HEPES (35 mM pH 7,8) pour donner une solution 1500 μM . Cette solution a été ajoutée à une solution de ^{99m}TcO -gluconate (V/V) et le mélange a été incubé 2 h à 50°C (Tab. IV.4). L'analyse par radio-HPLC du mélange réactionnel a permis de mettre en évidence la formation de $^{99m}Tc-1A1$ ($t_R = 17,3$ min) (Fig. IV.33), identifié par comparaison avec son équivalent marqué au ^{99g}Tc .

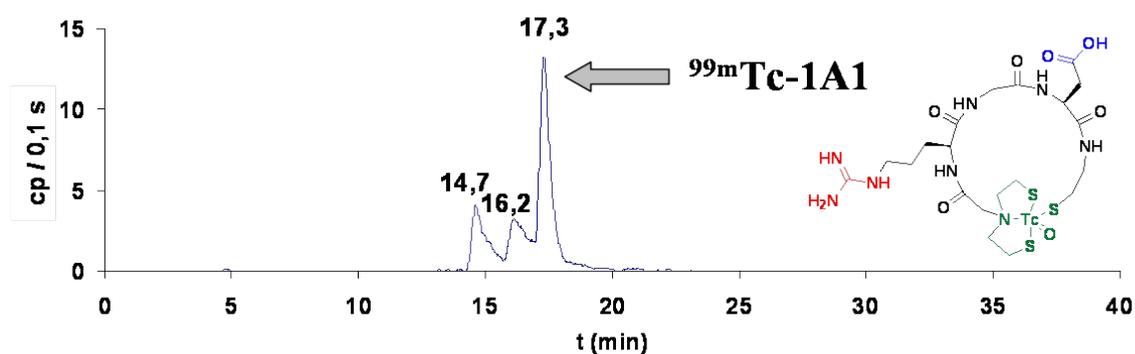


FIG. IV.33 – Radiochromatogramme du mélange réactionnel obtenu après incubation de ^{99m}TcO -gluconate en présence de **1A1** réduit (750 μM , 2 h, 50°C). HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.

Aucune trace de TcO_4^- ($t_R \sim 5,6$ min) ou de colloïdes ($t_R < 35$ min) n'a été observée. La formation de technétium hydrolysé réduit est improbable car aucune accumulation de radioactivité n'a pu être mesurée dans la colonne et l'injection de la même quantité de radioactivité sous forme de TcO_4^- a donné une aire de pic comparable sur les chromato-

grammes HPLC. Ainsi tout le technétium a été réduit puis complexé. Toutefois, les deux pics à 14,7 et 16,2 min n'ont pas pu être identifiés. Nous avons donc cherché à optimiser les conditions de marquage du ligand **1A1**.

TAB. IV.4 – Conditions de marquage au ^{99m}Tc : mises au point et protocoles optimisés **M1** et **M2**.

Protocole	Concentration en ligand dans la solution de marquage (μM)	Temps d'incubation	Température d'incubation
premier essai	750	2 h	50°C
concentration	750	2 h	50°C
	500		
	250		
	50		
	25		
	5		
temps	250	30 min	50°C
		1 h	
		1,5 h	
		2 h	
température	250	30 min	20°C
			50°C
			90°C
M1	250	30 min	50°C
M2	250	15 min	90°C

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer la concentration optimale en ligand dans le milieu de complexation (Tab. IV.4). Le protocole de réduction décrit ci-dessus a permis d'obtenir des solutions de ligand réduit de concentration 1000, 500, 100, 50 et 10 μM à partir de la solution mère 1500 μM pour conduire à des concentrations finales dans le mélange réactionnel de 750, 500, 250, 50, 25 et 5 μM respectivement. Les radio-chromatogrammes obtenus pour ces 6 tests sont représentés dans la figure IV.34 et sont normalisés pour correspondre à une même quantité de radioactivité injectée en HPLC.

Dans le cas des plus faibles concentrations (5, 25 et 50 μM), le complexe attendu n'a pas pu être mis en évidence. Pour les concentrations supérieures, la formation du complexe est maximale pour les valeurs 250 et 500 μM et des produits secondaires ($t_R = 13,4, 14,6$ et 16,1 min) sont observés à 500 et 750 μM . Une concentration en ligand de 250 μM permet d'obtenir un maximum de $^{99m}\text{Tc-1A1}$ tout en limitant fortement les produits secondaires et a donc été retenue pour valider le protocole.

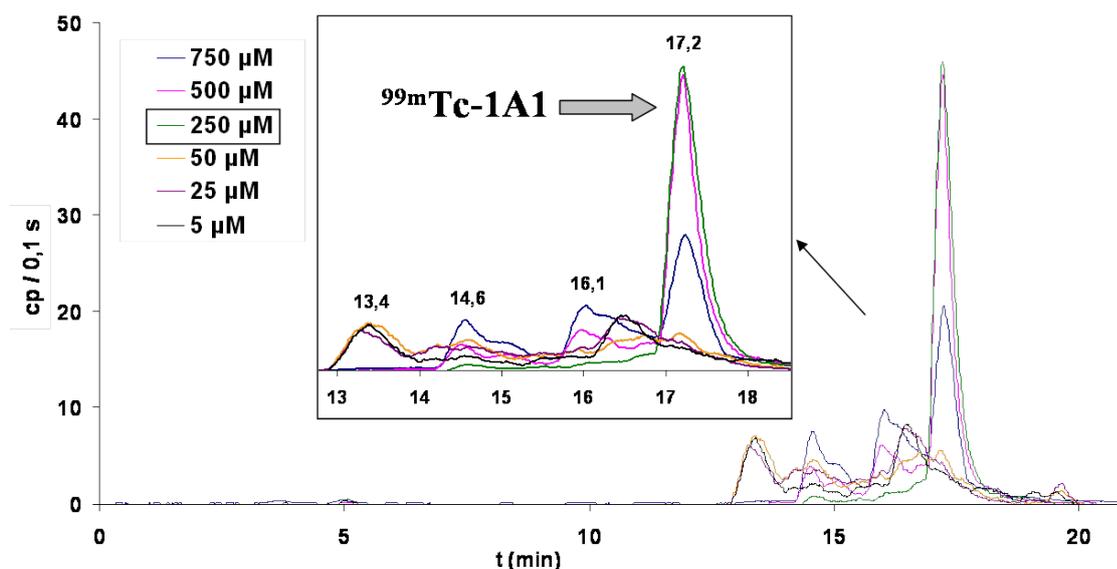


FIG. IV.34 – Radiochromatogrammes des mélanges réactionnels obtenus après incubation de ^{99m}TcO -gluconate en présence de **1A1** réduit à diverses concentrations (2 h à $50^{\circ}C$). HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min - intensité corrigée pour correspondre à une même activité injectée en HPLC.

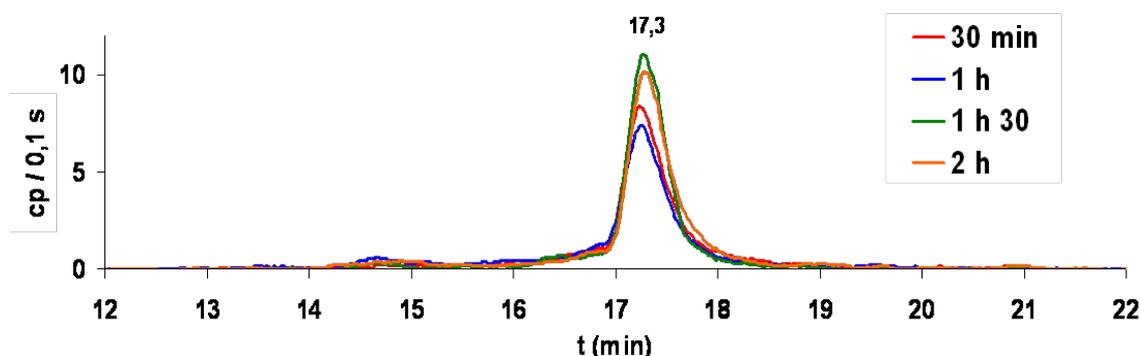


FIG. IV.35 – Radiochromatogrammes des mélanges réactionnels obtenus après un temps d'incubation variable de ^{99m}TcO -gluconate, en présence de **1A1** réduit ($250 \mu M$), à $50^{\circ}C$. HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min - intensité corrigée pour correspondre à une même activité injectée en HPLC.

Nous avons ensuite cherché à déterminer l'influence du temps de réaction sur le marquage de **1A1** (Tab. IV.4). Un mélange ^{99m}TcO -gluconate/**1A1** réduit (1/1) a donc été incubé à $50^{\circ}C$ entre 30 min et 2 h. Les radiochromatogrammes normalisés, d'aire totale constante, représentés dans la figure IV.35, ne présentent pas de différences majeures. Nous avons choisi de limiter le temps d'incubation à 30 min dans ces conditions, afin de conserver le maximum de radioactivité.

Nous avons également étudié la température d'incubation (Tab. IV.4). Un mélange $^{99m}\text{TcO-gluconate}/\mathbf{1A1}$ réduit a donc été incubé pendant 30 min à température ambiante, à 50°C ou à 90°C. Nous avons observé que l'aire totale des radio-chromatogrammes, normalisée pour correspondre à une même quantité de radioactivité injectée en HPLC, varie avec la température (Tab. IV.5 et Fig. IV.36). En effet, il s'avère que si l'incorporation de ^{99m}Tc est importante à 90°C, elle n'est que très partielle à température ambiante. D'autre part, nous n'observons pas la présence de technétium libre sur les chromatogrammes. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ces résultats est la formation à 50°C, et surtout à température ambiante, d'hydrolysé réduit qui est retenu en tête de colonne HPLC. Les différences observées en fonction de la température peuvent traduire des différences de cinétique importantes entre la complexation et l'hydrolyse. Compte tenu du résultat relativement satisfaisant obtenu à 50°C, nous avons choisi de conserver cette température de marquage pour éviter l'éventuelle dégradation des ligands par un chauffage excessif.

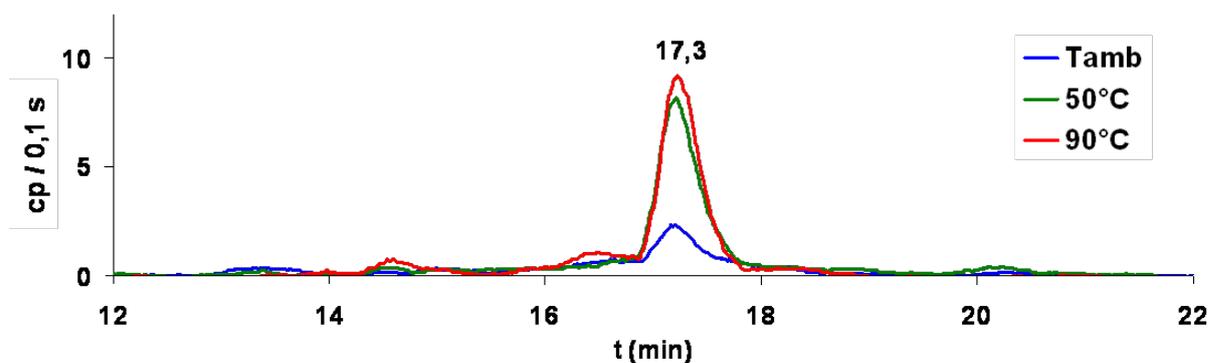


FIG. IV.36 – Radiochromatogrammes des mélanges réactionnels obtenus après 30 min d'incubation de $^{99m}\text{TcO-gluconate}$ en présence de $\mathbf{1A1}$ réduit (250 μM), à différentes températures. HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min - intensité corrigée pour correspondre à une même activité injectée en HPLC.

TAB. IV.5 – Aire totale normalisée des chromatogrammes HPLC en fonction de la température de marquage et pourcentage par rapport à l'aire à 90°C.

Température	Aire totale normalisée	(%)
Tamb	290 840	55
50°C	454 066	85
90°C	533 163	100

Ainsi, un premier mode opératoire (M1), optimisé sur $\mathbf{1A1}$, a été proposé pour le marquage par cyclisation (Tab. IV.4). Afin de tester la validité de ce mode opératoire, nous l'avons appliqué à la synthèse de 8 complexes. L'analyse radio-HPLC des mélanges

réactionnels obtenus pour $^{99m}Tc-1A1$, $^{99m}Tc-1B1$, $^{99m}Tc-1C1$ et $^{99m}Tc-1D1$ (série C_2) a permis dans chaque cas de mettre en évidence un pic majoritaire dont les temps de rétention sont voisins. C'est aussi le cas pour quatre composés de la série méta, $^{99m}Tc-1A3$, $^{99m}Tc-1B3$, $^{99m}Tc-1C3$ et $^{99m}Tc-1D3$. Ce mode opératoire M1 semble donc assez général pour les peptides synthétisés.

Dans la suite de ce travail, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à sept composés représentatifs de la chimiothèque de ligands, afin notamment d'évaluer la stabilité de ce type de traceurs. Il s'agit de **1A1**, **2A1**, **3A1**, **4A1**, **2B2**, **4D3** et **3C4**. Nous avons choisi ces composés pour disposer de représentants de chaque classe de linker (C_2 , C_3 , m et p), de chaque type de séquence tripeptidique (RGD, r β d, r β E et RGe) et de chaque combinaison de configuration des acides aminés (RGD, rGd, RGd et rGD). Le cas des composés para, dont **3C4**, sera traité plus loin.

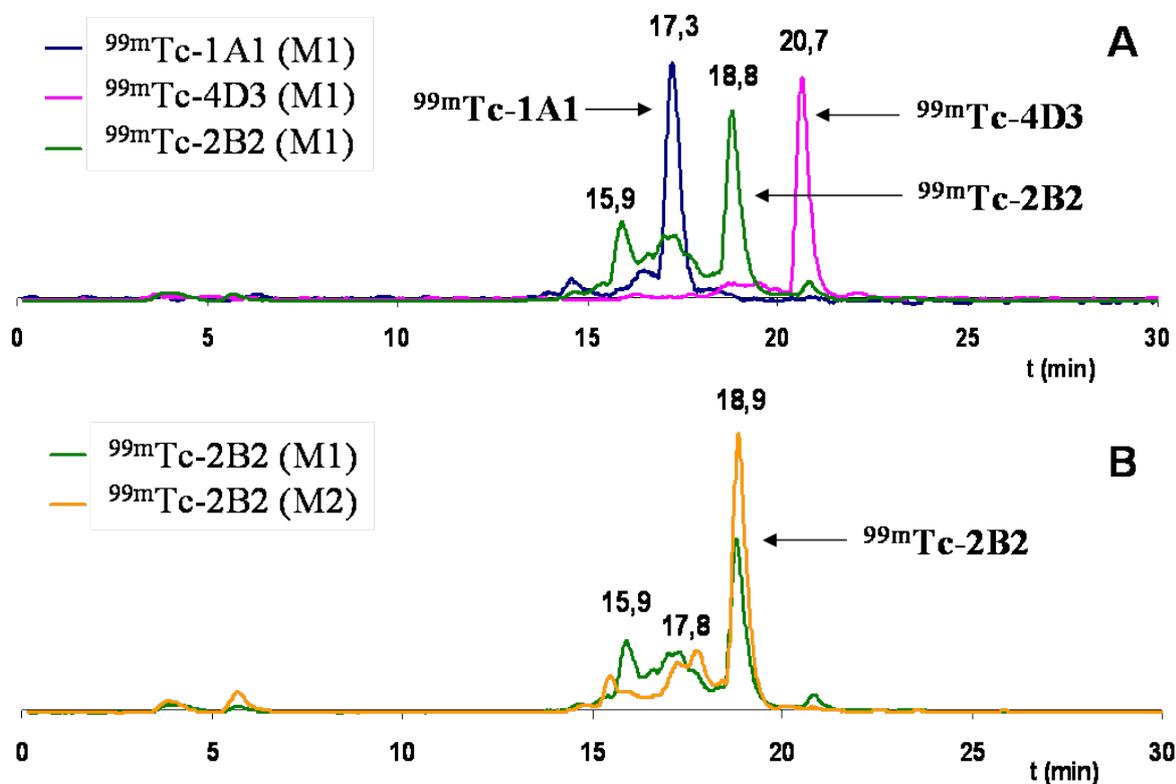


FIG. IV.37 – Radiochromatogrammes des mélanges réactionnels pour **1A1**, **2B2**, et **4D3** obtenus selon les modes opératoires M1 (**A**) et M2 (**B**). HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.

Le mode opératoire M1 de marquage a été optimisé avec **1A1** et les conditions retenues se sont avérées également favorables à la formation de $^{99m}Tc-4D3$ (Fig. IV.37 A). Pour $^{99m}Tc-2B2$, un massif (de 15 à 18 min) est observé sur le radiochromatogramme, avant le pic identifié comme étant celui du complexe ($t_R = 18,8$ min) par comparaison avec le composé marqué au ^{99g}Tc . Ce massif ne pouvant être attribué catégoriquement à des

diastéréomères du complexe, nous avons cherché à faire varier les conditions de marquage afin d'en limiter la formation. Des modifications des conditions de réduction du ligand ont été testées, comme l'utilisation d'éthanol au lieu du méthanol et une dilution dans du tampon PBS au lieu de HEPES, sans que des variations notables soient observées. Les conditions de réduction de **M1** ont donc été conservées et nous avons alors modifié les conditions de marquage, avec une incubation de 15 min à 90°C (mode opératoire **M2**). Dans ce cas, le massif précédant le pic du complexe s'est avéré moins important (Fig. IV.37 B). Le mode opératoire **M2** a donc été adopté pour le marquage de **2B2** et a donné des résultats satisfaisants pour **2A1**, **3A1** et **4A1**.

IV.5.2.b Essais de marquages en mélange

Nous avons souhaité évaluer la faisabilité d'un marquage en mélange afin de faciliter la formation des complexes pour les criblages *in vivo*. Nous avons réalisé des essais à l'aide des ligands **2A1**, **4B2**, **3C1** et **1D2**.

Les quatre ligands ont été marqués séparément selon le protocole **M2**, puis analysés en radio-HPLC pour disposer d'une référence (avec une dilution des ligands réduits dans du tampon PBS au lieu de HEPES) (Fig. IV.38 A). Ces 4 traceurs ont ensuite été mélangés ($4 \times 25 \mu\text{L}$), puis analysés en radio-HPLC et les pics correspondant à chaque produits ont été observés (Fig. IV.38 B). Nous avons ensuite testé deux conditions de marquage en mélange :

- réduction séparée des ligands, puis mélange de ces solutions et marquage (Fig. IV.38 C);
- réduction en mélange des ligands puis marquage (Fig. IV.38 D).

Les radio-chromatogrammes obtenus dans ces conditions ne permettent pas de bien distinguer les quatre pics attendus. Les produits secondaires semblent nombreux et une partie du technétium n'a pas été chélatée. Ces résultats nous ont conduit à choisir une réduction et un marquage sur ligands isolés, suivi de leur mélange, pour l'obtention des solutions de traceurs à cribler *in vivo*.

IV.5.2.c Cas des ligands à linker para

Le cas des ligands à linker aromatique para s'est avéré problématique. La complexation par ^{99g}Tc de **2A4** a conduit majoritairement à la formation de diastéréomères de l'homodimère, aussi bien avec l'intermédiaire tétrachlorooxotechnétate qu'avec le ^{99g}TcO -gluconate (Fig IV.39). En ^{99m}Tc , nous avons également pu mettre en évidence la formation de ces dimères mais le monomère n'a pas pu être clairement identifié. En effet, malgré les différents essais menés dans diverses conditions de concentration en ligand ou de temps de réaction, nous n'avons pas pu obtenir un seul pic majoritaire en HPLC. D'autres ligands à linker para ont été marqués au ^{99g}Tc et au ^{99m}Tc et, dans tous les cas, plusieurs pics

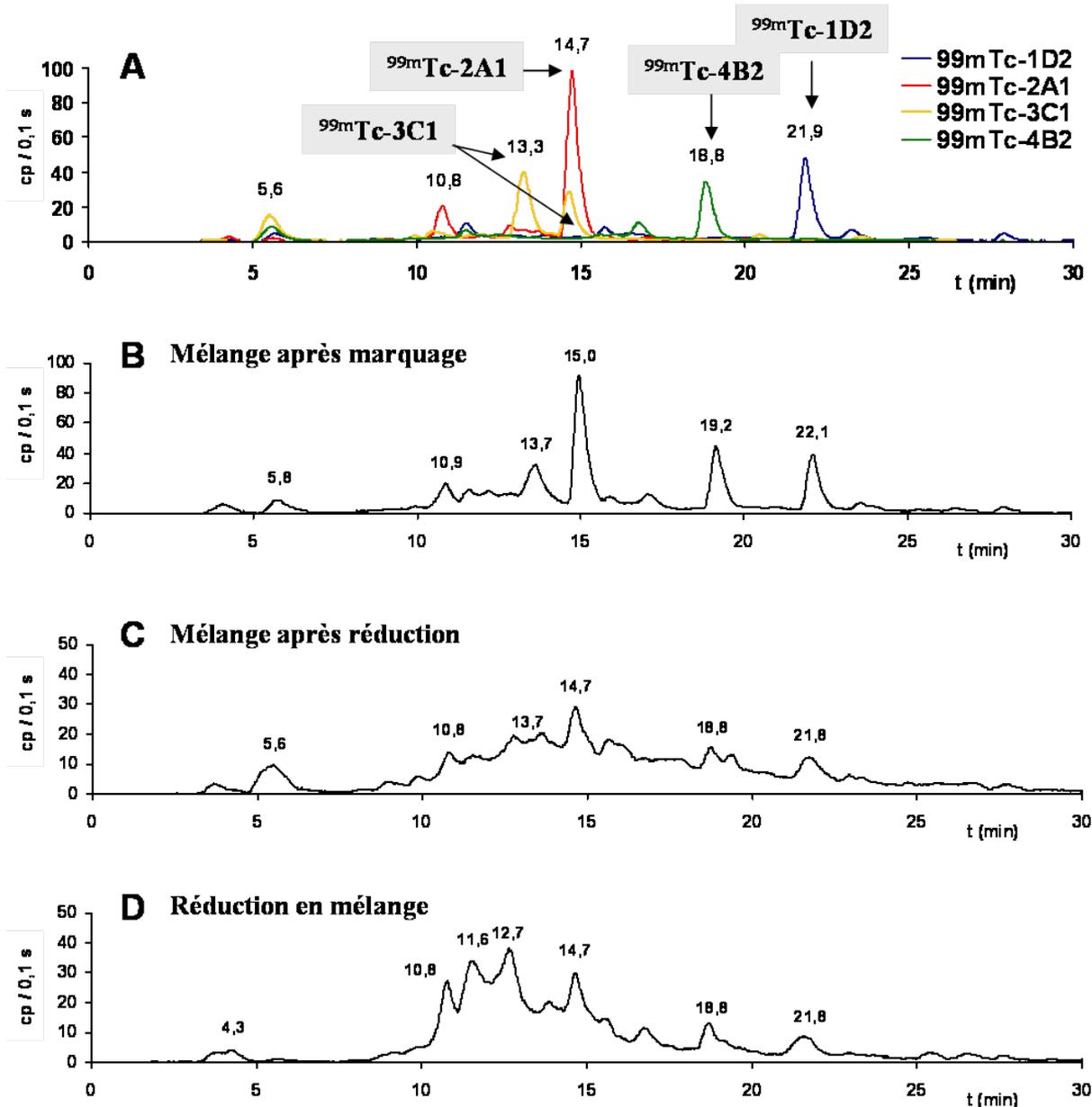


FIG. IV.38 – (A) Superposition des radiochromatogrammes des traceurs $1D2$, $2A1$, $3C1$ et $4B2$. (B) Analyse du mélange des 4 traceurs. (C) Analyse du milieu réactionnel de marquage après mélange des solutions de ligands réduits. (D) Analyse du milieu réactionnel de marquage de la solution de ligands réduits en mélange. HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection γ , gradient 15-30% B en 30 min.

(3-4 typiquement) ont été observés en ^{99m}Tc , sans pouvoir être attribués précisément. De plus, une partie du technétium n'est pas complexée, conduisant à une plus faible intensité des pics radio-HPLC par rapport aux composés à linker C_2 par exemple.

La difficulté à obtenir les complexes monocyclisés pourrait s'expliquer par la relative rigidité du cycle, imposée par l'orientation para du linker. En effet, le groupement aro-

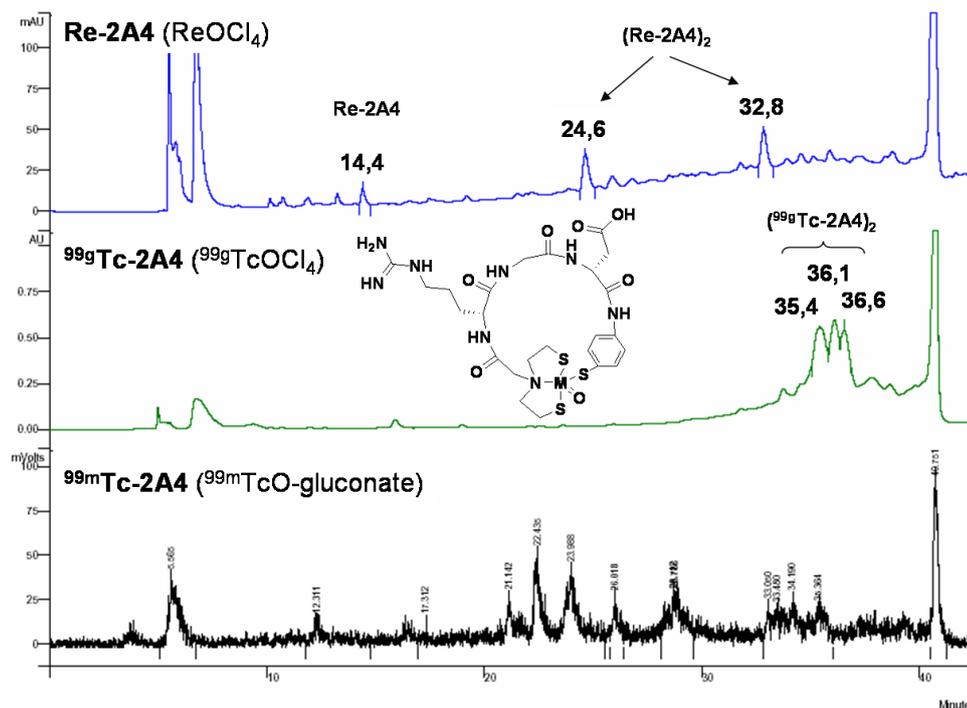


FIG. IV.39 – Chromatogrammes HPLC de *Re-2A4*, $^{99g}\text{Tc-2A4}$ et $^{99m}\text{Tc-2A4}$. HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection UV à 254 nm ou γ , gradient 15-30% B en 30 min.

matique est directement lié au motif $\text{NS}_2\text{-MO-S}$ ($\text{M} = \text{Re}$ ou Tc) qui est connu pour présenter une géométrie pyramidale à base carrée. On peut donc supposer que la présence du groupement *p*-4-aminothiophénol n'est pas favorable à la cyclisation du tripeptide. Au contraire, la formation d'un dimère permettrait de relaxer les contraintes de cycles et serait favorisée.

D'autre part, nous avons également été confrontés à des problèmes de stabilité de ces ligands à linker para (peptides non complexés) qui se dégradent après quelques mois de conservation à -20°C sous forme lyophilisée. Compte tenu de ces inconvénients, nous avons axé les études de stabilité sur les composés modèles en C_2 , C_3 et méta ($^{99m}\text{Tc-1A1}$, $^{99m}\text{Tc-2B2}$, et $^{99m}\text{Tc-4D3}$).

IV.5.2.d Détermination du coefficient de partition

Nous avons cherché à estimer le coefficient de partition eau-octanol des complexes cycliques marqués au ^{99m}Tc . Ce paramètre permet de déterminer les propriétés de lipophilie d'une molécule et ainsi d'anticiper certaines de ses propriétés comme la pénétration des membranes cellulaires, la liaison à des protéines circulantes et l'affinité pour des récepteurs. En imagerie, la lipophilie est souvent utilisée pour prédire la biodistribution des radiotracer et prévoir leur taux d'élimination des tissus non-ciblés [Wilson 01].

Le coefficient de partition P correspond au rapport des concentrations à l'équilibre d'une substance dissoute dans un système biphasique, constitué de deux solvants non-miscibles. Le plus souvent, le système eau-octanol est utilisé :

$$P = \frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{eau}}}$$

Ce coefficient est généralement exprimé sous la forme de son logarithme, $\log P$. Un $\log P$ élevé correspondra donc à une molécule lipophile.

Nous avons estimé le coefficient de partition des composés modèles ^{99m}Tc-**1A1**, ^{99m}Tc-**2B2**, et ^{99m}Tc-**4D3** par la méthode classique de "shake flask" en comptant la radioactivité présente dans les phases aqueuse et octanol. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV.6. Comme attendu, ils traduisent l'hydrophilie des traceurs, reflétant la présence des groupements carboxylate et guanidinium. Le composé ^{99m}Tc-**2B2** est logiquement plus lipophile que ^{99m}Tc-**1A1** puisque son linker comporte un groupe méthylène supplémentaire et que la glycine est remplacée par une β -alanine. De même, ^{99m}Tc-**4D3** est le plus lipophile des trois en raison de la présence du linker aromatique, d'une β -alanine et d'un glutamate.

Nous avons calculé la valeur théorique du $\log P$ et les résultats sont reportés dans le tableau IV.6 (calculs effectués sur le site www.molinspiration.com, selon une méthode d'addition des contributions de fragments et introduction de facteurs correctifs). Les valeurs expérimentales suivent l'ordre théorique, bien que le résultat obtenu pour ^{99m}Tc-**2B2** soit relativement éloigné de la prédiction.

TAB. IV.6 – *Mesure expérimentale et estimation de $\log P$ pour ^{99m}Tc-1A1, ^{99m}Tc-2B2 et ^{99m}Tc-4D3 ainsi que pour les ligands réduits.*

Complexe	$\log P$ mesuré	$\log P$ calculé	Ligand réduit	$\log P$ calculé
^{99m} Tc- 1A1	-2,5	-2,89	1A1	-2,37
^{99m} Tc- 2B2	-1,7	-2,86	2B2	-2,33
^{99m} Tc- 4D3	-1,4	-1,28	4D3	-0,75

Nous avons également tenté de déterminer le coefficient de partition des ligands réduits à titre de comparaison avec les complexes de technétium. Toutefois, les résultats obtenus sont difficilement exploitables. En effet, nous avons analysé par LC-MS les phases aqueuses, ainsi que des références de concentration connue, afin de déterminer la proportion de ligand dans les différentes phases. Cependant, nous avons mis en évidence la présence des ligands réduits, mais également de leurs formes oxydées monomériques ou dimériques. Dans ces conditions, il est difficile de conclure.

En comparant les valeurs théoriques calculées pour les ligands réduits et pour les complexes, on peut constater que la cyclisation par coordination du technétium conduit à une

augmentation de l'hydrophilie. L'introduction du cœur $\text{Tc}=\text{O}$ fortement polarisé ainsi que la coordination des groupements thiols pourraient en partie expliquer ce résultat.

IV.5.2.e Modélisation de $^{99m}\text{Tc-1A1}$

Comme nous l'avons mentionné dans la présentation de ce travail, nous ne disposions pas, au début de ce projet, de modèle prédictif fiable de la structure des complexes d'oxotechnétium, ce qui nous a conduit à adopter une démarche combinatoire à partir du tripeptide RGD. Récemment dans notre service, M. Masella a mis au point un modèle de solvant mésoscopique permettant d'effectuer des prédictions de structures de molécules comprenant un cœur oxotechnétium [Masella 08]. Des calculs ont alors été réalisés *ab initio* pour **Tc-1A1**. La simulation a été réalisée dans un champ de force polarisable [Masella 03], dans une boîte de solvant de $49,5 \times 49,5 \times 49,5$, avec une densité en eau de 1 g/L, soit environ 4000 pseudo-particules. La simulation a été effectuée sur 10 ns, à 300 K, sans autre contrainte appliquée au système.

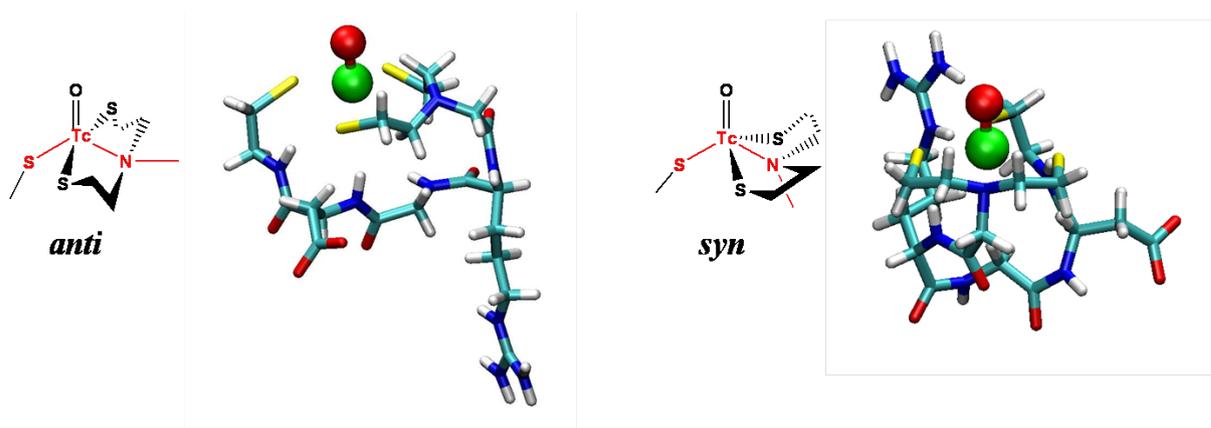


FIG. IV.40 – Structure de **Tc-1A1** obtenue pour les configurations *syn* et *anti* du cœur métallique.

Les modélisations ont été réalisées à partir des configurations *syn* et *anti* du cœur métallique. Les résultats obtenus sont présentés figure IV.40. Dans les deux cas, la structure du cycle est rigide et très contrainte, pouvant induire une instabilité de la molécule. Dans le cas de la configuration *anti*, l'arginine et l'acide aspartique sont tournés vers le solvant et la distance entre les $C\beta$ est de l'ordre de 6 à 7 Å durant l'ensemble de la simulation (Fig. IV.41), ce qui est proche de la valeur trouvée pour le c(RGDfV) (6,68 Å) [Haubner 96b]. Au contraire, dans le cas de la conformation *syn*, la distance est de l'ordre de 7 à 8 Å et la structure est complètement repliée. En effet, le groupement guanidinium de l'arginine semble interagir avec le cœur métallique, ce qui est un facteur supplémentaire d'instabilité, les autres liaisons de coordination pouvant se trouver affaiblies.

Ainsi, les résultats de la modélisation de **Tc-1A1** montrent que, en fonction de la confi-

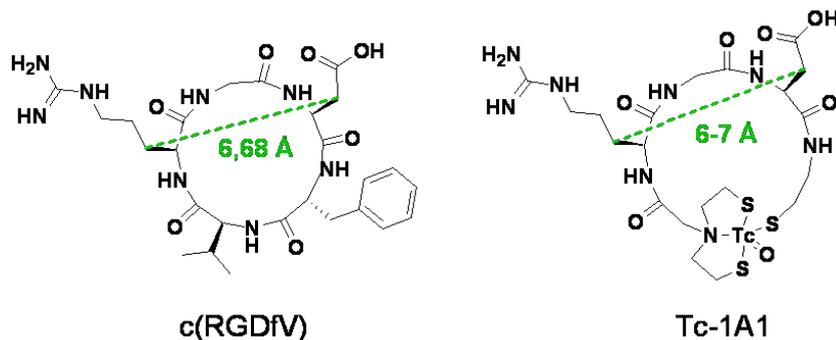


FIG. IV.41 – Distance entre les $C\beta$ de l'arginine et de l'acide aspartique du $c(RGDfV)$ et de $Tc-1A1$.

guration du motif $NS_2-TcO-S$, la structure de la séquence RGD peut être très différente. Dans le cas où la molécule est repliée, les groupements pharmacophoriques reconnus par l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ sont peu disponibles pour une interaction entre le complexe et sa cible. Ces résultats, obtenus avec du technétium, pourraient par extrapolation expliquer la différence d'affinité observée *in vitro* pour les isomères **aA** et **b** de **Re-1A1** si **a** est l'isomère *syn* et **b**, l'isomère *anti*. Toutefois, nous n'avons pas pu obtenir des quantités suffisantes de complexes rhénés qui auraient permis de déterminer leur structure exacte par leur cristallisation ou leur analyse par RMN.

IV.6 Etudes de stabilité des complexes marqués au ^{99m}Tc

IV.6.1 Stabilité au glutathion

La stabilité des traceurs $^{99m}Tc-1A1$, $^{99m}Tc-2A1$, $^{99m}Tc-3A1$, $^{99m}Tc-4A1$, $^{99m}Tc-2B2$ et $^{99m}Tc-4D3$ a été évaluée en milieu tamponné (HEPES 35 mM, pH 7,8) en présence de glutathion (GSH, 1 mM) comme pour les composés acycliques (III.4.1). Les ligands ont été marqués selon le mode opératoire **M1** ou **M2** (30 min à 50°C ou 15 min à 90°C respectivement) puis le glutathion réduit a été ajouté et l'ensemble a été laissé à température ambiante. Des aliquots ont été régulièrement prélevés et analysés par radio-HPLC. L'aire des pics correspondants aux complexes, corrigée de la décroissance, est rapportée en pourcentage par rapport à l'aire initiale (Fig. IV.42). La plupart des composés testés est stable en présence de GSH sur une période de 6 h.

Seul $^{99m}Tc-2B2$ présente une apparente instabilité puisque l'aire du pic du complexe ($t_R = 18,8$ min) tombe à 50% de sa valeur initiale sur la période étudiée. Toutefois, nous avons vu précédemment que, même avec le mode opératoire **M2**, le marquage de **2B2** conduit à un chromatogramme présentant un pic principal à 18,8 min et un massif entre 14,5 et 18,7 min (Fig. IV.43).

Nous avons donc évalué l'évolution de l'aire de ce massif et les résultats sont présentés

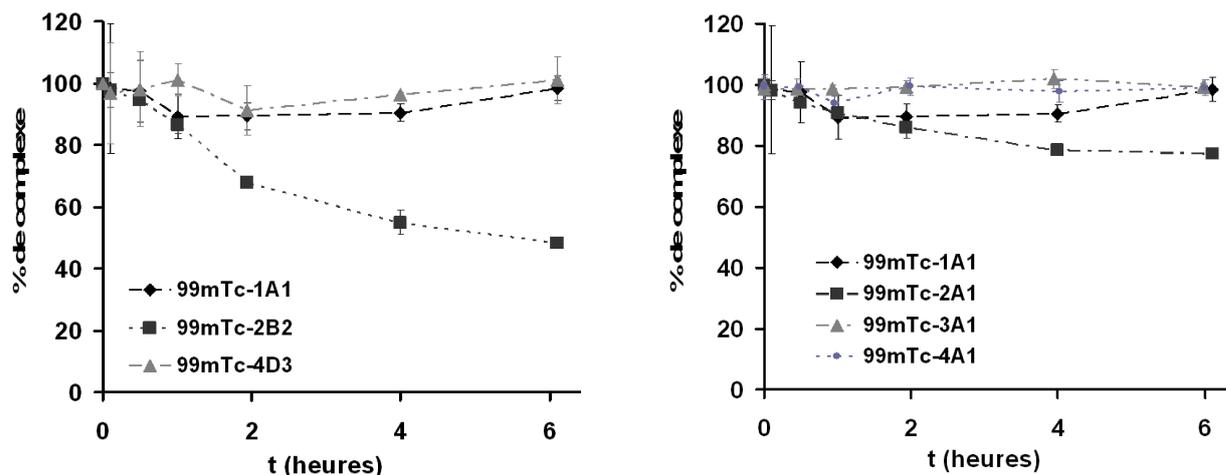


FIG. IV.42 – Etude de stabilité au GSH des composés $^{99m}\text{Tc-1A1}$, $^{99m}\text{Tc-2A1}$, $^{99m}\text{Tc-3A1}$, $^{99m}\text{Tc-4A1}$, $^{99m}\text{Tc-2B2}$ et $^{99m}\text{Tc-4D3}$ - évolution en fonction du temps du pourcentage de complexe restant par rapport à $t=0$.

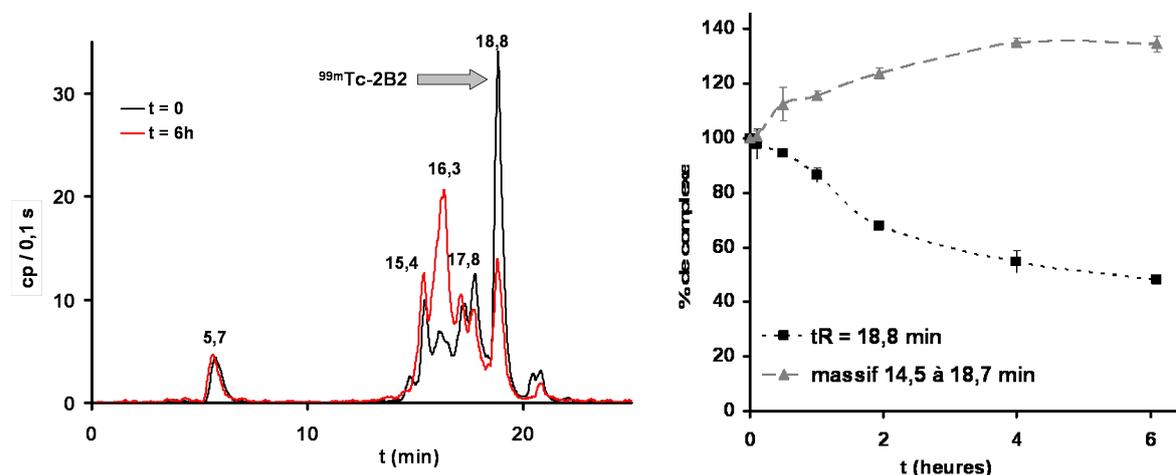


FIG. IV.43 – Etude de stabilité au GSH de $^{99m}\text{Tc-2B2}$. Radiochromatogrammes à $t = 0$ et 6 h , corrigés de la décroissance, et évolution au cours du temps de l'aire HPLC du pic à $18,8\text{ min}$ et du massif compris entre $14,5$ et $18,7\text{ min}$. HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.

dans le figure IV.43. L'augmentation de l'aire du massif est complémentaire de la disparition de complexe à $18,8\text{ min}$. La comparaison des radio-chromatogrammes a permis de mettre en évidence une évolution en faveur d'un composé à $t_R = 16,3\text{ min}$. Ce composé étant présent en l'absence de glutathion, nous avons supposé qu'il s'agit d'un isomère de $^{99m}\text{Tc-2B2}$ dont la formation pourrait avoir été favorisée par le GSH. En effet, le GSH pourrait former transitoirement un intermédiaire acyclique, en substituant le thiol du motif de complexation, qui conduit à une cyclisation préférentielle donnant l'autre isomère (Fig. IV.44). Ces résultats traduisent une complexation du ^{99m}Tc principalement sous contrôle cinétique et une action du GSH principalement sous contrôle thermodynamique qui conduit à l'isomère le plus stable [Clavaud 08].

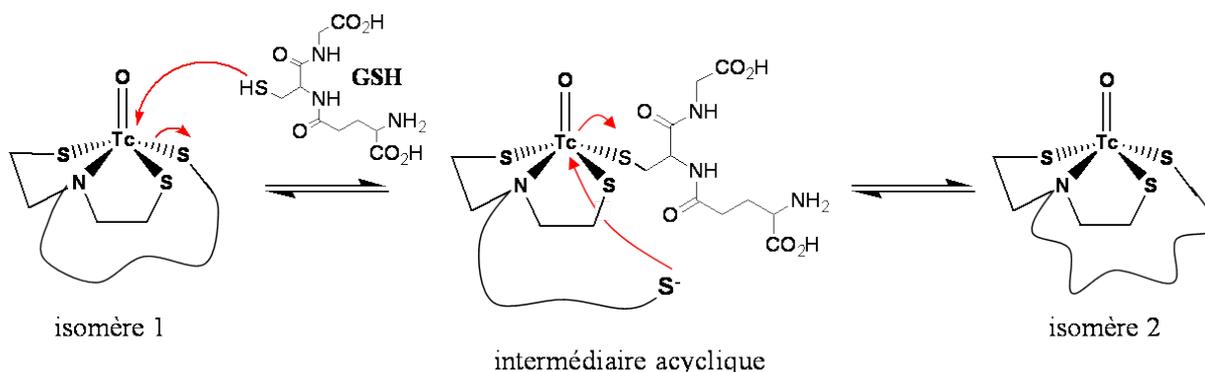


FIG. IV.44 – Proposition de mécanisme d'isomérisation en présence de GSH.

Cette hypothèse a également été avancée pour le composé $^{99m}Tc-2A1$ dont l'aire passe à 80% de sa valeur initiale après 6 h. En effet, les radio-chromatogrammes de ce composé présentent également un massif aux côtés du pic principal mais dans des proportions beaucoup plus faibles que pour $^{99m}Tc-2B2$.

Ainsi, l'ensemble des composés testés est stable au glutathion et dans certains cas, sa présence semble favoriser la formation d'isomères.

IV.6.2 Stabilité dans du plasma murin

La stabilité des traceurs $^{99m}Tc-1A1$, $^{99m}Tc-2A1$, $^{99m}Tc-3A1$, $^{99m}Tc-4A1$, $^{99m}Tc-2B2$ et $^{99m}Tc-4D3$ a été évaluée dans du plasma murin, dans les mêmes conditions que celles employées pour les complexes bimoléculaires. Les ligands ont été marqués selon le mode opératoire **M1** ou **M2**, puis la solution de complexe a été ajoutée au plasma, en proportion 1/5 en volume, avant d'incuber l'ensemble à 37°C. Les protéines présentes dans les aliquots prélevés ont été précipitées à l'aide de méthanol et le surnageant a été analysé par radio-HPLC. L'aire des pics correspondants aux complexes, corrigée de la décroissance, est rapportée en pourcentage par rapport à l'aire initiale (Fig. IV.45). Il s'avère que les composés de la série en linker C_2 (xA1) sont stables dans ces conditions puisqu'il en reste plus de 80% après 6 h.

Au contraire, l'aire des pics correspondants aux composés $^{99m}Tc-2B2$ et $^{99m}Tc-4D3$ diminue fortement au cours du temps pour atteindre 30 et 10% respectivement de leur valeur initiale. Notons qu'aucun produit n'apparaît sur les radiochromatogrammes et que les proportions des produits secondaires (Tc libre et isomères supposés) restent relativement stables au cours du temps (Fig. IV.46). L'interprétation de ces résultats s'est avérée délicate. En effet, pour les quatre composés en C_2 , l'aire totale des chromatogrammes HPLC, corrigée de la décroissance, reste constante au cours du temps, ce qui signifie qu'une même quantité de radioactivité est présente dans les surnageants injectés en HPLC (Fig. IV.47).

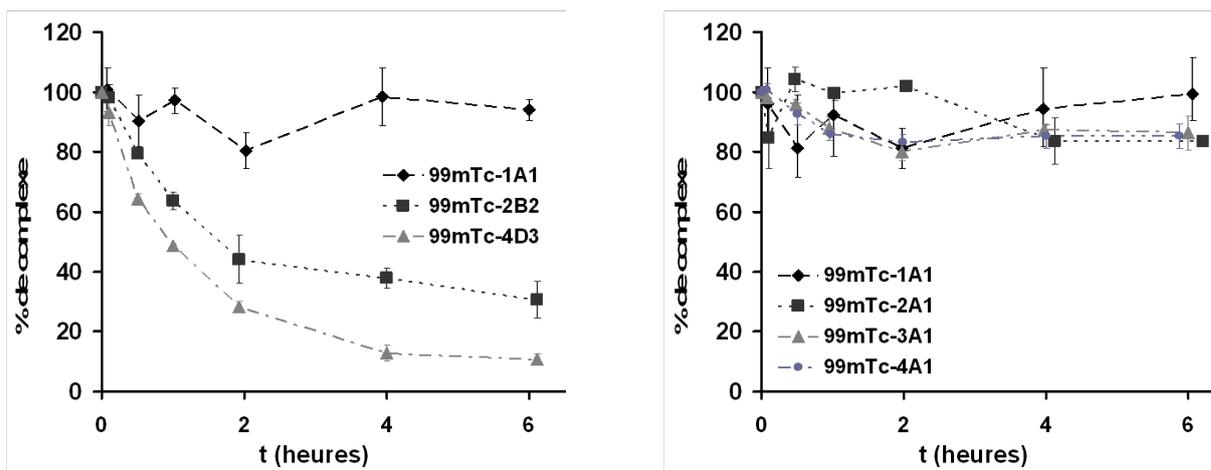


FIG. IV.45 – Etude de stabilité dans le plasma des composés $^{99m}\text{Tc-1A1}$, $^{99m}\text{Tc-2A1}$, $^{99m}\text{Tc-3A1}$, $^{99m}\text{Tc-4A1}$, $^{99m}\text{Tc-2B2}$ et $^{99m}\text{Tc-4D3}$ - évolution en fonction du temps du pourcentage de complexe restant par rapport à $t=0$.

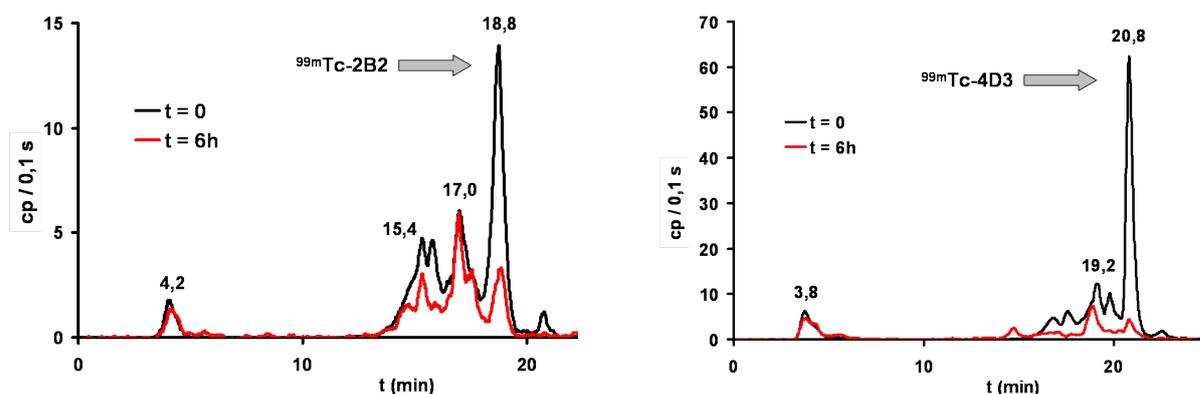


FIG. IV.46 – Etude de stabilité dans le plasma de $^{99m}\text{Tc-2B2}$ et $^{99m}\text{Tc-4D3}$: radiochromatogrammes à $t=0$ et 6h , corrigés de la décroissance. HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.

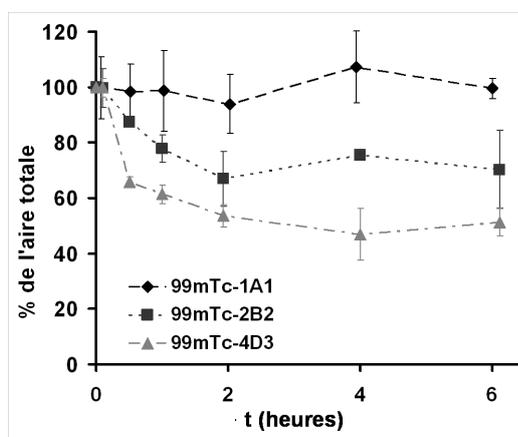


FIG. IV.47 – Evolution de l'aire totale des radio-chromatogrammes HPLC pour les composés $^{99m}\text{Tc-1A1}$, $^{99m}\text{Tc-2B2}$ et $^{99m}\text{Tc-4D3}$.

Ce n'est pas le cas pour $^{99m}Tc-2B2$ et $^{99m}Tc-4D3$. En effet, pour $^{99m}Tc-2B2$, l'aire totale diminue de 30% et pour $^{99m}Tc-4D3$, de 50%, sur la période étudiée. Dans tous les cas, nous avons mesuré la radioactivité présente dans les aliquots prélevés puis dans le surnageant injecté en HPLC (Tab. IV.7). On constate que pour $^{99m}Tc-1A1$, la proportion de radioactivité dans le surnageant varie peu alors qu'elle diminue de 30% pour $^{99m}Tc-2B2$ et de 60% pour $^{99m}Tc-4D3$. Ces variations correspondent à celles observées pour l'aire totale des chromatogrammes. Nous avons proposé deux hypothèses pour expliquer la diminution de la radioactivité dans les surnageants de $^{99m}Tc-2B2$ et $^{99m}Tc-4D3$. La première serait une adsorption des traceurs sur les protéines du plasma, entraînant le piégeage des composés lors de la précipitation au méthanol. Dans ce cas, nous devons envisager qu'*in vivo* ces traceurs ne seront peut être pas relargués des protéines du plasma et donc qu'ils ne seront pas disponibles pour imager la tumeur. La seconde hypothèse proposée est celle d'une dissociation partielle des traceurs par les protéines du plasma. Des thiols présents à leur surface pourraient, par exemple, substituer le thiol du motif de complexation et ainsi ouvrir le complexe, ce sans conduire au relargage de technétium libre.

TAB. IV.7 – Proportion de radioactivité dans le surnageant de $^{99m}Tc-1A1$, $^{99m}Tc-2B2$ et $^{99m}Tc-4D3$ par rapport à l'activité totale de l'aliquot.

temps (h)	Surnageant $^{99m}Tc-1A1$ (%)	Surnageant $^{99m}Tc-2B2$ (%)	Surnageant $^{99m}Tc-4D3$ (%)
0,2	63	76	51
0,5	68,5	70,5	38,5
1	65	65	37
2	59,5	60	26
4	57	55	21
6	55	53,5	20

Deux des traceurs testés pour leur stabilité dans le plasma présentent donc un comportement problématique et semblent piégés par les protéines du plasma. Les quatre autres composés sont stables. Compte tenu de ces différences, on voit ici l'intérêt d'un criblage *in vivo* de cette chimiothèque de traceurs, qui permettrait d'éliminer directement les composés interagissant avec les protéines du plasma.

IV.7 Evaluation *in vivo* des complexes cycliques

IV.7.1 Criblage de 12 complexes par souris

IV.7.1.a Principe

Le principe du screening *in vivo* repose sur l'injection d'un mélange de produits à un animal portant un modèle tumoral, puis de déterminer quels produits se sont concentrés préférentiellement dans la tumeur. Le choix du nombre de composés testés par animal est délicat. En effet, pour les traceurs optimisés, injectés à l'unité, la radioactivité retrouvée dans la tumeur chez des modèles murins ne dépasse généralement pas 1 à 2% de la dose injectée. Cette proportion risquait donc d'être largement inférieure dans le cas d'un mélange contenant au moins un produit actif, la radioactivité totale étant divisée par le nombre de produits marqués. Au début de ce projet, nous avons testé cette approche avec l'injection de mélanges de 12 traceurs par souris. Malgré les difficultés rencontrées pour le marquage des ligands à linker para, nous avons décidé de les inclure dans ce premier test.

Nous avons donc testé 12 produits par souris, avec deux animaux par test, sacrifiées 1 ou 3 h après injection. Chaque mélange contient 4 traceurs à linker C₂, 4 méta et 4 para, choisis de manière à éviter les superpositions de pics en radio-HPLC, les composés à linker C₃ n'étant pas encore disponibles lors de ces premiers essais (Tab. IV.8).

TAB. IV.8 – Mélanges de 12 traceurs testés *in vivo*.

Mélange	C ₂	m	p	Mélange	C ₂	m	p
a	1A1	1A3	1A4	c	3A1	3A3	3A4
	1B1	1B3	1B4		3B1	3B3	3B4
	1C1	1C3	1C4		3C1	3C3	3C4
	1D1	1D3	1D4		3D1	3D3	3D4
b	2A1	2A3	2A4	d	4A1	4A3	4A4
	2B1	2B3	2B4		4B1	4B3	4B4
	2C1	2C3	2C4		4C1	4C3	4C4
	2D1	2D3	2D4		4D1	4D3	4D4

Rappelons une nouvelle fois que ces tests ont été réalisés antérieurement aux expériences de liaison *in vitro* et que, par conséquent, le choix des traceurs n'a pas été influencé par ces résultats qui nous auraient sans aucun doute conduits à privilégier certaines séries.

IV.7.1.b Protocole de marquage au ^{99m}Tc et screening

Les conditions de marquage **M1** ont été adaptées afin de réduire le temps de préparation des complexes et de pouvoir réaliser le criblage, suivi de l'analyse des extraits

de tumeurs, dans des temps compatibles avec la période de décroissance du ^{99m}Tc . En effet, dans le protocole **M1**, la réduction des ligands était suivie de l'évaporation sous flux d'argon du solvant de réaction (MeOH) puis de la dilution dans du tampon HEPES (35 mM, pH 7,8). Cette étape est assez longue et les composés aromatiques posent des problèmes de solubilité dans le tampon. Pour ce test *in vivo*, nous avons réalisé la réduction puis nous avons directement dilué le milieu réactionnel dans du tampon. Dans ce cas, la concentration finale en méthanol dans la solution de traceur est de 0,6%. Bien que cette proportion soit faible, nous avons choisi de remplacer le méthanol par de l'éthanol, moins cytotoxique. Enfin, il est plus usuel d'utiliser du tampon PBS (pH 7,4) pour les injections *in vivo*, le milieu réactionnel a donc directement été dilué dans ce tampon. Les traceurs formés selon ce nouveau protocole **M3** ont donné des radio-chromatogrammes semblables à ceux obtenus avec le mode opératoire **M1**.

Chaque ligand a été marqué séparément avant de réaliser le mélange de traceurs. Nous avons observé que les intensités relatives des pics obtenus en radio-HPLC pour les séries de ligands à linker C_2 , méta ou para, sont de l'ordre de 4/2/1 respectivement. Nous avons donc réalisé les mélanges de 12 complexes en introduisant les ligands en proportions 1/2/4 pour $C_2/m/p$ afin de compenser les différences de cinétique de complexation. Ainsi, les mélanges contiennent des quantités de radioactivité similaires pour chacun des produits. Les mélanges **a**, **b**, **c** et **d** ont été analysés par radio-HPLC, de même que chacune des solutions de complexes. Les ligands à linker en C_2 et méta ont été correctement marqués, ceux en para présentent, comme précédemment, plusieurs pics sur les radiochromatogrammes. Les mélanges présentent des pics relativement bien séparés, correspondant aux temps de rétention attendus.

Les solutions de mélanges de 12 traceurs (volume total : 100 μ L) ont été injectées aux souris ayant développé une tumeur U87-MG. Après 1 ou 3 h, les animaux ont été sacrifiés par décervication et les tumeurs prélevées et comptées. Elles ont ensuite été extraites dans un mélange MeOH/PBS 8/2 et le surnageant analysé en radio-HPLC. La proportion de radioactivité dans le surnageant par rapport à l'activité totale présente dans la tumeur est de l'ordre de 60%.

IV.7.1.c Résultats

Les doses injectées sont comprises entre 20 et 26 MBq par mélange et l'activité des tumeurs, corrigée du bruit de fond et de la décroissance représente 0,15 à 0,24% de la dose injectée (Tab. IV.9). Pour des raisons de radioprotection, il ne nous a pas été possible de déterminer la masse de chaque tumeur afin de pouvoir calculer le pourcentage de la dose injectée par gramme de tumeur (%ID/g). Nous avons utilisé une masse moyenne de 34 mg, calculée à partir d'un échantillon de 15 tumeurs, prélevées sur des souris en vue d'études

ex vivo et dont les masses étaient comprises entre 18 mg et 59 mg. Cette valeur nous a permis d'estimer les %ID/g (Tab. IV.9). Les résultats obtenus sont comparables aux valeurs présentées dans la littérature pour des composés technétiés ciblant les intégrines.

TAB. IV.9 – Doses injectées, activités des tumeurs corrigées du bruit de fond puis de la décroissance, pourcentage de la dose injectée (%ID : injected dose) et estimation de %ID/g de tumeur.

Mélange (temps écoulé)	Activité injectée (MBq)	Activité tumeur (MBq)	%ID	%ID/g
a (1 h)	26,0	0,061	0,24	6,9
a (3 h)	21,4	0,052	0,24	7,1
b (1 h)	25,9	0,030	0,12	3,4
b (3 h)	25,7	0,037	0,15	4,3
c (1 h)	20,3	0,037	0,18	5,3
c (3 h)	20,1	0,038	0,19	5,5
d (1 h)	21,5	0,042	0,20	5,8
d (3 h)	21,3	0,026	0,12	3,6

L'analyse radio-HPLC des extraits de tumeurs n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'un des composés des mélanges testés. Dans tous les cas, seul du technétium libre a été observé, sous forme réduite ou non. Trois hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Tout d'abord, il est possible que les traceurs testés ne soient pas de bons ligands de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ et donc ne ciblent pas la tumeur et ne s'y accumulent pas, ce qui semble confirmé par les tests de liaison dans la plupart des cas. On remarquera toutefois que la mélange **a**, qui conduit à un %ID/g maximal (de 6,9 à 7,1%), contient le composé $^{99m}\text{Tc-1A1}$ qui possède une bonne affinité pour $\alpha_V\beta_3$ sous sa forme rhénée. Par ailleurs, si on calcule l'activité théoriquement injectée par produit, on trouve des valeurs relativement faibles : $\sim 0,8$ MBq pour les ligands à linker C_2 , $\sim 1,6$ MBq pour les méta et $\sim 3,3$ MBq pour les para. Ainsi, même si les traceurs s'accumulent dans la tumeur, leur activité pourrait être trop faible pour être détectée par radio-HPLC. Enfin, il est tout à fait possible que les traceurs aient pu être en partie dégradés lors de l'étape d'extraction, relargant du technétium libre sous forme réduite ou de TcO_4^- .

Il faut toutefois relativiser les valeurs de %ID/g puisqu'elles sont établies à partir d'une masse de tumeur moyenne et non au cas par cas. En revanche, on remarquera que les %ID sont maximales et stables sur 3 h pour les mélanges **a** et **c** qui contiennent chacun un produit *a priori* actif, équivalent technétié de **Re-1A1** (mélange **a**) et de **Re-3C1** (mélange **c**).

IV.7.2 Criblage de 4 complexes par souris

IV.7.2.a Principe

Suite aux premiers tests *in vivo*, nous avons souhaité tester un nombre plus restreint de composés par animal pour disposer d'une activité plus importante par traceur. Nous avons choisi de réaliser des mélanges de 4 complexes. Lors de ce test, nous avons à disposition l'ensemble des 64 ligands de la chimiothèque. De plus, nous avons montré que les composés à linker para se forment difficilement et que les intensités des pics HPLC obtenus pour les composés à linker méta étaient moins importantes que pour les C₂ et C₃. Nous nous sommes donc limités cette fois aux complexes à linker C₂ et C₃. Les mélanges ont été réalisés de telle sorte qu'un représentant de chaque combinaison d'analogue de la séquence RGD soit représenté et puisse être identifié par HPLC :

TAB. IV.10 – Mélanges de 4 traceurs testés *in vivo*.

Mélange	C ₂		C ₃	
e	1A1 (RGD)	2B1 (rβd)	3C2 (RGe)	4D2 (rβE)
f	1B1 (RβD)	2C1 (rGe)	3D2 (Rβe)	4A2 (rGD)
g	1C1 (RGE)	2D1 (rβe)	3A2 (RGd)	4B2 (rβD)
h	1D1 (RβE)	2A1 (rGd)	3B2 (Rβd)	4C2 (rGE)
i	3A1 (RGd)	4B1 (rβd)	4C2 (RGe)	4D2 (rβE)
j	3B1 (Rβd)	4C1 (rGe)	4D2 (Rβe)	4A2 (rGD)
k	3C1 (RGe)	4D1 (rβe)	4A2 (RGd)	4B2 (rβD)
l	3D1 (Rβe)	4A1 (rGd)	4B2 (Rβd)	4C2 (rGE)

IV.7.2.b Protocole de marquage au ^{99m}Tc et screening

Afin d'écourter la phase de préparation des traceurs, nous avons vérifié que les solutions de ligands réduits pouvaient être utilisées jusqu'à trois jours après réduction. Dans ce test, nous les avons préparées la veille, avec une réduction dans le méthanol, suivie de l'évaporation du solvant et reprise dans du tampon PBS, pour donner des solutions 500 μM. Le marquage a été réalisé avec une incubation de 15 min à 90°C pour chaque traceur (protocole M4), puis les mélanges ont été préparés (4 × 30 μL). Les mélanges **e**, **f**, **g**, **h**, **i**, **j**, **k** et **l** ont été analysés par radio-HPLC et les pics correspondant aux traceurs ont été observés. Dans certains cas, seuls trois pics sont présents, suggérant que 2 produits présentaient le même temps de rétention dans ces conditions.

Les solutions de 4 traceurs (100 μL) ont été injectées aux souris ayant développé une tumeur U87-MG. Les animaux ont été sacrifiés après 1,5 h par décervication et les tumeurs prélevées et comptées. Elles ont ensuite été extraites dans un mélange MeOH/PBS 8/2 et le surnageant analysé en radio-HPLC. La proportion de radioactivité dans le surnageant

par rapport à l'activité totale de la tumeur est, comme précédemment, de l'ordre de 60%.

IV.7.2.c Résultats

Les doses injectées sont comprises entre 28 et 46 MBq par mélange et l'activité des tumeurs, corrigée du bruit de fond et de la décroissance représente 0,06 à 0,10% de la dose injectée (Tab. IV.11). Comme précédemment, nous avons estimé le pourcentage de la dose injectée par gramme de tumeur (%ID/g) en utilisant une masse moyenne de 34 mg (Tab. IV.11). Les valeurs obtenues sont plus faibles que dans les tests précédents.

TAB. IV.11 – Doses injectées, activités des tumeurs corrigées du bruit de fond puis de la décroissance, pourcentage de la dose injectée (%ID : injected dose) et estimation de %ID/g de tumeur.

Mélange	Activité injectée (MBq)	Activité tumeur (MBq)	%ID	%ID/g
e	39,1	0,032	0,08	2,4
f	43,4	0,038	0,09	2,6
g	44,5	0,026	0,06	1,7
h	45,7	0,031	0,07	2,0
i	28,8	0,024	0,08	2,5
j	32,0	0,033	0,10	3,0
k	33,2	0,021	0,06	1,9
l	32,6	0,025	0,08	2,3

L'analyse radio-HPLC des extraits de tumeurs n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'un des composés des mélanges testés. Dans tous les cas, seul du technétium libre réduit a été observé. De nouveau, ces résultats décevants peuvent être expliqués par la dégradation des complexes lors de l'extraction, notamment dans le cas du mélange e qui contient ^{99m}Tc-1A1. Il est difficile de se prononcer en ce qui concerne les autres mélanges, mais nous avons voulu tester cette hypothèse en menant des tests de stabilité en homogénat de tumeurs.

IV.7.3 Stabilité dans l'homogénat de tumeur

Compte tenu des premiers résultats *in vivo*, nous avons souhaité étudier la stabilité des traceurs lors de l'étape d'extraction des tumeurs. Nous avons déjà mentionné que l'étape d'extraction peut conduire au relargage de glutathion par lyse des cellules, mais nous avons montré précédemment que les complexes cycliques semblent plutôt stables au GSH. Toutefois, l'homogénat de tumeur est un milieu complexe dans lequel diverses molécules sont présentes et peuvent influencer sur la stabilité des traceurs. Nous avons donc

étudié la stabilité de composés modèles ($^{99m}Tc-1A1$, $^{99m}Tc-2B2$ et $^{99m}Tc-4D3$) dans de l'extrait de tumeur. Afin de se rapprocher des conditions rencontrées *in vivo*, nous avons incubé les complexes dans de l'homogénat de tumeur à 37°C pendant 30 min. Les radio-chromatogrammes obtenus pour $^{99m}Tc-1A1$ et $^{99m}Tc-2B2$ sont présentés dans la figure IV.48. L'ensemble des résultats obtenus pour $^{99m}Tc-4D3$ est identique à ceux de $^{99m}Tc-1A1$.

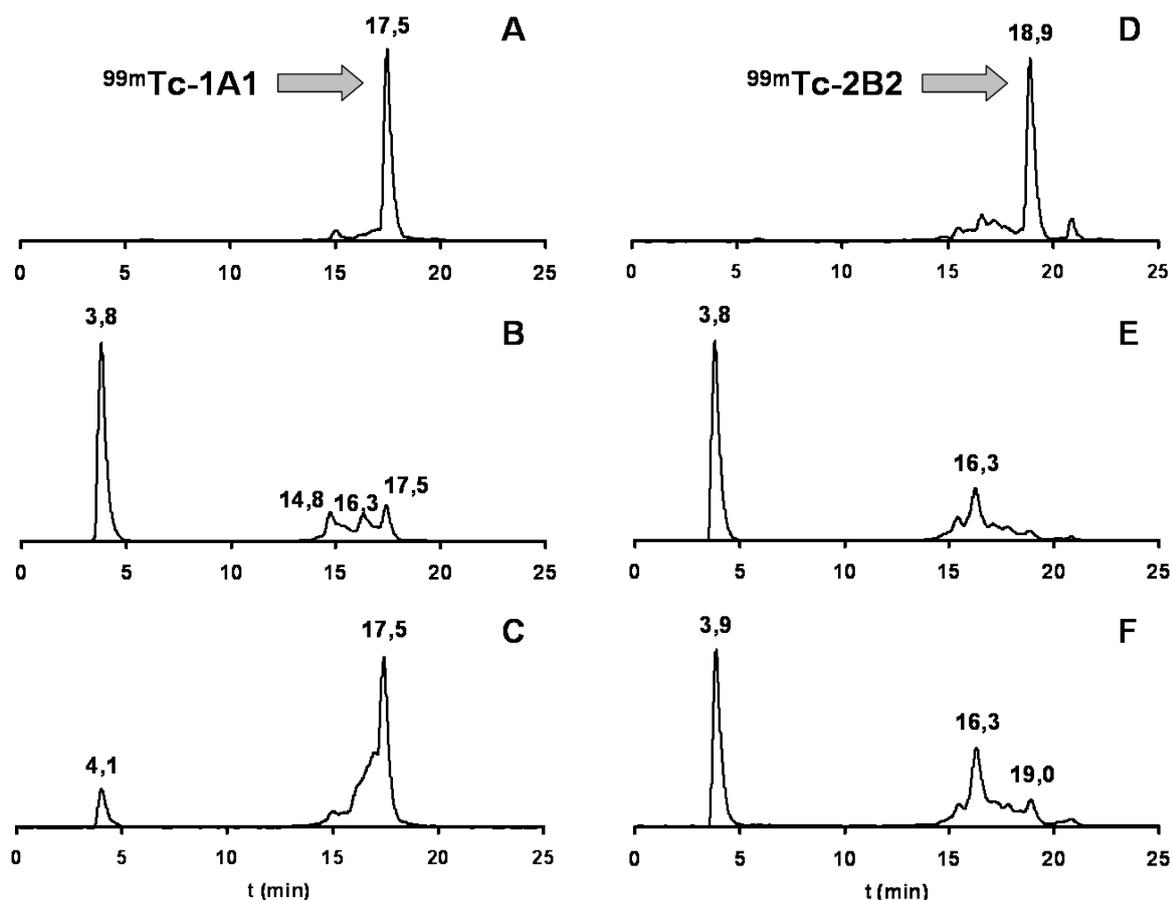


FIG. IV.48 – *Etudes de stabilité en homogénat de tumeur : radiochromatogrammes de $^{99m}Tc-1A1$ et $^{99m}Tc-2B2$ seuls (A et D) et après incubation 30 min à 37°C dans de l'homogénat de tumeur sans (B et E) et avec (C et F) inhibiteurs de protéases. HPLC Varian, colonne C18 analytique Varian, détection γ , gradient 0-100% B en 30 min.*

La comparaison entre les chromatogrammes obtenus pour les traceurs seuls (A et D) et après incubation dans de l'homogénat de tumeur (B et E) montre clairement une dégradation des complexes avec libération de technétium libre réduit. Il est connu que les peptides cycliques sont plus résistants aux protéases que les peptides linéaires [Ovchinnikov 75]. Toutefois dans notre cas, les ligands tripeptidiques sont cyclisés par la coordination d'un cœur oxotechnétium et le comportement de telles entités vis-à-vis des protéases est peu documenté [Albrecht 05].

Nous avons réalisé un test de sensibilité à la trypsine sur le ligand linéaire **1A1**, ainsi que sur le complexe **Re-1A1**. En effet, la trypsine est une protéase qui peut hydrolyser des peptides au niveau d'une liaison K-X ou R-X, avec X un acide aminé quelconque. Nous avons donc incubé **1A1** et **Re-1A1** avec de la trypsine dans du tampon HEPES (35 mM, pH 8,6) et les solutions ont été analysées par LC-MS (chromatogrammes dans la partie expérimentale). Le peptide linéaire est hydrolysé pour une concentration de 1% molaire en protéase. Au contraire, le complexe **Re-1A1** résiste jusqu'à une concentration de 10% molaire. Ces résultats reflètent une bonne résistance du complexe à la trypsine, probablement liée à la conformation contrainte du peptide.

Ainsi, lors du test en homogénat de tumeur, on peut imaginer que le complexe cyclique est ouvert par des thiols libres présents dans l'homogénat de tumeurs et que le ligand est ensuite dégradé par les protéases présentes dans le milieu, par exemple via une coupure de type trypsique (Fig. IV.49). L'hypothèse inverse, qui consisterait en l'ouverture du complexe cyclique par une coupure trypsique, conduisant à un complexe bimoléculaire qui serait dissocié par des thiols libres, semble plus improbable. Cependant, cette hypothèse ne peut être totalement exclue dans la mesure où de nombreuses protéases, hormis la trypsine, peuvent être reluguées au cours de l'extraction.

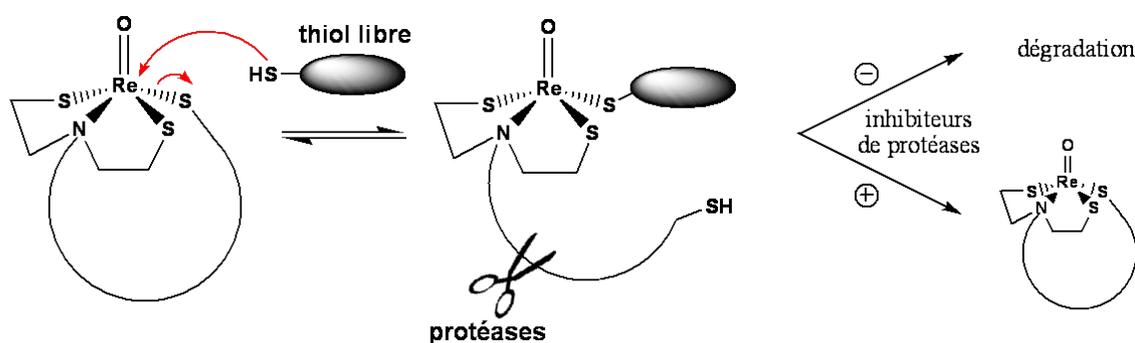


FIG. IV.49 – Proposition de mécanisme de dégradation en homogénat de tumeur.

Afin de limiter la dégradation en homogénat de tumeurs, nous avons ajouté un mélange d'inhibiteurs de protéase, sans chélatants de métaux, durant l'incubation des traceurs. Dans le cas de $^{99m}\text{Tc-1A1}$ et de $^{99m}\text{Tc-4D3}$, la présence d'inhibiteurs de protéases permet de conserver la majorité du traceur (Fig. IV.48 C). Au contraire, pour $^{99m}\text{Tc-2B2}$, le pic du complexe à 18,8 min disparaît comme dans le premier cas (Fig. IV.48 F). Pourtant, il semble que la proportion du composé de $t_R = 16,3$ min soit plus importante en présence d'inhibiteurs de protéases. Nous avons vu dans l'étude de stabilité au GSH que ce composé se formait aux dépens du complexe à 18,8 min et nous avons proposé qu'il pouvait s'agir d'un isomère de $^{99m}\text{Tc-2B2}$. Il est cependant difficile de conclure de manière définitive sur cette isomérisation catalysée par les protéases ou le GSH, plutôt que sur une simple

dissociation du complexe qui s'accompagnerait de la formation de produits secondaires technétiés.

Ainsi, il semble que l'addition d'inhibiteurs de protéases permette, dans certains cas, de protéger les traceurs dans l'extrait de tumeur. Le protocole d'extraction des tumeurs, lors des études *in vivo*, a donc été modifié pour tenir compte de ces résultats. Il est prévu, à cours terme, de tester $^{99m}Tc-1A1$ seul afin de statuer définitivement sur son efficacité réelle en tant que traceur. En effet, on ne peut exclure une éventuelle dégradation par des protéases avant l'étape d'extraction, alors que le traceur est dans le milieu circulant ou concentré au niveau de la tumeur.

IV.7.4 Etude de biodistribution

IV.7.4.a Principe

Afin d'évaluer le comportement *in vivo* des traceurs cycliques, nous avons réalisé une étude de biodistribution sur quatre complexes. Le choix des traceurs a été basé sur le test précédent de 4 composés en mélange. Nous avons choisi de déconvoluer le mélange présentant le meilleur %ID dans la tumeur, c'est-à-dire **j**, avec $^{99m}Tc-3B1$, $^{99m}Tc-4C1$ et $^{99m}Tc-1D2$ et $^{99m}Tc-2A2$ (Fig IV.50). En effet, lors de ce choix, nous n'avions pas encore les résultats des tests de liaison *in vitro* obtenus avec **Re-1A1**.

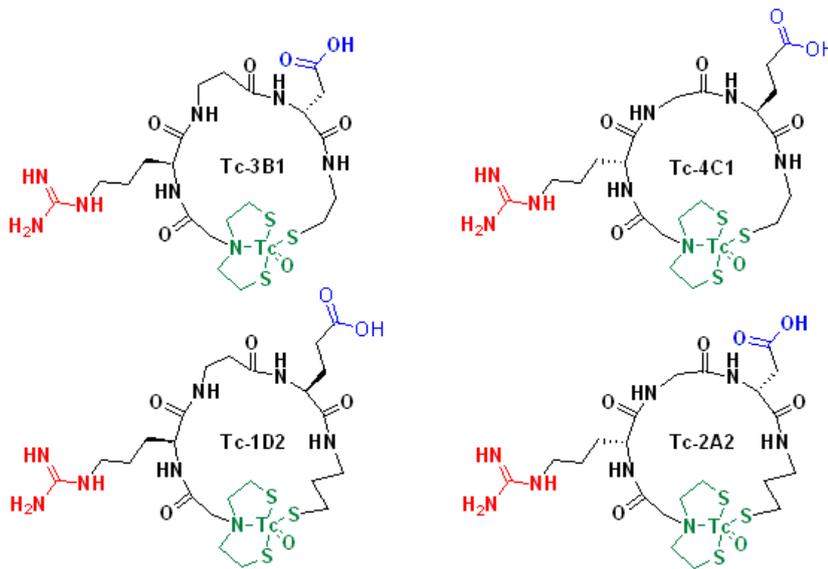


FIG. IV.50 – Structure des complexes $^{99m}Tc-3B1$, $^{99m}Tc-4C1$ et $^{99m}Tc-1D2$ et $^{99m}Tc-2A2$.

Les traceurs ont été synthétisés selon le protocole de marquage M4, puis 100 μ L de solution de traceurs ont été injectés à des souris ayant développé une tumeur U87-MG. Les animaux ont été anesthésiés après 1,5 h, puis les urines et le sang ont été prélevés,

suivis du pancréas, de la rate, des reins, du cœur, des poumons et du foie. Tous les organes ont été comptés puis congelés. Ils ont été pesés après 20 périodes radioactives (5 jours). La tumeur a été prélevée sans délai, comptée, extraite en présence d'inhibiteurs de protéases et analysée comme précédemment.

IV.7.4.b Résultats

Les radio-chromatogrammes des extraits de tumeur ne présentent que le signal du technétium libre réduit. Ainsi, même en présence d'inhibiteurs de protéases, les traceurs injectés n'ont pas pu être mis en évidence dans la tumeur. Compte tenu du faible nombre de produits testés ici, il est difficile de savoir si c'est l'étape d'extraction qui est rédibitoire ou si les traceurs choisis ne présentent pas une bonne affinité pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ et ne sont pas retenus dans la tumeur.

D'autre part, le pourcentage de la dose injectée retrouvé dans les tumeurs est relativement faible par rapport à ce qui a été observé dans les autres tests (Tab. IV.12) alors que l'activité injectée par produit est ici plus importante. L'analyse de ce résultat est assez délicate, mais on peut suggérer qu'il y ait eu un effet additif plus ou moins spécifique des différents produits dans le cas des injections des mélanges de traceurs. On peut également imaginer une dégradation plus rapide des traceurs dans le cas des mélanges et, par conséquent, une entrée plus importante de TcO_4^- dans les tumeurs.

TAB. IV.12 – Doses injectées, activités des tumeurs corrigées du bruit de fond puis de la décroissance, pourcentage de la dose injectée (%ID : injected dose) et estimation de %ID/g de tumeur.

Mélange	Activité injectée (MBq)	Activité tumeur (MBq)	%ID	%ID/g
$^{99m}\text{Tc-3B1}$	36,0	0,010	0,03	0,8
$^{99m}\text{Tc-4C1}$	33,0	0,017	0,05	1,5
$^{99m}\text{Tc-1D2}$	29,3	0,012	0,04	1,2
$^{99m}\text{Tc-2A2}$	26,4	0,008	0,03	0,9

Les résultats de biodistribution sont pour leur part assez satisfaisants (Tab. IV.13 et Fig. IV.51). L'activité des urines est très élevée (40 à 85 %ID/mL) et relativement importante dans les reins (4 à 11 %ID/g), confirmant une élimination rénale prédominante des traceurs. Notons que pour $^{99m}\text{Tc-4C1}$, les urines n'ont pas pu être entièrement récupérées pour cette souris, ce qui pourrait expliquer la plus faible valeur obtenue. L'élimination hépatique varie selon les produits mais semble limitée. Les pourcentages de la dose injectée, calculés pour les autres organes, sont faibles, traduisant une fixation non spécifique faible sur les organes sains.

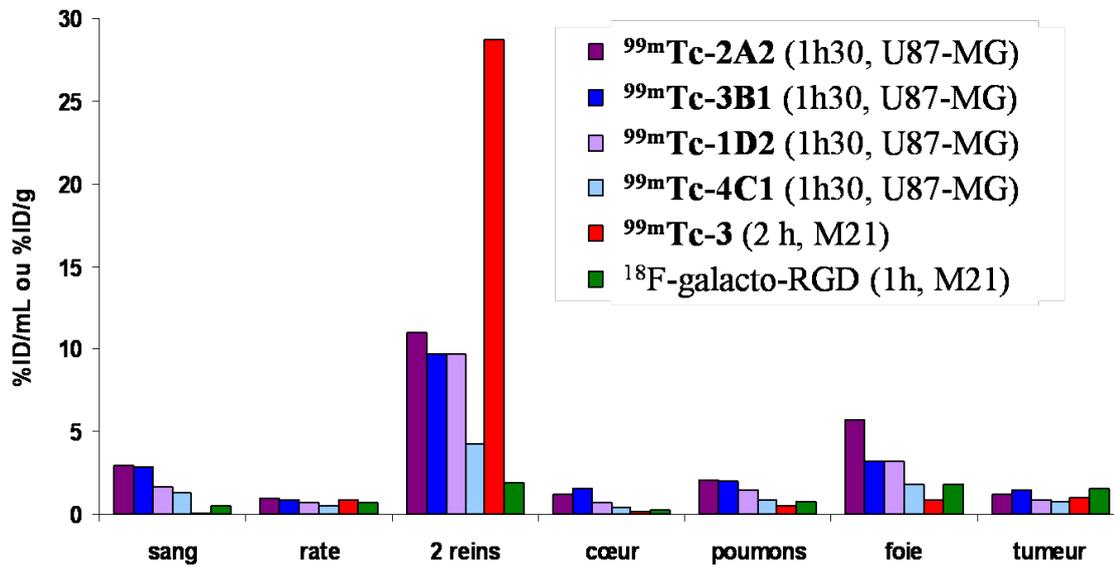


FIG. IV.51 – Données de biodistribution, 1,5 h après injection des traceurs $^{99m}Tc-3B1$, $^{99m}Tc-4C1$ et $^{99m}Tc-1D2$ et $^{99m}Tc-2A2$, rapportées en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe (%ID/g) ou par mL pour le sang (%ID/mL). Comparaison avec les données sur M21 de $^3-^{99m}Tc$ après 2 h et de ^{18}F -galacto-RGD après 1 h [Haubner 04a, Haubner 01b].

TAB. IV.13 – Données de biodistribution, 1,5 h après injection des différents traceurs, rapportées en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe (%ID/g) ou par mL pour le sang et les urines (%ID/mL). Pour les tumeurs, une masse moyenne de 34 mg a été utilisée pour estimer le %ID/g.

Organe	$^{99m}Tc-4C1$	$^{99m}Tc-3B1$	$^{99m}Tc-2A2$	$^{99m}Tc-1D2$
urine	39,6	84,9	70,1	62,2
sang	1,29	2,89	2,96	1,64
pancréas	0,26	0,60	0,48	0,44
rate	0,49	0,84	0,93	0,72
reins	4,21	9,64	10,9	9,66
cœur	0,47	1,53	1,21	0,69
poumons	0,90	1,99	2,11	1,43
foie	1,79	3,17	5,69	3,22
tumeur	0,80	1,50	1,20	0,90

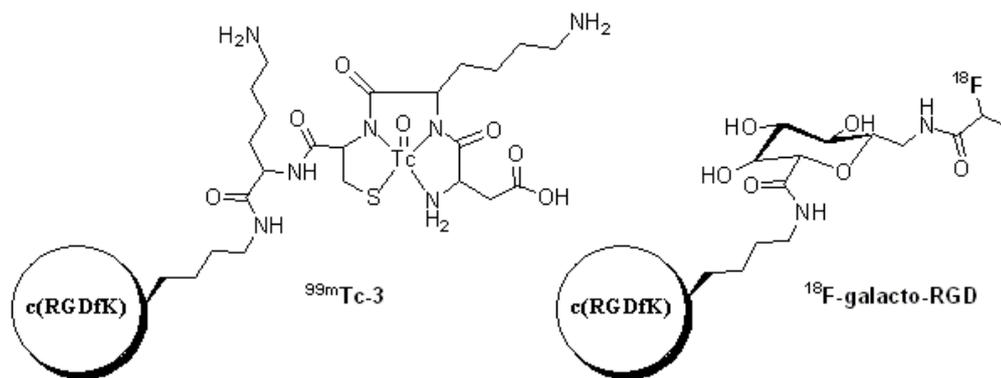


FIG. IV.52 – Structure de $^{99m}\text{Tc-3}$ et du $^{18}\text{F-galacto-RGD}$.

Nous avons comparé ces résultats de biodistribution avec ceux de la littérature pour le composé modèle $\mathbf{3-}^{99m}\text{Tc}$, obtenus sur un modèle murin de xéno greffe M21, 2 h après injection du traceurs [Haubner 04a]. Nous avons également rapporté les résultats de biodistribution du traceur $^{18}\text{F-galacto-RGD}$ (Fig. IV.52). En effet, ce composé est actuellement le plus avancé pour l'imagerie moléculaire de $\alpha_V\beta_3$ et a été testé chez des patients [Haubner 05, Beer 05, Beer 06, Beer 08]. Les données de biodistribution ont également été obtenues sur un modèle murin de xéno greffe M21, 1 h après injection [Haubner 01b]. La comparaison avec nos traceurs montre qu'ils ont des propriétés de biodistribution assez proches du $^{18}\text{F-galacto-RGD}$, mis à part l'accumulation hépatique qui est plus élevée dans notre cas. De plus, l'accumulation tumorale est du même ordre que pour ces composés modèles.

Ainsi, malgré les difficultés rencontrées lors des premiers tests *in vivo* pour identifier les traceurs par analyse des extraits de tumeurs, les résultats de biodistribution obtenus sont encourageants. Ils mettent en évidence une forte élimination rénale, indispensable pour des traceurs d'imagerie et l'excrétion hépatique est malgré tout relativement limitée. D'autre part, aucune accumulation non-spécifique dans les organes étudiés n'a été mise en évidence. Enfin, le pourcentage de la dose injectée retrouvé dans la tumeur est proche de celui observé pour les composés modèles présentés, en particulier le $^{18}\text{F-galacto-RGD}$.

Lors des études préliminaires, présentées dans le chapitre II, nous avons montré que l'injection *in vivo* de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ conduit à un signal HPLC correspondant à la présence de technétium libre réduit dans les extraits de tumeurs. Lors des criblages *in vivo* que nous avons menés, seule cette espèce a été mise en évidence sur les radiochromatogrammes. Il est difficile de conclure quant à sa formation. En effet, les traceurs ont pu être dégradés au moment de l'extraction des tumeurs mais une autre hypothèse pourrait être la dégradation des complexes *in vivo* dans le milieu circulant ou au niveau de la tumeur, conduisant au relargage de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, qui viendrait s'accumuler dans les tumeurs.

Conclusion

La seconde partie de notre projet concernait le développement de complexes cycliques obtenus par coordination d'un cœur oxotechnétium par des tripeptides fonctionnalisés analogues de la séquence RGD. Afin d'explorer les potentialités de cette approche, une chimiothèque de 64 ligands a été synthétisée dans une approche combinatoire sur support solide.

La cyclisation par le cœur oxorhénium a été réalisée par la synthèse de divers complexes, aussi bien à l'unité qu'en mélange. Différents isomères ont été mis en évidence, en particulier pour **Re-1A1** qui conduit à des complexes monomériques et homodimériques. La plasticité de ces isomères a été étudiée dans différentes conditions de pH et de température. Il semble que dans les conditions physiologiques, les proportions de ces isomères restent constantes. Les tests de liaison *in vitro*, récemment mis au point au laboratoire, ont dès à présent donné des résultats prometteurs avec le complexe **Re-1A1 b** qui présente une IC_{50} de 86 nM sur $\alpha_V\beta_3$.

Le marquage au ^{99m}Tc des ligands a été optimisé avec **1A1** et le protocole s'est avéré généralisable à l'ensemble des ligands à linker en C_2 et méta puis a été légèrement modifié pour ceux en C_3 . Les complexes à linker para n'ont pas pu être obtenus de manière satisfaisante.

Des tests de stabilité au glutathion et dans le plasma ont été réalisés sur les complexes ^{99m}Tc -**1A1**, ^{99m}Tc -**2A1**, ^{99m}Tc -**3A1**, ^{99m}Tc -**4A1**, ^{99m}Tc -**2B2** et ^{99m}Tc -**4D3**. Les résultats des stabilités vis-à-vis du GSH sont dans l'ensemble satisfaisants, mis à part le composé ^{99m}Tc -**2B2** qui présente un comportement particulier. En effet, il semble dans ce cas y avoir la formation d'un isomère du complexe obtenu lors du marquage. Les complexes présentant un linker C_2 sont, quant à eux, stables dans le plasma. Les résultats obtenus pour les complexes ^{99m}Tc -**2B2** et ^{99m}Tc -**4D3** sont plus problématiques puisqu'ils semblent en partie piégés par les protéines du plasma. Si tel est le cas, il faut envisager qu'ils ne soient pas relargués *in vivo* et donc qu'ils ne soient pas suffisamment disponibles pour un ciblage efficace de la tumeur.

Deux premiers tests de screening *in vivo* ont été réalisés avec respectivement 12 puis 4 composés par animal. Dans tous les cas, seul du technétium libre réduit a été identifié lors de l'analyse des extraits de tumeurs par radio-HPLC. Toutefois, le pourcentage de la dose injectée retrouvé dans les tumeurs est assez élevé et est comparable à celui de produits décrits dans la littérature. Des tests de stabilité en homogénat de tumeurs ont été réalisés sur ^{99m}Tc -**1A1**, ^{99m}Tc -**2B2** et ^{99m}Tc -**4D3**. Ils ont mis en évidence la nécessité d'ajouter des inhibiteurs de protéases lors de l'extraction des tumeurs pour les analyses *ex vivo* afin de limiter la dégradation des complexes à cette étape. On ne peut cependant pas exclure une dégradation dans le milieu circulant ou au niveau de la tumeur qui pourrait fortement diminuer l'efficacité des traceurs. Nous avons réalisé une étude de biodistribution

sur $^{99m}\text{Tc-3B1}$, $^{99m}\text{Tc-4C1}$ et $^{99m}\text{Tc-1D2}$ et $^{99m}\text{Tc-2A2}$. Une élimination essentiellement rénale a été mise en évidence avec une relativement faible accumulation dans le foie et les organes sains. Ces résultats encourageants suggèrent que l'étape d'extraction des tumeurs est délétère pour nos traceurs et que ce mode d'identification directe ne semble pas adapté dans notre cas. Bien que plus lourde à mettre en œuvre, une déconvolution pourrait permettre d'identifier les traceurs ciblant la tumeur. Toutefois, la mise en place très récente au laboratoire de tests *in vitro* ouvre de nouvelles perspectives pour le criblage préliminaire de séries de traceurs, notamment sous la forme de complexes d'oxorhénium.

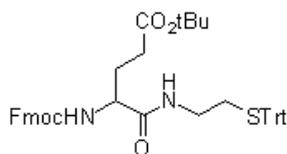
Il faut cependant relativiser l'intérêt *in fine* de ces tests *in vitro*. En effet, comme nous l'avons vu, les cinétiques de complexation sont différentes pour Re et Tc et conduisent à des mélanges d'isomères souvent très variables et imprévisibles. Ainsi, il est possible que des peptides aboutissant à des complexes rhéniés inactifs donnent des composés technétiés efficaces et inversement. Cette hypothèse nous encourage donc à poursuivre nos efforts en matière de criblage *in vivo*.

Partie expérimentale - Chapitre IV

Les procédures courantes sont présentées dans l'annexe générale, en particulier les généralités sur la synthèse sur support solide ainsi que les méthodes d'analyse par HPLC.

Synthèses

Synthèse sur résine Wang - voie 2



Fmoc-Glu(OtBu)-O-NH-(CH₂)₂-STrt 19. Du chlorure de 2-aminoéthanethiol (3,75 g, 33 mmol, 1,1 eq.) est mis en solution dans du TFA (100 mL). Du triphénylméthanol (7,8 g, 30 mmol, 1 eq.) est ajouté. Le mélange est agité pendant 2 h. Le TFA est évaporé sous pression réduite et de l'eau distillée (100 mL) est ajoutée, suivie de DCM (50 mL), pour solubiliser l'huile obtenue.

Une solution de NaHCO₃ saturée est ajoutée progressivement jusqu'à précipitation. Le DCM est évaporé et la solution de NaHCO₃ est à nouveau ajoutée jusqu'à obtenir un pH basique (pH = 8) et la fin de la formation de mousse. Le précipité est filtré sur fritté et séché sous vide sur une pompe à palettes. Le triphénylméthyl-2-aminoéthanethiol est obtenu sous la forme d'un solide blanc (sel de TFA) et est directement utilisé.

Le Fmoc-Glu(OtBu)-OH (2,13 g, 5 mmol, 1 eq.) est dissous dans du chloroforme (40 mL). Du DCC (1,54 g, 7,5 mmol, 1,5 eq.) est ajouté, suivi de Cl-HOBt (1,15 g, 7,5 mmol, 1,5 eq.), de triphénylméthyl-2-aminoéthanethiol (2,17 g, 5 mmol, 1 eq.) et de DIPEA (4,4 mL, 25 mmol, 5 eq.). Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. Le brut est purifié par chromatographie flash (éluant : cyclohexane/acétone 80/20), conduisant à un solide blanc. m = 3,20 g, Rdt = 88%.

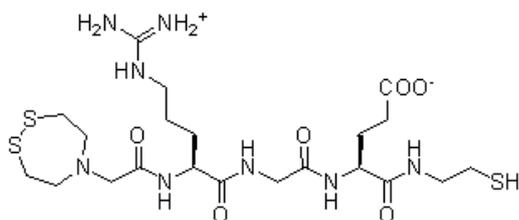
RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) : δ 7,60 (d, J = 7,6 Hz, 2H, Fmoc), 7,44-7,40 (m, 2H, Fmoc), 7,27-7,01 (m, 19H, Fmoc et Trt), 6,36 (bs, 1H, NH), 5,75 (m, 1H, NH), 4,21 (d, J = 6,8 Hz, 2H, CH₂ Fmoc), 4,02 (t, J = 6,8 Hz, 1H, CH Fmoc), 2,94-2,91 (m, 2H, N-CH₂-C-S), 2,27-2,23 (m, 2H, N-C-CH₂-S), 2,19-2,13 (m, 2H, CH₂γ Glu), 1,92-1,74 (2H, m, CH₂β Glu), 1,30 (s, 9H, tBu) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 765,30 (M + K⁺, 6%), 749,30 (M + Na⁺, 6%), 505,10 (M - Fmoc + 2H⁺, 100%).

Couplage du composé 19 sur une résine Wang. Le composé **19** (726 mg, 1 mmol, 2 eq.) est dissous dans un mélange DCM/TFA 1/1 (10 mL) et le mélange est agité pendant 1 h. Le solvant est évaporé sous pression réduite et du toluène est chassé deux fois sur le produit brut qui est utilisé sans purification. Le Fmoc-Glu-N-CH₂-CH₂-S_{Tr} brut (1 mmol, 4 eq.) et du DCC (103 mg, 0,5 mmol, 1 eq.) sont dissous dans du DCM (3 mL). Le mélange est agité pendant 10 min à 0°C. Le solvant est évaporé sous pression réduite et l'anhydride symétrique est directement utilisée. De la DMAP (6,1 mg, 0,05 mmol, 0,1 eq.) est ajoutée, dans un volume minimal de NMP (typiquement 0,5 mL), à une résine Wang (333 mg, 0,5-0,7 mmol, substitution : 1,5-2 mmol/g) conditionnée dans de la NMP. L'anhydride symétrique (0,5 mmol, 1 eq.) est ajoutée dans un minimum de NMP. Le mélange est agité pendant une nuit. Cette séquence est répétée trois fois puis, après lavages, le taux de greffage est estimé par dosage Fmoc : 28% (0,2 mmol.g⁻¹). Le capping de la résine est réalisé à l'aide de chlorure de benzyle (290 μL, 2,5 mmol, 5 eq.) en présence de pyridine (40 μL, 0,5 mmol, 1 eq.) dans de la NMP pendant 30 min. Les étapes suivantes ont été réalisées sur 200 mg de cette résine (0,034 mmol de fonctions réactives).

Elongation du peptide. Les quatre étapes récurrentes utilisées sont décrites dans le tableau IV.18 de l'annexe générale.

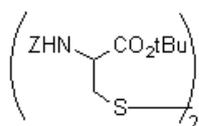
Etape 1 - Déprotection Fmoc. L'agitation est réalisée trois fois pendant 10 min à température ambiante. **Etape 3 - Couplage.** Pour le couplage des acides aminés, la résine est mise en suspension dans de la NMP (2 mL). Fmoc-Gly-OH ou Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH (0,7 mmol, 20 eq.), Cl-HOBt (0,7 mmol, 20 eq.), DIPEA (0,7 mmol, 20 eq.) DCC (0,7 mmol, 20 eq.) sont successivement ajoutés. Le mélange est agité pendant une nuit puis traité selon l'étape 4. L'efficacité du couplage est déterminée qualitativement par un test de Kaiser. Pour le couplage du précurseur de NS₂ **10**, la résine a été mise en suspension dans 2 mL de DCM. Le composé **10** (20 mg, 0,09 mmol, 2,5 eq.), du HATU (49,4 mg, 0,13 mmol, 3,8 equiv.) et de la DIPEA (23 μL, 0,13 mmol, 3,8 eq.) sont successivement ajoutés. Le mélange est agité pendant une nuit puis la résine traitée selon l'étape 4. Le couplage n'étant pas total d'après le test de Kaiser, un second couplage a été réalisé pendant 5 h en doublant les quantités de réactifs.



1C1. L'étape de clivage et de déprotection du peptide est répétée deux fois par traitement de la résine par un mélange TFA/TIPS/H₂O (95/2,5/2,5) pendant 1 h à température ambiante. Après filtration, la résine est lavée trois fois avec du DCM. Les filtrats sont rassemblés et concentrés sous pression réduite, du toluène est chassé deux fois sur le produit brut et le peptide est précipité à l'aide de *tert*-butylméthyl

éther froid. Le composé **1A1** est purifié par HPLC semi-préparative (HPLC Varian) avec un gradient 0-100% B en 30 min. Les analyses sont présentées plus loin, avec l'ensemble de la chimiothèque.

Synthèse en solution d'un bras de couplage puis synthèse sur résine Rink

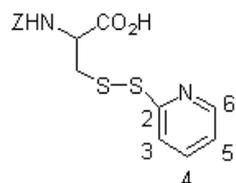


(ZNH-Cys-OtBu)₂ 20. Le chlorhydrate de (Cys-tBu)₂ (6,5 g, 15,3 mmol, 1 eq.) est suspendu dans du chloroforme (150 mL) et de la DIPEA (5,3 mL, 30,6 mmol, 2 eq.) est ajoutée pour dissoudre le sel. Le pH est ajusté à 9-10 avec de la DIPEA puis 10,6 mL (61,2 mmol, 4 eq.) de DIPEA sont ajoutés. Le chloroformate de benzyle (8,7 mL, 61,2 mmol, 4 eq.), dilué dans du chloroforme (50 mL), est ajouté lentement par une ampoule de coulée isobare, sous argon, à 0°C. Le pH est ajusté à 9-10 avec de la DIPEA. Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante, sous argon. La phase organique est lavée deux fois avec une solution aqueuse d'acide citrique à 10%. La phase aqueuse est extraite au chloroforme. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée. Le produit est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 8/2), conduisant à une huile jaune. *m* = 8,0 g, Rdt = 84%.

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) : δ 7,34 (m, 10H, 2 × arom), 5,70 (d, *J* = 7,8 Hz, 2H, 2 × NH), 5,10 (s, 4H, 2 × Ar-CH₂-OCO), 4,58-4,51 (m, 2H, 2 × CH_α Cys), 3,15 (d, *J* = 4,8 Hz, 4H, 2 × CH_{2β} Cys), 1,46 (s, 18H, 2 × tBu) ;

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz) : δ 169,4 (2C, C=O), 155,8 (2C, C=O), 136,4 (2C, arom), 128,8 (4C, arom), 128,3 (4C, arom), 127,1 (2C, arom), 67,2 (2C, Ar-CH₂-OCO), 65,5 (2C, tBu), 53,8 (2C, C_α Cys), 42,1 (2C, C_β Cys), 28,1 (6C, CH₃ tBu) ;

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 659,30 (M + K⁺, 18%), 643,30 (M + Na⁺, 100%), 621,20 (M + H⁺, 8%).



ZNH-Cys(Pys)-OH 21. Le produit **20** (8,0 g, 12,9 mmol) est dissous dans du DCM (60 mL) et du TFA (60 mL) est ajouté lentement. Le mélange est agité pendant 1,5 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et du toluène est chassé trois fois. Le solide blanc obtenu est séché sur pompe à palettes et utilisé sans purification préalable. Il est dissous dans du THF dégazé (150 mL). La tributylphosphine (4,8 mL, 19,3 mmol, 1,5 eq.) et de l'eau (350 μL, 19,3 mmol, 1,5 eq.) sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante sous argon. Le solvant est évaporé, l'huile jaune obtenue (ZNH-Cys-OH) est séchée sur pompe à palettes et utilisée sans purification préalable. De l'Aldrithiol-2 (11,4 g, 51,6 mmol, 2 eq.) est dissous dans une solution d'acide acétique à 10% dans l'EtOH (30 mL). La ZNH-Cys-OH

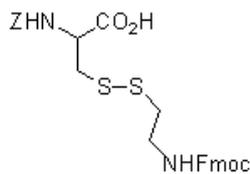
brute (6,6 g, 25,8 mmol, 1eq), en solution dans de l'EtOH (60 mL), est ensuite ajoutée. Le mélange est agité une nuit à température ambiante, sous atmosphère d'argon. Le produit est filtré sur fritté, le solvant évaporé sous pression réduite, du toluène est chassé deux fois sur le produit brut qui est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt de 1/1 à 3/7 avec 1% d'acide acétique, puis CHCl₃/MeOH 9/1 + 1% d'acide acétique), conduisant à une pâte blanche. m = 5,5 g, Rdt = 50%.

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) : δ 8,45 (d, J = 5,2 Hz, 1H, H6 pyridine), 7,71 (td, J = 8,7 et 1,75 Hz, 1H, H4 pyridine), 7,47 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H3 pyridine), 7,34 (m, 5H, H arom), 7,23 (m, 1H, H5 pyridine), 6,30 (d, J = 5,3 Hz, 1H, NH), 5,09 (s, 2H, Ar-CH₂-OCO), 4,46 (m, 1H, CH_α Cys), 3,46 et 2,92 (2 dd, J = 14,3 et 4,2 Hz, 2H, CH₂β Cys) ;
ES/MS (ionisation positive) : m/z 387,10 (M + Na⁺, 22%), 365,20 (M + H⁺, 100%).

Fmoc-(CH₂)₂-SH **22.** Le chlorhydrate d'aminoéthanethiol (2,7 g, 24 mmol, 1 eq.) est dissous dans du MeOH (240 mL). De la DIPEA est ajoutée pour neutraliser le mélange, puis 8,55 mL (49,2 mmol, 2,05 eq.) de DIPEA sont ajoutés, le pH est ajusté à 8-9 avec une addition supplémentaire de DIPEA. Du N-(9-fluorénylméthoxycarboxy)succinimide (8,5 g, 25,2 mmol, 1,05 eq.) est ajouté. Le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Le solvant est évaporé sous pression réduite, l'huile obtenue est reprise dans du DCM (200 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse d'acide citrique à 10%. La phase aqueuse est extraite avec du DCM. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie flash (éluant : un mélange hexane/AcOEt 7/3), conduisant à un solide blanc. m = 4,8 g, Rdt = 67%.

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz) : δ 7,77 (d, J = 7,1 Hz, 2H, arom Fmoc), 7,60 (d, J = 7,1 Hz, 2H, arom Fmoc), 7,44-7,29 (m, 4H, arom Fmoc), 5,15 (s, 1H, NH), 4,43 (d, J = 6,7 Hz, 2H, CH₂ Fmoc), 4,22 (t, J = 6,7 Hz, 1H, CH Fmoc), 3,37 (m, 2H, CH₂-N), 2,64 (m, 2H, CH₂-S), 1,34 (t, J = 8,5 Hz, 1H, SH).

Composé **23.** Le thiol activé **21** (3,28 g, 9 mmol, 1 eq.) est dissous dans du chloroforme (100 mL). Le Fmoc-aminoéthanethiol **22** (2,69 g, 9 mmol, 1 eq.) est ajouté par portions. Le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Le solvant est évaporé et le produit est repris dans de l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution d'acide citrique à 10%. La phase aqueuse est extraite avec de l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur Na₂SO₄, filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie flash (éluant : CHCl₃/AcOEt de 8/2 à 7/3, puis CHCl₃/MeOH 9/1 + 1% acide acétique), conduisant à un solide beige. m = 3,64 g, Rdt = 73%.



RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 7,75 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, arom Fmoc), 7,57 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, arom Fmoc), 7,42-7,36 (m, 4H, arom Fmoc), 7,33 (m, 5H, arom Z), 5,76 (s, 1H, NH), 5,28 (s, 1H, NH), 5,11 (s, 2H, Ar- $\text{CH}_2\text{-OCO}$), 4,72 (m, 1H, CH_α Cys), 4,43 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2 Fmoc), 4,19 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H, CH Fmoc), 3,50-3,34 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3,15-3,09 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 2,80-2,78 et 2,72-2,65 (2m, 2H, $\text{CH}_2\beta$ Cys) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 575,10 ($\text{M} + \text{Na}^+$, 100%), 553,10 ($\text{M} + \text{H}^+$, 22%).

Greffage sur résine Rink. Un mélange pipéridine/NMP 1/4 (25 mL) est ajouté à de la résine Rink-amide (4,5 g, 2,4 mmol de groupements Fmoc-NH, substitution : 0,53 mmol/g). Le mélange est agité 5 min ($\times 3$). Après lavage (selon l'étape 2), la résine est suspendue dans de la NMP (25 mL). Le composé **23** (3,9 g, 7,1 mmol, 3 eq.) est ajouté, suivi de HOBt (965 mg, 7,1 mmol, 3 eq.), de DCC (1,47 g, 7,1 mmol, 3 eq.) et de DIPEA (1,24 mL, 7,1 mmol, 3 eq.). Le mélange est agité pendant 5 h à température ambiante. Après lavages (selon l'étape 4), le taux de substitution de la résine a été déterminé par un dosage Fmoc et est de 95% (0,43 mmol/g). Le capping de la résine est réalisé en faisant réagir de l'anhydride acétique (1,13 mL, 11,95 mmol, 5 eq.) en présence de DIPEA (4,16 mL, 23,9 mmol, 10 eq.) dans de la NMP pendant 1 h.

Synthèse combinatoire de 11 produits. Le composé $\text{NS}_2\text{-R}\beta\text{D-C}_2$ **1B1** a tout d'abord été synthétisé pour valider la méthode qui a ensuite été appliquée pour obtenir 10 produits par une approche combinatoire par division des lots de résine (Fig. IV.12). La synthèse a été réalisée sur la résine greffée avec le composé **23** (0,2 mmol de fonctions Fmoc-NH). Les quatre étapes habituelles de la synthèse sur support solide sont décrites en annexe et précisées ci-dessous.

Etape 3, Couplage des acides aminés. Après lavages (étape 2), la résine est suspendue dans de la NMP (3 mL). L'acide aminé, l'HOBt, le DCC et la DIPEA (10 eq. pour les acides aminés naturels, 4 eq. pour les autres) sont ajoutés. Le mélange est agité entre 2 h et une nuit suivant les cas. La résine est lavée (étape 4) et l'efficacité du couplage est déterminée par un test de Kaiser.

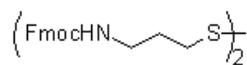
Etape 3, Couplage du précurseur de NS_2 . Après lavages (étape 2), la résine est suspendue dans de la NMP (3 mL). Le composé **10** (3 eq.), du HATU (4,5 eq.) et de la DIPEA (4,5 eq.) sont ajoutés. Le mélange est agité pendant une nuit et la résine est lavée (étape 4). L'efficacité du couplage est déterminée par un test de Kaiser.

Clivage par réduction puis déprotection. La résine est conditionnée avec du DCM et lavée avec un mélange DCM/THF 1/1. Du THF (3 mL) est ajouté, suivi par de l'eau (1,5 eq.) et de la tributylphosphine (1,5 eq.). Le mélange est agité pendant 45 min. La solution est filtrée et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est dissous dans un mélange TFA/TIPS/ H_2O 95/2,5/2,5 (4 mL) et le mélange est agité pendant 45 min. Le solvant est évaporé sous pression réduite et du toluène est chassé deux fois sur le produit

brut. Le peptide est précipité dans du *tert*-butylméthyl éther froid puis purifié par HPLC préparative.

Synthèse sur résine Mmt

La résine 3-aminoéthanthioliol 4-méthoxytrityl (linker C₂) disponible commercialement a été directement utilisée pour le couplage des acides aminés. Pour les linkers méta et para, le 3-aminothiophénol ou le 4-aminothiophénol ont été greffés sur une résine chlorométhoxytrityl (Cl-Mmt). Pour le linker C₃, nous avons tout d'abord synthétisé le Fmoc-3-aminopropanedisulfure **24**.



Composé 24. Le composé **17-C3** brut (5,1 g, 31,2 mmol, 1 eq.) est dissous dans du MeOH (200 mL). Le mélange est neutralisé avec de la DIPEA avant d'ajouter 10,7 mL de DIPEA (61,7 mmol, 2,1 eq.), suivis de N-(9-fluorénylméthoxycarboxyloxy)succinimide (10,7

g, 31,6 mmol, 1,1 eq.). Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit est repris dans du DCM (250 mL). La phase organique est lavée avec une solution d'acide citrique à 10%. La phase aqueuse est extraite avec du DCM. Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec une solution saturée de NaCl, séchées sur Na₂SO₄, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : DCM/MeOH 9/1 puis DCM/MeOH 8/2), conduisant à un solide blanc. m = 3,4 g, Rdt = 20%. (Rq : ce faible rendement aurait certainement été amélioré en ajoutant 2,1 eq. de N-(9-fluorenylméthoxycarboxyloxy)succinimide au lieu de 1,1 eq.).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) : δ 7,75 (d, J = 7,6 Hz, 4H, Fmoc arom), 7,57 (d, J = 7,6 Hz, 4H, 2 × Fmoc arom), 7,41-7,28 (m, 8H, 2 × Fmoc arom), 4,97 (bs, 2H, 2 × NH), 4,40 (d, J = 6,6 Hz, 4H, 2 × CH₂ Fmoc), 4,19 (t, J = 6,6 Hz, 2H, 2 × CH Fmoc), 3,33-3,28 (m, 4H, 2 × CH₂-N), 2,71 (t, J = 6,4 Hz, 4H, 2 × CH₂-S), 1,95-1,88 (m, 4H, 2 × C-CH₂-C) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 625,21 (M + H⁺, 100%).

Greffage des linkers para et méta sur résine Cl-Mmt. Un équivalent (par rapport à la substitution de la résine : 1,3 mmol/g) de 4-aminothiophénol ou de 3-aminothiophénol est dissous dans du DCM (10 mL/eq. de linker) et est ajouté à 1 eq. de résine préalablement conditionnée. De la DIPEA (0,7 eq.) est ajoutée et le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante. Après filtration, la séquence est répétée une fois. Après lavage au DCM, le capping des groupements chlorure de trityl n'ayant pas réagi est réalisé avec un mélange DCM/MeOH/DIPEA 80/15/5. Après lavages, un aliquot de résine est clivé avec un mélange TFA/TIPS/H₂O 95/2,5/2,5 et analysé par HPLC.

Greffage du linker C_3 sur résine Cl-Mmt. Un équivalent (par rapport au loading de la résine : 1,3 mmol/g) de Fmoc-3-aminopropanedisulfure **24** est dissous dans du chloroforme (10 mL/eq. de linker) et 2 gouttes d'eau sont ajoutées. Une solution de tributylphosphine à 10% dans $CHCl_3$ (1,5 eq.) est ajoutée. Le mélange est agité à température ambiante pendant 45 min sous atmosphère d'argon. La moitié de la solution est ajoutée à 1 eq. de résine préalablement conditionnée et le mélange est agité 1 h à température ambiante. Après filtration, l'autre moitié de la solution de linker réduit est ajoutée à la résine. Le mélange est agité pendant 1 h. Après lavage, le rendement de couplage est déterminé par un dosage Fmoc et est typiquement de l'ordre de 30 à 90%. Un capping des fonctions n'ayant pas réagi est réalisé avec un mélange DCM/MeOH/DIPEA 80/15/5.

Elongation du peptide. Les quatre étapes récurrentes utilisées sont décrites dans le tableau IV.18 de l'annexe générale et les détails pour l'étape 3 sont détaillés ci-dessous.

Couplage du premier acide aminé. L'acide aminé Fmoc-D/L-Asp(tBu)-OH ou Fmoc-D/L-Glu(tBu)-OH (5 eq. pour les acides aminés naturels - L, 4 eq. pour les non-naturels - D) est dissous dans de la NMP (2,5 mL/eq. d'acide aminé). Du HATU (5 eq. pour les acides aminés L, 4 eq. pour les D) et de la DIPEA (10 eq. pour les acides aminés L, 8 eq. pour les L) sont ajoutés. La solution est agitée pendant 2-3 min à température ambiante puis ajoutée à la résine préalablement conditionnée. Le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante. La résine est lavée (étape 4) et le rendement de couplage est déterminé par un dosage Fmoc. En fonction des résultats de ce dosage, les étapes précédentes sont répétées une ou deux fois. Un capping des fonctions amines n'ayant pas réagi est réalisé avec du chlorure d'acétyle (5 eq.) en présence de DIPEA (10 eq.) dans de la NMP.

Couplage des deuxième et troisième acides aminés. L'acide aminé (10 eq. pour les L, 4 eq. pour les D) est dissous dans de la NMP (1 mL/eq. d'acide aminé). Du DCC et de l'HOBt (10 eq. pour les acides aminés L, 4 eq. pour les D) sont ajoutés. La solution est agitée pendant 2-3 min à température ambiante et est ajoutée à la résine préalablement conditionnée. De la DIPEA (10 eq. pour les acides aminés L, 4 eq. pour les D) est ensuite ajoutée et le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante. La résine est lavée (étape 4) et l'efficacité du couplage est déterminée par des tests de Kaiser et au TNBS.

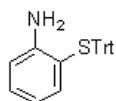
Couplage du précurseur de NS_2 . Le composé **10** (3 eq.) est dissous dans de la NMP (1 mL/eq.). Du HATU (4,5 eq.) et de la DIPEA (4,5 eq.) sont ajoutés. La solution est agitée pendant 2-3 min à température ambiante et est ajoutée à 1 eq. de résine préalablement conditionnée. Le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante. Après lavage (étape 4), l'efficacité du couplage est déterminée par des tests de Kaiser et au TNBS.

Clivage et déprotection. L'étape de clivage et de déprotection du peptide est réalisée trois fois à température ambiante à l'aide d'un mélange TFA/TIPS/ H_2O (95/2,5/2,5) pen-

dant 15 min. Après filtration, la résine est lavée trois fois avec du DCM. Les filtrats sont concentrés sous pression réduite et du toluène est chassé deux fois sur le produit brut. Le peptide est précipité dans du *tert*-butylméthyl éther froid.

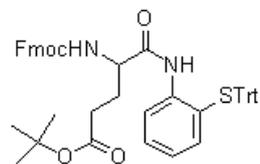
Purification. Le peptide est dissous dans de l'acide acétique et pré-purifié sur une colonne Sep-Pak (cf. annexe générale). Un gradient manuel de 0 à 100% B est utilisé : 20 mL de 5 en 5%. Les fractions collectées sont analysées par HPLC avec un gradient linéaire de 0-100% B en 30 min. Les fractions contenant le produit attendu sont rassemblées et lyophilisées puis redissoutes dans un mélange H₂O/AcN 1/1 avant d'être purifiées par HPLC semi-préparative (HPLC Waters-2) ou préparative (HPLC Varian). Les gradients utilisés sont optimisés en fonction du mélange purifié.

Synthèses en solution pour la série de linker ortho



Composé 25. Le triphénylméthanol (15,5 g, 59,6 mmol, 1 eq.) est dissous dans du DCM (5 mL). Le 2-aminothiophénol (7 mL, 65 mmol, 1,5 eq.) est ajouté sous atmosphère inerte, suivi de TFA (40 mL). Le mélange est agité pendant 3 h puis le solvant est évaporé sous pression réduite. De l'eau (30 mL), puis une solution saturée de NaHCO₃, sont ajoutées pour basifier la solution (formation de mousse). Le mélange est extrait au chloroforme (3 × 100 mL) puis le solvant est évaporé pour donner un solide jaune pâle. m = 21,1 g, Rdt = 99,5%.

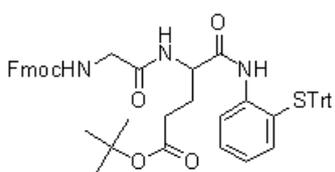
¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz) : δ 7,35 (m, 6H, H arom Trt), 7,19 (m, 9H, H arom. Trt), 6,99 (m, 2H, H arom), 6,40 (m, 2H, H arom), 3,63 (bs, 2H, NH₂).



Composé 26. Le Fmoc-Glu(OtBu)-OH (6,4 g, 15 mmol, 1 eq.) est dissous dans du DCM (150 mL). Du HATU (8,55 g, 22,5 mmol, 1,5 eq.) est ajoutée, suivi du composé **25** (5,5 g, 15 mmol, 1 eq.) et de DIPEA (3,9 mL, 22,3 mmol, 1,5 eq.). Le mélange est agité pendant une nuit, puis le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : Hexane/AcOEt

95/5), conduisant à un solide blanc. m = 9 g, Rdt = 77%.

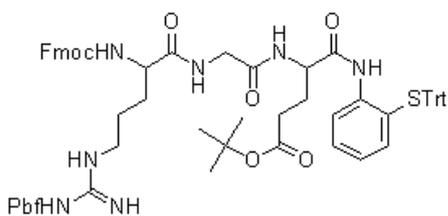
¹H RMN (CDCl₃O, 250 MHz) : δ 8,48 (bs, 1H, NH), 8,24 (d, J = 8,1 Hz, 1H, arom), 7,79 (m, 2H, arom Fmoc), 7,60 (m, 2H, arom Fmoc), 7,41-7,19 (m, 15 + 4 + 2H, Trt + Fmoc + arom), 6,83 (t, J = 7,3 Hz, 1H, arom), 5,35 (d, J = 7,3 Hz, 1H, NH), 4,55 + 4,37 (2m, 2H, CH₂ Fmoc), 4,21 (t, J = 7,2 Hz, 1H, CH Fmoc), 3,99 (m, 1H, CH_α Glu), 2,32-1,92 et 1,77-1,50 (2m, 4H, 2 × CH₂ Glu), 1,47 (s, 9H, 3 × CH₃ tBu).



Composé 27. Le composé **26** (9,3 g, 12 mmol, 1 eq.) est dissous dans de la DMF (70 mL) et de la DIPA (16,8 mL, 120 mmol, 10 eq.) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 3 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut déprotégé est directement utilisé. Il

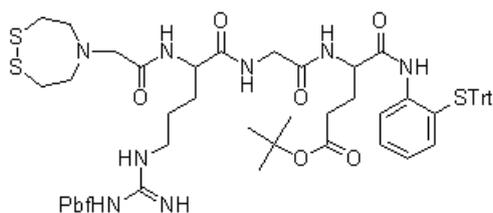
est dissous dans du DCM (100 mL) et la Fmoc-Gly-OH (3,57 g, 12 mmol, 1 eq.) est ajoutée, suivie du HATU (4,56 g, 12 mmol, 1 eq.) et de la DIPEA (4,2 mL, 24 mmol, 2 eq.). Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante puis le solvant est évaporé. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 7/3), conduisant à un solide blanc. $m = 7,9$ g, Rdt = 79%.

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 8,38 (bs, 1H, NH), 8,17 (dd, $J = 8,6$ et 1,4 Hz, 1H, arom.), 7,77 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, arom. Fmoc), 7,62 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, arom. Fmoc), 7,44-7,33 (m, 4H, arom. Fmoc), 7,32-7,28 (m, 6H, arom. Trt), 7,25-7,16 (m, 10H, 9H arom. Trt et 1 arom.), 6,81 (td, $J = 7,6$ et 1,4 Hz, 1H, arom.), 6,74 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, arom.), 5,26 (bs, 1H, NH), 4,45 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H, CH_2 Fmoc), 4,25 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, CH Fmoc), 4,23 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, CH_α Glu), 3,85 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, CH_2 Gly), 2,39-2,14 et 2,07-1,68 (2m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$ Glu), 1,44 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$ tBu).



Composé 28. Le composé **27** (7,9 g, 9,6 mmol, 1 eq.) est dissous dans de la DMF (50 mL) et de la DIPA (13,5 mL, 96 mmol, 10 eq.) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 3 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut déprotégé est directement utilisé. Il est dissous dans du DCM (60 mL) et la Fmoc-Arg(Pbf)-OH (6,2 g, 9,6 mmol, 1 eq.) est ajoutée, suivie du HATU (3,6 g, 9,6 mmol, 1 eq.) et de la DIPEA (3,3 mL, 19,2 mmol, 2 eq.). Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante puis le solvant est évaporé. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : DCM/MeOH 98/2), conduisant à un solide blanc. $m = 13,3$ g, Rdt quantitatif.

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 250 MHz) : δ 8,36 (bs, 1H, NH), 8,04 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, arom.), 7,57 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H, arom. Fmoc), 7,62 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H, arom. Fmoc), 7,48 (bs, 1H, NH), 7,38-7,27 (m, 10H, 4H Fmoc et 6H Trt), 7,22-7,17 (m, 10H, 9H arom. Trt et 1 arom.), 6,74 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, arom.), 6,28 (bs, 2H, NH Arg), 6,17 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, arom.), 4,31 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H, CH_2 Fmoc), 7,25 (m, 2H, CH_α Arg et CH_α Glu), 4,16 (m, 1H, CH Fmoc), 3,88 (m, 2H, CH_2 Gly), 3,38-3,05 (m, 2H, CH_2 -N Arg), 2,88 (s, 3H, CH_3 Pbf), 2,26 (s, 3H, CH_3 Pbf), 2,48 (s, 3H, CH_3 Pbf), 2,27-2,18 (m, 2H, CH_2 Arg), 2,04 (s, 3H, CH_3 Pbf), 1,99-1,82 et 1,79-1,45 (m, 6H, $2 \times \text{CH}_2$ Glu et CH_2 Arg), 1,40 (m, 15H, $3 \times \text{CH}_3$ tBu et $2 \times \text{CH}_3$ Pbf).

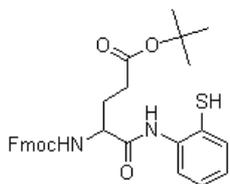


Composé 29. Le composé **28** (9,6 mmol, 1 eq.) est dissous dans de la DMF (50 mL) et de la DIPA (13,5 mL, 96 mmol, 10 eq.) est ajoutée. Le mélange est agité pendant 3 h à température ambiante. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le produit brut déprotégé est directement utilisé. Il est

dissous dans du DCM (60 mL) et le précurseur de NS₂ **10** (2,2 g, 9,6 mmol, 1 eq.) est ajouté, suivi du HATU (3,6 g, 9,6 mmol, 1 eq.) et de la DIPEA (3,3 mL, 19,2 mmol, 2 eq.). Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante puis le solvant est évaporé. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : DCM/MeOH 98/2 puis 95/5), conduisant à un solide blanc. $m = 8,3$ g, Rdt = 72%.

¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz) : δ 8,33 (bs, 1H, NH), 8,03 (m, 1H, arom.), 7,41 (bs, 1H, NH), 7,33-7,28 (m, 6H, Trt), 7,24-7,14 (m, 11H, 9H arom. Trt et 2 arom.), 6,77 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, arom.), 6,22 (bs, 3H, NH Arg), 4,40 (m, 1H, CH α_2 Arg), 7,12 (m, 1H, CH α Glu), 3,89 (m, 2H, CH₂ Gly), 3,39 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3,30-3,25 (m, 2H, CH₂-N Arg), 3,25 (t, $J = 5,5$ Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 2,96-2,80 (m, 4H, CH₃ Pbf et 2 \times CH₂-S NS₂), 2,55 (s, 3H, CH₃ Pbf), 2,48 (s, 3H, CH₃ Pbf), 2,22-2,17 (m, 2H, CH₂ Arg), 2,06 (s, 3H, CH₃ Pbf), 1,97-1,46 (m, 6H, 2 \times CH₂ Glu et CH₂ Arg), 1,46 (m, 15H, 3 \times CH₃ tBu et 2 \times CH₃ Pbf).

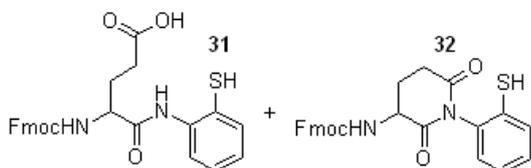
Composé 30. Le Fmoc-Glu(tBu)-OH (2,1 g, 5 mmol, 1 eq.) est dissous dans un minimum de DCM puis de la HOBt (0,68 g, 5 mmol, 1 eq.) est ajoutée, suivie du DCC (1,0 g, 5 mmol, 1 eq.). Le mélange est agité pendant 30 min à température ambiante puis le 2-aminothiophénol (0,54 mL, 5 mmol, 1 eq.) est ajouté. Le mélange est agité pendant 1,5 h à température ambiante. La dicyclohexylurée formée est éliminée par



filtration sur un fritté et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie flash (éluant : hexane/AcOEt 7/3), conduisant à un solide blanc. $m = 882$ mg, Rdt = 33%.

¹H RMN (CDCl₃O, 250 MHz) : δ 8,76 (bs, 1H, NH), 8,17 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, arom), 7,76 (d, $J = 7,5$ Hz, 2H, arom Fmoc), 7,69 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, arom), 7,60 (m, 2H, arom Fmoc), 7,49-7,27 (m, 4 + 2H, Fmoc + arom), 7,05 (td, $J = 7,7$ et 1,3 Hz, 1H, arom), 5,95 (bs, 1H, NH), 4,52-4,33 (m, 3H, CH₂ Fmoc et CH α Glu), 4,23 (t, $J = 6,8$ Hz, 1H, CH Fmoc), 2,55-2,01 (2m, 4H, 2 \times CH₂ Glu), 1,46 (s, 9H, 3 \times CH₃ tBu).

Composés 31 et 32. Le composé **30** (106 mg, 0,2 mmol) est dissous dans 5 mL d'un mélange TFA/TIPS/H₂O 95/2,5/2,5. Les mélange est agité pendant 30 min à température ambiante puis le solvant est évaporé sous pression



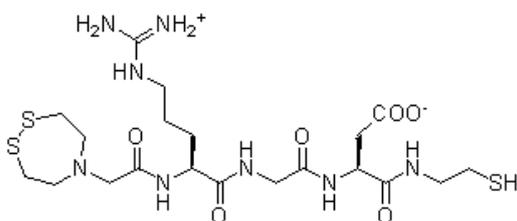
réduite. Du toluène est chassé deux fois sur le produit brut. Le mélange brut est purifié par HPLC semi-préparative (HPLC Water-1) avec un gradient 0-100% B en 30 min et les fractions sont analysées par spectrométrie de masse.

31 : $t_R = 23,7$ min, $m/z = 475,02$ ($M + H^+$);

32 : $t_R = 26,9$ min, $m/z = 459,01$ ($M + H^+$).

Caractérisations des tripeptides fonctionnalisés

Les tripeptides fonctionnalisés ont été obtenus en tant que monomères, avec le groupement NS_2 sous forme de disulfure (noté NS_2) ou de dithiol (noté $N(SH)_2$), et/ou en tant que dimères (noté $(NS_2-X_1X_2X_3-X)_2$). Pour le linker C_3 , les masses haute résolution (HRMS) ont été calculées pour $M + 2H^+$. Les analyses HPLC des produits purs ont été réalisées par HPLC analytique (HPLC Varian) avec un gradient 0-100% B en 30 min.



1A1 NS_2 -RGD- C_2 . HPLC : t_R 15.1 min ;

1H RMN (D_2O , 250 MHz) : δ 8.63 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, NH), 8.37 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 8.21 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, NH), 4.66 (t, $J = 6.4$ Hz, 1H, $CH\alpha$ Asp), 4.38-4.33 (m, 1H, $CH\alpha$ Arg), 4.30 (s, 2H, CH_2 NS_2), 3.94 (s, 2H, CH_2 Gly), 3.88 (t, $J = 5.5$ Hz, 4H, $2 \times CH_2-N$ NS_2), 3.37 (t, $J = 6.4$

Hz, 2H, $N-CH_2-C-S$), 3.25-3.16 (m, 6H, $2 \times CH_2-S$ NS_2 et CH_2-N Arg), 2.88-2.84 (m, 2H, CH_2 Asp), 2.61 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, $N-C-CH_2-S$), 1.90-1.60 (m, 4H, $CH_2\beta$ et $CH_2\gamma$ Arg); **^{13}C RMN (D_2O , 62.5 MHz)** : δ 174.8 (COOH Asp), 174.4 (C=O Arg), 172.9 (C=O Asp), 171.6 (C=O Gly), 165.9 (C=O NS_2), 157.4 (C=N Arg), 58.9 ($2 \times CH_2-N$ NS_2), 58.9 (CH_2 NS_2), 54.4 ($C\alpha$ Arg), 50.9 ($C\alpha$ Asp), 43.0 + 42.9 (CH_2 Gly et $N-C-C-S$), 41.1 (CH_2-N Arg), 36.3 (CH_2 Asp), 34.5 ($2 \times CH_2-S$ NS_2), 28.8 ($C\beta$ Arg), 24.9 ($C\gamma$ Arg), 23.8 ($N-C-C-S$);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 581.16 ($M + H^+$, 22%), 291.25 ($M + 2H^+$, 100%);

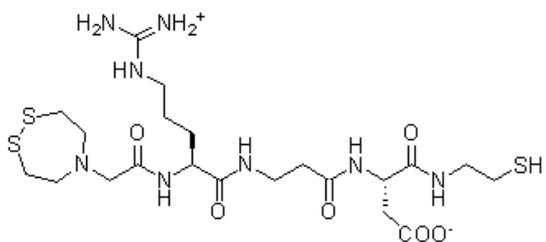
HRMS : m/z calculé pour $C_{20}H_{37}N_8O_6S_3$ 581.1998; trouvé 581.2028.

1A1 dimère (NS_2 -RGD- C_2) $_2$. HPLC : t_R 15.9 min ;

1H RMN (D_2O , 250 MHz) : δ 8.63 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, NH), 8.31 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, NH), 8.17 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, NH), 4.66 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, $CH\alpha$ Asp), 4.36-4.33 (m, 2H, $CH\alpha$ Arg), 4.29 (s, 4H, CH_2 NS_2), 3.92 (s, 4H, CH_2 Gly), 3.86 (t, $J = 5.7$ Hz, 8H, $2 \times CH_2-N$ NS_2), 3.53-3.47 (m, 4H, $N-CH_2-C-S$), 3.21 (t, $J = 5.7$ Hz, 8H, $2 \times CH_2-S$ NS_2), 3.17-3.14 (m, 4H, CH_2-N Arg), 2.86-2.77 (m, 8H, CH_2 Asp et $N-C-CH_2-S$), 1.83-1.59 (m, 8H, $CH_2\beta$ et $CH_2\gamma$ Arg);

^{13}C RMN (D_2O , 62.5 MHz) : δ 174.9 (COOH Asp), 174.6 (C=O Arg), 173.0 (C=O Asp), 171.7 (C=O Gly), 166.0 (C=O NS₂), 157.5 (C=N Arg), 59.1 + 58.9 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.6 (C α Arg), 50.9 (C α Asp), 43.2 (CH₂ Gly), 41.3 (CH₂-N Arg), 39.0 (N-C-C-S), 37.3 (N-C-C-S), 36.5 (CH₂ Asp), 34.6 (2 \times CH₂-S NS₂), 28.8 (C β Arg), 25.1 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 1159.24 (M + H⁺, 5%), 580.35 (M + 2H⁺, 40%), 387.52 (M + 3H⁺, 100%).



1B1 NS₂-R β D-C₂. HPLC : t_R 15.2 min ;

^1H RMN (D_2O , 250 MHz) : δ 4.63 (t, J = 5.7 Hz, 1H, CH α Asp), 4.30 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.26-4.20 (m, 1H, CH α Arg), 3.88 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.52-3.43 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.37 (t, J = 6.5 Hz, 2H, N-CH₂-C-S), 3.23 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.17-3.15 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.86-2.81 (m,

2H, CH₂ Asp), 2.62 (t, J = 6.5 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 2.48 (t, J = 5.8 Hz, 2H, CH₂-CO β Ala), 1.82-1.59 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

^{13}C RMN (D_2O , 62.5 MHz) : δ 173.9 (COOH Asp), 173.7 (C=O Arg), 172.9 (C=O β Ala), 172.4 (C=O Asp), 164.9 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.1 + 58.0 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (C α Arg), 50.2 (C α Asp), 42.1 (N-C-C-S), 40.4 (CH₂-N Arg), 35.6 (CH₂ β Ala et CH₂ Asp), 34.6 (CH₂ β Ala), 33.7 (2 \times CH₂-S NS₂), 28.1 (C β Arg), 24.2 (C γ Arg), 23.0 (N-C-C-S) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 595.22 (M + H⁺, 100%) ;

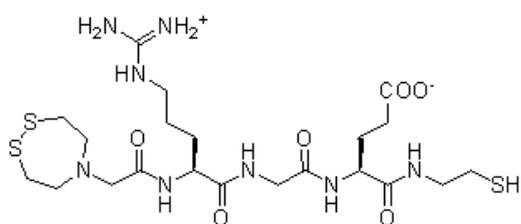
HRMS : m/z calculé pour C₂₁H₃₉N₈O₆S₃ 595.2155 ; trouvé 595.2202.

1B1 dimère (NS₂-R β D-C₂)₂. HPLC : t_R 15.8 min ;

^1H RMN (D_2O , 250 MHz) : δ 4.63 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH α Asp), 4.29 (s, 4H, CH₂ NS₂), 4.24-4.19 (m, 2H, CH α Arg), 3.87 (t, J = 5.6 Hz, 8H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.54-3.42 (m, 8H, CH₂-N β Ala et N-CH₂-C-S), 3.22 (t, J = 5.6 Hz, 8H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.16-3.14 (m, 4H, CH₂-N Arg), 2.85-2.77 (m, 8H, CH₂ Asp et N-CH₂-C-S), 2.49 (t, J = 6.2 Hz, 4H, CH₂-CO β Ala), 1.81-1.51 (m, 8H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

^{13}C RMN (D_2O , 62.5 MHz) : δ 173.9 (COOH Asp), 173.6 (C=O Arg), 172.9 (C=O β Ala), 172.3 (C=O Asp), 164.9 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.1 (2 \times CH₂-N NS₂), 58.0 (CH₂ NS₂), 53.7 (C α Arg), 50.1 (C α Asp), 40.4 (CH₂-N Arg), 38.1 + 36.4 (N-C-C-S), 35.6 + 35.6 (CH₂ β Ala et CH₂ Asp), 34.7 (CH₂ β Ala), 33.7 (2 \times CH₂-S NS₂), 28.1 (C β Arg), 24.2 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 1187.00 (M + H⁺, 1%), 594.33 (M + 2H⁺, 15%), 396.72 (M + 3H⁺, 100%).



1C1 NS₂-RGE-C₂. HPLC : t_R 15.5 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 8.62 (t, J = 5.8 Hz, 1H, NH), 8.29 (t, J = 6.4 Hz, 1H, NH), 4.38-4.33 (m, 2H, CH α Arg et CH α Glu), 4.31 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.94 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.88 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.40-3.34

(m, 2H, N-CH₂-C-S), 3.23 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.19-3.17 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.63 (t, J = 6.4 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 2.46 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂ γ Glu), 2.20-1.90 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.85-1.61 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 176.9 (COOH Glu), 173.7 (C=O Arg), 173.1 (C=O Glu), 170.9 (C=O Gly), 165.1 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.2-58.1 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (C α Arg), 53.3 (C α Glu), 42.1 (N-C-C-S et CH₂ Gly), 40.4 (CH₂-N Arg), 33.7 (2 \times CH₂-S NS₂), 29.8 (C α Glu), 28.0 (C β Arg), 26.1 (C β Glu), 24.2 (C γ Arg), 23.0 (N-C-C-S) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 595.24 (M + H⁺, 100%) ;

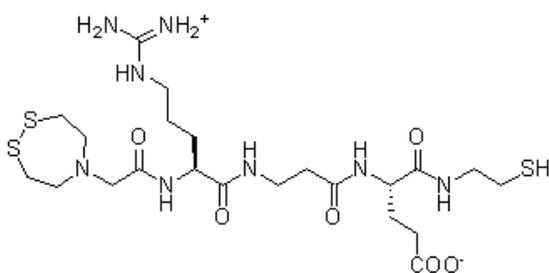
HRMS : m/z calculé pour C₂₁H₃₉N₈O₆S₃ 595.2155 ; trouvé 595.2123.

1C1 dimère (NS₂-RGE-C₂)₂. HPLC : t_R 16.1 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.36-4.34 (m, 4H, CH α Arg et CH α Glu), 4.30 (s, 4H, CH₂ NS₂), 3.93 (s, 4H, CH₂ Gly), 3.87 (t, J = 5.5 Hz, 8H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.61-3.46 (m, 4H, N-CH₂-C-S), 3.22 (t, J = 5.5 Hz, 8H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.18-3.16 (m, 4H, CH₂-N Arg), 2.82 (t, J = 6.2 Hz, 4H, N-C-CH₂-S), 2.44 (t, J = 7.2 Hz, 4H, CH₂ γ Glu), 2.17-1.90 (m, 4H, CH₂ Glu), 1.88-1.60 (m, 8H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 176.3 (COOH Glu), 173.7 (C=O Arg), 173.0 (C=O Glu), 170.9 (C=O Gly), 165.2 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.2 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (C Arg), 53.1 (C α Glu), 42.2 (CH₂ Gly), 40.4 (CH₂-N Arg), 37.9 + 36.4 (N-C-C-S), 33.8 (2 \times CH₂-S NS₂), 29.9 (C γ Glu), 27.9 (C β Arg), 26.4 (C β Glu), 24.2 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 1187.00 (M + H⁺, 4%), 594.39 (M + 2H⁺, 43%), 396.58 (M + 3H⁺, 100%).



1D1 NS₂-R β E-C₂. HPLC : t_R 15.6 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.29 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.25-4.21 (m, 2H, CH α Glu et CH α Arg), 3.87 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.49-3.41 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.36 + 3.35 (2t, J = 6.4 Hz, 2H, N-CH₂-C-S), 3.22 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.17-3.14 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.63 (t, J = 6.4 Hz, 2H, N-C-

CH₂-S), 2.52-2.50 (m, 2H, CH₂-CO βAla), 2.46 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂γ Glu), 2.09-1.81 (m, 2H, CH₂β Glu), 1.82-1.58 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 176.8 (COOH Glu), 173.8 (C=O Arg), 173.4 (C=O Glu), 172.9 (C=OβAla), 164.5 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.1-58.1 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (Cα Arg), 53.4 (Cα Glu), 42.0 (N-C-C-S), 40.4 (CH₂-N Arg), 35.7 (CH₂βAla), 34.6 (CH₂ Ala), 33.7 (2 × CH₂-S NS₂), 29.9 (Cγ Glu), 28.2 (Cβ Arg), 26.2 (Cβ Glu), 24.2 (Cγ Arg), 23.0 (N-C-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 609.07 (M + H⁺, 100%);

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₂H₄₁N₈O₆S₃ 609.2311; trouvé 609.2311.

1D1 dimère (NS₂-RβE-C₂)₂. HPLC : *t_R* 16.0 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.29 (s, 4H, CH₂ NS₂), 4.28-4.22 (m, 4H, CHα Glu et CHα Arg), 3.87 (t, J = 5.6 Hz, 8H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.55-3.50 (m, 4H, CH₂-N βAla), 3.46 (t, J = 6.3 Hz, 4H, N-CH₂-C-S), 3.22 (t, J = 5.6 Hz, 8H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.17-3.14 (m, 4H, CH₂-N Arg), 2.82 (t, J = 6.3 Hz, 4H, N-C-CH₂-S), 2.52-2.49 (m, 4H, CH₂-CO βAla), 2.45 (t, J = 7.4 Hz, 4H, CH₂γ Glu), 2.11-1.88 (m, 4H, CH₂β Glu), 1.81-1.51 (m, 8H, CH₂β et CH₂γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 176.8 (COOH Glu), 173.7 (C=O Arg), 173.3 (C=O Glu), 172.9 (C=O βAla), 164.9 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.2 + 58.1 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (Cα Arg), 53.3 (Cα Glu), 40.4 (CH₂-N Arg), 37.9 + 36.4 (N-C-C-S), 35.7 (CH₂ βAla), 34.6 (CH₂ βAla), 33.7 (2 × CH₂-S NS₂), 29.9 (Cγ Glu), 28.2 (Cβ Arg), 26.2 (Cβ Glu), 24.2 (Cγ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 1215.36 (M + H⁺, 1%), 608.25 (M + 2H⁺, 28%), 405.50 (M + 3H⁺, 100%).

2A1 NS₂-rGd-C₂. HPLC : *t_R* 15.4 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.71 (t, J = 6.7 Hz, 1H, CHα Asp), 4.41 (t, J = 6.6 Hz, 1H, CHα Arg), 4.35 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.99 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.93 (t, J = 5.7 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.42 (t, J = 6.4 Hz, 2H, N-CH₂-C-S), 3.38 (t, J = 5.7 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.24-3.21 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.92-2.88 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.67 (t, J = 6.4 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 1.93-1.65 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 174.2 (COOH Asp), 173.8 (C=O Arg), 172.4 (C=O Asp), 171.0 (C=O Gly), 165.3 (C=O NS₂), 156.7 (C=N Arg), 58.3 + 58.2 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (Cα Arg), 50.4 (Cα Asp), 42.3 (CH₂ Gly et N-C-C-S), 40.5 (CH₂-N Arg), 35.6 (CH₂ Asp), 33.8 (2 × CH₂-S NS₂), 28.1 (Cβ Arg), 24.3 (Cγ Arg), 23.1 (N-C-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 581.23 (M + H⁺, 100%);

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₀H₃₇N₈O₆S₃ 581.1998; trouvé 581.2040.

2A1 dimère (NS₂-rGd-C₂). HPLC : t_R 16.0 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 8.18-8.14 (m, 1H, NH), 4.65 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH α Asp), 4.36-4.29 (m, 6H, CH α Arg et CH₂ NS₂), 3.93 (s, 4H, CH₂ Gly), 3.86 (t, J = 5.3 Hz, 8H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.51-3.49 (m, 4H, N-CH₂-C-S), 3.24-3.15 (m, 12H, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.85-2.80 (m, 8H, CH₂ Asp et N-C-CH₂-S), 1.87-1.62 (m, 8H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 174.4 (COOH Asp), 173.8 (C=O Arg), 172.2 (C=O Asp), 170.8 (C=O Gly), 165.2 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.1 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (C α Arg), 50.2 (C α Asp), 42.3 (CH₂ Gly), 40.4 (CH₂-N Arg), 38.1 (N-C-C-S), 36.4 (N-C-C-S), 36.0 (CH₂ Asp), 33.7 (2 \times CH₂-S NS₂), 27.9 (C β Arg), 24.2 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 580.32 (M + 2H⁺, 10%), 387.19 (M + 3H⁺, 100%).

2B1 N(SH)₂-r β d-C₂. HPLC : t_R 16.7 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.58 (t, J = 6.6 Hz, 1H, CH α Asp), 4.22 (t, J = 6.8 Hz, 1H, CH α Arg), 4.13 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.46-3.40 (m, 6H, 2 \times CH₂-N NS₂ et CH₂-N β Ala), 3.32 (t, J = 6.5 Hz, 2H, N-CH₂-C-S), 3.13 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.84 (t, J = 7.1 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2.79-2.76 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.57 (t, J = 6.5 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 2.46 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂-CO β Ala), 1.81-1.44 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 175.4 (COOH Asp), 175.2 (C=O Arg), 174.4 (C=O β Ala), 173.7 (C=O Asp), 169.8 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 56.6 (2 \times CH₂-N NS₂), 55.6 (CH₂ NS₂), 52.7 (C α Arg), 50.5 (C α Asp), 42.1 (2 \times CH₂-S NS₂), 41.8 (N-C-C-S), 40.2 (CH₂-N Arg), 36.1 + 35.7 (CH₂ β Ala et CH₂ Asp), 34.4 (CH₂ β Ala), 27.8 (C β Arg), 23.5 (C γ Arg), 23.0 (N-C-C-S) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 597.15 (M + H⁺, 68%), 299.61 (M + 2H⁺, 100%) ;

HRMS : m/z calculé pour C₂₁H₃₉N₈O₆S₃ 595.2155 ; trouvé 595.2198.

2C1 N(SH)₂-rGe-C₂. HPLC : t_R 15.7 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.43-4.29 (m, 2H, CH α Arg et CH α Glu), 4.20 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.97 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.51 (t, J = 7.1 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.42-3.37 (m, 2H, N-CH₂-C-S), 3.22 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.92 (t, J = 7.1 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2.66 (t, J = 6.3 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 2.48 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂ γ Glu), 2.21-1.94 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.91-1.55 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.8 (COOH Glu), 174.4 + 174.0 (C=O Arg et C=O Glu), 171.8 (C=O Gly), 166.1 (C=O NS₂), 157.5 (C=N Arg), 57.8 (2 \times CH₂-N NS₂), 55.0 + 54.7 (C α Arg et CH₂ NS₂), 54.2 (C α Glu), 44.2 (2 \times CH₂-S NS₂), 42.9 (N-C-C-S et CH₂ Gly), 41.3 (CH₂-N Arg), 30.8 (C γ Glu), 28.9 (C β Arg), 27.1 (C β Glu), 25.1 (C γ

Arg), 23.9 (N-C-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 597.24 (M + H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₁H₃₉N₈O₆S₃ 595.2155; trouvé 595.2160.

2D1 N(SH)₂-rβe-C₂. HPLC : t_R 16.7 min;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.25-4.21 (m, 2H, CH_α Glu et CH_α Arg), 4.13 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.46-3.41 (m, 6H, 2 × CH₂-N NS₂ et CH₂-N βAla), 3.35-3.30 (m, 2H, N-CH₂-C-S), 3.13 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.85 (t, J = 7.1 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 2.59 (t, J = 6.4 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 2.49-2.34 (m, 4H, CH₂-CO βAla et CH₂γ Glu), 2.11 1.83 (m, 2H, CH₂β Glu), 1.78-1.50 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.0 (COOH Glu), 173.7 (C=O Arg), 173.5 (C=O Glu), 172.8 (C=O βAla), 169.2 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 56.7 (2 × CH₂-N NS₂), 55.6 (CH₂ NS₂), 53.4 (C_α Arg), 52.7 (C_α Glu), 42.1-41.8 (N-C-C-S et CH₂-S NS₂), 40.2 (CH₂-N Arg), 35.7 (CH₂ βAla), 34.3 (CH₂ βAla), 30.1 (C_γ Glu), 27.8 (C_β Arg), 26.2 (C_β Glu), 23.4 (C_γ Arg), 23.0 (N-C-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 611.25 (M + H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₂H₄₁N₈O₆S₃ 609.2311; trouvé 609.2356.

3A1 N(SH)₂-RGd-C₂. HPLC : t_R 16.7 min;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.74-4.71 (m, 1H, CH_α Asp), 4.43-4.40 (m, 1H, CH_α Arg), 4.22 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.98 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.53 (t, J = 7.0 Hz, 4H, 2x CH₂-N NS₂), 3.41 (t, J = 5.9 Hz, 2H, N-CH₂-C-S), 3.23 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.96-2.91 (m, 6H, 2 × CH₂-S NS₂ et CH₂ Asp), 2.66 (t, J = 5.9 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 1.92-1.56 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 175.0 (COOH Asp), 174.3 (C=O Arg), 171.7 (C=O Asp), 170.8 (C=O Gly), 166.1 (C=O NS₂), 157.5 (C=N Arg), 57.7 + 57.5 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.9 (C_α Arg), 51.1 (C_α Asp), 43.1 + 43.0 (CH₂ Gly et N-C-C-S), 41.2 (CH₂-N Arg), 36.4 (CH₂ Asp), 34.7 (2x CH₂-S NS₂), 28.6 (C_β Arg), 25.0 (C_γ Arg), 23.8 (N-C-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 583.19 (M + H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₀H₃₇N₈O₆S₃ 581.1998; trouvé 581.2025.

3B1 NS₂-Rβd-C₂. HPLC : t_R 15.4 min;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.71-4.66 (m, 1H, CH_α Asp), 4.33 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.28 (m, 1H, CH_α Arg), 3.91 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.54 3.48 (m, 2H, CH₂-N βAla), 3.40 (t, J = 6.3 Hz, 2H, N-CH₂-C-S), 3.29-3.24 (m, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.21-3.18 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.95-2.90 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.66 (t, J = 6.3 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 2.54 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂-CO βAla), 1.84-1.24 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

^{13}C RMN (D_2O , 62.5 MHz) : δ 174.1 (COOH Asp), 173.8 (C=O Arg), 173.0 (C=O β Ala), 172.5 (C=O Asp), 165.1 (C=O NS₂), 156.8 (C=N Arg), 58.3 + 58.2 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.9 (C α Arg), 50.3 (C α Asp), 42.3 (N-C-C-S), 40.5 (CH₂-N Arg), 35.8 (CH₂ β Ala et CH₂ Asp), 34.8 (CH₂ β Ala), 33.8 (2 \times CH₂-S NS₂), 28.4 (C β Arg), 24.3 (C γ Arg), 23.1 (N-C-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 595.22 (M + H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₁H₃₉N₈O₆S₃ 595.2155; trouvé 595.2191.

3C1 N(SH)₂-RGe-C₂. HPLC : t_R 16.7 min;

^1H RMN (D_2O , 250 MHz) : δ 4.38-4.26 (m, 2H, CH α Arg et CH α Glu), 4.18 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.94 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.48 (t, J = 7.2 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.39-3.32 (m, 2H, N-CH₂-C-S), 3.18 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.89 (t, J = 7.2 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2.62 (t, J = 6.3 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 2.47 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂ γ Glu), 2.14-1.93 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.85-1.60 (4H, m, CH₂ β et CH₂ γ Arg);

^{13}C RMN (D_2O , 62.5 MHz) : δ 176.9 (COOH Glu), 173.5 + 173.2 (C=O Arg et C=O Glu), 171.0 (C=O Gly), 165.3 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.9 (2 \times CH₂-N NS₂), 54.0 (CH₂ NS₂), 53.9 (C α Arg), 53.3 (C α Glu), 43.4 (2 \times CH₂-S NS₂), 42.2 + 42.1 (N-C-C-S et CH₂ Gly), 40.4 (CH₂-N Arg), 29.9 (C γ Glu), 27.9 (C β Arg), 26.2 (C β Glu), 24.2 (C γ Arg), 23.0 (N-C-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 597.24 (M + H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₁H₃₉N₈O₆S₃ 595.2155; trouvé 595.2197.

3D1 N(SH)₂-R β e-C₂. HPLC : t_R 16.7 min;

^1H RMN (D_2O , 250 MHz) : δ 8.28 (m, 1H, NH), 7.93 (m, 1H, NH), 4.27-4.22 (m, 2H, CH α Arg et CH α Glu), 4.11 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.49-3.43 (m, 6H, CH₂-N β Ala et 2 \times CH₂-N NS₂), 3.34 (t, J = 6.4 Hz, 2H, N-CH₂-C-S), 3.16 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.87 (t, J = 7.2 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2.61 (t, J = 6.4 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 2.51-2.42 (m, 4H, CH₂-CO β Ala et CH₂ γ Glu), 2.09-1.81 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.79-1.50 (4H, m, CH₂ β et CH₂ γ Arg);

^{13}C RMN (D_2O , 62.5 MHz) : δ 178.3 (COOH Glu), 174.5 + 174.4 (C=O Arg et C=O Glu), 170.8 (C=O β Ala), 170.0 (C=O NS₂), 157.5 (C=N Arg), 57.5 (2 \times CH₂-N NS₂), 56.6 (CH₂ NS₂), 54.3 (C α Arg), 53.6 (C α Glu), 44.0 (N-C-C-S), 42.9 (2 \times CH₂-S NS₂), 41.1 (CH₂-N Arg), 36.6 (CH₂ β Ala), 35.3 (CH₂ β Ala), 31.3 (C γ Glu), 28.7 (C β Arg), 27.2 (C β Glu), 24.3 (C γ Arg), 23.9 (N-C-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 611.25 (M + H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₂H₄₁N₈O₆S₃ 609.2311; trouvé 609.2350.

4A1 N(SH)₂-rGD-C₂. HPLC : t_R 16.7 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.72 (m, 1H, CH α Asp), 4.42 (t, J = 6.1 Hz, 1H, CH α Arg), 4.23 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.00 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.54 (t, J = 7.0 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.42 (t, J = 5.9 Hz, 2H, N-CH₂-C-S), 3.24 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.97-2.92 (m, 6H, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂ Asp), 2.67 (t, J = 5.9 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 1.90-1.60 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 175.0 (COOH Asp), 174.2 (C=O Arg), 173.1 (C=O Asp), 171.7 (C=O Gly), 166.1 (C=O NS₂), 157.4 (C=N Arg), 57.7 + 57.5 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.6 (C α Arg), 51.2 (C α Asp), 43.1 (CH₂ Gly), 43.0 (N-C-C-S), 41.2 (CH₂-N Arg), 36.4 (CH₂ Asp), 34.7 (2 \times CH₂-S NS₂), 28.8 (C β Arg), 25.0 (C γ Arg), 23.8 (N-C-C-S) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 583.24 (M + H⁺, 100%) ;

HRMS : m/z calculé pour C₂₀H₃₇N₈O₆S₃ 581.1998 ; trouvé 581.1976.

4B1 NS₂-r β D-C₂. HPLC : t_R 15.4 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.64 (m, 1H, CH α Asp), 4.26-3.22 (m, 3H, CH₂ NS₂ et CH α Arg), 3.82 (m, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.51-3.48 (m, 4H, CH₂-N β Ala et N-CH₂-C-S), 3.27-3.20 (m, 6H, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.83 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.76-2.61 (m, 2H, N-C-CH₂-S), 2.50 (m, 2H, CH₂-CO β Ala), 1.90-1.55 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg).

ES/MS (ionisation positive) : m/z 595.22 (M + H⁺, 100%) ;

HRMS : m/z calculé pour C₂₁H₃₉N₈O₆S₃ 595.2155 ; trouvé 595.2184.

4C1 NS₂-rGE-C₂. HPLC : t_R 15.7 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.32-4.22 (m, 2H, CH α Arg et CH α Glu), 4.28 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.90 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.85 (t, J = 5.1 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.35-3.29 (m, 2H, N-CH₂-C-S), 3.19 (t, J = 5.1 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.17-3.12 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.58 (t, J = 6.2 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 2.43 (t, J = 7.3 Hz, 2H, CH₂ γ Glu), 2.15-1.88 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.80-1.59 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.3 (COOH Glu), 174.1 (C=O Arg), 173.5 (C=O Glu), 171.3 (C=O Gly), 165.7 (C=O NS₂), 156.0 (C=N Arg), 58.6 + 58.3 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.2 (C α Arg), 53.5 (C α Glu), 42.4 + 42.3 (N-C-C-S et CH₂ Gly), 40.7 (CH₂-N Arg), 34.1 (2 \times CH₂-S NS₂), 29.8 (C γ Glu), 28.1 (C β Arg), 26.3 (C β Glu), 24.5 (C γ Arg), 23.3 (N-C-C-S) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 595.20 (M + H⁺, 100%) ;

HRMS : m/z calculé pour C₂₁H₃₉N₈O₆S₃ 595.2155 ; trouvé 595.2189.

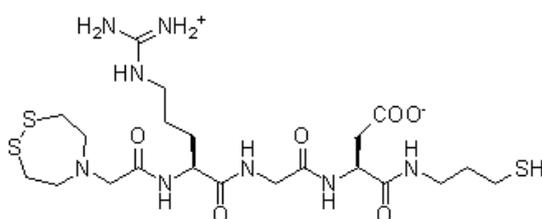
4D1 NS₂-rβE-C₂. HPLC : t_R 15.5 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.25 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.25-4.17 (m, 2H, CH α Glu et CH α Arg), 3.83 (t, J = 5.4 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.47-3.40 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.32 (t, J = 6.4 Hz, 2H, N-CH₂-C-S), 3.18 (t, J = 5.4 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.15-3.10 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.58 (t, J = 6.4 Hz, 2H, N-C-CH₂-S), 2.48-2.39 (m, 4H, CH₂-CO β Ala et CH₂ γ Glu), 2.16-1.88 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.82-1.56 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.0 (COOH Glu), 173.7 (C=O Arg), 173.4 (C=O Glu), 172.9 (C=O β Ala), 165.0 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.1-57.9 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (C α Arg), 53.3 (C α Glu), 42.0 (N-C-C-S), 40.3 (CH₂-N Arg), 35.6 (CH₂ β Ala), 34.6 (CH₂ β Ala), 33.7 (2 \times CH₂-S NS₂), 30.1 (C γ Glu), 28.1 (C β Arg), 26.2 (C β Glu), 24.2 (C γ Arg), 23.0 (N-C-C-S) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 609.18 (M + H⁺, 15%), 305.28 (M + 2H⁺, 100%) ;

HRMS : m/z calculé pour C₂₂H₄₁N₈O₆S₃ 609.2311 ; trouvé 609.2335.



1A2 NS₂-RGD-C₃. HPLC : t_R 16.0 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.63-4.59 (m, 1H, CH α Asp), 4.33-4.31 (m, 1H, CH α Arg), 4.29 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.91 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.86 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.29-3.27 (m, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.21 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.17-3.14 (m, 2H,

CH₂-N Arg), 2.84-2.81 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.47 (t, J = 6.9 Hz, 2H, N-C-C-CH₂-S), 1.83-1.61 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg), 1.79-1.71 (m, 2H, N-C-CH₂-C-S) ;

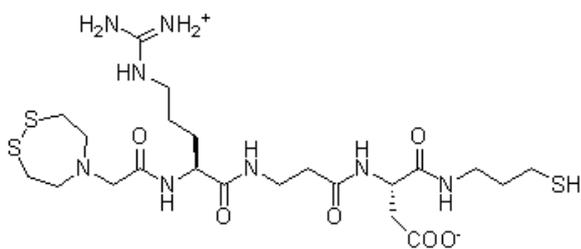
¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 174.1 (COOH Asp), 173.8 (C=O Arg), 172.0 (C=O Asp), 170.8 (C=O Gly), 165.1 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.2-58.0 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (C α Arg), 50.2 (C α Asp), 42.3 (CH₂ Gly), 40.4 (CH₂-N Arg), 37.8 (N-C-C-C-S), 35.5 (CH₂ Asp), 33.7 (2 \times CH₂-S NS₂), 32.2 (N-C-C-C-S), 28.0 (C β Arg), 24.2 (C γ Arg), 20.8 (N-C-C-C-S) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 595.21 (M + H⁺, 100 %) ; **HRMS** : m/z calculé pour C₂₁H₃₉N₈O₆S₃ 595.2155 ; trouvé 595.2162.

1A2 dimère (NS₂-RGD-C₃)₂. HPLC : t_R 16.9 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.70 (m, 2H, CH α Asp), 4.33 (m, 2H, CH α Arg), 4.31 (s, 4H, CH₂ NS₂), 3.92 (s, 4H, CH₂ Gly), 3.86 (t, J = 5.4 Hz, 8H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.28 (m, 4H, N-CH₂-C-C-S), 3.22 (t, J = 5.4 Hz, 8H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.18-3.15 (m, 4H, CH₂-N Arg), 2.82-2.79 (m, 4H, CH₂ Asp), 2.68 (t, J = 7.1 Hz, 4H, N-C-C-CH₂-S), 1.89-1.83 (m, 4H, N-C-CH₂-C-S), 1.80-1.62 (m, 8H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 1187.00 (M + H⁺, 2%), 594.33 (M + 2H⁺, 42%), 396.58 (M + 3H⁺, 100%).



1B2 NS₂-RβD-C₃. HPLC : t_R 15.9 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.57 (t, J = 6.6 Hz, 1H, CH α Asp), 4.27 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.23-4.18 (m, 1H, CH α Arg), 3.85 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.46-3.40 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.30-3.23 (m, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.21 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times

CH₂-S NS₂), 3.16-3.13 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.81-2.76 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.48 (t, J = 6.8 Hz, 2H, N-C-C-CH₂-S), 2.49-2.45 (m, 2H, CH₂-CO β Ala), 1.87-1.50 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg), 1.77-1.71 (m, 2H, N-C-CH₂-C-S) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 174.1 (COOH Asp), 173.7 (C=O Arg), 172.9 (C=O β Ala), 172.3 (C=O Asp), 165.0 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.1 + 58.1 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (C α Arg), 50.3 (C α Asp), 40.4 (CH₂-N Arg), 37.7 (N-C-C-C-S), 35.7 + 35.6 (CH₂ β Ala et CH₂ Asp), 34.7 (CH₂ β Ala), 33.7 (2 \times CH₂-S NS₂), 32.2 (N-C-C-C-S), 28.2 (C β Arg), 24.2 (C γ Arg), 20.8 (N-C-C-C-S) ;

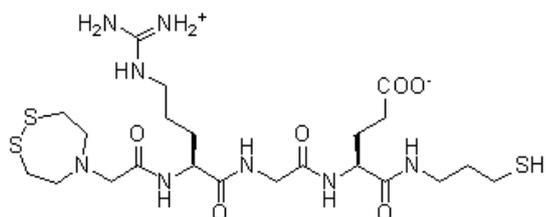
ES/MS (ionisation positive) : m/z 609.20 (M + H⁺, 18%), 304.99 (M + 2H⁺, 100%) ;

HRMS : m/z calculé pour C₂₂H₄₁N₈O₆S₃ 609.2311 ; trouvé 609.2327.

1B2 dimère (NS₂-RβD-C₃)₂. HPLC : t_R 16.7 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ = 4.57 (t, J = 5.9 Hz, 2H, CH α Asp), 4.27 (s, 4H, CH₂ NS₂), 4.23-4.18 (m, 2H, CH α Arg), 3.85 (t, J = 5.4 Hz, 8H, 2x CH₂-N NS₂), 3.47-3.43 (m, 4H, CH₂-N β Ala), 3.28-3.26 (m, 4H, N-CH₂-C-C-S), 3.21 (t, J = 5.4 Hz, 8H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.16-3.13 (m, 4H, CH₂-N Arg), 2.80-2.75 (m, 4H, CH₂ Asp), 2.68 (t, J = 6.8 Hz, 4H, N-C-C-CH₂-S), 2.48 (t, J = 5.8 Hz, 4H, CH₂-CO β Ala), 1.92-1.50 (m, 8H, CH₂ β et CH₂ γ Arg), 1.85-1.80 (4H, m, N-C-CH₂-C-S) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 1215.44 (M + H⁺, 4%), 608.39 (M + 2H⁺, 38%), 405.91 (M + 3H⁺, 100%).



1C2 NS₂-RGE-C₃. HPLC : t_R 16.3 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.30-4.28 (m, 1H, CH α Arg), 4.25 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.21-4.18 (m, 1H, CH α Glu), 3.88 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.82 (t, J = 5.7 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.23 (t, J = 6.6 Hz, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.18 (t, J = 5.7 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.14-3.11 (m,

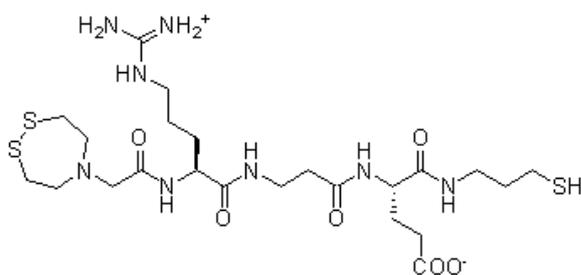
2H, CH₂-N Arg), 2.45 (t, J = 7.0 Hz, 2H, N-C-C-CH₂-S), 2.39-2.35 (m, 2H, CH₂ γ Glu), 2.05-1.84 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.77-1.66 (m, 2H, N-C-CH₂-C-S) , 1.64-1.56 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.1 (COOH Glu), 173.7 (C=O Arg), 173.0 (C=O

Glu), 170.9 (C=O Gly), 165.3 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.2-57.9 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (C_α Arg), 53.3 (C_α Glu), 42.1 (CH₂ Gly), 40.4 (CH₂-N Arg), 37.6 (N-C-C-C-S), 33.8 (2 × CH₂-S NS₂), 32.1 (N-C-C-C-S), 30.0 (C_γ Glu), 28.0 (C_β Arg), 26.2 (C_β Glu), 24.2 (C_γ Arg), 20.8 (N-C-C-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 609.18 (M + H⁺, 50%), 305.00 (M + 2H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₂H₄₁N₈O₆S₃ 609.2311; trouvé 609.2326.



1D2 NS₂-R_βE-C₃. HPLC : t_R 16.2 min;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.29 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.25-4.20 (m, 2H, CH_α Glu et CH_α Arg), 3.87 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.44 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂-N β Ala), 3.25 (m, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.23 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.17-3.14 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.50 (t, J = 6.8 Hz,

2H, N-C-C-CH₂-S), 2.46 (m, 2H, CH₂-CO β Ala), 2.44 (t, J = 7.4 Hz, 2H, CH₂ γ Glu), 2.07-1.84 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.79-1.74 (m, 2H, N-C-CH₂-C-S), 1.82-1.58 (4H, m, CH₂ β et CH₂ γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 176.8 (COOH Glu), 173.7 (C=O Arg), 173.2 (C=O Glu), 172.9 (C=O β Ala), 164.9 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 58.1 + 58.0 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (C_α Arg), 53.4 (C_α Glu), 40.4 (CH₂-N Arg), 37.6 (N-C-C-C-S), 35.7 (CH₂ β Ala), 34.6 (CH₂ β Ala), 33.7 (2 × CH₂-S NS₂), 32.2 (N-C-C-C-S), 30.0 (C_γ Glu), 28.2 (C_β Arg), 26.2 (C_β Glu), 24.2 (C_γ Arg), 21.0 (N-C-C-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 623.23 (M + H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₃H₄₃N₈O₆S₃ 623.2468; trouvé 623.2479.

2A2 dimère (NS₂-rGd-C₃)₂. HPLC : t_R 16.9 min;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.55 (t, J = 5.9 Hz, 1H, CH_α Asp), 4.43 (t, J = 6.5 Hz, 1H, CH_α Arg), 3.95 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.75 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.52-3.44 (m, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.36-3.31 (m, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.25 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 3.12-3.01 (m, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 2.77-2.67 (m, 4H, CH₂ Asp et N-C-C-CH₂-S), 1.97-1.63 (6H, m, CH₂ β et CH₂ γ Arg et N-C-CH₂-C-S);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 178.1 (COOH Asp), 174.8 (C=O Arg), 174.5 (C=O Asp), 171.4 (C=O Gly), 169.6 (C=O NS₂), 157.5 (C=N Arg), 59.4 (CH₂ NS₂), 57.6 (2 × CH₂-N NS₂), 53.5 (C_α Arg), 51.6 (C_α Asp), 43.7 (CH₂ Gly), 41.4 (CH₂-N Arg), 39.2 (2 × CH₂-S NS₂), 38.7 + 38.5 (N-C-C-C-S et CH₂ Asp), 35.7 (N-C-C-C-S), 30.1 (C_β Arg), 28.9 (C_γ Arg), 25.1 (N-C-C-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 594.15 (M + 2H⁺, 30%), 396.55 (M + 3H⁺, 100%);

HRMS (M + 2H⁺) : m/z calculé pour C₂₁H₃₈N₈O₆S₃ 594.2076; trouvé 594.2087.

2B2 dimère (NS₂-rβd-C₃)₂. HPLC : t_R 16.7 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.58 (t, J = 6.5 Hz, 1H, CH_α Asp), 4.27 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.24 (t, J = 7.1 Hz, 1H, CH_α Arg), 3.85 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.44 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂-N βAla), 3.28-3.14 (m, 4H, N-CH₂-C-C-S et CH₂-N Arg), 3.22 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 2.78 + 2.68 (2t, J = 6.7 Hz et 6.2 Hz, 4H, CH₂ Asp et N-C-C-CH₂-S), 2.48 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂-CO βAla), 1.95-1.51 (m, 6H, CH₂β et CH₂γ Arg et N-C-CH₂-C-S) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 175.1 (COOH Asp), 174.4 (C=O Arg), 173.7 (C=O βAla), 173.1 (C=O Asp), 165.9 (C=O NS₂), 157.3 (C=N Arg), 58.8 + 58.6 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.4 (C_α Arg), 51.2 (C_α Asp), 41.1 (CH₂-N Arg), 38.6 (N-C-C-C-S), 36.4 + 35.5 + 35.7 (2 × CH₂ βAla, CH₂ Asp et N-C-C-C-S), 34.5 (2 × CH₂-S NS₂), 28.9 + 28.4 (C_β Arg et N-C-C-C-S), 25.0 (C_γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 608.40 (M + 2H⁺, 6%), 406.10 (M + 3H⁺, 50%), 304.99 (M + 4H⁺, 100%) ;

HRMS (M + 2H⁺) : m/z calculé pour C₂₂H₄₀N₈O₆S₃ 608.2233 ; trouvé 608.2222.

2C2 dimère (NS₂-rGe-C₃)₂. HPLC : t_R 16.8 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.44 (t, J = 6.5 Hz, 1H, CH_α Arg), 4.25 (m, 1H, CH_α Glu), 3.97 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.66 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.39 (t, J = 5.3 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.34-3.31 (m, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.26 (t, J = 6.5 Hz, 4H, CH₂-N Arg), 3.08-2.97 (m, 2H, 2 × CH₂-S NS₂), 2.76 (t, J = 7.0 Hz, 2H, N-C-C-CH₂-S), 2.28 (t, J = 7.7 Hz, 2H, CH₂γ Glu), 2.10-1.63 (m, 8H, CH₂β Glu, N-C-CH₂-C-S, CH₂β et CH₂γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 608.20 (M + 2H⁺, 7%), 405.98 (M + 3H⁺, 50%), 304.81 (M + 4H⁺, 100%) ;

HRMS (M + 2H⁺) : m/z calculé pour C₂₂H₄₀N₈O₆S₃ 608.2233 ; trouvé 608.2204.

2D2 dimère (NS₂-rβe-C₃)₂. HPLC : t_R 16.6 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.27 (t, J = 6.6 Hz, 1H, CH_α Arg), 4.16 (m, 1H, CH_α Glu), 3.86 (2H, s, CH₂ NS₂), 3.53 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.48-3.41 (m, 2H, CH₂-N βAla), 3.28 (m, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.18 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 3.09-3.03 (m, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 2.70 (t, J = 6.9 Hz, 2H, N-C-C-CH₂-S), 2.49 (m, 2H, CH₂-CO βAla), 2.28 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂γ Glu), 2.04-1.52 (m, 8H, CH₂β Glu, N-C-CH₂-C-S, CH₂β et CH₂γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 180.8 (COOH Glu), 174.5 + 174.3 + 173.8 (C=O Arg, C=O Glu et C=O βAla), 170.5 (C=O NS₂), 157.3 (C=N Arg), 58.9 (CH₂ NS₂), 57.9 (2 × CH₂-N NS₂), 54.7 (C_α Arg), 54.1 (C_α Glu), 41.1 (CH₂-N Arg), 38.5 (N-C-C-C-S), 37.2 (CH₂ βAla et C_γ Glu), 35.7 (N-C-C-C-S), 35.5 (CH₂ βAla), 33.5 (2 × CH₂-S NS₂), 29.2 + 28.5 (C_β Arg et N-C-C-C-S), 28.2 (C_β Glu), 25.1 (C_γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 622.33 (M + 2H⁺, 12%), 415.35 (M + 3H⁺, 53%),

311.86 (M + 4H⁺, 100%);

HRMS (M + 2H⁺) : *m/z* calculé pour C₂₃H₄₂N₈O₆S₃ 622.2389; trouvé 622.2380.

3A2 dimère (NS₂-RGd-C₃)₂. HPLC : *t_R* 16.8 min;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.51 (t, J = 6.4 Hz, 1H, CH_α Asp), 4.38 (t, J = 6.5 Hz, 1H, CH_α Arg), 3.94 + 3.91 (2s, 2H, CH₂ NS₂), 3.71 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.42 (t, J = 5.4 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.36-3.26 (m, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.21 (t, J = 6.5 Hz, 4H, CH₂-N Arg), 3.08-2.96 (m, 2H, 2x CH₂-S NS₂), 2.72-2.56 (m, 4H, CH₂ Asp et N-C-C-CH₂-S), 1.95-1.60 (m, 6H, CH₂β et CH₂γ Arg et N-C-CH₂-C-S);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 594.48 (M + 2H⁺, 25 %), 396.77 (M + 3H⁺, 100%);

HRMS (M + 2H⁺) : *m/z* calculé pour C₂₁H₃₈N₈O₆S₃ 594.2076; trouvé 594.2076.

3B2 dimère (NS₂-Rβd-C₃)₂. HPLC : *t_R* 16.8 min;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.62 (t, J = 6.6 Hz, 1H, CH_α Asp), 4.30 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.25 (t, J = 7.0 Hz, 1H, CH_α Arg), 3.88 (t, J = 5.3 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.52-3.39 (m, 2H, CH₂-N βAla), 3.35-3.25 (m, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.24 (t, J = 5.3 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.22-3.16 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.83 (t, J = 7.4 Hz, 2H, N-C-C-CH₂-S), 2.71 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂ Asp), 2.50 (t, J = 6.1 Hz, 2H, CH₂-CO βAla), 1.96-1.85 (m, 2H, N-C-CH₂-C-S), 1.83-1.55 (4H, m, CH₂β et CH₂γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 174.7 + 174.3 + 173.6 + 172.8 (COOH Asp, C=O Arg, C=O βAla et C=O Asp), 165.7 (C=O NS₂), 157.3 (C=N Arg), 58.9 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.5 (C_α Arg), 51.0 (C_α Asp), 41.1 (CH₂-N Arg), 38.6 (N-C-C-C-S), 36.4 (CH₂ βAla et CH₂ Asp), 35.7 (N-C-C-C-S), 35.5 (CH₂ βAla), 34.5 (2 × CH₂-S NS₂), 28.9 + 28.5 (C_β Arg et N-C-C-C-S), 25.0 (C_γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 608.36 (M + 2H⁺, 5%), 406.12 (M + 3H⁺, 60%), 304.94 (M + 4H⁺, 100%);

HRMS (M + 2H⁺) : *m/z* calculé pour C₂₂H₄₀N₈O₆S₃ 608.2233; trouvé 608.2256.

3C2 dimère (NS₂-RGe-C₃)₂. HPLC : *t_R* 16.9 min;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.51-4.47 (m, 1H, CH_α Arg), 4.21-4.18 (m, 1H, CH_α Glu), 4.00 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.65 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.38 (t, J = 5.7 Hz, 4H, 2x CH₂-N NS₂), 3.28 (t, J = 7.2 Hz, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.10-2.99 (m, 6H, 2 × CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.78 (t, 2H, J = 7.2 Hz, N-C-C-CH₂-S), 2.33 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂γ Glu), 2.15-2.05 (2H, m, CH₂β Glu), 2.05-1.65 (m, 6H, N-C-CH₂-C-S et CH₂β et CH₂γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 608.33 (M + 2H⁺, 8%), 406.07 (M + 3H⁺, 67%), 304.94 (M + 4H⁺, 100%);

HRMS (M + 2H⁺) : *m/z* calculé pour C₂₂H₄₀N₈O₆S₃ 608.2233; trouvé 608.2212.

3D2 dimère (NS₂-Rβe-C₃)₂. HPLC : t_R 16.7 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.33-4.25 (m, 2H, CH α Glu et CH α Arg), 4.29 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.90 (m, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.53 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.37-3.25 (m, 4H, N-CH₂-C-C-S et CH₂-N Arg), 3.32 3.28 (m, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2.80 (t, J = 6.8 Hz, 2H, N-C-C-CH₂-S), 2.57-2.47 (m, 4H, CH₂-CO β Ala et CH₂ γ Glu), 2.18-1.95 (m, 4H, CH₂ β Glu et N-C-CH₂-C-S), 1.93-1.65 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.1 (COOH Glu), 174.2 (C=O Arg), 173.7-173.5 (C=O Glu et C=O β Ala), 166.4 (C=O NS₂), 157.3 (C=N Arg), 58.8 (CH₂ NS₂), 58.7 (2 \times CH₂-N NS₂), 54.4 (C α Arg), 53.9 (C α Glu), 41.1 (CH₂-N Arg), 38.5 (N-C-C-C-S), 36.4 (CH₂ β Ala), 35.8 (N-C-C-C-S), 35.4 (CH₂ β Ala), 34.9 (2 \times CH₂-S NS₂), 31.1 (C γ Glu), 29.0 + 28.6 (C β Arg et N-C-C-C-S), 27.3 (C β Glu), 25.0 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 622.19 (M + 2H⁺, 20%), 415.25 (M + 3H⁺, 75%), 311.76 (M + 4H⁺, 100%) ;

HRMS (M + 2H⁺) : m/z calculé pour C₂₃H₄₂N₈O₆S₃ 622.2389 ; trouvé 622.2394.

4A2 dimère (NS₂-rGD-C₃)₂. HPLC : t_R 17.0 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.53 (m, 1H, CH α Asp), 4.41 (t, J = 6.6 Hz, 1H, CH α Arg), 3.96 + 3.93 (2s, 2H, CH₂ NS₂), 3.69 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.41 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.35-3.28 (m, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.23 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 3.04-2.97 (m, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2.74-2.56 (m, 4H, CH₂ Asp et N-C-C-CH₂-S), 1.98-1.64 (m, 8H, CH₂ Arg, N-C-CH₂-C-S et CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 594.26 (M + 2H⁺, 28 %), 396.61 (M + 3H⁺, 100%) :

HRMS (M + 2H⁺) : m/z calculé pour C₂₁H₃₈N₈O₆S₃ 594.2076 ; trouvé 594.2071.

4B2 dimère (NS₂-rβD-C₃)₂. HPLC : t_R 16.6 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.57 (m, 1H, CH α Asp), 4.29 (t, J = 6.7 Hz, 1H, CH α Arg), 4.10 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.73 (t, J = 5.4 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.48 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.31 (m, 2H, N-CH₂-C-C-S), 3.24-3.16 (m, 6H, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.77-2.60 (m, 4H, CH₂ Asp et N-C-C-CH₂-S), 2.51 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂-CO β Ala), 1.95-1.87 (m, 2H, N-C-CH₂-C-S), 1.87-1.55 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.1 (COOH Asp), 174.3 (C=O Arg), 173.7 + 173.6 (C=O β Ala et C=O Asp), 168.2 (C=O NS₂), 157.3 (C=N Arg), 58.8 (CH₂ NS₂), 58.3 (2 \times CH₂-N NS₂), 54.3 (C α Arg), 52.1 (C α Asp), 41.1 (CH₂-N Arg), 38.7 + 38.6 (N-C-C-C-S et CH₂ Asp), 36.5-35.6 (CH₂ β Ala), 35.9 (2 \times CH₂-S NS₂), 35.7 (CH₂ β Ala et N-C-C-C-S), 29.0 + 28.5 (C β Arg et N-C-C-C-S), 25.0 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 608.25 (M + 2H⁺, 20%), 405.93 (M + 3H⁺, 75%), 304.63 (M + 4H⁺, 100%) ;

HRMS (M + 2H⁺) : m/z calculé pour C₂₂H₄₀N₈O₆S₃ 608.2233 ; trouvé 608.2241.

4C2 dimère (NS₂-rGE-C₃)₂. HPLC : t_R 16.9 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.35-4.27 (m, 2H, CH α Arg et CH α Glu), 4.29 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.94 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.90 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.38-3.18 (m, 8H, N-CH₂-C-C-S, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.72 (t, J = 6.8 Hz, 2H, N-C-C-CH₂-S), 2.46 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂ γ Glu), 2.16-1.93 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.95-1.86 (m, 2H, N-C-CH₂-C-S), 1.89-1.60 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.5 (COOH Glu), 174.4 (C=O Arg), 173.4 (C=O Glu), 171.5 (C=O Gly), 166.3 (C=O NS₂), 157.3 (C=N Arg), 59.0 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.7 (C α Arg), 53.7 (C α Glu), 42.9 (CH₂ Gly), 41.1 (CH₂-N Arg), 38.5 (N-C-C-C-S), 35.7 (N-C-C-C-S), 34.6 (2 \times CH₂-S NS₂), 30.8 (C γ Glu), 28.5 (C β Arg et N-C-C-C-S), 27.2 (C β Glu), 24.9 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 608.26 (M + 2H⁺, 18%), 405.98 (M + 3H⁺, 65%), 304.81 (M + 4H⁺, 100%) ;

HRMS (M + 2H⁺) : m/z calculé pour C₂₂H₄₀N₈O₆S₃ 608.2233 ; trouvé 608.2253.

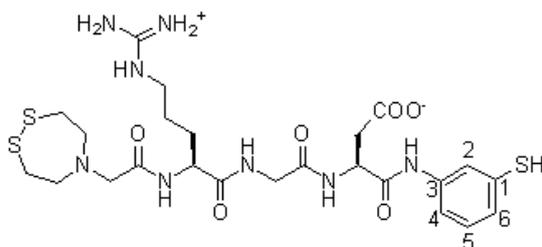
4D2 dimère (NS₂-r β E-C₃)₂. HPLC : t_R 16.7 min ;

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 4.28 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.28-4.22 (m, 2H, CH α Glu et CH α Arg), 3.87 (t, J = 5.2 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.52 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.46-3.17 (m, 8H, N-CH₂-C-C-S, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.73 (t, J = 6.8 Hz, 2H, N-C-C-CH₂-S), 2.53-2.42 (m, 4H, CH₂-CO β Ala et CH₂ γ Glu), 2.12 1.53 (m, 8H, CH₂ β Glu, N-C-CH₂-C-S et CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.7 (COOH Glu), 174.3 (C=O Arg), 173.7-173.6 (C=O Glu et C=O β Ala), 165.9 (C=O NS₂), 157.3 (C=N Arg), 58.8 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.4 (C α Arg), 53.9 (C α Glu), 41.1 (CH₂-N Arg), 38.5 (N-C-C-C-S), 36.4 (CH₂ β Ala), 35.8 (N-C-C-C-S), 35.4 (CH₂ β Ala), 34.6 (2 \times CH₂-S NS₂), 30.9 (C γ Glu), 28.9 + 28.5 (C β Arg et N-C-C-C-S), 27.2 (C β Glu), 25.0 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 622.24 (M + 2H⁺, 8%), 415.30 (M + 3H⁺, 65%), 311.80 (M + 4H⁺, 100%) ;

HRMS (M + 2H⁺) : m/z calculé pour C₂₃H₄₂N₈O₆S₃ 622.2389 ; trouvé 622.2399.



1A3 NS₂-RGD-m.

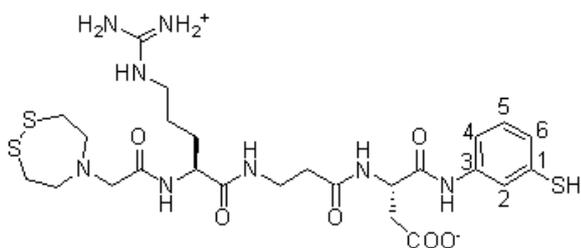
¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 8.21 (bs, 1H, NH), 7.76 (bs, 1H, NH), 7.40 (s, 1H, H₂ arom), 7.32 7.11 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.74-4.71 (m, 1H, CH α Asp), 4.31 (t, J=6.7 Hz, 1H, CH α Arg), 4.22 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.94 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.78 (t, J = 5.3 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.16-3.07 (m, 6H, 2 \times CH₂-S NS₂ et

CH₂-N Arg), 2.89-2.83 (m, 2H, CH₂ Asp), 1.80-1.55 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

^{13}C RMN (D_2O , 62.5 MHz) : δ 174.8 (COOH Asp), 173.9 (C=O Arg), 171.0 + 171.0 (C=O Asp et Gly C=O), 165.3 (C=O NS₂), 156.5 (C=N Arg), 136.9 (C₃ arom), 132.0 (C₁ arom), 129.8 (C₅ arom), 125.9 (C₆ arom), 121.6 (C₂ arom), 118.8 (C₄ arom), 58.0 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.8 (C α Arg), 50.9 (C α Asp), 42.5 (CH₂ Gly), 40.4 (CH₂-N Arg), 35.9 (CH₂ Asp), 33.7 (2 \times CH₂-S NS₂), 27.9 (C β Arg), 24.0 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 629.19 (M + H⁺, 25%), 315.17 (M + 2H⁺, 100%) ;

HRMS : m/z calculé pour C₂₄H₃₇N₈O₆S₃ 629.1998 ; trouvé : 629.1989.



1B3 NS₂-R β D-m.

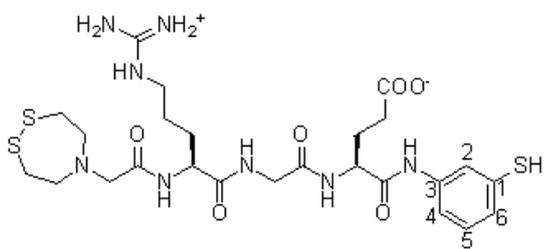
^1H RMN (D_2O , 250 MHz) : δ 7.36 (s, 1H, H₂ arom), 7.22-7.07 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.72-4.70 (m, 1H, CH α Asp), 4.18 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.15-4.13 (m, 1H, CH α Arg), 3.75 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.51-3.33 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.13 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2.94

(t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.89-2.82 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.48 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH₂-CO β Ala), 1.68 1.40 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

^{13}C RMN (D_2O , 62.5 MHz) : δ 174.7 (COOH Asp), 174.4 (C=O Arg), 173.6 (C=O β Ala), 171.7 (C=O Asp), 165.6 (C=O NS₂), 157.1 (C=N Arg), 137.6 (C₃ arom), 132.9 (C₁ arom), 130.5 (C₅ arom), 126.5 (C₆ arom), 122.3 (C₂ arom), 119.5 (C₄ arom), 58.8 + 58.7 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.4 (C α Arg), 51.4 (C α Asp), 41.0 (CH₂-N Arg), 36.3 + 36.1 (CH₂ β Ala et CH₂ Asp), 35.3 (CH₂ β Ala), 34.4 (2 \times CH₂-S NS₂), 28.8 (C β Arg), 24.8 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 643.24 (M + H⁺, 10%), 322.06 (M + 2H⁺, 100%) ;

HRMS : m/z calculé pour C₂₅H₃₉N₈O₆S₃ 643.2155 ; trouvé : 643.2180.



1C3 NS₂-RGE-m.

^1H RMN (D_2O , 250 MHz) : δ 7.68 (s, 1H, H₂ arom), 7.17-7.02 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.37-4.31 (m, 1H, CH α Glu), 4.20 (t, J = 6.5 Hz, 1H, CH α Arg), 4.11 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.88 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.65-3.52 (m, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.12-3.01 (m, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.00-2.85 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.45-2.32

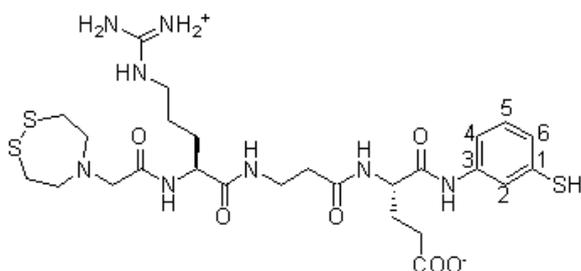
(m, 2H, CH₂ γ Glu), 2.12-1.89 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.78-1.45 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

^{13}C RMN (D_2O , 62.5 MHz) : δ 177.0 (COOH Glu), 173.8 (C=O Arg), 171.0 + 170.9 (C=O Glu et C=O Gly), 163.1 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 137.8 (C₃ arom), 132.4

(C₁ arom), 129.8 (C₅ arom), 124.1 (C₆ arom), 121.7 (C₂ arom), 118.6 (C₄ arom), 58.2 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.0 (C_α Arg et C_α Glu), 42.4 (CH₂ Gly), 40.4 (CH₂-N Arg), 33.9 (2 × CH₂-S NS₂), 30.1 (C_γ Glu), 27.8 (C_β Arg), 26.5 (C_β Glu), 24.1 (C_γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 643.20 (M + H⁺, 38%), 322.28 (M + 2H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₅H₃₉N₈O₆S₃ 643.2155; trouvé : 643.2173.



1D3 NS₂-R_βE-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.38 (s, 1H, H₂ arom), 7.21-7.06 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.35 (t, J = 5.9 Hz, 1H, CH_α Arg), 4.19 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.16-4.14 (m, 1H, CH_α Glu), 3.75 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.56-3.31 (m, 2H, CH₂-N βAla), 3.14 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 × CH₂-

S NS₂), 2.92 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.50-2.44 (m, 4H, CH₂γ Glu et CH₂-CO βAla), 2.14-1.94 (m, 2H, CH₂β Glu), 1.62-1.41 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 176.7 (COOH Glu), 173.7 (C=O Arg), 172.9 (C=O Glu), 171.9 (C=O βAla), 164.8 (C=O NS₂), 156.3 (C=N Arg), 137.0 (C₃ arom), 132.1 (C₁ arom), 129.89 (C₅ arom), 125.7 (C₆ arom), 121.3 (C₂ arom), 118.5 (C₄ arom), 58.1 + 58.0 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (C_α Arg), 53.5 (C_α Glu), 40.3 (CH₂-N Arg), 35.6 (CH₂ βAla), 34.2 (CH₂ βAla), 33.6 (2 × CH₂-S NS₂), 29.8 (C_γ Glu), 28.1 (C_β Arg), 26.2 (C_β Glu), 24.0 (C_γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 657.29 (M + H⁺, 5%), 329.12 (M + 2H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₆H₄₁N₈O₆S₃ 657.2311; trouvé : 657.2316.

2A3 NS₂-rGd-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.37 (s, 1H, H₂ arom), 7.26-7.09 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.74 (m, 1H, CH_α Asp), 4.32-4.26 (m, 1H, CH_α Arg), 4.21 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.91 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.76 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.12 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.07-3.04 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.90 (t, J = 5.3 Hz, 2H, CH₂ Asp), 1.77-1.52 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 174.8 (COOH Asp), 174.6 (C=O Arg), 171.7 (C=O Asp), 171.5 (C=O Gly), 165.7 (C=O NS₂), 157.2 (C=N Arg), 137.5 (C₃ arom), 132.8 (C₁ arom), 130.5 (C₅ arom), 126.6 (C₆ arom), 122.3 (C₂ arom), 119.5 (C₄ arom), 58.8 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.4 (C_α Arg), 51.4 (C_α Asp), 43.1 (CH₂ Gly), 41.7 (CH₂-N Arg), 36.0 (CH₂ Asp), 34.5 (2 × CH₂-S NS₂), 28.5 (C_β Arg), 24.8 (C_γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 629.18 (M + H⁺, 25%), 314.83 (M + 2H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₄H₃₇N₈O₆S₃ 629.1998; trouvé : 629.1983.

2B3 NS₂-rβd-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.36 (s, 1H, H₂ arom), 7.22-7.07 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.72-4.71 (m, 1H, CH_α Asp), 4.18 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.16-4.13 (m, 1H, CH_α Arg), 3.75 (t, J = 5.7 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.49-3.37 (m, 2H, CH₂-N βAla), 3.13 (t, J = 5.7 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 2.97-2.92 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.89-2.81 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.48 (t, J = 5.9 Hz, 2H, CH₂-CO βAla), 1.62-1.44 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 174.0 (COOH Asp), 173.7 (C=O Arg), 172.9 (C=O βAla), 171.0 (C=O Asp), 164.9 (C=O NS₂), 156.4 (C=N Arg), 136.9 (C₃ arom), 132.1 (C₁ arom), 129.8 (C₅ arom), 125.8 (C₆ arom), 121.6 (C₂ arom), 118.8 (C₄ arom), 58.0 + 57.9 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.6 (C_α Arg), 50.7 (C_α Asp), 40.3 (CH₂-N Arg), 35.6 + 35.4 (CH₂ βAla et CH₂ Asp), 34.5 (CH₂ βAla), 33.6 (2 × CH₂-S NS₂), 28.1 (Cβ Arg), 24.0 (Cγ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 643.17 (M + H⁺, 20%), 321.90 (M + 2H⁺, 100%) ;

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₅H₃₉N₈O₆S₃ 643.2155 ; trouvé : 643.2151.

2C3 NS₂-rGe-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.37 (s, 1H, H₂ arom), 7.28-7.11 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.36-4.31 (m, 2H, CH_α Arg et CH_α Glu), 4.21 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.91 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.75 (m, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.11 (m, 6H, 2 × CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.44 (m, 2H, CH₂γ Glu), 2.14-1.99 (m, 2H, CH₂β Glu), 1.76-1.58 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.4 (COOH Glu), 174.1 (C=O Arg), 172.0 (C=O Glu), 171.3 (C=O Gly), 165.5 (C=O NS₂), 156.8 (C=N Arg), 137.1 (C₃ arom), 132.4 (C₁ arom), 130.1 (C₅ arom), 126.1 (C₆ arom), 121.7 (C₂ arom), 118.9 (C₄ arom), 58.4 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.0 (C_α Arg et C_α Glu), 42.4 (CH₂ Gly), 40.6 (CH₂-N Arg), 33.0 (2 × CH₂-S NS₂), 29.7 (Cγ Glu), 26.7 (Cβ Arg), 26.4 (Cβ Glu), 24.3 (Cγ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 643.13 (M + H⁺, 40%), 321.84 (M + 2H⁺, 100%) ;

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₅H₃₉N₈O₆S₃ 643.2155 ; trouvé : 643.2151.

2D3 NS₂-rβe-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 8.21 (bs, 1H, NH), 7.72 (bs, 1H, NH), 7.39 (s, 1H, H₂ arom), 7.24-7.07 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.38 (t, J = 6.7 Hz, 1H, CH_α Arg), 4.21 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.20-4.10 (m, 1H, CH_α Glu), 3.77-3.70 (m, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.51-3.38 (m, 2H, CH₂-N βAla), 3.15 (t, J = 5.7 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 2.96 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.52-2.46 (m, 4H, CH₂γ Glu et CH₂-CO βAla), 2.21-1.89 (m, 2H, CH₂β Glu), 1.66-1.47 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 176.9 (COOH Glu), 173.7 (C=O Arg), 172.9 (C=O Glu), 171.9 (C=O βAla), 165. (C=O NS₂), 156.4 (C=N Arg), 137.0 (C₃ arom), 132.1 (C₁ arom), 129.8 (C₅ arom), 125.7 (C₆ arom), 121.3 (C₂ arom), 118.5 (C₄ arom), 58.0 (2

× CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 + 53.6 (C α Arg et C α Glu), 40.3 (CH₂-N Arg), 35.6 (CH₂ β Ala), 34.3 (CH₂ β Ala), 33.7 (2 × CH₂-S NS₂), 30.0 (C γ Glu), 28.1 (C β Arg), 26.3 (C β Glu), 24.1 (C γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 657.6 (M + H⁺, 5%), 329.22 (M + 2H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₆H₄₁N₈O₆S₃ 657.2311; trouvé : 657.2316.

3A3 NS₂-RGd-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.40 (s, 1H, H₂ arom), 7.29-7.13 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.74 (m, 1H, CH α Asp), 4.32-4.28 (m, 1H, CH α Arg), 4.21 + 4.19 (2s, 2H, CH₂ NS₂), 3.96 + 3.94 (2s, 2H, CH₂ Gly), 3.78 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.15 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.11-3.07 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.90 (t, J = 6.2 Hz, 2H, CH₂ Asp), 1.81-1.54 (4H, m, CH₂ β et CH₂ γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 174.7 (COOH Asp), 173.9 (C=O Arg), 171.1 + 170.9 (C=O Asp et C=O Gly), 165.3 (C=O NS₂), 156.5 (C=N Arg), 136.8 (C₃ arom), 132.1 (C₁ arom), 129.8 (C₅ arom), 125.9 (C₆ arom), 121.7 (C₂ arom), 118.9 (C₄ arom), 58.0 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 (C α Arg), 50.8 (C α Asp), 42.5 (CH₂ Gly), 40.3 (CH₂-N Arg), 35.9 (CH₂ Asp), 33.7 (2 × CH₂-S NS₂), 27.8 (C β Arg), 24.0 (C γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 629.17 (M + H⁺, 18%), 314.84 (M + 2H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₄H₃₇N₈O₆S₃ 629.1998; trouvé : 629.1977.

3B3 NS₂-R β d-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 8.28 (bs, 1H, NH), 7.86 (bs, 1H, NH), 7.41 (s, 1H, H₂ arom), 7.29-7.13 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.65-4.60 (m, 1H, CH α Asp), 4.22 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.20-4.15 (m, 1H, CH α Arg), 3.79-3.77 (m, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.53-3.37 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.17-3.14 (m, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.02 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.93-2.73 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.58-2.41 (m, 2H, CH₂-CO β Ala), 1.75-1.45 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 175.0 (COOH Asp), 173.8 (C=O Arg), 173.0 (C=O β Ala), 171.3 (C=O Asp), 165.3 (C=O NS₂), 156.5 (C=N Arg), 137.0 (C₃ arom), 132.2 (C₁ arom), 129.8 (C₅ arom), 125.8 (C₆ arom), 121.7 (C₂ arom), 118.9 (C₄ arom), 58.0 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.6 (C α Arg), 51.1 (C α Asp), 40.3 (CH₂-N Arg), 36.5 + 35.6 (CH₂ β Ala et CH₂ Asp), 34.7 (CH₂ β Ala), 33.8 (2 × CH₂-S NS₂), 28.1 (C β Arg), 24.1 (C γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 643.16 (M + H⁺, 11%), 321.90 (M + 2H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₅H₃₉N₈O₆S₃ 643.2155; trouvé : 643.2166.

3C3 NS₂-RGe-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.3 (s, 1H, H₂ arom), 7.33-7.11 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.40 (m, 1H, CH α Glu), 4.31 (t, J = 6.6 Hz, 1H, CH α Arg), 4.23 (s, 2H, CH₂

NS₂), 3.96 + 3.93 (2s, 2H, CH₂ Gly), 3.79 (t, J = 5.4 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.15-3.10 (m, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.10-3.07 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.51-2.45 (m, 2H, CH₂γ Glu), 2.36-2.01 (m, 2H, CH₂β Glu), 1.81-1.54 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.2 (COOH Glu), 173.8 (C=O Arg), 171.7 + 171.1 (C=O Glu et C=O Gly), 165.5 (C=O NS₂), 156.5 (C=N Arg), 136.8 (C₃ arom), 132.1 (C₁ arom), 129.8 (C₅ arom), 125.9 (C₆ arom), 121.6 (C₂ arom), 118.8 (C₄ arom), 58.1 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.89 + 53.6 (Cα Arg et Cα Glu), 42.3 (CH₂ Gly), 40.3 (CH₂-N Arg), 33.9 (2 × CH₂-S NS₂), 30.1 (Cγ Glu), 27.7 (Cβ Arg), 26.3 (Cβ Glu), 24.0 (Cγ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 643.20 (M + H⁺, 57%), 322.14 (M + 2H⁺, 100%);

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₅H₃₉N₈O₆S₃ 643.2155; trouvé : 643.2125.

3D3 NS₂-Rβe-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.78 (bs, 1H, NH), 7.41 (s, 1H, H₂ arom), 7.29-7.11 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.40 (t, J = 7.0 Hz, 1H, CHα Arg), 4.24 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.20-4.15 (m, 1H, CHα Glu), 3.80 (t, J = 5.4 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.50-3.42 (m, 2H, CH₂-N βAla), 3.17 (t, J = 5.4 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.00 (t, J = 6.6 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.53-2.43 (m, 4H, CH₂γ Glu et CH₂-CO βAla), 2.25-1.94 (m, 2H, CH₂β Glu), 1.79-1.50 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.2 (COOH Glu), 173.8 (C=O Arg), 172.9 (C=O Glu), 171.9 (C=O βAla), 165.2 (C=O NS₂), 163.2 (C=N Arg), 137.0 (C₃ arom), 132.1 (C₁ arom), 129.8 (C₅ arom), 125.8 (C₆ arom), 121.5 (C₂ arom), 118.7 (C₄ arom), 58.0 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.6 (Cα Arg et Cα Glu), 40.3 (CH₂-N Arg), 35.7 (CH₂ βAla), 34.4 (CH₂ βAla), 33.8 (2 × CH₂-S NS₂), 30.2 (Cγ Glu), 28.2 (Cβ Arg), 26.4 (Cβ Glu), 24.1 (Cγ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 657.10 (M + H⁺, 25%), 328.18 (M + 2H⁺, 100%);

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₆H₄₁N₈O₆S₃ 657.2311; trouvé : 657.2293.

4A3 NS₂-rGD-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.35 (s, 1H, H₂ arom), 7.22-7.07 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.73 (m, 1H, CHα Asp), 4.29 (t, J = 6.1 Hz, 1H, CHα Arg), 4.16 + 4.10 (2s, 2H, CH₂ NS₂), 3.93 + 3.90 (2s, 2H, CH₂ Gly), 3.75 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.11 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.06-3.03 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.89 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂ Asp), 1.83-1.51 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 175.0 (COOH Asp), 174.6 (C=O Arg), 171.8 (C=O Asp), 171.5 (C=O Gly), 165.9 (C=O NS₂), 157.2 (C=N Arg), 137.6 (C₃ arom), 132.8 (C₁ arom), 130.5 (C₅ arom), 126.6 (C₆ arom), 122.3 (C₂ arom), 119.5 (C₄ arom), 58.9 + 58.8 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.4 (Cα Arg), 51.3 (Cα Asp), 43.2 (CH₂ Gly), 41.1 (CH₂-N Arg), 36.2 (CH₂ Asp), 34.4 (2 × CH₂-S NS₂), 28.5 (Cβ Arg), 24.7 (Cγ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 629.19 (M + H⁺, 60%), 315.29 (M + 2H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour $C_{24}H_{37}N_8O_6S_3$ 629.1998 ; trouvé : 629.2001.

4B3 NS₂-rβD-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 8.28-8.24 (m, 1H, NH), 7.36 (s, 1H, H₂ arom), 7.27-7.06 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.76-4.74 (m, 1H, CH α Asp), 4.20 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.16-4.09 (m, 1H, CH α Arg), 3.77 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.51-3.39 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.13 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2.97 (t, J = 6.7 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.90-2.75 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.52-2.42 (m, 2H, CH₂-CO β Ala), 1.69-1.45 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 174.0 (COOH Asp), 173.7 (C=O Arg), 172.9 (C=O β Ala), 170.9 (C=O Asp), 164.9 (C=O NS₂), 156.4 (C=N Arg), 136.9 (C₃ arom), 132.1 (C₁ arom), 129.8 (C₅ arom), 125.8 (C₆ arom), 121.6 (C₂ arom), 118.8 (C₄ arom), 58.1 + 57.8 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.5 (C α Arg), 50.6 (C α Asp), 40.3 (CH₂-N Arg), 35.6 + 35.5 (CH₂ β Ala et CH₂ Asp), 34.4 (CH₂ β Ala), 33.6 (2 \times CH₂-S NS₂), 28.1 (C β Arg), 24.2 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 643.29 (M + H⁺, 20%), 322.37 (M + 2H⁺, 100%) ;

HRMS : m/z calculé pour $C_{25}H_{39}N_8O_6S_3$ 643.2155 ; trouvé : 643.2151.

4C3 NS₂-rGE-m.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.40 (s, 1H, H₂ arom), 7.29-7.12 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.42 (t, J = 8.2 Hz, 1H, CH α Glu), 4.32 (t, J = 6.7 Hz, 1H, CH α Arg), 4.23 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.97 + 3.94 (2s, 2H, CH₂ Gly), 3.79 (t, J = 5.4 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.16-3.09 (m, 6H, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.49 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂ γ Glu), 2.24-2.02 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.82-1.56 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.2 (COOH Glu), 173.8 (C=O Arg), 172.0 + 171.1 (C=O Glu et C=O Gly), 165.6 (C=O NS₂), 156.5 (C=N Arg), 136.8 (C₃ arom), 132.1 (C₁ arom), 129.8 (C₅ arom), 125.9 (C₆ arom), 121.6 (C₂ arom), 118.8 (C₄ arom), 58.1 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 55.0 + 53.6 (C α Arg et C α Glu), 42.3 (CH₂ Gly), 40.3 (CH₂-N Arg), 33.8 (2 \times CH₂-S NS₂), 30.1 (C γ Glu), 27.6 (C β Arg), 26.2 (C β Glu), 24.0 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 643.18 (M + H⁺, 27%), 322.23 (M + 2H⁺, 100%) ;

HRMS : m/z calculé pour $C_{25}H_{39}N_8O_6S_3$ 643.2155 ; trouvé : 643.2159.

4D3 NS₂-rβE-m.

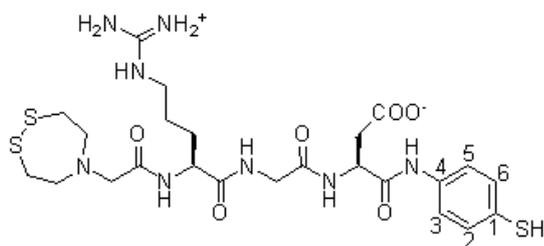
¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.38 (s, 1H, H₂ arom), 7.20-7.11 (m, 3H, H₄, H₅ et H₆ arom), 4.37-4.36 (m, 1H, CH α Arg), 4.21 (m, 3H, CH₂ NS₂ et CH α Glu), 3.76 (m, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.42 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.14 (m, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2.96 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.47 (m, 4H, CH₂-CO β Ala et CH₂ γ Glu), 2.09-1.98 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.63-1.46 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.8 (COOH Glu), 174.8 (C=O Arg), 174.0 (C=O

Glu), 172.9 (C=O β Ala), 165.8 (C=O NS₂), 157.4 (C=N Arg), 138.0 (C₃ arom), 133.1 (C₁ arom), 130.8 (C₅ arom), 126.8 (C₆ arom), 122.5 (C₂ arom), 119.7 (C₄ arom), 59.2 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.6 (C α Arg et C α Glu), 41.3 (CH₂-N Arg), 36.7 (CH₂ β Ala), 35.4 (CH₂ β Ala), 34.7 (2 \times CH₂-S NS₂), 30.5 (C γ Glu), 29.2 (C β Arg), 27.3 (C β Glu), 25.1 (C γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 657.18 (M + H⁺, 5%), 329.21 (M + 2H⁺, 100%);

HRMS : m/z calculé pour C₂₆H₄₁N₈O₆S₃ 657.2311; trouvé : 657.2311.



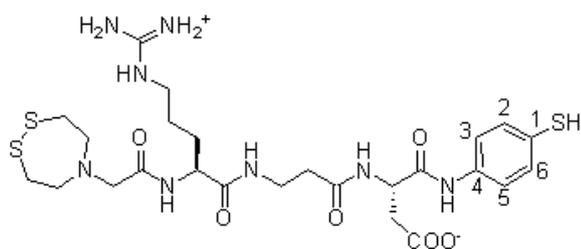
1A4 NS₂-RGD-p.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.48-7.45 (m, 1H, NH), 7.33 (s, 4H, arom), 4.32 (t, J = 7.0 Hz, 1H, CH α Asp), 4.25-4.22 (m, 1H, CH α Arg), 4.21 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.96 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.78 (t, J = 6.0 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.15 (t, J = 6.0 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.13-3.05 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.90-2.80 (m, 2H,

CH₂ Asp), 1.90-1.50 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg).

ES/MS (ionisation positive) : m/z 629.16 (M + H⁺, 14 %), 315.53 (M + 2H⁺, 100 %);

HRMS : m/z calculé pour C₂₄H₃₇N₈O₆S₃ 629.1998; trouvé 629.1982.



1B4 NS₂-R β D-p.

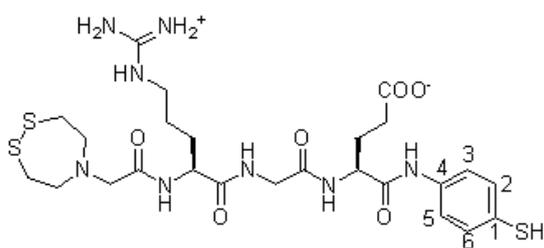
¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 8.20 (bs, 1H, NH), 7.60 (bs, 1H, NH), 7.35-7.26 (m, 4H, arom), 4.59 4.52 (m, 1H, CH α Asp), 4.14 (m, 3H, CH₂ NS₂ et CH α Arg), 3.67 (m, 4H, 2x CH₂-N NS₂), 3.41 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.20-3.86 (m, 6H, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.85-2.83 (m, 2H, CH₂ Asp),

2.47 (m, 2H, CH₂-CO β Ala), 1.63-1.43 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg);

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 175.5 (COOH Asp), 175.2 (C=O Arg), 174.4 (C=O β Ala), 172.3 (C=O Asp), 166.4 (C=O NS₂), 157.9 (C=N Arg), 134.2 (C₄ arom), 130.7 (C₂ et C₆ arom), 129.3 (C₁ arom), 123.7 (C₃ et C₅ arom), 59.5 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 55.1 (C α Arg), 52.3 (C α Asp), 41.7 (CH₂-N Arg), 37.1 + 36.0 + 35.8 (2 \times CH₂ β Ala et CH₂ Asp), 35.1 (2 \times CH₂-S NS₂), 29.5 (C β Arg), 25.6 (C γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 643.19 (M + H⁺, 8.7 %), 322.25 (M + 2H⁺, 100 %);

HRMS : m/z calculé pour C₂₅H₃₉N₈O₆S₃ 643.2155; trouvé 643.2161.

**1C4 NS₂-RGE-p.**

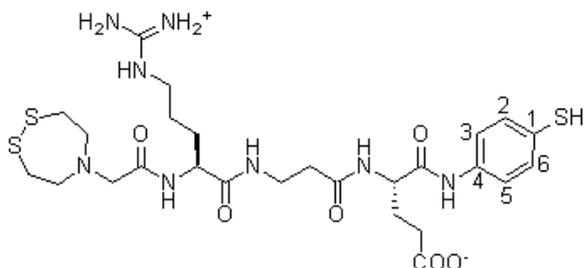
¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.35 (s, 4H, arom), 4.46-4.39 (m, 1H, CH α Arg), 4.39-4.33 (m, 1H, CH α Glu), 4.24 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.98 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.83 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.19 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 3.16-3.08 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.53 (t,

J = 7.2 Hz, 2H, CH₂ γ Glu), 2.26-2.03 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.86-1.60 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.8 (COOH Glu), 174.6 (C=O Arg), 172.5 (C=O Glu), 171.8 (C=O Gly), 166.0 (C=O NS₂), 156.6 (C=N Arg), 134.7 (C₄ arom), 130.3 (C₂ et C₆ arom), 128.7 (C₁ arom), 123.5 (C₃ et C₅ arom), 59.1 + 59.0 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.5-54.4 (C α Arg et C α Glu), 43.0 (CH₂ Gly), 41.2 (CH₂-N Arg), 34.6 (2 \times CH₂-S NS₂), 30.8 (C γ Glu), 28.7 (C β Arg), 27.0 (C β Glu), 24.9 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 643.18 (M + H⁺, 46 %), 322.18 (M + 2H⁺, 100 %).

HRMS : m/z calculé pour C₂₅H₃₉N₈O₆S₃ 643.2155 ; trouvé 643.2180.

**1D4 NS₂-R β E-p.**

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.28 (s, 4H, arom), 4.35 (t, J = 7.0 Hz, 1H, CH α Glu), 4.18 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.17-4.14 (m, 1H, CH α Arg), 3.76 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.51-3.31 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.14 (t, J = 5.5 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2.92 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CH₂-N Arg),

2.53-2.44 (m, 4H, CH₂-CO β Ala et CH₂ γ Glu), 2.14-1.99 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.64-1.35 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 176.9 (COOH Glu), 173.7 (C=O Arg), 172.9 (C=O Glu), 171.9 (C=O β Ala), 166.0 (C=O NS₂), 156.8 (C=N Arg), 133.9 (C₄ arom), 129.4 (C₂ et C₆ arom), 127.8 (C₁ arom), 122.6 (C₃ et C₅ arom), 58.1 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 + 53.6 (C α Arg et C α Glu), 40.2 (CH₂-N Arg), 36.4 (CH₂ β Ala), 35.5 (CH₂ β Ala), 33.7 (2 \times CH₂-S NS₂), 30.0 (C γ Glu), 28.1 (C β Arg), 26.3 (C β Glu), 24.0 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 657.22 (M + H⁺, 33 %), 329.12 (M + H⁺, 100 %) ;

HRMS : m/z calculé pour C₂₆H₄₁N₈O₆S₃ 657.2311 ; trouvé 657.2326.

2A4 NS₂-rGd-p.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.52-7.35 (m, 1H, NH), 7.27 (s, 4H, arom), 4.74 (m, 1H, CH α Asp), 4.32-4.25 (m, 1H, CH α Arg), 4.21 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.91 (s, 2H, CH₂

Gly), 3.76 (t, $J = 5.5$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 3.12 (t, $J = 5.5$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 3.09-3.04 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N Arg}$), 2.89 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, CH_2 Asp), 1.83-1.52 (m, 4H, $\text{CH}_2\beta$ et $\text{CH}_2\gamma$ Arg);

$^{13}\text{C RMN (D}_2\text{O, 62.5 MHz)}$: δ 174.9 (COOH Asp), 174.6 (C=O Arg), 171.7 (C=O Asp), 171.4 (C=O Gly), 165.8 (C=O NS_2), 157.2 (C=N Arg), 134.6 (C_4 arom), 130.2 (C_2 et C_6 arom), 128.6 (C_1 arom), 123.5 (C_3 et C_5 arom), 58.9 + 58.8 ($2 \times \text{CH}_2\text{-N}$ et $\text{CH}_2 \text{NS}_2$), 54.4 ($\text{C}\alpha$ Arg), 51.4 ($\text{C}\alpha$ Asp), 43.1 (CH_2 Gly), 41.0 ($\text{CH}_2\text{-N Arg}$), 36.7 (CH_2 Asp), 34.3 ($2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 28.6 ($\text{C}\beta$ Arg), 24.8 ($\text{C}\gamma$ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 629.14 ($\text{M} + \text{H}^+$, 100 %), 314.84 ($\text{M} + 2\text{H}^+$, 85 %);

HRMS : m/z calculé pour $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_3$ 629.1998; trouvé 629.2001.

2B4 $\text{NS}_2\text{-r}\beta\text{d-p}$.

$^1\text{H RMN (D}_2\text{O, 250 MHz)}$: δ 8.25 (bs, 1H, NH), 7.48 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, arom), 7.33 (bs, 2H, arom), 7.17 (d, $J = 8.3$, 1H, arom), 4.62-4.58 (m, 1H, $\text{CH}\alpha$ Asp), 4.22 (m, 3H, $\text{CH}_2 \text{NS}_2$ et $\text{CH}\alpha$ Arg), 3.78 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 3.47 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N } \beta\text{Ala}$), 3.19 (t, $J = 5.5$ Hz, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 3.02 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-N Arg}$), 2.87 (m, 2H, CH_2 Asp), 2.54 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO } \beta\text{Ala}$), 1.77-1.45 (m, 4H, $\text{CH}_2\beta$ et $\text{CH}_2\gamma$ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 643.19 ($\text{M} + \text{H}^+$, 7.5 %), 322.17 ($\text{M} + 2\text{H}^+$, 100 %);

HRMS : m/z calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_3$ 643.2155; trouvé 643.2144.

2C4 $\text{NS}_2\text{-rGe-p}$.

$^1\text{H RMN (D}_2\text{O, 250 MHz)}$: δ 7.44-7.30 (m, 4H, arom), 4.43 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H, $\text{CH}\alpha$ Arg), 4.35 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H, $\text{CH}\alpha$ Glu), 4.25 (s, 2H, $\text{CH}_2 \text{NS}_2$), 3.98 (s, 2H, CH_2 Gly), 3.81 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 3.16 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 3.04 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N Arg}$), 2.51 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\gamma$ Glu), 2.22-2.05 (m, 2H, $\text{CH}_2\beta$ Glu), 1.88-1.55 (m, 4H, $\text{CH}_2\beta$ et $\text{CH}_2\gamma$ Arg);

$^{13}\text{C RMN (D}_2\text{O, 62,5 MHz)}$: δ 177.3 (COOH Glu), 173.8 (C=O Arg), 171.7 + 171.0 (C=O Glu et C=O Gly), 165.4 (C=O NS_2), 156.5 (C=N Arg), 132.4 (C_4 arom), 129.5 (C_2 et C_6 arom), 127.7 (C_1 arom), 122.6 (C_3 et C_5 arom), 58.1 ($\text{CH}_2 \text{NS}_2$), 58.0 ($2 \times \text{CH}_2\text{-N NS}_2$), 53.7 ($\text{C}\alpha$ Arg et $\text{C}\alpha$ Glu), 42.3 (CH_2 Gly), 40.4 ($\text{CH}_2\text{-N Arg}$), 33.9 ($2 \times \text{CH}_2\text{-S NS}_2$), 30.2 ($\text{C}\gamma$ Glu), 27.9 ($\text{C}\beta$ Arg), 26.3 ($\text{C}\beta$ Glu), 24.1 ($\text{C}\gamma$ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : m/z 643.13 ($\text{M} + \text{H}^+$, 16 %), 321.99 ($\text{M} + 2\text{H}^+$, 100 %);

HRMS : m/z calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_6\text{S}_3$ 643.2155; trouvé 643.2163.

2D4 NS₂-rβe-p.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.49-7.21 (m, 4H, arom), 4.47-4.35 (m, 1H, CH_α Glu), 4.33-4.25 (m, 1H, CH_α Arg), 4.20 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.83-3.72 (m, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.60-3.35 (m, 2H, CH₂-N βAla), 3.22-3.12 (m, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.01-2.90 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.65-2.42 (m, 4H, CH₂-CO βAla et CH₂γ Glu), 2.25-1.99 (m, 2H, CH₂β Glu), 1.80-1.42 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.1 (COOH Glu), 173.8 (C=O Arg), 172.9 + 171.9 (C=O Glu et C=O βAla), 165.1 (C=O NS₂), 156.4 (C=N Arg), 134.1 (C₄ arom), 129.5 (C₂ et C₆ arom), 127.9 (C₁ arom), 122.6 (C₃ et C₅ arom), 58.0 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.7 + 53.6 (C_α Arg et C_α Glu), 40.3 (CH₂-N Arg), 35.6 (CH₂ βAla), 34.3 (CH₂ βAla), 33.7 (2 × CH₂-S NS₂), 30.1 (C_γ Glu), 28.1 (C_β Arg), 26.3 (C_β Glu), 24.0 (C_γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 657.24 (M + H⁺, 6.0 %), 329.17 (M + 2H⁺, 100 %) ;

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₆H₄₁N₈O₆S₃ 657.2311 ; trouvé 657.2303.

3A4 NS₂-RGd-p.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.40 (m, 1H, NH), 7.27 (s, 4H, arom), 4.74 (m, 1H, CH_α Asp), 4.32-4.24 (m, 1H, CH_α Arg), 4.20 + 4.17 (2s, 2H, CH₂ NS₂), 3.93 + 3.90 (2s, 2H, CH₂ Gly), 3.76 (t, J = 5.7 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.12 (t, J = 5.7 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.06-2.97 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.90 (t, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂ Asp), 1.79-1.48 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 174.9 (COOH Asp), 174.7 (C=O Arg), 171.9 (C=O Asp), 171.6 (C=O Gly), 165.9 (C=O NS₂), 157.4 (C=N Arg), 134.7 (C₄ arom), 130.3 (C₂ et C₆ arom), 128.9 (C₁ arom), 123.8 (C₃ et C₅ arom), 58.9 (2 × CH₂-N et CH₂ NS₂), 54.5 (C_α Arg), 51.4 (C_α Asp), 43.3 (CH₂ Gly), 41.2 (CH₂-N Arg), 36.2 (CH₂ Asp), 34.5 (2 × CH₂-S NS₂), 28.7 (C_β Arg), 24.9 (C_γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 629.14 (M + H⁺, 62 %), 314.84 (M + 2H⁺, 100 %) ;

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₄H₃₇N₈O₆S₃ 629.1998 ; trouvé 629.2002.

3B4 NS₂-Rβd-p.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 8.24 (bs, 1H, NH), 7.46 (d, J = 8.3 Hz, 1H, arom), 7.31 (bs, 2H, arom), 7.15 (d, J = 8.3 Hz, 1H, arom), 4.66-4.61 (m, 1H, CH_α Asp), 4.23 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.22 (m, 1H, CH_α Arg), 3.82 (m, 4H, 2x CH₂-N NS₂), 3.47 (m, 2H, CH₂-N βAla), 3.19 (m, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.06-2.98 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.96-2.85 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.53 (m, 2H, CH₂-CO βAla), 1.80-1.45 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 643.18 (M + H⁺, 20 %), 322.14 (M + 2H⁺, 100 %) ;

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₅H₃₉N₈O₆S₃ 643.2155 ; trouvé 643.2154.

3C4 NS₂-RGe-p.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.33 (m, 4H, arom), 4.44 (2d, J = 8.3, 1H, CH_α Arg), 4.33 (t, J = 6.7 Hz, 1H, CH_α Glu), 4.22 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.97 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.79 (t, J = 5.3 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.14 (m, 6H, 2 × CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.50 (t, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂γ Glu), 2.35-2.05 (m, 2H, CH₂β Glu), 1.95-1.55 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 643.22 (M + H⁺, 19 %), 322.22 (M + 2H⁺, 100 %);

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₅H₃₉N₈O₆S₃ 643.2155; trouvé 643.2173.

3D4 NS₂-Rβe-p.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 8.24 (bs, 1H, NH), 7.53 (bs, 1H, NH), 7.37 (m, 4H, arom), 4.47-4.41 (m, 1H, CH_α Glu), 4.26 (t, J = 6.6 Hz, 1H, CH_α Arg), 4.20 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.79 (t, J = 5.2 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.49 (m, 2H, CH₂-N βAla), 3.19 (t, J = 5.2 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.07 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.60-2.47 (m, 4H, CH₂-CO βAla et CH₂γ Glu), 2.23-1.99 (m, 2H, CH₂β Glu), 1.76-1.50 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 657.60 (M + H⁺, 4.1 %), 329.22 (M + 2H⁺, 100 %);

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₆H₄₁N₈O₆S₃ 657.2311; trouvé 657.2316.

4A4 NS₂-rGD-p.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.45 (m, 1H, NH), 7.33 (s, 4H, arom), 4.36-4.26 (m, 2H, CH_α Asp et CH_α Arg), 4.23 + 4.20 (2s, 2H, CH₂ NS₂), 3.97 + 3.95 (2s, 2H, CH₂ Gly), 3.79 (t, J = 5.4 Hz, 4H, 2 × CH₂-N NS₂), 3.18-3.08 (m, 6H, 2 × CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.93 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂ Asp), 1.85-1.55 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 629.14 (M + H⁺, 12 %), 315.12 (M + 2H⁺, 100 %);

HRMS : *m/z* calculé pour C₂₄H₃₇N₈O₆S₃ 629.1998; trouvé 629.1996.

4B4 NS₂-rβD-p.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 8.26 (m, 1H, NH), 7.49 (m, 1H, NH), 7.35 (m, 4H, arom), 4.67 (m, 1H, CH_α Asp), 4.23 (m, 3H, CH₂ NS₂ et CH_α Arg), 3.82 (t, J = 5.3 Hz, 4H, 2x CH₂-N NS₂), 3.49 (m, 2H, CH₂-N βAla), 3.20 (t, J = 5.3 Hz, 4H, 2 × CH₂-S NS₂), 3.07 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂-N Arg), 2.92-2.76 (m, 2H, CH₂ Asp), 2.55 (m, 2H, CH₂-CO βAla), 1.83-1.48 (m, 4H, CH₂β et CH₂γ Arg);

ES/MS (ionisation positive) : *m/z* 643.20 (M + H⁺, 8.2 %), 322.17 (M + 2H⁺, 100 %);

HRMS : m/z calculé pour $C_{25}H_{39}N_8O_6S_3$ 643.2155 ; trouvé 643.2166.

4C4 NS₂-rGE-p.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.28 (s, 4H, arom), 4.41 (m, 1H, CH α Arg), 4.31 (t, J = 6.9 Hz, 1H, CH α Glu), 4.20 (s, 2H, CH₂ NS₂), 3.95 + 3.93 (2 s, 2H, CH₂ Gly), 3.77 (t, J = 5.4 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.10-3.05 (m, 6H, 2 \times CH₂-S NS₂ et CH₂-N Arg), 2.47 (t, J = 7.1 Hz, 2H, CH₂ γ Glu), 2.22-1.98 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.80-1.50 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 177.3 (COOH Glu), 173.8 (C=O Arg), 171.6 + 171.1 (C=O Glu et C=O Gly), 165.7 (C=O NS₂), 156.5 (C=N Arg), 133.9 (C₄ arom), 129.5 (C₂ et C₆ arom), 127.9 (C₁ arom), 122.8 (C₃ et C₅ arom), 58.2 (CH₂ NS₂), 58.1 (2 \times CH₂-N NS₂), 53.8 + 53.6 (C α Arg et C α Glu), 42.3 (CH₂ Gly), 40.4 (CH₂-N Arg), 33.9 (2 \times CH₂-S NS₂), 30.2 (C γ Glu), 27.8 (C β Arg), 26.3 (C β Glu), 24.0 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 643.26 (M + H⁺, 8.3 %), 322.11 (M + 2H⁺, 100 %) ;

HRMS : m/z calculé pour $C_{25}H_{39}N_8O_6S_3$ 643.2155 ; trouvé 643.2180.

4D4 NS₂-r β E-p.

¹H RMN (D₂O, 250 MHz) : δ 7.26 (m, 4H, arom), 4.34 (m, 1H, CH α Glu), 4.20 (s, 2H, CH₂ NS₂), 4.16 (m, 1H, CH α Arg), 3.76 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-N NS₂), 3.43-3.40 (m, 2H, CH₂-N β Ala), 3.13 (t, J = 5.6 Hz, 4H, 2 \times CH₂-S NS₂), 2.97-2.91 (m, 2H, CH₂-N Arg), 2.51-2.43 (m, 4H, CH₂-CO β Ala et CH₂ γ Glu), 2.15-1.96 (m, 2H, CH₂ β Glu), 1.67-1.41 (m, 4H, CH₂ β et CH₂ γ Arg) ;

¹³C RMN (D₂O, 62.5 MHz) : δ 176.8 (COOH Glu), 173.7 (C=O Arg), 172.9 (C=O Glu), 171.7 (C=O β Ala), 164.9 (C=O NS₂), 156.4 (C=N Arg), 133.9 (C₄ arom), 129.4 (C₂ et C₆ arom), 127.8 (C₁ arom), 122.7 (C₃ et C₅ arom), 58.1 (2 \times CH₂-N et CH₂ NS₂), 53.6 + 53.5 (C α Arg et C α Glu), 40.2 (CH₂-N Arg), 35.6 (CH₂ β Ala), 34.4 (CH₂ Ala), 33.6 (2 \times CH₂-S NS₂), 29.9 (C γ Glu), 28.1 (C β Arg), 26.3 (C β Glu), 24.1 (C γ Arg) ;

ES/MS (ionisation positive) : m/z 657.24 (M + H⁺, 8.7 %), 329.59 (M + 2H⁺, 100 %) ;

HRMS : m/z calculé pour $C_{26}H_{41}N_8O_6S_3$ 657.2311 ; trouvé 657.2328.

Complexations

Les solvants utilisés pour la réduction des ligands et pour la complexation sont dégazés à l'argon avant usage.

Complexation au rhénium

Procédure générale de complexation à partir de $[\text{ReOCl}_4][\text{NBu}_4]$. Le ligand (10 μmol , 1 eq.) est dissous dans du MeOH dégazé (150 μL). Une solution de PBU_3 à 10% dans le MeOH (15 μmol , 1,5 eq.) est ajoutée et le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante sous atmosphère d'argon. Du tétrabutylammonium de tétrachlorooxorhenate (10 μmol , 1 eq.) est ajouté dans du MeOH dégazé (150 μL), suivi de triéthylamine (40 μmol , 4 eq.). Le pH est ajusté à 10 avec de la triéthylamine. Le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante. Le précipité formé (vert) est isolé après centrifugation et élimination du surnageant, puis séché sur pompe à palettes.

LC-MS : gradient 15-30% B en 30 min, **Re-1A1** : $t_R = 11,5$ min, m/z 783,1 ($\text{M} + \text{H}^+$) et $t_R = 14,9$ min, m/z 783,1 ($\text{M} + \text{H}^+$); **Re-2B2** : $t_R = 11,7$ min, m/z 811,2 ($\text{M} + \text{H}^+$); **Re-4D3** : $t_R = 18,9$ min, m/z 859,2 ($\text{M} + \text{H}^+$); **Re-2A4** : $t_R = 13,6$ min, m/z 831,1 ($\text{M} + \text{H}^+$);

ES/MS (ionisation positive) : m/z **Re-1B1** : 797,11 ($\text{M} + \text{H}^+$), **Re-1C1** : 797,06 ($\text{M} + \text{H}^+$), **Re-1D1** : 811,10 ($\text{M} + \text{H}^+$), **Re-2A1** : 783,03 ($\text{M} + \text{H}^+$), **Re-3A1** : 783,08 ($\text{M} + \text{H}^+$), **Re-4A1** : 783,00 ($\text{M} + \text{H}^+$), **Re-1A2** : 797,09 ($\text{M} + \text{H}^+$), **Re-1C3** : 845,11 ($\text{M} + \text{H}^+$), **Re-1C4** : 845,03 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Complexation au Re en mélange. Les ligands **1D1**, **1D2** et **1D3** (1,5 μmol de chaque, 1 eq.) sont mélangés dans du MeOH dégazé (100 μL). Une solution de tributylphosphine à 10% dans le MeOH (6,75 μmol , 1,5 eq./ligand) est ajoutée et le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante sous atmosphère d'argon. Du tétrabutylammonium de tétrachlorooxorhenate (4,5 μmol , 1 eq./ligand) est ajouté dans du MeOH dégazé (75 μL) suivi par de la triéthylamine (18 μmol , 4 eqv./ligand). Le pH est ajusté à pH 10 avec de la triéthylamine. Le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante avant centrifugation. Le précipité (solide vert) est dissous dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}/\text{DMSO}$ 1/1/1 (300 μL) et analysé par LC-MS.

LC-MS : gradient 15-30% B en 30 min, Tab. IV.14

Complexation au ^{99g}Tc

méthode a. Le ligand (1 eq.) est dissous dans du MeOH dégazé (15 $\mu\text{L}/\mu\text{mol}$). Une solution de tributylphosphine à 10% dans le MeOH (1,5 eq.) est ajoutée et le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante sous atmosphère d'argon. Du tétrabutylam-

TAB. IV.14 – Analyse LC/MS du mélange brut de complexes cycliques obtenus en mélange : temps de rétention (t_R) et valeur de m/z .

Complexes		t_R (min)	[M + H ⁺]	[M + 2H ⁺]
monomère	Re-1D1	10,7	810,4	
monomère	Re-1D1	16,0	810,5	
monomère	Re-1D1	16,2	810,4	
homodimère	(Re-1D1)₂	19,9		810,4
monomère	Re-1D2	11,5	824,4	
monomère	Re-1D2	11,7	824,4	
monomère	Re-1D2	21,0	824,4	
homodimère	(Re-1D2)₂	21,8		824,4
monomère	Re-1D3	17,6	858,4	
monomère	Re-1D3	17,9	858,4	
monomère	Re-1D3	31,7	858,4	
monomère	Re-1D3	32,0	858,4	
homodimère	(Re-1D3)₂	32,8		858,4
hétérodimère	Re-1D1-Re-1D2	21,1		817,4
hétérodimère	Re-1D1-Re-1D3	27,8		834,4
hétérodimère	Re-1D2-Re-1D3	28,1		841,4

monium de tétrachlorooxo[^{99g}Tc]technetate (1 eq.) est ajouté dans du MeOH dégazé (10 $\mu\text{L}/\mu\text{mol}$) et le mélange est agité pendant 1 min pour donner, dans la majorité des cas, un précipité brun-rouge.

méthode b. Le ligand (1 eq.) est réduit comme dans la **méthode a.** L'intermédiaire ^{99g}TcO-gluconate est obtenu comme décrit dans l'annexe générale et est ajouté (1 eq.) au ligand réduit. Le mélange est agité pendant 1 min pour donner, dans la majorité des cas, un précipité brun.

LC-MS : gradient 15-30% B en 30 min, ^{99g}Tc-**1A1** : $t_R = 14,3$ min, m/z 695,1 (M + H⁺); ^{99g}Tc-**2B2** : $t_R = 21,2$ min, m/z 723,1 (M + H⁺) et $t_R = 22,4$ min, m/z 723,1 (M + H⁺); ^{99g}Tc-**4D3** : $t_R = 22,3$ min, m/z 771,1 (M + H⁺) et $t_R = 34,9$ min, m/z 771,1 (M + H⁺).

Complexation au ^{99m}Tc

Mode opératoire M1

Réduction du ligand. Le ligand (1 mg, 1 eq.) est dissous dans du MeOH dégazé (30 μL). Une solution de tributylphosphine à 10% dans le MeOH (1,5 eq.) est ajoutée et le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante sous atmosphère d'argon sur un agitateur orbitalaire. Le solvant est évaporé sous un flux d'argon et le ligand réduit est repris dans un tampon HEPES (35 mM pH 7,8) dégazé, pour donner une solution 500

μM .

Radiomarquage au ^{99m}Tc . Le complexe $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}\text{O}](\text{NS}_2/\text{S})$ est obtenu par une réaction d'échange de ligand à partir de l'intermédiaire ^{99m}TcO -gluconate, formé selon le protocole décrit dans l'annexe générale. Un mélange de ligand réduit (100 μL de la solution 500 μM) et de ^{99m}TcO -gluconate (100 μL) est incubé pendant 30 min à 50°C.

Ce mode opératoire a été utilisé pour le marquage des ligands à linker C_2 et méta, en particulier 1A1 et 4D3.

Mode opératoire M2

Ce mode opératoire est semblable à **M1** avec une incubation de 15 min à 90°C pour le radiomarquage.

Ce mode opératoire a été utilisé pour le marquage des ligands à linker C_3 , en particulier 2B2.

Mode opératoire M3

Le ligand (1 mg, 1 eq.) est dissous dans de l'EtOH dégazé (30 μL). Une solution de tributylphosphine à 10% dans l'EtOH (1,5 eq.) est ajoutée et le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante sous atmosphère d'argon sur un agitateur orbitalaire. Le ligand réduit est dilué dans du tampon PBS (pH 7,4) dégazé, pour donner une solution 500 μM . La suite du protocole est semblable à **M1**.

Ce mode opératoire a été utilisé pour le marquage des ligands lors du test in vivo des mélanges de 12 traceurs.

Mode opératoire M4

Réduction du ligand. Le ligand (1 mg, 1 eq.) est dissous dans du MeOH dégazé (30 μL). Une solution de tributylphosphine à 10% dans le MeOH (1,5 eq.) est ajoutée et le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante sous atmosphère d'argon sur un agitateur orbitalaire. Le solvant est évaporé sous un flux d'argon et le ligand réduit est repris dans du tampon PBS (pH 7,4) dégazé pour donner une solution 500 μM .

Radiomarquage au ^{99m}Tc . Le complexe $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{V}}\text{O}](\text{NS}_2/\text{S})$ est obtenu par une réaction d'échange de ligand à partir de l'intermédiaire ^{99m}TcO -gluconate, formé selon le protocole décrit dans l'annexe générale. Un mélange de ligand réduit (100 μL de la solution 500 μM) et de ^{99m}TcO -gluconate (100 μL) est incubé pendant 15 min à 90°C.

Ce mode opératoire a été utilisé pour le marquage des ligands lors du test in vivo des mélanges de 4 traceurs et pour l'étude de biodistribution.

Les temps de rétention obtenus en HPLC (HPLC Varian) pour les différents complexes testés sont donnés dans le tableau IV.15.

TAB. IV.15 – Temps de rétention des complexes de ^{99m}Tc observés en HPLC analytique (HPLC Varian) avec un gradient 0-100% B en 30 min ou 15-30% B en 30 min.

Complexe	t_R (min)	
	0-100%	15-30%
$^{99m}\text{Tc-1A1}$	17,2	15,1
$^{99m}\text{Tc-1B1}$	17,4	15,9
$^{99m}\text{Tc-1C1}$	17,1	15,5
$^{99m}\text{Tc-1D1}$	17,6	16,8
$^{99m}\text{Tc-2A1}$	17,3	14,6
$^{99m}\text{Tc-2B1}$	-	15,5
$^{99m}\text{Tc-2C1}$	-	14,7
$^{99m}\text{Tc-2D1}$	-	16,3
$^{99m}\text{Tc-3A1}$	-	14,7
$^{99m}\text{Tc-3B1}$	-	16,5
$^{99m}\text{Tc-3C1}$	16,7 et 17,2	13,5 et 14,9
$^{99m}\text{Tc-3D1}$	-	13,5
$^{99m}\text{Tc-4A1}$	-	14,4
$^{99m}\text{Tc-4B1}$	-	15,8
$^{99m}\text{Tc-4C1}$	-	14,5
$^{99m}\text{Tc-4D1}$	-	16,3
$^{99m}\text{Tc-1D2}$	18,9	21,8
$^{99m}\text{Tc-2A2}$	18,4	18,5
$^{99m}\text{Tc-2B2}$	18,8	21,0
$^{99m}\text{Tc-4B2}$	18,3	18,8
$^{99m}\text{Tc-1A3}$	20,7	35,8
$^{99m}\text{Tc-1B3}$	20,4	33,3
$^{99m}\text{Tc-1C3}$	20,5	34,7
$^{99m}\text{Tc-1D3}$	20,4	33,7
$^{99m}\text{Tc-2A3}$	-	35,5
$^{99m}\text{Tc-2B3}$	-	33,0
$^{99m}\text{Tc-2C3}$	-	34,5
$^{99m}\text{Tc-2D3}$	-	33,4
$^{99m}\text{Tc-3A3}$	-	33,5
$^{99m}\text{Tc-3B3}$	-	35,2
$^{99m}\text{Tc-3C3}$	-	34,9
$^{99m}\text{Tc-3D3}$	-	35,0
$^{99m}\text{Tc-4A3}$	-	33,3
$^{99m}\text{Tc-4B3}$	-	34,9
$^{99m}\text{Tc-4C3}$	-	34,6
$^{99m}\text{Tc-4D3}$	20,6	34,7

Estimation du coefficient de partition ($\log P$)

Les complexes $^{99m}\text{Tc-1A1}$, $^{99m}\text{Tc-2B2}$ et $^{99m}\text{Tc-4D3}$ ont été synthétisés selon le mode opératoire **M2**. En triplicate, de l'octanol (500 μL), du tampon PBS (475 μL) et du complexe technétié (25 μL) sont agités dans un eppendorf pendant 1 min à température ambiante. Le mélange est laissé à décanter pendant environ 1 min puis centrifugé pendant 4 min. Des prélèvements sont réalisés en triplicate dans chacun des trois eppendorf : 10 μL de phase aqueuse (V_{aq}) et 100 μL de phase organique (V_{oct}). L'activité contenue dans ces aliquots est comptée et le bruit de fond (0,013 MBq) soustrait. Les moyennes des activités des triples triplicates sont calculées (A_{oct} et A_{eau}) et pondérées par le volume des aliquots. Le coefficient de partition est calculé d'après la formule :

$$P = \frac{A_{oct} \times V_{aq}}{A_{eau} \times V_{oct}}$$

$^{99m}\text{Tc-1A1}$ $\log P = -2,5$; $^{99m}\text{Tc-2B2}$ $\log P = -1,7$; $^{99m}\text{Tc-4D3}$ $\log P = -1,4$.

Tests de plasticité sur Re-1A1

Complexation au rhénium de 1A1

Une première synthèse a été réalisée à l'échelle de 21,5 μmol de ligand **1A1** selon le protocole présenté précédemment. Le précipité a été repris dans un mélange MeOH/DMSO pour avoir une solubilisation maximale. Le mélange brut a été analysé en LC-MS puis purifié par HPLC semi-préparative (HPLC Varian) avec un gradient 15-30% B en 30 min. Les fractions à $t_R = 10,3$ et 14,1 min ont été collectées, puis lyophilisées et correspondent aux complexes monomériques attendus et sont notés **a** et **b** respectivement. Chaque isomère est repris dans 500 μL d'eau et un aliquot de 200 μL (f1) ainsi que 6 aliquots de 50 μL (f2) sont préparés, puis lyophilisés et conservés à -20°C .

LC-MS : a : $t_R = 10,1$ min, m/z 783,1 ($\text{M} + \text{H}^+$); **b** : $t_R = 13,9$ min, m/z 783,1 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Une seconde synthèse a été réalisée à l'échelle de 100 μmol de ligand **1A1** selon le protocole général. Le précipité est suspendu dans 3,2 mL d'eau et 30 aliquots de 20 μL (f3) sont préparés et lyophilisés ainsi de 2 aliquots de 100 μL (f4). Ces échantillons sont conservés au congélateur avant utilisation pour les études de plasticité. La solution de complexe restante a été purifiée par HPLC semi-préparative et les espèces **a**, **b** et **d** ont été isolées.

LC-MS : gradient 15-30% B en 30 min, **a** : $t_R = 10,1$ min, m/z 783,1 ($\text{M} + \text{H}^+$); **b** : $t_R = 13,9$ min, m/z 783,1 ($\text{M} + \text{H}^+$); **d** : $t_R = 20,5$ min, m/z 783,1 ($\text{M} + 2\text{H}^+$).

Effet du pH sur Re-1A1

Etude de la composition du mélange brut à pH 7 en fonction du temps

Quatre fractions f3 du mélange brut de **Re-1A1** sont reprises séparément dans 25 μL d'eau à pH = 7. Les solutions sont soniquées et homogénéisées, puis laissées à température ambiante. Après 0, 1, 3 ou 6 h, un aliquot est homogénéisé, soniqué et centrifugé, puis 20 μL de surnageant sont analysés par LC-MS (gradient 15-30% B en 30 min). L'intégration des pics HPLC correspondant aux espèces monomériques **a** et **b** et homodimériques **c** et **d** permettent de calculer les proportions de chaque isomère par rapport à l'aire totale de ces espèces. Cette étude est réalisée en duplicate.

Etude de la composition du mélange brut en fonction du pH

Une solution à pH 3 est obtenue en ajustant le pH d'une solution de HCl aqueux 1 mM avec de l'eau. Une solution de pH 11,5 est obtenue en ajustant le pH d'une solution de Na_2CO_3 avec de l'eau. Pour chaque pH, une fraction f3 de mélange brut de **Re-1A1** est reprise dans 25 μL de solution. Les aliquots sont homogénéisés, soniqués et laissés à température ambiante. Après 3 h, ils sont de nouveau homogénéisés et soniqués puis centrifugés. 20 μL de surnageant sont analysés par LC-MS (gradient 15-30% B en 30 min). Cette étude est réalisée en duplicate. La composition du mélange à pH 7 est celle obtenue dans l'étude précédente pour $t = 3$ h.

Etude des isomères a et b purifiés à pH 3, 7 et 11,5

Trois aliquots f2 d'isomères **a** et **b** sont respectivement repris dans 40 μL de solutions à pH 3, 7 ou 11,5 préparées comme ci-dessus. Après homogénéisation, les solutions sont laissées 3 h à température ambiante. Après homogénéisation, 35 μL sont analysés par LC-MS (gradient 15-30% B en 30 min).

Effet de la température sur Re-1A1

Etude de la composition du mélange brut à 37°C en fonction du temps

Neuf fractions f3 du mélange brut de **Re-1A1** sont reprises dans 25 μL de tampon PBS. Les solutions sont soniquées et homogénéisées puis placées dans un bain d'huile stabilisé à 37°C. Après 0, 0,5, 1, 2, 3, 6, 9, 15 ou 24 h, un aliquot est homogénéisé, soniqué et centrifugé, puis 20 μL de surnageant sont analysés par LC-MS (gradient 15-30% B en 30 min). L'intégration des pics HPLC correspondant aux espèces monomériques **a** et **b** et homodimériques **c** et **d** permettent de calculer les proportions de chaque isomère par rapport à l'aire totale de ces espèces. Cette étude est réalisée en duplicate.

Etude de la composition du mélange brut lors d'une montée en température

Un aliquot f4 du mélange brut de **Re-1A1** est repris dans 125 μL de tampon PBS, homogénéisé et soniqué. La solution est placée dans un bain-marie à 20°C. Après 1 h d'incubation, 25 μL sont prélevés, soniqués puis centrifugés et 20 μL de surnageant sont analysés par LC-MS (gradient 15-30% B en 30 min). La température est ajustée à 37°C en environ 5 min. Après 1 h à 37°C les mêmes opérations sont répétées, de même que pour 60°C et 90°C. Le mélange restant est ensuite lentement ramené à température ambiante et le dernier aliquot est traité dans les mêmes conditions. Cette étude est réalisée en duplicate.

Etude des isomères a et b purifiés lors d'une montée en température

L'aliquot f1 d'isomère **a** ou **b** est repris dans 150 μL d'eau dégazée. Après homogénéisation, la solution est placée dans un bain-marie à 20°C. Après 1 h d'incubation, 25 μL sont prélevés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis placés à -20°C. La température est ajustée à 37°C en environ 5 min. Après 1 h à 37°C les mêmes opérations sont répétées, de même que pour 60°C et 90°C. Le mélange restant est ensuite lentement ramené à température ambiante et le dernier aliquot est traité dans les mêmes conditions. Les échantillons sont remis à température en même temps avant d'être successivement analysés par LC-MS (gradient 15-30% B en 30 min).

Stabilité dans le plasma de l'isomère b de Re-1A1

Une solution mère d'isomère **b** de **Re-1A1** 20 mM dans le DMSO est préparée juste avant le test. Le plasma (135 μL) est décongelé à température ambiante et 15 μL de solution de complexe sont ajoutés. Après homogénéisation, le mélange est incubé à température ambiante. Des aliquots de 10 μL sont régulièrement prélevés ($t = 0, 5, 15, 30$ min, 1, 3, 5 et 8 h) et les protéines du plasma sont précipitées avec 90 μL de MeOH (plasma/MeOH 1/9). Après centrifugation (1 min), le surnageant (80 μL) est analysé par HPLC analytique (HPLC Waters-2), avec un gradient 0-100% B en 30 min. L'intégration des pics HPLC correspondant aux espèces monomérique **b** et homodimérique **d** permet de calculer les proportions de chaque isomère par rapport à l'aire totale de ces espèces.

Test de sensibilité à la trypsine de Re-1A1

Le mélange brut de **Re-1A1** (1 mg, 1,3 μmol) est repris dans 2 mL de tampon HEPES (35 mM, pH 8,6), puis dilué pour obtenir une solution à 55,5 μM . Des aliquots de cette solution (180 μL) sont mélangés avec 20 μL de solution de trypsine 50, 10, 5, 1 et 0,5 μM pour conduire à des mélanges complexe/trypsine 10/1, 50/1, 100/1, 500/1 et 1000/1 molaires. Après 1 h d'incubation à température ambiante, 120 μL de solution sont prélevés et congelés dans de l'azote liquide avant d'être analysés par LC-MS (gradient 15-30%

B en 30 min). Une solution 57 μM de ligand **1A1**, présent sous forme de monomère et d'homodimère, est traitée de la même manière. Les chromatogrammes HPLC sont présentés dans les figures IV.53 et IV.54.

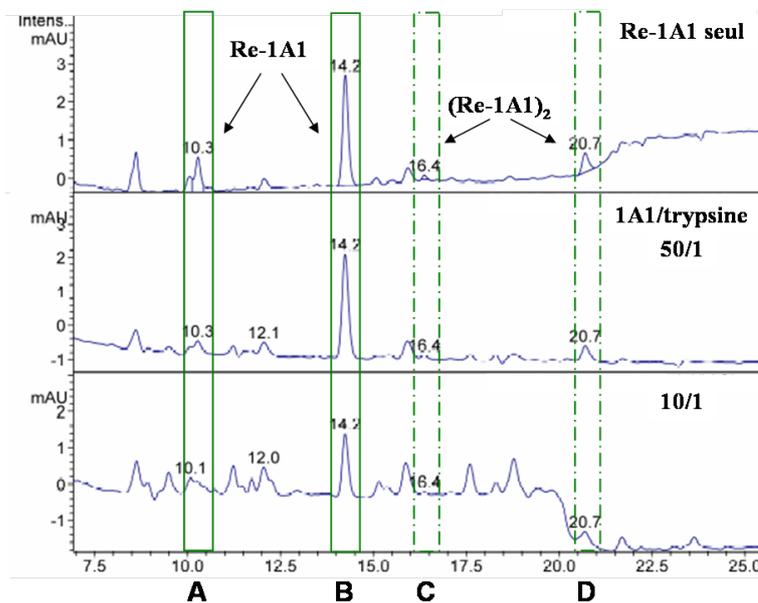


FIG. IV.53 – Analyses LC-MS de **Re-1A1** seul ou incubé en présence de trypsin. Colonne C18 analytique Varian, détection UV à 254 nm, gradient 15-30% B en 30 min.

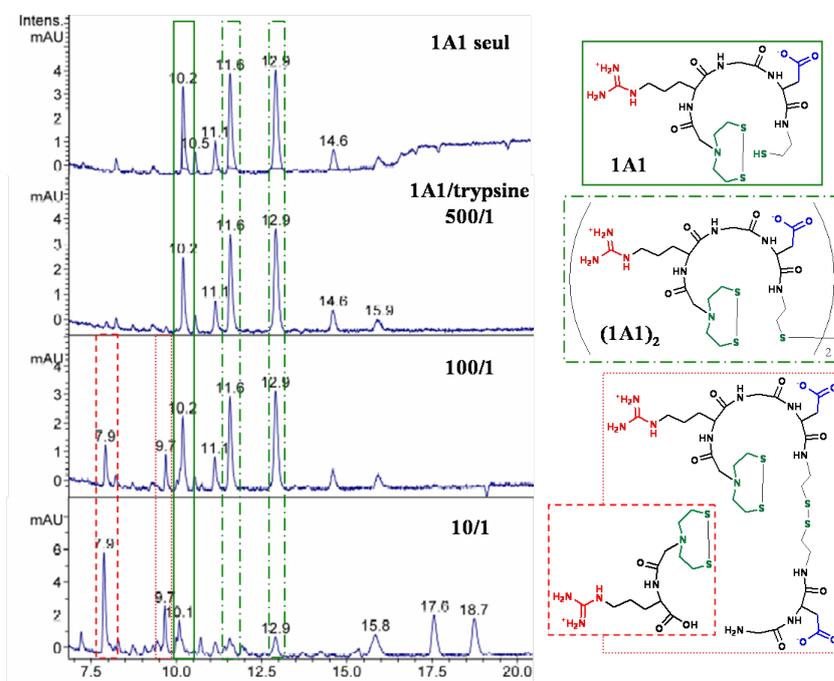


FIG. IV.54 – Analyses LC-MS de **1A1** seul ou incubé en présence de trypsin. Colonne C18 analytique Varian, détection UV à 254 nm, gradient 15-30% B en 30 min.

Tests de stabilité des complexes de ^{99m}Tc

Stabilité au glutathion (GSH)

Les complexes marqués au ^{99m}Tc sont obtenus selon le protocole **M1** ou **M2** ($V_{tot} = 200 \mu\text{L}$).

Le test est réalisé en ajoutant 25 μL de tampon HEPES (35 mM, pH 7,8) aux 200 μL de complexe, suivis de 25 μM de solution 10 mM de GSH dans l'HEPES. Après homogénéisation, le mélange est laissé à température ambiante. Le blanc est obtenu en ajoutant 50 μL de HEPES aux 200 μL de complexe. Les solutions sont préalablement dégazées. Des aliquots de 5 à 10 μL sont prélevés à $t = 0, 0,5, 1, 2, 4$ et 6 h. Ils sont dilués avec de l'eau pour donner un volume total de 1 mL et sont analysés par radio-HPLC analytique (HPLC Varian), avec un gradient 0-100% B en 30 min. Le volume de l'aliquot ainsi que le volume injecté en HPLC sont ajustés en fonction du rapport signal sur bruit.

Stabilité dans le plasma

Les complexes marqués au ^{99m}Tc sont obtenus selon le protocole **M1** ou **M2** ($V_{tot} = 200 \mu\text{L}$). Le plasma et le complexe sont mis à température dans un bain-marie à 37°C. Le complexe (25 μL) est ajouté au plasma (125 μL) et le mélange est placé à 37°C après homogénéisation. Des aliquots de 10 μL sont régulièrement prélevés ($t = 0, 0,5, 1, 2, 4$ et 6 h) et les protéines du plasma sont précipitées avec 90 μL de MeOH (plasma/MeOH 1/9). Après comptage du total et centrifugation (1 min), le culot et le surnageant sont séparés et comptés. Le surnageant (100 μL) est analysé par radio-HPLC analytique (HPLC Varian), avec un gradient 0-100% B en 30 min.

Stabilité dans de l'homogénat de tumeur

Test sans inhibiteurs de protéases. Les complexes marqués au ^{99m}Tc sont obtenus selon le protocole **M1** ou **M2**. Une tumeur (25 à 60 mg), conservée à -80°C depuis son prélèvement, est décongelée lentement sur de la glace. Elle est introduite dans un potter et 200 μL de tampon PBS sont ajoutés, suivis du complexe (0,05 MBq/mg de tumeur). L'ensemble est broyé, transféré dans un tube ependorf puis incubé à 37°C pendant 30 min. Du méthanol est ajouté (800 μL , MeOH/PBS 8/2) pour précipiter les protéines et l'ensemble est centrifugé. Le surnageant est prélevé et analysé par radio-HPLC analytique (HPLC Varian), avec un gradient 0-100% B en 30 min.

Test avec inhibiteurs de protéases. Les complexes marqués au ^{99m}Tc sont obtenus selon le protocole **M1** ou **M2**. Une tumeur (18 à 33 mg), conservée à -80°C depuis son prélèvement, est décongelée lentement sur de la glace. Du tampon PBS (5 μL /mg de

tumeur) est introduit dans un potter suivi d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans chélatants (0,05 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de tumeur). La tumeur est ajoutée après homogénéisation, puis l'ensemble est broyé et transféré dans un tube ependorf. Après incubation à 37°C pendant 30 min, du méthanol est ajouté (MeOH/PBS 8/2) pour précipiter les protéines et l'ensemble est centrifugé. Le surnageant est prélevé et analysé par radio-HPLC analytique (HPLC Varian), avec un gradient 0-100% B en 30 min.

Rq. Le cocktail d'inhibiteur de protéases (Sigma) est spécifique des extraits de tissus de mammifères et contient des inhibiteurs des protéases à sérine, à cystéine et acides ainsi que des aminopeptidases. Il ne contient pas de complexants de métaux.

Tests *in vitro*

Les tests *in vitro* ont été réalisés par M. Gonera, selon un protocole adapté de [Orlando 91]. L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (Chemicon, Temecula, CA) ou $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Enzyme Research Laboratories, UK) est diluée à 1000 ng/mL dans du tampon 1 (20 mM Tris HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2). Un aliquot de 100 μL /puits est ajouté sur une plaque à 96-puits (Millipore, Multiscreen-IP HTS) et l'ensemble est incubé une nuit à 4°C. La plaque est lavée avec un tampon 2 (50 mM Tris HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2 et respectivement 1 et 5% de BSA "Bovine Serum Albumin" pour $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_{IIb}\beta_3$) puis incubée pendant 2 h à température ambiante. La plaque est ensuite incubée pendant 3 h, en présence de différentes quantités de ligands (de 0,1 nM à 10 μM) et avec 0,06 nM de [^{125}I]-iodoéchistatine. Après incubation, les puits sont lavés deux fois avec du tampon 2 et comptés en présence de liquide à scintillation (appareil Top count NXT, PerkinElmer). Chaque résultat correspond à la moyenne de trois puits.

Tests *in vivo*

Criblage de 12 complexes par souris

Le criblage de 48 produits a été réalisé en deux fois avec tout d'abord les banques **a** et **b** puis **c** et **d** (Tab. IV.16).

Les ligands sont marqués au ^{99m}Tc séparément, juste avant l'injection, selon le protocole **M3**. Les mélanges sont réalisés en proportions 1/2/4 pour $\text{C}_2/\text{m}/\text{p}$ avec un volume total de 500 μL . Une injection de 100 μL est réalisée dans la veine de la queue de souris vigiles ayant développé une tumeur U87-MG. Les animaux sont sacrifiés après 1 ou 3 h par décervication. La tumeur est prélevée et comptée. Elle est ensuite extraite avec 1 à 1,5 mL de MeOH/PBS 8/2 selon sa taille. L'homogénat de tumeur est transvasé dans un tube ependorf, compté puis centrifugé. Le surnageant est prélevé, compté, de même

TAB. IV.16 – Mélanges de 12 traceurs testés *in vivo*.

Mélange	C ₂	m	p	Mélange	C ₂	m	p
a	1A1	1A3	1A4	c	3A1	3A3	3A4
	1B1	1B3	1B4		3B1	3B3	3B4
	1C1	1C3	1C4		3C1	3C3	3C4
	1D1	1D3	1D4		3D1	3D3	3D4
b	2A1	2A3	2A4	d	4A1	4A3	4A4
	2B1	2B3	2B4		4B1	4B3	4B4
	2C1	2C3	2C4		4C1	4C3	4C4
	2D1	2D3	2D4		4D1	4D3	4D4

que le culot. Le surnageant est ensuite analysé (500 μ L) par radio-HPLC (HPLC Varian) avec un gradient 15-30% B en 30 min. Les mélanges de traceurs, ainsi que les solutions de chaque complexe, sont analysés dans les mêmes conditions.

Criblage de 4 complexes par souris

Le criblage des 32 traceurs à linker C₂ et C₃ a été réalisé par l'injection de mélanges de 4 complexes (Tab. IV.17).

TAB. IV.17 – Mélanges de 4 traceurs testés *in vivo*.

Mélange	C ₂		C ₃	
e	1A1 (RGD)	2B1 (r β d)	3C2 (RGe)	4D2 (r β E)
f	1B1 (R β D)	2C1 (rGe)	3D2 (R β e)	4A2 (rGD)
g	1C1 (RGE)	2D1 (r β e)	3A2 (RGd)	4B2 (r β D)
h	1D1 (R β E)	2A1 (rGd)	3B2 (R β d)	4C2 (rGE)
i	3A1 (RGd)	4B1 (r β d)	4C2 (RGe)	4D2 (r β E)
j	3B1 (R β d)	4C1 (rGe)	4D2 (R β e)	4A2 (rGD)
k	3C1 (RGe)	4D1 (r β e)	4A2 (RGd)	4B2 (r β D)
l	3D1 (R β e)	4A1 (rGd)	4B2 (R β d)	4C2 (rGE)

Les ligands sont marqués au ^{99m}Tc séparément, juste avant l'injection, selon le protocole **M4**, la réduction des ligands ayant été effectuée la veille. Les mélanges sont réalisés en ajoutant 30 μ L de chaque complexe pour un volume total de 120 μ L. Une injection de 100 μ L est réalisée dans la veine de la queue de souris vigiles ayant développé une tumeur U87-MG. Les animaux sont sacrifiés après 1,5 h par décervication. La tumeur est prélevée et comptée. Elle est ensuite extraite avec 1 mL de MeOH/PBS 8/2. L'homogénat de tumeur est transvasé dans un tube ependorf, compté puis centrifugé. Le surnageant est prélevé, compté, de même que le culot. Le surnageant est ensuite analysé (450 μ L)

par radio-HPLC (HPLC Varian) avec un gradient 15-30% B en 30 min. Les mélanges de traceurs sont analysés dans les mêmes conditions.

Etude de la biodistribution de ^{99m}Tc -3B1, ^{99m}Tc -4C1 et ^{99m}Tc -1D2 et ^{99m}Tc -2A2

Les ligands **3B1**, **4C1** et **1D2** et **2A2** sont marqués au ^{99m}Tc selon le protocole **M4**. Pour chaque traceur, une injection de 100 μL est réalisée dans la veine de la queue d'une souris vigile ayant développé une tumeur U87-MG. Après 1,5 h, les 4 souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (2%). Les urines puis le sang (400 à 800 μL) sont tout d'abord prélevés suivis du pancréas, de la rate, des reins, du cœur, des poumons, de la bile et du foie. Les organes sont comptés puis congelés et conservés à -20°C . Ils ont été pesés après décroissance radioactive.

La tumeur est également prélevée et comptée. Elle est ensuite introduite dans un potter contenant 150 μL de tampon PBS et 1,5 μL de cocktail d'inhibiteur de protéases. Elle est broyée, puis 600 μL de MeOH sont ajoutés (MeOH/PBS 8/2). Après un nouveau broyage, l'homogénat de tumeur est transvasé dans un tube ependorf, compté puis centrifugé. Le surnageant est prélevé, compté, de même que le culot. Le surnageant est ensuite analysé par radio-HPLC (HPLC Varian) avec un gradient 0-100% B en 30 min. Les traceurs sont analysés dans les mêmes conditions.

Conclusion et perspectives

Ce travail avait pour objectif la mise au point de nouveaux traceurs marqués au ^{99m}Tc pour l'imagerie moléculaire de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. L'intérêt du technétium comme agent d'imagerie est largement établi et la chélation du cœur oxotechnétium par le motif NS_2/S est bien documentée. La surexpression de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, au niveau des cellules tumorales ainsi que des cellules endothéliales permettant la vascularisation des tumeurs, en fait une cible intéressante pour la détection précoce du cancer. Cette intégrine reconnaît le motif peptidique RGD, dont la structure détermine la sélectivité des ligands pour cette intégrine.

Ne disposant d'aucun modèle prédictif fiable de la structure des complexes d'oxotechnétium au début de ce projet, nous avons entrepris de développer ces traceurs selon une approche combinatoire. Nous avons également souhaité évaluer la faisabilité d'un criblage *in vivo* des complexes d'oxotechnétium. Ce type d'approche permet, *a priori*, de prendre en compte au plus tôt les aspects de biodistribution et de pharmacocinétique.

Les traceurs ont été obtenus selon deux stratégies. La première consiste à réaliser l'assemblage combinatoire de motifs indépendants par coordination du cœur métallique, conduisant à des analogues acycliques de RGD. La seconde approche fait appel à la cyclisation d'analogues linéaires de RGD par la coordination d'un cœur oxotechnétium.

La première partie de ce travail concernait la mise au point du criblage *in vivo*. Le modèle tumoral utilisé est une tumeur de glioblastome humain, U87-MG, implantée chez des souris nude. Nous avons tout d'abord validé ce modèle tumoral, qui était nouveau au laboratoire, à l'aide d'un composé tritié ($[^3\text{H}]$ -propionyl-c(RGDfK) (**1**)). Nous avons montré l'existence de sites saturables avec son équivalent non tritié, ainsi que la spécificité de liaison sur $\alpha_V\beta_3$, par compétition avec un ligand connu, c(RGDyV) (**2**).

Le mode d'indentification envisagé pour le criblage *in vivo*, par analyse des extraits de tumeurs, a été mis au point sur des traceurs modèles. Le $^{99m}\text{Tc-DKCK-c(RGDfK)}$ (**3**), décrit par Haubner comme ciblant l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, a pu être clairement mis en évidence dans les extraits de tumeurs après injection *in vivo*. Deux composés présentant le motif de complexation NS_2/S , ainsi que l'élément ciblant c(RGDfK), et représentatifs des traceurs cycliques et acycliques ont également été testés. Le produit $^{99m}\text{Tc-CK(NS}_2\text{)-c(RGDfK)}$ (**4**), obtenu par cyclisation intramoléculaire, a pu être mis en évidence dans

les tumeurs sous la forme d'un produit de clivage, $^{99m}\text{Tc-11}$. L'apparente instabilité du produit modèle doit être relativisée par sa plus grande flexibilité par rapport aux traceurs cycliques étudiés dans ce projet et qui joue vraisemblablement un rôle dans sa sensibilité aux endoprotéases. Le composé modèle de l'approche bimoléculaire, $\text{Cys-}^{99m}\text{Tc-(NS}_2\text{)-c(RGDfK)}$ (**5**), n'a pas été identifié dans l'extrait de tumeur, laissant présager une certaine instabilité de ce type de complexes.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'approche bimoléculaire, permettant d'obtenir des complexes par l'assemblage combinatoire de modules complémentaires, par coordination d'un cœur oxotechnétium. Afin d'explorer cette voie, nous avons synthétisé une première série de modules **A** et **B**, présentant respectivement un mime de l'acide aspartique et un mime de l'arginine. Les 24 modules **A** ont été obtenus par synthèse combinatoire sur support solide et les 3 modules **B**, par synthèse en solution. L'assemblage a été réalisé à l'aide de rhénium pour conduire à des complexes aussi bien à l'état isolé qu'en mélange. Le marquage au ^{99m}Tc a été mis au point pour fournir une méthode assez générale qui devra être optimisée au cas par cas pour les complexes qui seront sélectionnés comme traceurs potentiels.

Des tests de stabilité au glutathion et dans le plasma ont été réalisés sur deux complexes modèles ($\text{C2-}^{99m}\text{Tc-E3}$ et $\text{C3-}^{99m}\text{Tc-d6}$). Les résultats des tests dans le plasma sont contrastés et la résistance des complexes semble fortement dépendre de leur nature chimique. Les tests de stabilité au glutathion ont conduit, comme attendu, à la formation des complexes de substitution par le GSH. Si le GSH est peu présent dans le milieu circulant, on y trouve néanmoins diverses protéines présentant des thiols libres à leur surface (par exemple la sérum albumine) et qui pourraient avoir un effet délétère *in vivo*. La sensibilité au GSH est surtout problématique pour le criblage *in vivo*, dans la perspective d'une identification par analyse des extraits de tumeurs. En effet, du GSH peut être relargué par lyse cellulaire lors de cette étape et empêcher l'identification des traceurs.

Compte tenu des difficultés soulevées pour un criblage *in vivo*, nous avons choisi d'abandonner provisoirement cette approche bimoléculaire pour nous tourner vers les complexes cycliques. Toutefois, ces composés bimoléculaires font depuis peu l'objet de tests de liaison *in vitro* sous leur forme rhéniée. En effet, des tests *in vitro* de liaison sur des intégrines purifiées, par déplacement de l' ^{125}I -iodoéchistatine, ont été mis en place au laboratoire depuis le printemps 2008. Ce type de tests n'avait pas été adopté au début de ce projet car leur mise au point est lourde et seul un nombre très restreint d'intégrines était alors disponible.

La seconde approche que nous avons développée a permis d'obtenir des complexes cyclisés par la coordination d'un cœur oxorhénium ou oxotechnétium. Une chimiothèque de 64 tripeptides linéaires fonctionnalisés, analogues de RGD, a été synthétisée en parallèle sur support solide. L'optimisation de la voie de synthèse a permis de mettre au point une méthode générale mais dont l'inconvénient est de nécessiter une purification par HPLC des peptides. Une amélioration du mode de synthèse des ligands linéaires a été envisagée au laboratoire par P. Dubs, à l'aide de la réaction multicomposant de Ugi (Fig. IV.55). Toutefois, cette voie prometteuse n'a pas pu être développée à cause de rendements décevants et de l'instabilité des aldéhydes nécessaires à cette synthèse.

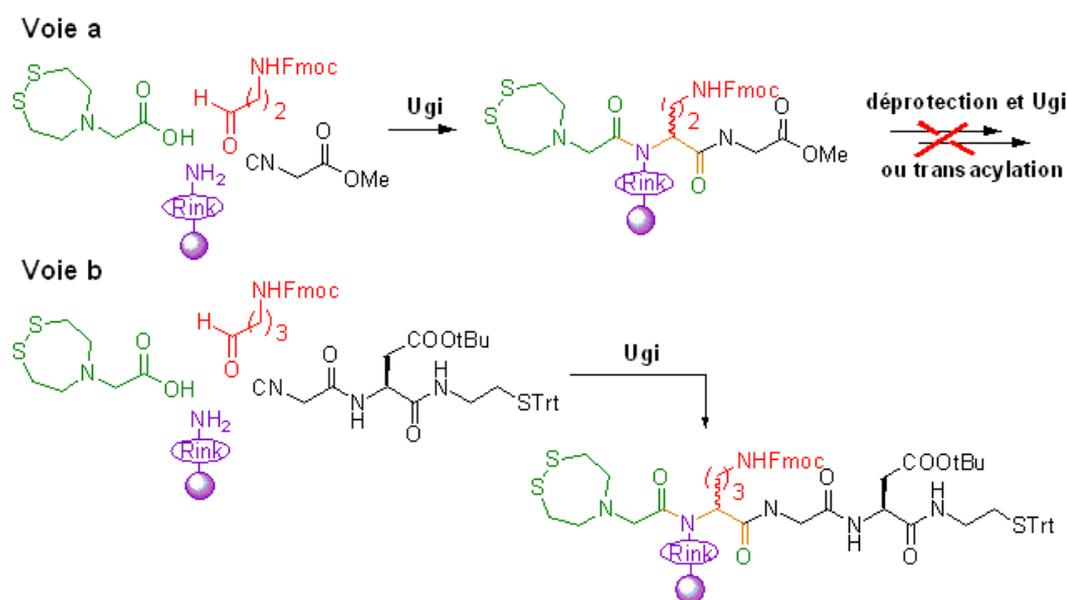


FIG. IV.55 – Synthèse des ligands linéaires par la réaction multicomposants de Ugi.

Les peptides ont été cyclisés par coordination de ReO^{3+} . Nous avons mis en évidence, pour **Re-1A1**, la formation d'isomères des complexes monomériques et dimériques. La plasticité de ces isomères a été étudiée dans différentes conditions de pH et de température. Il semble que dans des conditions physiologiques, les proportions de ces isomères restent constantes. Les tests de liaison *in vitro*, désormais disponibles au laboratoire, ont donné des résultats prometteurs avec l'isomère **Re-1A1 b** qui présente une IC_{50} de 86 nM et une IC_{50} 10 fois plus élevée avec $\alpha_{IIb}\beta_3$. L'ensemble des complexes rhéniés de la chimiothèque font actuellement l'objet d'un criblage *in vitro* et permettront de sélectionner les complexes les plus affins pour $\alpha_V\beta_3$.

Le marquage au ^{99m}Tc a été optimisé sur $^{99m}\text{Tc-1A1}$ et le protocole s'est avéré généralisable à la majorité des ligands. Seuls les traceurs présentant un linker aromatique para n'ont pas pu être obtenus de manière satisfaisante, probablement en raison des trop fortes contraintes dans le cycle.

Des tests de stabilité au glutathion et dans le plasma ont également été réalisés sur six composés modèles. Les résultats des stabilités en présence de GSH sont dans l'ensemble satisfaisants, même s'il semble que pour l'un des traceurs, un isomère différent de celui obtenu initialement se forme dans ces conditions. Les complexes à linker C₂ semblent stables dans le plasma. Au contraire, les composés modèles ^{99m}Tc-2B2 (C₃) et ^{99m}Tc-4D3 (méta) semblent en partie piégés par les protéines du plasma. Il est possible que, dans ce cas, ces produits ne soient pas relargués *in vivo* et donc ne soient pas disponibles pour le ciblage de la tumeur.

Des premiers tests de criblage *in vivo* ont été réalisés sur une partie de la chimiotèque de traceurs cyclisés au ^{99m}Tc. Dans tous les cas, seul du technétium libre réduit a été mis en évidence dans les extraits de tumeurs. Cependant, le pourcentage de la dose injectée retrouvé dans les tumeurs est comparable à celui de produits décrits dans la littérature. Des tests de stabilité en homogénat de tumeur ont été réalisés et ont montré la nécessité d'ajouter des inhibiteurs de protéases lors de l'étape d'extraction des tumeurs. Une étude de biodistribution a été réalisée sur les complexes ^{99m}Tc-3B1, ^{99m}Tc-4C1, ^{99m}Tc-1D2 et ^{99m}Tc-2A2. Les résultats montrent une élimination principalement rénale et mettent en évidence une relativement faible accumulation dans le foie et les organes sains. Ces résultats encourageants suggèrent que l'étape d'extraction des tumeurs pourrait être délétère pour les traceurs et empêcherait leur identification directe. Bien que plus lourde à mettre en œuvre, une alternative pour l'analyse des criblages *in vivo* repose sur la déconvolution des chimiothèques. Toutefois, la mise en place des tests *in vitro* au laboratoire offre de nouvelles perspectives pour le criblage des traceurs sous la forme de complexes d'oxorhénium.

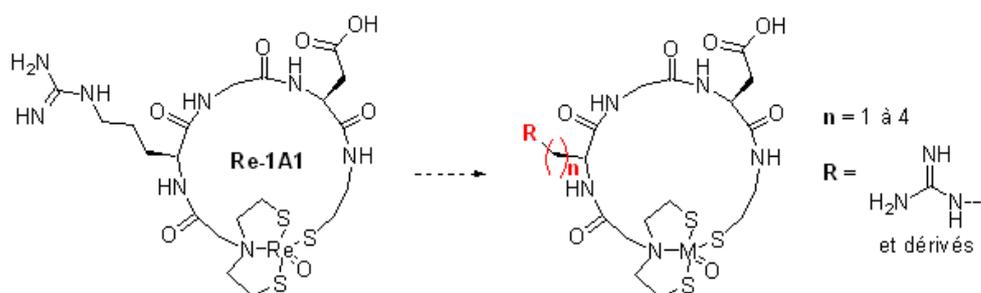


FIG. IV.56 – Perspectives de variations de la séquence RGD au niveau de l'arginine.

Ainsi, ces travaux préliminaires ont permis de mettre en place au laboratoire un modèle tumoral exprimant l'intégrine $\alpha_V\beta_3$. Nous avons également validé la faisabilité d'un criblage *in vivo* avec des composés modèles. Cependant cette approche semble délicate à réaliser pour les molécules que nous avons développées en raison de leur instabilité dans

les conditions d'analyses. D'autre part, ces travaux ont permis d'explorer deux approches de conception de traceurs marqués au Re, ^{99g}Tc ou ^{99m}Tc , analogues de la séquence RGD, où le métal joue le rôle d'élément structurant. L'approche cyclique semble plus prometteuse que l'approche bimoléculaire pour des raisons de stabilité des complexes. Les premiers tests *in vitro* ont dès à présent permis d'identifier un complexe cyclique de rhénium comme ligand potentiel de $\alpha_V\beta_3$.

Les perspectives de ce travail sont désormais de cribler *in vitro* l'ensemble des molécules obtenues, sous leur forme rhéniée, puis de marquer les plus intéressantes au ^{99m}Tc et de les tester *in vivo*. Des variations de la séquence RGD sont également envisagées suite à ces premiers résultats, notamment par des modifications au niveau de l'arginine que nous n'avons pas modifiée dans ces travaux (Fig IV.56).

Annexe Générale

Chimie

Réactifs

Les réactifs chimiques, de pureté analytique, et les solvants ont été obtenus chez Sigma-Aldrich, VWR, Fluka ou SDS et étaient de la plus haute pureté disponible. Les résines et acides aminés proviennent de chez Novabiochem et la HATU de chez Molekula.

Matériel

Les chromatographies flash ont été réalisées sur gel de silice 40-63 μm Merck. Le suivi des réactions a été effectué par chromatographie analytique sur couche mince (Merck 60F₂₅₄). Les points ont été visualisés grâce à une lampe UV (254 nm) et révélés à la ninhydrine ou à l'acide phosphomolybdique.

Les spectres RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker AVANCE 250 ou 400, et sont reportés en ppm par rapport au triméthylsilane (TMS). Les spectres de masse ont été réalisés sur un appareil Quattro micro ou Plattform LCZ (Micromass, Altrincham, U.K.). Les analyses de masse haute résolution (HRMS) ont été réalisées sur un spectromètre Q-tof (Micromass).

Procédures générales de synthèse sur support solide (SPPS)

Synthèses en stratégie Fmoc

Les réactions sur support solide ont été réalisées dans des réacteurs cylindriques en verre munis à l'une de leurs extrémités d'un bouchon en verre et à l'autre extrémité d'un fritté suivi d'un robinet permettant l'élimination des excès de réactifs par aspiration. Au début de chaque synthèse et après chaque lavage au méthanol, les résines ont été conditionnées dans du DCM pour permettre un gonflement maximal.

La procédure générale de synthèse sur support solide en stratégie Fmoc est présentée ci-dessous. Des adaptations ont parfois été nécessaires et sont présentées dans les parties expérimentales des différents chapitres.

Selon les cas, une procédure spécifique est utilisée pour greffer le premier résidu sur la résine. Les acides aminés suivants sont introduits en utilisant quatre étapes récurrentes présentées dans le tableau IV.18. L'ensemble de la synthèse est réalisé à température ambiante.

TAB. IV.18 – *Étapes récurrentes pour la synthèse sur support solide.*

Étape	Agent chimique ou solvant	Nombre de répétitions	Durée
1 déprotection Fmoc	pipéridine/NMP 1/4 (ou pipéridine/DMF)	3	5 min
2 lavages	NMP (ou DMF)	3	1 min
	DCM	3	1 min
	NMP (ou DMF)	3	1 min
3 couplage	Fmoc-X-OH, DIPEA, agent d'activation	1 à 3*	2 h à 1 nuit
4 lavages	NMP (ou DMF)	3	1 min
	DCM	3	1 min
	MeOH	3	1 min

* en fonction des résultats des tests de Kaiser et au TNSB.

Étape 1, déprotection Fmoc : La résine est suspendue dans deux volumes de pipéridine/NMP (ou DMF) 1/4 et le mélange est agité pendant 5 min. Le solvant est filtré et l'étape est répétée trois fois.

Étape 2 et 4, lavages : La résine est agitée dans le solvant de lavage (10 mL/eq. de linker) pendant 1 min. Les couplages se font en général dans la NMP ou la DMF. Le dernier lavage avant couplage et le premier lavage après couplage doivent donc être réalisés dans le solvant utilisé pour la réaction. Le DCM est utilisé pour conditionner les résines et permettre leur gonflement ainsi que pour les lavages. D'une manière générale, les alcools conduisent à une rétractation des résines, ils sont donc utilisés pour les sécher. De plus, le méthanol permet de solubiliser la dicyclohexylurée formée quand le couple DCC/HOBt est utilisé comme agent d'activation de l'acide aminé.

Étape 3, couplage : Différentes méthodes d'activation des acides aminés peuvent être utilisées. Nous avons principalement utilisé la HATU en présence de DIPEA et le couple DCC/HOBt. Les quantités de réactifs sont détaillées dans chaque partie expérimentale.

Contrôle qualitatif des étapes de couplage et de déprotection

Après chaque étape de couplage, un test (Kaiser et/ou TNBS) est effectué pour vérifier son efficacité en révélant la présence d'amines libres restantes. Le couplage est réitéré jusqu'à obtenir un test négatif.

Test au TNBS [Hancock 76] :

Solution 1 : DIPEA à 20% dans la DMF,

Solution 2 : solution 1% d'acide 2,4,6-trinitrobenzensulfonique (TNBS) dans la DMF.

Deux gouttes de chaque solution sont ajoutées à un échantillon de résine dans un tube à essais. Le mélange est laissé 5 min à température ambiante. La présence de fonctions amines libres conduit à une coloration rouge-orangé des billes de résine.

Test de Kaiser :

Solution 1 : 80 g de phénol dans 20 ml d'EtOH à 95%,

Solution 2 : pyridine/KCN 98/2,

Solution 3 : 0,1 g de ninhydrine dans 100 ml d'EtOH à 95%.

Trois gouttes de chaque solution sont ajoutées à un échantillon de résine dans un tube à essais. Le mélange est chauffé 5 min à 110°C. La présence de fonctions amines libres conduit à une coloration bleue des billes de résine.

Test de Kaiser quantitatif

La quantité de fonctions amines sur la résine peut être déterminée par un test de Kaiser quantitatif [Sarin 81].

Une masse m (5-6 mg) de résine est pesée. Les réactifs du test de Kaiser sont ajoutés à la résine (75 μL pour les solutions 1 et 3 et 100 μL pour la solution 2) et un mélange sans résine est également réalisé comme contrôle. Les mélanges sont chauffés à 110°C pendant 5 min et la réaction est arrêtée en ajoutant dans chaque tube 4,75 mL d'EtOH à 60% dans l'eau ($V_{tot} = 5 \text{ mL}$). Les deux solutions sont diluées au 1/5 puis leurs absorbances sont mesurées à 570 nm. La substitution (S) de la résine correspond au nombre de fonctions amines par gramme de résine :

$$S = \frac{n}{m} = \frac{(A_{res} - A) \times V}{l \times \epsilon \times m}$$

avec S en mmol.g^{-1} ; n en mmol ; m en g ; V en mL ; $l = 1 \text{ cm}$; $\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; A_{res} l'absorbance de la solution contenant la résine et A celle de la solution de contrôle.

Dosage Fmoc

Le contrôle quantitatif du taux de couplage peut être réalisé par dosage Fmoc. La déprotection du groupement Fmoc conduit à la formation de dibenzofulvène dont l'adduit

avec la pipéridine absorbe dans l'UV ($\lambda = 290 \text{ nm}$, $\epsilon = 5253 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Cette propriété est mise à profit pour déterminer le taux de couplage des résines.

Une masse m (5-6 mg) de résine est pesée et la résine est mise en suspension dans $V = 10 \text{ mL}$ d'un mélange pipéridine/DMF 1/4 puis la suspension est agitée pendant 10 min à température ambiante. Une mesure d'absorbance (A) est alors effectuée à 290 nm et donne le nombre de groupements Fmoc clivés (n) selon la loi de Beer-Lambert. La substitution (S) de la résine correspond au nombre de fonctions réactives par gramme de résine :

$$S = \frac{n}{m} = \frac{A \times V}{l \times \epsilon \times m}$$

avec S en $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$; n en mmol; m en g; V en mL; $l = 1 \text{ cm}$ et $\epsilon = 5253 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Calcul de la substitution théorique de la résine

La substitution théorique de la résine est donnée par :

$$S_{th} = \frac{S_i \times 1000}{1000 + S_i \times (M_2 - M_1)}$$

avec S_i , la substitution initiale de la résine; M_2 , la masse moléculaire du groupement fixé (g/mol) et M_1 , la masse moléculaire du groupement partant (g/mol). Le rendement de couplage correspond au rapport entre S et S_{th} .

Analyses et purifications HPLC

Les analyses et purifications par HPLC ont été réalisées sur divers appareils dont les caractéristiques sont décrites ci-dessous. Sauf mention contraire, les temps de rétention donnés dans les analyses des produits ont été obtenus sur le système Varian, avec une colonne analytique et un gradient 0-100% B en 30 min.

Pré-purifications sur colonne Sep-Pak

Les pré-purifications de certains ligands et de complexes de rhénium ont été réalisées sur des colonnes Sep-Pak Vac 18 (20cc, 500 mg ou 5 g, Cartridges, Waters).

Pour ces purifications, les ligands tripeptidiques bruts ont été repris dans de l'acide acétique ou dans un mélange eau/AcN, alors que les complexes de rhénium ont été repris dans du DMSO.

La cartouche est conditionnée par les éluions successives d'un volume (2 ou 20 mL, selon la taille) d'EtOH, d'EtOH à 10 % dans l'eau, d'eau et enfin d'eau + 0,1% de TFA. La solution à purifier est déposée au sommet de la cartouche puis un gradient de 0-100% B est réalisé manuellement en faisant varier la proportion de B de 5% en 5% (A : eau + 0,1% de TFA; B : AcN + 0,1% de TFA).

HPLC Varian

Les analyses des composés technétiés, de certains produits finaux et des purifications ont été réalisées par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) sur un appareil Prostar Varian couplé à un détecteur à barette de diodes Varian 335, suivi en série d'un détecteur gamma HERM LB500 (radioflow monitor, Berthold). Les séparations ont été effectuées sur des colonnes Varian Pursuit C18 :

- colonne analytique : $4,6 \times 250$ mm, $5 \mu\text{m}$, protection par une garde analytique C18 Security Guard (Phenomenex), $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;
- colonne semi-préparative : 10×250 mm, $5 \mu\text{m}$, $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;
- colonne préparative : $21,2 \times 250$ mm, $5 \mu\text{m}$, $20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Un système d'éluant binaire (A : 0,1% d'acide formique dans l'eau ; B : 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile) a été utilisé pour réaliser des gradients linéaires. Nous avons principalement utilisé des gradients 0-100% B en 30 min et 15-30% B en 30 min pour les analyses et divers gradient x-y% B en 30 min pour les purifications sur colonne semi-préparative et préparative. Ces gradients sont décrits dans les tableaux IV.19 et IV.20.

TAB. IV.19 – Gradient 0-100% B en 30 min

t (min)	% A	% B
0	100	0
5	100	0
35	0	100
40	0	100
45	100	0
60	100	0

TAB. IV.20 – Gradient x-y% B en 30 min

t (min)	% A	% B
0	100	0
5	100 - x	x
35	100 - y	y
36	0	100
41	0	100
42	100	0
57	100	0

HPLC Waters-1 et 2

Les analyses et purifications de certains produits ont été réalisées sur deux appareils identiques, de type Waters Controller 600, munis de pompes Waters 600, couplés à un détecteur à barette de diodes Waters 996. Les séparations ont été effectuées sur des colonnes Vydac "protein/peptide reversed-phase" C18 analytiques ($4,6 \times 250$ mm, $5 \mu\text{m}$) ou semi-préparatives (10×250 mm, $5 \mu\text{m}$).

HPLC Waters-3

Les analyses de produits tritiés et certaines purifications ont été réalisées sur un appareil Waters, muni de pompes 600E, couplé à un détecteur à barette de diodes Waters 996. Les séparations ont été effectuées sur des colonnes Varian Pursuit C18.

LC-MS

Les analyses de LC-MS ont été réalisées sur un système chromatographique Agilent 1100 Series, avec une colonne analytique Varian Pursuit C18 protégée par une garde C18 (Security Guard, Phenomenex), dans un système d'éluant binaire (A : 0,1% d'acide formique dans l'eau ; B : 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile), couplé à un spectromètre de masse Bruker Esquire HCT ES/MS.

Sauf mention contraire, les analyses ont été réalisées avec un gradient 0-100% B en 30 min.

Technétium : ^{99g}Tc et ^{99m}Tc

Marquage au ^{99g}Tc .

Attention !!! Le technétium 99g est un émetteur β^- (292 keV) avec une période de $2,12 \cdot 10^5$ ans. Les procédures normales de sécurité doivent être respectées pour éviter toute contamination. Le $[^{99g}\text{TcO}_4][\text{NH}_4]$ a été obtenu du Oak Ridge National Laboratory. Il a été purifié avant utilisation par un traitement avec du peroxyde d'hydrogène et de l'hydroxyde d'ammonium dans le méthanol pendant une nuit. L'évaporation du solvant a permis d'obtenir le pertechnétate d'ammonium sous la forme d'une poudre blanche.

Intermédiaire tétrabutylammonium tétrachlorooxo $[^{99g}\text{Tc}]$ technetate, d'après [Davison 80, Davison 82]. Le $[^{99g}\text{TcO}_4][\text{NH}_4]$ (420 mg, 2,32 mmol, 1 eq.) est dissous dans du HCl 12 N (50 mL) et la solution prend une coloration vert/violet. Après 10 min d'agitation à température ambiante, du bromure de tétrabutylammonium (972 mg, 3,02 mmol, 1,3 eq.) préalablement solubilisé dans de l'eau (2 mL) est lentement additionné. Un précipité vert/gris se forme et est récupéré sur un fritté. Il est lavé au propan-2-ol (5×3

mL) puis à l'Et₂O (2 × 5 mL), conduisant à une poudre grise.

Intermédiaire ^{99g}TcO-gluconate. Le gluconate de sodium (24 mg, 110 μmol, 10 eq.), dissous dans 100 μL (+ 100 μL pour rincer) d'eau dégazée, est ajouté au [^{99g}TcO₄][NH₄] (2 mg, 11 μmol, 1 eq.). Le SnCl₂ (2 mg, 11 μmol, 1 eq.) est dissous dans 20 μL de HCl 0,1N dégazé et est ajouté par fractions de 2 μL au mélange précédent qui prend une coloration violette. Cette solution de ^{99g}TcO-gluconate (11 μmol dans 220 μL) doit être immédiatement utilisée pour la complexation de ligands au ^{99g}Tc. Dès qu'elle tend vers une coloration noire, elle ne doit plus être utilisée car l'intermédiaire oxotechnétate formé a alors été réduit.

Intermédiaire ^{99g/99m}TcO-gluconate (co-marquage). Le gluconate de sodium (24 mg, 110 μmol, 10 eq.), dissous dans 100 μL (+ 100 μL pour rincer) de solution saline de [^{99m}TcO₄⁻], éluée du générateur ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, est ajouté au [^{99g}TcO₄][NH₄] (2 mg, 11 μmol, 1 eq.). Le SnCl₂ (2 mg, 11 μmol, 1 eq.) est dissous dans 20 μL de HCl 0,1N dégazé et est ajouté par fractions de 2 μL au mélange précédent qui prend une coloration violette. Cette solution de ^{99g}TcO-gluconate (11 μmol dans 220 μL) doit être immédiatement utilisée pour le co-marquage de ligands au ^{99g/99m}Tc. Dès qu'elle tend vers une coloration noire, elle ne doit plus être utilisée car l'intermédiaire oxotechnétate formé a alors été réduit.

Marquage au ^{99m}Tc.

Attention!!! Le technétium 99m est un émetteur γ (140 keV) avec une période de 6 h. La manipulation des solutions contenant ce radionucléide doit toujours être effectuée derrière un écran de plomb. Le [^{99m}TcO₄⁻] a été élué sous la forme d'une solution saline physiologique à partir de générateurs ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, calibrés à 4 GBq, obtenus chez CIS Bio International (ELUMATIC III). Ce type de générateur peut être utilisé pendant environ 15 jours avec une élution quotidienne de 5 mL.

Intermédiaire ^{99m}TcO-gluconate. L'intermédiaire ^{99m}TcO-gluconate est obtenu en mélangeant une solution de chlorure d'étain (2 μL, 2 mg/ml dans HCl 0,1 N) avec une solution aqueuse de gluconate de sodium (10 μL, 50 mM) et une solution de [^{99m}Tc]pertechnétate (90 μL, environ 130 MBq) éluée d'un générateur ⁹⁹Mo/^{99m}Tc. L'ensemble est homogénéisé et laissé au repos 5 min à température ambiante avant utilisation.

Le comptage des solutions a été réalisé sur un compteur MEDI 404 (Medisystem).

Biologie

Culture cellulaire

La lignée cellulaire U87-MG a été fournie par l'European Collection of Cell Culture (SIGMA) et a été conservée dans de l'azote liquide avant d'être mise en culture. Le milieu de culture contient les éléments suivants (pour 500 mL) :

- EMEM (Eagle's minimum essential medium) : 500 mL ;
 - 2 mM de L-glutamine : 5 mL d'une solution 200 mM ;
 - 1% d'acides aminés non-essentiels : 5 ml de solution commerciale ;
 - 1 mM de pyruvate de sodium : 5 mL d'une solution 100 mM ;
 - 10% de SVF (sérum de veau foetal) : 50 mL ;
 - pénicilline (100 U/mL) et streptomycine (100 µg/mL) : 5 mL d'une solution à 10 000 U/mL de pénicilline et à 10 mg/mL de streptomycine dans NaCl 0,9%.
- Le milieu est filtré et peut se conserver 15 jours à +4°C.

Les cellules sont de type adhérentes et sont donc cultivées dans des flacons. Elles sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂.

Mise en culture :

L'ampoule de cellules est sortie du tank d'azote liquide et placée immédiatement dans de la glace. Elle est décongelée sous l'eau, son contenu est transvasé dans un falcon de 15 mL et l'ampoule est rincée avec un peu de milieu de culture. Le volume est complété à 10 mL avec du milieu de culture. Le mélange est centrifugé (5 min à 1500 tr/min) pour éliminer le DMSO qui était présent pour la congélation. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension. 5 mL de milieu de culture sont ajoutés et l'ensemble est homogénéisé avant d'être transféré dans un flacon de 50 mL. Celui-ci est placé à l'étuve et son bouchon dévissé. Le premier passage doit être effectué après 24 h.

Passages : pour un flacon de 275 mL (75 cm³)

La trypsine, le milieu et la solution saline Hansk doivent être utilisés à température ambiante.

- (1) Le flacon est sorti de l'étuve en conditions stériles et les cellules sont observées au microscope pour vérifier qu'elles sont arrivées à confluence.
- (2) Le flacon est vidé dans un bécher d'eau de Javel et rincé précautionneusement avec 5 mL de solution saline Hansk.
- (3) 5 mL de trypsine sont ajoutés et le flacon est placé 5 min à l'étuve pour favoriser le décollement des cellules. Les cellules encore adhérentes sont ensuite décollées en tapotant la boîte sur la paille.
- (4) 5 mL de milieu sont ajoutés et le mélange est homogénéisé en essayant de briser le

maximum d'amas cellulaires ($V_{tot} = 10$ mL).

(5) Pour un passage au 1/10, 1 mL du mélange précédent est introduit dans un nouveau flacon de 275 mL contenant 19 mL de milieu. Après homogénéisation, le flacon est placé à l'étuve.

Suivant les besoins, le passage peut être fait dans différentes proportions à partir de $V_{tot} = 10$ mL :

passage 1/2 : 5 ml cellules + 15 ml de milieu

passage 1/3 : 3 ml cellules + 17 ml de milieu

passage 1/5 : 2 ml cellules + 18 ml de milieu

passage 1/10 : 1 ml cellules + 19 ml de milieu

Remarque :

Lors de la mise en culture, le premier passage se fait à partir d'un flacon de 50 mL. Le rinçage est alors réalisé avec 3 mL de solution saline Hansk, les cellules sont décollées avec 2 mL de trypsine, puis 2 mL de milieu sont ajoutés ($V_{tot} = 4$ mL). Dans le nouveau flacon de 275 ml, les 4 mL précédents sont introduits dans 16 mL de milieu.

Différents comptages ont été réalisés pour des boîtes passées au 1/10 une fois par semaine. Il y a de $10 \cdot 10^6$ à $12 \cdot 10^6$ cellules par boîtes (cellule de comptage de Malassez).

Préparation des cellules pour les xenogreffes

Les tumeurs sont obtenues par injection sous-cutanée d'environ $5 \cdot 10^6$ cellules U87-MG suspendues dans 150 μ L de EMEM. Le nombre de boîtes nécessaires est déterminé en fonction du nombre de tumeurs à former. En général, on prévoit deux tumeurs surnuméraires par sécurité.

Le nombre de boîtes approprié est traité comme décrit ci-dessus jusqu'à l'étape (4). Les suspensions de cellules sont alors rassemblées dans des falcons de 50 ml (à adapter selon le volume total). Après centrifugation (5 min à 1500 tr/min), le surnageant est éliminé et les culots sont rassemblés par mise en suspension dans du milieu de culture, avec un volume total de 50 mL. Le nombre de cellules est évalué par comptage sur une cellule de Malassez. Le volume correspondant au nombre de cellules nécessaire pour les injections est prélevé. La suspension est centrifugée et le surnageant éliminé. Les cellules sont remises en suspension dans un volume de EMEM tel qu'il y ait 150 μ L par injection.

Implantation des tumeurs et études *in vivo*

Les études animales ont été réalisées conformément au Décret sur l'Expérimentation Animale (Décret 87-848, 19 octobre 1987). Les tumeurs ont été développées sur des souris femelles athymiques (BalbC nu/nu) obtenues des laboratoires Charles River. Les souris

sont livrées âgées de 6 semaines (~ 20 g) et sont utilisées 1 semaine après leur arrivée. Toutes les manipulations des animaux ont été conduites par un technicien habilité pour l'expérimentation animale.

Pour les études *in vivo*, une injection sous-cutanée d'environ 5.10^6 cellules U87-MG, suspendues dans $150 \mu\text{L}$ de EMEM, est réalisée sur l'épaule avant droite des souris. Lorsque des tumeurs doivent être prélevées pour des études *in vitro*, 2 à 3 tumeurs peuvent être implantées sur chaque animal : une sur chaque épaule et une au milieu du dos. Dans tous les cas, les animaux sont utilisés 15 jours après l'injection des cellules. Les tumeurs formées ont un diamètre allant de 2 à 4 mm, les plus grosses étant les plus vascularisées.

Les tests *in vivo* sont réalisés par injection des produits étudiés par voie intraveineuse dans la queue des souris. La solution injectée doit être à pH physiologique tamponné et les solvants organiques, en concentration inférieure à 10%, doivent être évités. Les animaux sont sacrifiés par décervication et les tumeurs prélevées. Les tumeurs employées dans les tests *in vitro* ont été conservées à -80°C avant utilisation.

Lors des études de biodistribution, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane (2%). Les urines puis le sang (400 à $800 \mu\text{L}$) ont tout d'abord été prélevés suivis du pancréas, de la rate, des reins, du cœur, des poumons, de la bile et du foie.

Bibliographie

- [Abrams 90] ABRAMS M.J., JUWEID M., TENKATE C.I., SCHWARTZ D.A., HAUSER M.M., GAUL F.E., FUCCELLO A.J., RUBIN R.H., STRAUSS H.W. et FISCHMAN A.J. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J. Nucl. Med.*, 1990, vol 31, p 2022–2028.
- [Albeda 90] ALBEDA S.M., METTE S.A., ELDER D.E., STEWART R.M., DAMJANOVICH L., HERLYN M. et BUCK C.A. Integrin distribution in malignant melanoma : association of the β_3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.*, 1990, vol 50, p 6757–6764.
- [Albrecht 04] ALBRECHT M., STORTZ P., RUNSINK J. et WEIS P. Preparation of tripeptide-bridged dicatechol ligands and their macrocyclic molybdenum(VI) complexes : fixation of the RGD sequence and the WKY sequence of urotensin II in a cyclic conformation. *Chem. Eur. J.*, 2004, vol 10, p 3657–3666.
- [Albrecht 05] ALBRECHT M. et STORTZ P. Metallacyclopeptides : artificial analogs of naturally occurring peptides. *Chem. Soc. Rev.*, 2005, vol 34, p 496–506.
- [Alves 07] ALVES S., CORREIA J.D., GANO L., ROLD T.L., PRASANPHANICH A., HAUBNER R., RUPPRICH M., ALBERTO R., DECRISTOFORO C., SANTOS I. et SMITH C.J. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a novel $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -pyrazolyl conjugate of *cyclo*-(Arg-Gly-Asp- D -Tyr-Lys). *Bioconj. Chem.*, 2007, vol 18, p 530–537.
- [Anderson 00] ANDERSON S.A., RADER R.K., WESTLIN W.F., NULL C., JACKSON D., LANZA G.M., WICKLINE S.A. et KOTYK J.J. Magnetic resonance contrast enhancement of neovasculature with $\alpha_V\beta_3$ -targeted nanoparticles. *Magn. Res. Med.*, 2000, vol 44, p 433–439.
- [Arnaout 02] ARNAOUT M.A., GOODMAN S.L. et XIONG J.P. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr. Op. Cell Biol.*, 2002, vol 14, p 641–651.
- [Assa-Munt 01] ASSA-MUNT N., JIA X., LAAKKONEN P. et RUOSLAHTI E. Solution structures and integrin binding activities of an RGD peptide with two isomers. *Biochemistry*, 2001, vol 40, p 2373–2378.
- [Aumailley 91] AUMAILLEY M., GURRATH M., MÜLLER G., CALVETE J., TIMPL R. et KESSLER H. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapep-

- tides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *F.E.B.S.*, 1991, vol 291, p 50–54.
- [Backes 99] BACKES B.J. et ELLMAN J.A. An alkanesulfonamide safety-catch linker for solid-phase synthesis. *J. Org. Chem.*, 1999, vol 64, p 2322–2330.
- [Barda 04] BARDA Y., COHEN N., LEV V., BEN-AROYA N., KOCH Y., MISHANI E., FRIDKIN M. et GILON C. Backbone metal cyclization : novel ^{99m}Tc labeled GnRH analog as potential SPECT molecular imaging agent in cancer. *Nucl. Med. Biol.*, 2004, vol 31, p 921–933.
- [Beer 05] BEER A.J., HAUBNER R., GOEBEL M., LUDERSCHMIDT S., SPILKER M.E., WESTER H.J., WEBER W.A. et SCHWAIGER M. Bio-distribution and pharmacokinetics of the $\alpha_V\beta_3$ -selective tracer ^{18}F -galacto-RGD in cancer patients. *J. Nucl. Med.*, 2005, vol 46, p 1333–1341.
- [Beer 06] BEER A.J., HAUBNER R., WOLF I., GOEBEL M., LUDERSCHMIDT S., NIEMEYER M., GROSU A.L., MARTINEZ M.J., WESTER H.J., WEBER W.A. et SCHWAIGER M. PET-based human dosimetry of ^{18}F -galacto-RGD, a new radiotracer for imaging $\alpha_V\beta_3$ expression. *J. Nucl. Med.*, 2006, vol 47, p 763–769.
- [Beer 08] BEER A.J., LORENZEN S., METZ S., HERRMANN K., WATZLOWIK P., WESTER H.J., PESCHEL C., LORDICK F. et SCHWAIGER M. Comparison of integrin $\alpha_V\beta_3$ expression and glucose metabolism in primary and metastatic lesions in cancer patients : a PET study using ^{18}F -galacto-RGD and ^{18}F -FDG. *J. Nucl. Med.*, 2008, vol 49, p 22–29.
- [Belvisi 06] BELVISI L., BERNARDI A., COLOMBO M., MANZONI L., POTENZA D., SCOLASTICO C., GIANNINI G., MARCELLINI M., RICCIONI T., CASTORINA M., LOGIUDICE P. et PISANO C. Targeting integrins : insights into structure and activity of cyclic RGD pentapeptide mimics containing azabicycloalkane amino acids. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, vol 14, p 169–180.
- [Benedetto 06] BENEDETTO S., PULITO R., CRICH S.G., TARONE G., AIME S., SILENGO L. et HAMM J. Quantification of the expression level of integrin receptor $\alpha_V\beta_3$ in cell lines and MR imaging with antibody-coated iron oxide particles. *Magn. Res. Med.*, 2006, vol 56, p 711–716.
- [Bernatowicz 93] BERNATOWICZ M.S., WU Y. et MATSUEDA G.R. Urethane protected derivatives of 1-guanylpyrazole for the mild and efficient preparation of guanidines. *Tet. Lett.*, 1993, vol 34, p 3389–3392.
- [Boturyn 04] BOTURYN D., COLL J.L., GARANGER E., FAVROT M.C. et DUMY P. Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, vol 126, p 5730–5739.
- [Brooks 94a] BROOKS P.C., CLARK R.A. et CHERESH D.A. Requirement of vascular integrin $\alpha_V\beta_3$ for angiogenesis. *Science*, 1994, vol 264, p 569–571.

- [Brooks 94b] BROOKS P.C., MONTGOMERY A.M., ROSENFELD M., REISFELD R.A., HU T., KLIER G. et CHERESH D.A. Integrin $\alpha_V\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 1994, vol 79, p 1157–1164.
- [Brooks 95] BROOKS P.C., STRÖMBLAD S., KLEMKE R., VISSCHER D., SARKAR F.H. et CHERESH D.A. Antiintegrin $\alpha_V\beta_3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J. Clin. Invest*, 1995, vol 96, p 1815–1822.
- [Cacciari 05] CACCIARI B. et SPALLUTO G. Non peptidic $\alpha_V\beta_3$ antagonists : recent developments. *Curr. Med. Chem.*, 2005, vol 12, p 51–70.
- [Cachin 06] CACHIN F., KELLY A. et MAUBLANT J. Evaluation de la réponse thérapeutique en cancérologie : place de l'imagerie isotopique. *Bull. Cancer*, 2006, vol 93, p 1191–1199.
- [Cai 05] CAI W., GAMBHIR S.S. et CHEN X. Multimodality tumor imaging targeting integrin $\alpha_V\beta_3$. *BioTechniques*, 2005, vol 39, p S14–S25.
- [Cai 06] CAI W., WU Y., CHEN K., CAO Q., TICE D.A. et CHEN X. *In vitro* and *in vivo* characterization of ^{64}Cu -labeled AbegrinTM, a humanized monoclonal antibody against integrin $\alpha_V\beta_3$. *Cancer Res.*, 2006, vol 66, p 9673–9681.
- [Carmeliet 00] CARMELIET P. et JAIN R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, vol 407, p 249–257.
- [Carmeliet 03] CARMELIET P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.*, 2003, vol 9, p 653–660.
- [Casiraghi 05] CASIRAGHI G., RASSU G., AUZZAS L., BURREDDU P., GAETANI E., BATTISTINI L., ZANARDI F., CURTI C., NICASTRO G., BELVISI L., MOTTO I., CASTORINA M., GIANNINI G. et PISANO C. Grafting aminocyclopentane carboxylic acids onto the RGD tripeptide sequence generates low nanomolar $\alpha_V\beta_3/\alpha_V\beta_5$ integrin dual binders. *J. Med. Chem.*, 2005, vol 48, p 7675–7687.
- [Castel 01] CASTEL S., PAGAN R., MITJANS F., PIULATS J., GOODMAN S., JONCZYK A., HUBER F., VILARO S. et REINA M. RGD peptides and monoclonal antibodies, antagonists of α_V -integrin, enter the cells by independent endocytic pathways. *Lab. Invest.*, 2001, vol 81, p 1615–1626.
- [Chan 00] CHAN W. et WHITE P. *Fmoc solid phase peptide synthesis*. Oxford University Press, New York, 2000.
- [Chassoux 06] CHASSOUX F. et LANDRÉ E. Dysembryoplastic neuroepithelial tumors current : concepts and clinical management in 2006. *Epilepsies*, 2006, vol 18, p 85–100.
- [Chen 04a] CHEN X., HOU Y., TOHME M., PARK R., KHANKALDYAN V., GONZALES-GOMEZ I., BADING J.R., LAUG W.E. et CONTI P.S. Pegylated Arg-Gly-Asp peptide : ^{64}Cu labeling and PET imaging of brain tumor $\alpha_V\beta_3$ -integrin expression. *J. Nucl. Med.*, 2004, vol 45, p 1776–1783.

- [Chen 04b] CHEN X., LIU S., HOU Y., TOHME M., PARK R., BADING J.R. et CONTI P.S. MicroPET imaging of breast cancer α_V -integrin expression with ^{64}Cu -labeled dimeric RGD peptides. *Mol. Im. Biol.*, 2004, vol 6, p 350–359.
- [Cheng 05] CHENG Z., WU Y., XIONG Z., GAMBHIR S.S. et CHEN X. Near-infrared fluorescent RGD peptides for optical imaging of integrin $\alpha_V\beta_3$ expression in living mice. *Bioconj. Chem.*, 2005, vol 16, p 1433–1441.
- [Clavaud 06a] CLAVAUD C. *Développement de ligands de protéines par assemblage combinatoire autour d'un cœur de rhénium(V) : application à la cyclophiline hCyp-18*. Thèse : Université Paris XI, Février 2006.
- [Clavaud 06b] CLAVAUD C., HECKENROTH M., STRICANE C., LELAIT M.A., MÉNEZ A. et DUGAVE C. Combinatorial self-assembly of cyclophilin hCyp-18 ligands through rhenium coordination. *ChemBioChem*, 2006, vol 7, p 1352–1355.
- [Clavaud 06c] CLAVAUD C., HECKENROTH M., STRICANE C., MÉNEZ A. et DUGAVE C. Cyclic and acyclic oxorhenium(V)-peptide conjugates as new ligands of the human cyclophilin hCyp18. *Bioconj. Chem.*, 2006, vol 17, p 807–814.
- [Clavaud 08] CLAVAUD C., LE GAL J., THAI R., MOUTIEZ M. et DUGAVE C. Dynamic combinatorial self-assembly of cyclophilin hCyp-18 ligands through oxorhenium coordination. *ChemBioChem*, 2008, vol 9, p 1823–1829.
- [Cleazardin 98] CLEZARDIN P. Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1998, vol 54, p 541–548.
- [Comet 98] COMET M. et VIDAL M. *Radiopharmaceutiques - Chimie des radio-traceurs et applications biologiques*. Grenoble Sciences, 1998. Chimie du technétium ^{99m}Tc , Chap. 1, du Moulinet d'Hardemare A., Pasqualini R., Riche F. et Vidal M.
- [Constable 03] CONSTABLE E.C., HOUSECROFT C.E. et MUNDWILER S. Metal-directed assembly of cyclometallopeptides. *Dalton Trans.*, 2003, p 2112–2114.
- [Cristofanilli 02] CRISTOFANILLI M., CHARNSANGAVEJ C; et HORTOBAGYI G.N. Angiogenesis modulation in cancer research : novel clinical approaches. *Nat. Rev.*, 2002, vol 1, p 415–426.
- [Davison 80] DAVISON A., ORVIG C., TROP H.S., SOHN M., DEPAMPHILIS B.V. et JONES A.G. Preparation of oxobis(dithiolato) complexes of technetium(V) and rhenium(V). *Inorg. Chem.*, 1980, vol 19, p 1988–1992.
- [Davison 82] DAVISON A., TROP H.S., DEPAMPHILIS B.V. et JONES A.G. Tetra-butylammonium tetrachlorooxotechnetate(V). *Inorg. Synth.*, 1982, vol 21, p 160–162.
- [Dayam 06] DAYAM R., AIELLO F., DENG J., WU Y., GAROFALO A., CHEN X. et NEAMATI N. Discovery of small molecule integrin $\alpha_V\beta_3$ antagonists as novel anticancer agents. *J. Med. Chem.*, 2006, vol 49, p 4526–4534.

- [Dechantsreiter 99] DECHANTSREITER M.A., PLANKER E., MATHÄ B., LOHOF E., HÖLZEMANN G., JONCZYK A., GOODMAN S.L. et KESSLER H. N-methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha_V\beta_3$ integrin antagonists. *J. Med. Chem.*, 1999, vol 42, p 3033–3040.
- [Decristoforo 99] DECRISTOFORO C. et MATHER S.J. Preparation, ^{99m}Tc -labeling, and *in vitro* characterization of HYNIC and N_3S modified RC-160 and $[\text{Tyr}^3]$ octreotide. *Bioconj. Chem.*, 1999, vol 10, p 431–438.
- [Decristoforo 06] DECRISTOFORO C., FAINTUCH-LINKOWSKI B., REY A., v GUGGENBERG E., RUPPRICH M., HERNANDEZ-GONZALES I., RODRIGO T. et HAUBNER R. ^{99m}Tc [HYNIC-RGD for imaging integrin $\alpha_V\beta_3$ expression. *Nucl. Med. Biol.*, 2006, vol 33, p 945–952.
- [DeGrado 80] DEGRADO W.F. et KAISER E.T. Polymer-bound oxime esters as supports for solid-phase peptide synthesis. Preparation of protected peptide fragments. *J. Org. Chem.*, 1980, vol 45, p 1295–1300.
- [DeGrado 82] DEGRADO W.F. et KAISER E.T. Solid-phase synthesis of protected peptides on a polymer-bound oxime : preparation of segments comprising the sequence of a cytotoxic 26-peptide analogue. *J. Org. Chem.*, 1982, vol 47, p 3258–3261.
- [deJong 98] DEJONG M., BREEMAN W.A., BAKKER W.H., KOOIJ P.P., BERNARD B.F., HOFLAND L.J., VISSER T.J., SRINIVASAN A., SCHMIDT M.A., ERION J.L., BUGAJ J.E., MÄCKE H.R. et KRENNING E.P. Comparison of ^{111}In -labeled somatostatin analogues for tumor scintigraphy and radionuclide therapy. *Cancer Res.*, 1998, vol 58, p 437–441.
- [deJonge 96] DEJONGE F.A. et PAUWELS E.K. Technetium, the missing element. *Eur. J. Nucl. Med.*, 1996, vol 23, p 336–344.
- [Delforge 96] DELFORGE D., ART M., GILLON B., DIEU M., DELAIVE E., RAES M. et REMACLE J. Automated solid-phase synthesis of cyclic peptides bearing a side-chain tail designed for subsequent chemical grafting. *Anal. Biochem.*, 1996, vol 242, p 180–186.
- [Dilworth 98] DILWORTH J.R. et PARROTT S.J. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chem. Soc. Rev.*, 1998, vol 27, p 43–55.
- [Duffy 01] DUFFY M.J. Clinical uses of tumor markers : a critical review. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 2001, vol 38, p 225–262.
- [Eliceiri 99] ELICEIRI B.P. et CHERESH D.A. The role of α_V integrins during angiogenesis : insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J. Clin. Invest.*, 1999, vol 103, p 1227–1230.
- [Eliceiri 01] ELICEIRI B.P. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ. Res.*, 2001, vol 89, p 1104–1110.
- [Ellegala 03] ELLEGALA D.B., LEONG-POI H., CARPENTER J.E., KLIBANOV A.L., KAUL S., SHAFFREY M.E., SKLENAR J. et LINDNER J.R. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to $\alpha_V\beta_3$. *Circulation*, 2003, vol 108, p 336–341.

- [Eskens 03] ESKENS F.A., DUMEZ H., HOEKSTRA R., PERSCHL A., BRINDLEY C., BÖTTCHER S., WYNENDAELE W., DREVS J., VERWEIJ J. et V OOSTEROM A.T. Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ in patients with advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer*, 2003, vol 39, p 917–926.
- [Farrell 02] FARRELL N. Biomedical uses and applications of inorganic chemistry. An overview. *Coord. Chem. Rev.*, 2002, vol 232, p 1–4.
- [Feinberg 75] FEINBERG R.S. et MERRIFIELD R.B. Modification of peptides containing glutamic acid by hydrogen fluoride-anisole mixtures. γ -acylation of anisole or the glutamyl nitrogen. *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, vol 97, p 3485–3496.
- [Feuston 02] FEUSTON B.P., CULBERSON J.C., DUGGAN M.E., HARTMAN G.D., LEU C.T. et RODAN S.B. Binding model for nonpeptide antagonists of $\alpha_V\beta_3$ integrin. *J. Med. Chem.*, 2002, vol 45, p 5640–5648.
- [Folkman 90] FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990, vol 82, p 4–6.
- [Fox 01] FOX S.B., GASPARINI G. et HARRIS A.L. Angiogenesis : pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol.*, 2001, vol 2, p 278–289.
- [Fridkin 05] FRIDKIN G., BONASERA T.A., LITMAN P. et GILON C. Backbone metal-cyclization : a novel approach for simultaneous peptide cyclization and radiolabeling. Application to the combinatorial synthesis of rhenium-cyclic somatostatin analogs. *Nucl. Med. Biol.*, 2005, vol 32, p 39–50.
- [Gabriel 03] GABRIEL M., DECRISTOFORO C., DONNEMILLER E., ULMER H., WATFAH RYCHLINSKI C., MATHER S.J. et MONCAYO R. An inpatient comparison of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC with ^{111}In -DOTA-octreotide for diagnosis of somatostatin receptor-expressing tumors. *J. Nucl. Med.*, 2003, vol 44, p 708–716.
- [Garanger 05] GARANGER E. *Conception, synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation pour la cancérologie*. Thèse : Université Joseph Fournier, Grenoble I, juin 2005.
- [Gasparini 98] GASPARINI G., BROOKS P.C., BIGANZOLI E., VERMEULEN P.B., BONOLDI E., DIRIX L.Y., RANIERI G., MICELI R. et CHERESH D.A. Vascular integrin $\alpha_V\beta_3$: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1998, vol 4, p 2625–2634.
- [Giancotti 99] GIANCOTTI F.G. et RUOSLAHTI E. Integrin signaling. *Science*, 1999, vol 285, p 1028–1032.
- [Ginj 05] GINJ M., CHEN J., WALTER M.A., ELTSCHINGER V., REUBI J.C. et MAECKE H.R. Preclinical evaluation of new and highly potent analogues of octreotide for predictive imaging and targeted radiotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 2005, vol 11, p 1136–1145.

- [Gladson 91] GLADSON C.L. et CHERESH D.A. Glioblastoma expression of vitronectine and the $\alpha_V\beta_3$ integrin. *J. Clin. Invest.*, 1991, vol 88, p 1924–1932.
- [Gokhale 06] GOKHALE N.H. et COWAN J.A. Metallopeptide-promoted inactivation of angiotensin-converting enzyme and endothelin-converting enzyme 1 : toward dual-action therapeutics. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2006, vol 11, p 937–947.
- [Goldenberg 97] GOLDENBERG D.M. et WEGENER W. Studies of breast cancer imaging with radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen. Immunomedics breast cancer study group. *Acta Med. Austriaca*, 1997, vol 24, p 55–59.
- [Goodman 02] GOODMAN S.L., HÖLZEMANN G., SULYOK G.A. et KESSLER H. Nanomolar small molecule inhibitors for $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_V\beta_5$ and $\alpha_V\beta_3$ integrins. *J. Med. Chem.*, 2002, vol 45, p 1045–1051.
- [Guo 04] GUO W. et GIANCOTTI F.G. Integrin signalling during tumour progression. *Nature*, 2004, vol 5, p 816–826.
- [Gupta 01] GUPTA A., SEIFERT S., SYHRE R., SCHEUNEMANN M. et JOHANNSEN B. Reactivity of $^{99m}\text{Tc(V)}$ '3+1' mixed-ligand complexes towards glutathione. *Radiochim. Acta*, 2001, vol 89, p 43–49.
- [Gurrath 92] GURRATH M., MÜLLER G., KESSLER H., AUMAILLEY M. et TIMPL R. Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *Eur. J. Biochem.*, 1992, vol 210, p 911–921.
- [Gutheil 00] GUTHEIL J.C., CAMPBELL T.N., PIERCE P.R., WATKINS J.D., HUSE W.D., BODKIN D.J. et CHERESH D.A. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin : a humanized monoclonal antibody to the integrin $\alpha_v\beta_3$. *Clin. Cancer Res.*, 2000, vol 6, p 3056–3061.
- [Hamacher 89] HAMACHER K. et HANUS J. Synthesis of 1- ^{14}C -D,L-homocysteine thiolactone : a potential tracer for myocardial ischemia using PET. *J. Lab. Comp. Radiopharm.*, 1989, vol 27, p 1275–1283.
- [Hanahan 00] HANAHAN D. et WEINBERG R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, vol 100, p 57–70.
- [Hancock 76] HANCOCK W.S. et BATTERSBY J.E. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.*, 1976, vol 71, p 260–264.
- [Haubner 96a] HAUBNER R., GRATIAS R., DIEFENBACH B., GOODMAN S.L., JONCZYK A. et KESSLER H. Structural and functional aspect of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin $\alpha_V\beta_3$ antagonists. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, vol 118, p 7461–7472.
- [Haubner 96b] HAUBNER R., SCHMITT W., HÖLZEMANN G., GOODMAN S.L., JONCZYK A. et KESSLER H. Cyclic RGD peptides containing β -turn mimetics. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, vol 118, p 7881–7891.

- [Haubner 99] HAUBNER R., WESTER H.J., REUNING U., SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE R., DIEFENBACH B., KESSLER H., STÖCKLIN G. et SCHWAIGER M. Radiolabeled $\alpha_V\beta_3$ integrin antagonists : a new class of tracers for tumor targeting. *J. Nucl. Med.*, 1999, vol 40, p 1061–1071.
- [Haubner 01a] HAUBNER R., WESTER H.J., BURKHART F., SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE R., WEBER W., GOODMAN S.L., KESSLER H. et SCHWAIGER M. Glycosylated RGD-containing peptides : tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. *J. Nucl. Med.*, 2001, vol 42, p 326–336.
- [Haubner 01b] HAUBNER R., WESTER H.J., WEBER W.A., MANG C., ZIEGLER S.I., GOODMAN S.L., SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE R., KESSLER H. et SCHWAIGER M. Noninvasive imaging of $\alpha_V\beta_3$ integrin expression using ^{18}F -labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res.*, 2001, vol 61, p 1781–1785.
- [Haubner 04a] HAUBNER R., BRUCHERTSEIFER F., BOCK M., KESSLER H., SCHWAIGER M. et WESTER H.J. Synthesis and biological evaluation of a ^{99m}Tc -labelled cyclic RGD peptide for imaging the $\alpha_V\beta_3$ expression. *Nuklearmedizin*, 2004, vol 43, p 26–32.
- [Haubner 04b] HAUBNER R., KUHNAST B., MANG C., WEBER W.A., KESSLER H., WESTER H.J. et SCHWAIGER M. [^{18}F]galacto-RGD : synthesis, radiolabeling, metabolic stability, and radiation dose estimates. *Bioconj. Chem.*, 2004, vol 15, p 61–69.
- [Haubner 05] HAUBNER R., WEBER W.A., BEER A.J., VABULIENE E., REIM D., SARBIA M., BECKER K.F., GOEBEL M., HEIN R., WESTER H.J., KESSLER H. et SCHWAIGER M. Noninvasive visualization of the activated $\alpha_V\beta_3$ integrin in cancer patients by positron emission tomography and [^{18}F]galacto-RGD. *PLoS Med.*, 2005, vol 2, p 244–252.
- [Haubner 06] HAUBNER R. $\alpha_V\beta_3$ -integrin imaging : a new approach to characterise angiogenesis? *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Im.*, 2006, vol 33, p S54–S63.
- [Herrmann 95] HERRMANN W.A. Essays on organometallic chemistry, VII. laboratory curiosities of yesterday, catalysts of tomorrow : organometallic oxides. *J. Organomet. Chem.*, 1995, vol 500, p 149–174.
- [Hom 97] HOM R.K. et KATZENELLENBOGEN J.A. Synthesis of a tetradentate oxorhenium(V) complex mimic of a steroidal estrogen. *J. Org. Chem.*, 1997, vol 62, p 6290–6297.
- [Horton 97] HORTON M.A. The $\alpha_V\beta_3$ integrin 'vitronectin receptor'. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 1997, vol 29, p 721–725.
- [Humphries 00] HUMPHRIES M.J. Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.*, 2000, vol 28, p 311–339.
- [Humphries 06] HUMPHRIES J.D., BYRON A. et HUMPHRIES M.J. Integrin ligands at a glance. *J. Cell Science*, 2006, vol 119, p 3901–3903.
- [Hynes 02a] HYNES R.O. Integrins : bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 2002, vol 110, p 673–687.

- [Hynes 02b] HYNES R.O. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat. Med.*, 2002, vol 8, p 918–921.
- [Jacene 07] JACENE H.A., FILICE R., KASECAMP W. et WAHL R.L. Comparison of ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan and ^{131}I -tositumomab in clinical practice. *J. Nucl. Med.*, 2007, vol 48, p 1767–1776.
- [Jain 03] JAIN R.K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.*, 2003, vol 9, p 685–693.
- [Jain 05] JAIN R.K. Normalization of tumor vasculature : an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 2005, vol 307, p 58–62.
- [Jansen 07] JANSEN F.P. et VANDERHEYDEN J.L. The future of SPECT in a time of PET. *Nucl. Med. Biol.*, 2007, vol 34, p 733–735.
- [Jayson 02] JAYSON G.C., ZWEIT J., JACKSON A., MULATERO C., JULYAN P., RANSON M., BROUGHTON L., WAGSTAFF J., HAKANNSSON L., GROENEWEGEN G., BAILEY J., SMITH N., HASTINGS D., LAWRENCE J., HAROON H., WARD T., MCGOWN A.T., TANG M., LEVITT D., MARREAUD S., LEHMANN F.F., HEROLD M. et ZWIERZINA H. Molecular imaging and biological evaluation of HuMV833anti-VEGF antibody : implication for trial design of antiangiogenic antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2002, vol 94, p 1484–1493.
- [Jia 06] JIA B., SHI J., YANG Z., XU B., LIU Z., ZHAO H., LIU S. et WANG F. ^{99m}Tc -labeled cyclic RGDfK dimer : initial evaluation for SPECT imaging of glioma integrin $\alpha_V\beta_3$ expression. *Bioconj. Chem.*, 2006, vol 17, p 1069–1076.
- [Jin 04] JIN H. et VARNER J. Integrins : role in cancer development and as treatment targets. *Br. J. Cancer*, 2004, vol 90, p 561–565.
- [Jung 06] JUNG K.H., LEE K.H., PAIK J.Y., KO B.H., BAE J.S., LEE B.C., SUNG H.J., KIM D.H., CHOE Y.S. et CHI D.Y. Favorable biokinetic and tumor-targeting properties of ^{99m}Tc -labeled glucosamino RGD and effect of Paclitaxel therapy. *J. Nucl. Med.*, 2006, vol 47, p 2000–2007.
- [Jurisson 99] JURISSON S.S. et LYDON J.D. Potential technetium small molecule radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.*, 1999, vol 99, p 2205–2218.
- [Kassis 05] KASSIS A.I. et ADELSTEIN S.J. Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J. Nucl. Med.*, 2005, vol 46, p 4S–12S.
- [Kates 93] KATES S.A., DANIELS S.B. et ALBERICIO F. Automated allyl cleavage for continuous-flow synthesis of cyclic and branched peptides. *Anal. Biochem.*, 1993, vol 212, p 303–310.
- [Kelso 04] KELSO M.J., BEYER R.L., HOANG H.N., LAKDAWALA A.S., SNYDER J.P., OLIVER W.V., ROBERTSON T.A., APPLETON T.G. et FAIRLIE D.P. α -turn mimetics : short peptide α -helices composed of cyclic metallopeptide modules. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, vol 126, p 4828–4842.

- [Kiessling 07] KIESSLING F., MORGENSTERN B. et ZHANG C. Contrast agents and applications to assess tumor angiogenesis *in vivo* by magnetic resonance imaging. *Curr. Med. Chem.*, 2007, vol 14, p 77–91.
- [Kling 02] KLING A., BACKFISCH G., DELZER J., GENESTE H., GRAEF C., HOLZENKAMP U., HORNBERGER W., LANGE U.E., LAUTERBACH A., MACK H., SEITZ W. et SUBKOWSKI T. Synthesis and SAR of N-substituted dibenzazepinone derivatives as novel potent and selective $\alpha_V\beta_3$ antagonists. *Bioorg. Med. Chem. lett.*, 2002, vol 12, p 441–446.
- [Kok 02] KOK R.J., SCHRAA A.J., BOS E.J., MOORLAG H.E., ASGEIRSDOTTIR S.A., EVERTS M., MEIJER D.K. et MOLEMA G. Preparation and functional evaluation of RGD-modified proteins as $\alpha_V\beta_3$ integrin directed therapeutics. *Bioconj. Chem.*, 2002, vol 13, p 128–135.
- [Kuijpers 07] KUIJPERS B.H., GROOTHUYS S., SOEDE A.C., LAVERMAN P., BOERMAN O.C., v DELFT F.L. et RUTJES F.P. Preparation and evaluation of glycosylated arginine-glycine-aspartate (RGD) derivatives for integrin targeting. *Bioconj. Chem.*, 2007, vol 18, p 1847–1854.
- [Kumar 97] KUMAR C.C., NIE H., PROROCK ROGERS C., MALKOWSKI M., MAXWELL E., CATINO J.J. et ARMSTRONG L. Biochemical characterization of the binding of Echistatin to integrin $\alpha_V\beta_3$ receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, vol 283, p 843–853.
- [Lai 03] LAI L.C., CHEONG S.K., GOH K.L., LEONG C.F., LOH C.S., LOPEZ J.B., NAWAWI H., SIVANESARATNAM V. et SUBRAMANIAM R. Clinical usefulness of tumour markers. *Malaysian J. Pathol.*, 2003, vol 25, p 83–105.
- [Lam 04] LAM M.G., D KLERK J.M. et v RIJK P.P. ^{186}Re -HEDP for metastatic bone pain in breast cancer patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Im.*, 2004, vol 31, p S162–170.
- [Laverman 99] LAVERMAN P., DAMS E.T., OYEN W.J., STORM G., KOENDERS E.B., PREVOST R., v. D MEER J.W., CORSTENS F.H. et BOERMAN O. A novel method to label liposomes with ^{99m}Tc by the hydrazino nicotinyl derivative. *J. Nucl. Med.*, 1999, vol 40, p 192–197.
- [Lee 07] LEE B.C., SUNG H.J., KIM J.S., JUNG K.H., CHOE Y.S., LEE K.H. et CHI D.Y. Synthesis of Tc-99m labeled glucosamino-Asp-cyclic(Arg-Gly-Asp- D-Phe-Lys) as a potential angiogenesis imaging agent. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, vol 15, p 7755–7764.
- [Lesniak 07] LESNIAK W.G., KARIAPPER M.S., NAIR B.M., TAN W., HUTSON A., BALOGH L.P. et KHAN M.K. Synthesis and characterization of PAMAM dendrimer-based multifunctional nanodevices for targeting $\alpha_v\beta_3$ integrins. *Bioconj. Chem.*, 2007, vol 18, p 1148–1154.
- [Lewis 99] LEWIS J.S., SRINIVASAN A., SCHMIDT M.A. et ANDERSON C.J. *In vitro* and *in vivo* evaluation of ^{64}Cu -TETA-Tyr³-Octreotate. A new somatostatin analog with improved target tissue uptake. *Nucl. Med. Biol.*, 1999, vol 26, p 267–273.

- [Lewis 01] LEWIS J.S., WANG M., LAFOREST R., WANG F., ERION J.L., BUGAJ J.E., SRINIVASAN A. et ANDERSON C.J. Toxicity and dosimetry of ^{177}Lu -DOTA-Y3-octreotate in a rat model. *Int. J. Cancer*, 2001, vol 94, p 873–877.
- [Li 07] LI Z.B., CAI W., CAO Q., CHEN K., WU Z., HE L. et CHEN X. ^{64}Cu -labeled tetrameric and octameric RGD peptides for small-animal PET of tumor $\alpha_V\beta_3$ integrin expression. *J. Nucl. Med.*, 2007, vol 48, p 1162–1171.
- [Liu 99] LIU S. et EDWARDS D.S. ^{99m}Tc -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.*, 1999, vol 99, p 2235–2268.
- [Liu 01] LIU S., EDWARDS D.S., ZIEGLER M.C., HARRIS A.R., HEMINGWAY S.J. et BARRETT J.A. ^{99m}Tc -labeling of a hydrazinonicotinamide-conjugated vitronectin receptor antagonist useful for imaging tumors. *Bioconj. Chem.*, 2001, vol 12, p 624–629.
- [Liu 05] LIU S., HSIEH W.Y., KIM Y.S. et MOHAMMED S.I. Effect of coligands on biodistribution characteristics of ternary ligand ^{99m}Tc complexes of a HYNIC-conjugated cyclic RGDfK dimer. *Bioconj. Chem.*, 2005, vol 16, p 1580–1588.
- [Liu 06] LIU S. Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin $\alpha_V\beta_3$ targeted radiotracers for tumor imaging. *Mol. Pharm.*, 2006, vol 3, p 472–487.
- [Liu 07] LIU S., HSIEH W.Y., JIANG Y., KIM Y.S., SREERAMA S.G., CHEN X., JIA B. et WANG F. Evaluation of a ^{99m}Tc -labeled cyclic RGD tetramer for noninvasive imaging integrin $\alpha_V\beta_3$ -positive breast cancer. *Bioconj. Chem.*, 2007, vol 18, p 438–446.
- [Liu 08] LIU S., KIM Y.S., HSIEH W.Y. et SREERAMA S.G. Coligand effects on the solution stability, biodistribution and metabolism of the ^{99m}Tc -labeled cyclic RGDfK tetramer. *Nucl. Med. Biol.*, 2008, vol 35, p 111–121.
- [Lohof 00] LOHOF E., PLANKER E., MANG C., BURKHART F., DECHANTSREITER M.A., HAUBNER R., WESTER H.J., SCHWAIGER M., HÖLZEMANN G., GOODMAN S.L. et KESSLER H. Carbohydrate derivatives for use in drug design : cyclic α_V -selective RGD peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, vol 39, p 2761–2764.
- [Maheshwari 00] MAHESHWARI G., BROWN G., LAUFFENBURGER D.A., WELLS A. et GRIFFITH L.G. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Science*, 2000, vol 113, p 1677–1686.
- [Marinelli 03] MARINELLI L., LAVECCHIA A., GOTTSCHALK K.E., NOVELLINO E. et KESSLER H. Docking studies of $\alpha_V\beta_3$ integrin ligands : pharmacophore refinement and implications for drug design. *J. Med. Chem.*, 2003, vol 46, p 4393–4404.
- [Masella 03] MASELLA M. et CUNIASSE P. A many-body model to study proteins. I. application to ML_n^{m+} complexes, $M^{m+} = \text{Li}^+, \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$, and Zn^{2+} , $L = \text{H}_2\text{O}, \text{CH}_3\text{OH}, \text{HCONH}_2$, $n = 1 - 6$, and to

- small hydrogen bonded system. *J. Chem. Phys.*, 2003, vol 119, p 1866–1873.
- [Masella 08] MASELLA M., BORGIS D. et CUNIASSE P. Combining a polarizable force-field and a coarse-grained polarizable solvent model : application to long dynamics simulation of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *J. Comput. Chem.*, 2008, vol 29, p 1707–1724.
- [McCarthy 94] MCCARTHY T.J., SCHWARZ S.W. et WELCH M.J. Nuclear medicine and positron emission tomography : an overview. *J. Chem. Educ.*, 1994, vol 71, p 830–836.
- [McCusker 02] MCCUSKER C.F., KOCIENSKI P.J., BOYLE F.T. et SCHÄTZLEIN A.G. Solid-phase synthesis of c(RGDfK) derivatives : on-resin cyclisation and lysine functionalisation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, vol 12, p 547–549.
- [Meissner 02] MEISSNER R.S., PERKINS J.J., DUONG L.T., HARTMAN G.D., HOFFMAN W.F., HUFF J.R., IHLE N.C., LEU C.T., NAGY R.M., NAYLOR-OLSEN A., RODAN G.A., RODAN S.B., WHITMAN D.B., WESOLOWSKI G.A. et DUGGAN M.E. Nonpeptide $\alpha_V\beta_3$ antagonists. Part 2 : Constrained glyceryl amides derived from the RGD tripeptide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, vol 12, p 25–29.
- [Meunier 03] MEUNIER J.P., SCHORSCH G. et ZIMMERMANN R. La chimie au service de l'imagerie médicale. *L'Actualité Chimique*, 2003, vol nov.-dec., p 49–56.
- [Miller 00] MILLER W.H., ALBERTS D.P., BHATNAGAR P.K., BONDINELL W.E., CALLAHAN J.F., CALVO R.R., COUSINS R.D., ERHARD K.F., HEERDING D.A., KEENAN R.M., KWON C., MANLEY P.J., NEWLANDER K.A., ROSS S.T., SAMANEN J.M., UZINSKAS I.N., VENSILAVSKY J.W., YUAN C.C., HALTIWANGER R.C., GOWEN M., HWANG S.M., JAMES I.E., LARK M.W., RIEMAN D.J., STROUP G.B., AZZARANO L.M., SALYERS K.L., SMITH B.R., WARD K.W., JOHANSON K.O. et HUFFMAN W.F. Discovery of orally active non-peptide vitronectin receptor antagonists based on a 2-benzazepine Gly-Asp mimetic. *J. Med. Chem.*, 2000, vol 43, p 22–26.
- [Minami 07] MINAMI Y., IKEDA W., KAJITA M., FUJITO T., AMANO H., TAMARU Y., KURAMITSU K., SAKAMOTO Y., MONDEN M. et TAKAI Y. Necl-5/poliovirus receptor interacts in *cis* with integrin $\alpha_V\beta_3$ and regulates its clustering and focal complex formation. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol 282, p 18481–18496.
- [Mizejewski 99] MIZEJEWSKI G.J. Role of integrins in cancer : survey of expression patterns. *P.S.E.B.M.*, 1999, vol 222, p 124–138.
- [Montgomery 94] MONTGOMERY A.M., REISFELD R.A. et CHERESH D.A. Integrin $\alpha_V\beta_3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol 91, p 8856–8860.
- [Mourtas 01] MOURTAS S., GATOS D. et BARLOS K. Solid phase synthesis of benzothiazolyl compounds. *Tet. Lett.*, 2001, vol 42, p 2201–2204.

- [Mourtas 03] MOURTAS S., KATAKALOU C., NICOLETTOU A., TZAVARA C., GATOS D. et BARLOS K. Resin-bound aminothiols : synthesis and application. *Tet. Lett.*, 2003, vol 44, p 179/182.
- [Nagarajan 07] NAGARAJAN S.R., LU H.F., GASIECKI A.F., KHANNA I.K., PARIKH M.D., DESAI B.N., ROGERS T.E., CLARE M., CHEN B.B., RUSSELL M.A., KEENE J.L., DUFFIN T., ENGLEMAN V.W., FINN M.B., FREEMAN S.K., KLOVER J.A., NICKOLS G.A., NICKOLS M.A., SHANNON K.E., STEININGER C.A., WESTLIN W.F., WESTLIN M.M. et WILLIAMS M.L. Discovery of +(2-(4-[2-(5,6,7,8-tetrahydro-1,8-naphthyridin-2-yl)ethoxy]phenyl)-cyclopropyl)acetic acid as potent and selective $\alpha_V\beta_3$ inhibitor : design, synthesis, and optimization. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, vol 15, p 3390–3412.
- [Nakagawa 83] NAKAGAWA S.H. et KAISER E.T. Synthesis of protected peptide segments and their assembly on a polymer-bound oxime : application to the synthesis of a peptide model for plasma apolipoprotein A-I. *J. Org. Chem.*, 1983, vol 48, p 678–685.
- [Nicolas 89] NICOLAS E., PEDROSO E. et GIRALT E. Formation of aspartimide peptides in Asp-Gly sequences. *Tet. Lett.*, 1989, vol 30, p 497–500.
- [Nock 99] NOCK B.A., MAINA T., YANNOUKAKOS D., PIRMETTIS I.C., PAPADOPOULOS M.S. et CHIOTELLIS E. Glutathione-mediated metabolism of technetium-99m SNS/S mixed ligand complexes : a proposed mechanism of brain retention. *J. Med. Chem.*, 1999, vol 42, p 1066–1075.
- [Nock 00] NOCK B.A., MAINA T., TSORTOS A., PELECANOU M., RAPTOPOULOU C.P., PAPADOPOULOS M., PIETZSCH H.J., STASSINOPOULOU C.I., TERZIS A., SPIES H., NOUNESIS G. et CHIOTELLIS E. Glutathione interaction with SNS/S mixed-ligand complexes of oxorhenium(V) : kinetic aspects and characterization of the product. *Inorg. Chem.*, 2000, vol 39, p 4433–4441.
- [O'Donoghue 96] O'DONOGHUE J.A. et WHELDON T.E. Targeted radiotherapy using Auger electron emitters. *Phys. Med. Biol.*, 1996, vol 41, p 1973–1992.
- [Orlando 91] ORLANDO R.A. et CHERESH D.A. Arginine-Glycine-Aspartic acid binding leading to molecular stabilization between integrin $\alpha_V\beta_3$ and its ligand. *J. Biol. Chem.*, 1991, vol 266, p 19543–19550.
- [Ovchinnikov 75] OVCHINNIKOV Y.A. et IVANOV V.T. Conformational states and biological activity of cyclic peptides. *Tetrahedron*, 1975, vol 31, p 2177–2209.
- [Papadopoulos 96] PAPADOPOULOS M.S., PIRMETTIS I.C., PELECANOU M., RAPTOPOULOU C.P., TERZIS A., STASSINOPOULOU C.I. et CHIOTELLIS E. *Syn-anti* isomerism in a mixed-ligand oxorhenium complex, $\text{ReO}[\text{SN}(\text{R})\text{S}][\text{S}]$. *Inorg. Chem.*, 1996, vol 35, p 7377–7383.
- [Papetti 02] PAPETTI M. et HERMAN I.M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002, vol 282, p C947–C970.

- [Patel 01] PATEL S.R., JENKINS J., PAPADOPOLOUS N., BURGESS M.A., PLAGER C., GUTTERMAN J. et BENJAMIN R.S. Pilot study of Vitaxin - an angiogenesis inhibitor - in patients with advanced leiomyosarcomas. *Cancer*, 2001, vol 92, p 1347–1348.
- [Pelecanou 98] PELECANOU M., PIRMETTIS I.C., NOCK B.A., PAPADOPOULOS M., CHIOTELLIS E. et STASSINOPOULOU C.I. Interaction of [ReO(SNS)(S)] and [$^{99m}\text{TcO}(\text{SNS})(\text{S})$] mixed ligand complexes with glutathione : isolation and characterization of the product. *Inorg. Chim. Acta*, 1998, vol 281, p 148–152.
- [Pelecanou 00] PELECANOU M., CHRYSOSU K. et STASSINOPOULOU C.I. Trends in NMR chemical shifts and ligands mobility of TcO(V) and ReO(V) complexes with aminothiols. *J. Inorg. Biochem.*, 2000, vol 79, p 347–351.
- [Perkins 05] PERKINS A.C. *In vivo* molecular targeted radiotherapy. *Biomed. Imaging Interv. J.*, 2005, vol 1, p e9.
- [Perrier 37] PERRIER C. et SEGRÈ E. Radioactive isotopes of element 43. *Nature*, 1937, vol 140, p 193–194.
- [Perrier 47] PERRIER C. et SEGRÈ E. Technetium : the element of atomic number 43. *Nature*, 1947, vol 159, p 24.
- [Pfaff 94] PFAFF M., TANGEMANN K., MÜLLER B., GURRATH M., MÜLLER G., KESSLER H., TIMPL R. et ENGEL J. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_V\beta_3$, and $\alpha_5\beta_1$ integrins. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol 269, p 20233–20238.
- [Pietzsch 03] PIETZSCH H.J., SEIFERT S., SYHRE R., TISATO F., REFOSCO F., LEIBNITZ P. et SPIES H. Synthesis, characterization, and biological evaluation of technetium(III) complexes with tridentate S,E,S/P,S coordination (E = O, N(CH₃), S) : a novel approach to robust technetium chelates suitable for linking the metal to biomolecules. *Bioconj. Chem.*, 2003, vol 14, p 136–143.
- [Plow 00] PLOW E.F., HAAS T.A., ZHANG L., LOFTUS J. et SMITH J.W. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol 275, p 21785–21788.
- [Raboisson 06] RABOISSON P., MANTHEY C.L., CHAIKIN M., LATTANZE J., CRYSLER C., LEONARD K., PAN W., TOMCZUK B.E. et MARUGAN J.J. Novel potent and selective $\alpha_V\beta_3/\alpha_V\beta_5$ integrin dual antagonists with reduced binding affinity for human serum albumin. *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, vol 41, p 847–861.
- [Raboisson 07] RABOISSON P., DESJARLAIS R.L., REED R., LATTANZE J., CHAIKIN M., MANTHEY C.L., TOMCZUK B.E. et MARUGAN J.J. Identification of novel short chain 4-substituted indoles as potent $\alpha_V\beta_3$ antagonist using structure-based drug design. *Eur. J. Med. Chem.*, 2007, vol 42, p 334–343.
- [Rapport 07] RAPPORT . *Les causes du cancer en France - version abrégée*. 2007. Rapport rédigé par l'Académie Nationale de Médecine, l'Académie

- Nationale des Sciences, le Centre International de Recherche sur le Cancer, la Fédération Nationale des Centres de Lutte contre de Cancer et avec le concours de l'Institut National du Cancer et de l'Institut de Veille Sanitaire.
- [Reynolds 02] REYNOLDS L.E., WYDER L., LIVELY J.C., TAVERNA D., ROBINSON S.D., HUANG X., SHEPPARD D., HYNES R.O. et HODIVALA-DILKE K.M. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking β_3 integrin or β_3 and β_5 integrins. *Nat. Med.*, 2002, vol 8, p 27–34.
- [Richardson 86] RICHARDSON A.P., MOUNTFORD P.J., BAIRD A.C., HEYDERMAN E., RICHARDSON T.C. et COAKLEY A.J. An improved iodogen method of labelling antibodies with ^{125}I . *Nucl. Med. Commun.*, 1986, vol 7, p 355–362.
- [Robinson 04] ROBINSON S.D., REYNOLDS L.E., WYDER L., HICKLIN D.J. et HODIVALA-DILKE K.M. β_3 -integrin regulates vascular endothelial growth factor-A-dependent permeability. *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.*, 2004, vol 24, p 2108–2114.
- [Rust 02] RUST W.L., CARPER S.W. et PLOPPER G.E. The promise of integrins as effective targets for anticancer agents. *J. Biomed. Biotech.*, 2002, vol 2, p 124–130.
- [Sancey 06] SANCEY L. *Evaluation d'un radioligand de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (RAFT-RGD) pour l'imagerie moléculaire de l'angiogenèse tumorale*. Thèse : Université Joseph Fournier - Grenoble I, Juin 2006.
- [Sancey 07] SANCEY L., ARDISSON V., RIOU L.M., AHMADI M., MARTI-BATLLE D., BOTURYN D., DUMY P., FAGRET D., GHEZZI C. et VUILLEZ J.P. *In vivo* imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha_V\beta_3$ integrin-targeted tracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Im.*, 2007, vol 34, p 2037–2047.
- [Santimaria 03] SANTIMARIA M., MOSCATELLI G., VIALE G.L., GIOVANNONI L., NERI G., VITI F., LEPRINI A., BORSI L., CASTELLANI P., ZARDI L., NERI D. et RIVA P. Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2003, vol 9, p 571–579.
- [Sarin 81] SARIN V.K., KENT S.B., TAM J.P. et MERRIFIELD R.B. Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal. Biochem.*, 1981, vol 117, p 147–157.
- [Schumann 00] SCHUMANN F., MÜLLER A., KOKSCH M., MÜLLER G. et SEWALD N. Are β -amino acids γ -turn mimetics? Exploring a new design principle for bioactive cyclopeptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, vol 122, p 12009–12010.
- [Schwochau 00] SCHWOCHAU K. *Technetium. Chemistry and radiopharmaceutical applications*. Wiley-VCH, 2000. Some fundamentals of technetium chemistry, Chap. 6, pp. 43-53.
- [Seifert 06] SEIFERT S., HEINRICH T., JENTSCHEL C., SMUDA C., BERGMANN R. et PIETZSCH H.J. Preparation and biological characterization

- of isomeric $^{188}\text{Re}(\text{V})$ oxocomplexes with tetradentate S_4 ligands derived from *meso*-dimercaptosuccinic acid for labeling biomolecules. *Bioconj. Chem.*, 2006, vol 17, p 1601–1606.
- [Seitz 08] SEITZ W., GENESTE H., BACKFISCH G., DELZER J., GRAEF C., HORNBERGER W., KLING A., SUBKOWSKI T. et ZIMMERMANN N. Design and synthesis of novel potent and selective integrin $\alpha_V\beta_3$ antagonists - novel synthetic routes to isoquinolinone, benzoxazinone, and quinazolinone acetates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, vol 18, p 527–531.
- [Sharma 01] SHARMA S.D. Structurally determined cyclic metallo-constructs and applications. 2001, n°US 6331285 B1.
- [Shen 07] SHEN Y., ZHANG Y., LAN X. et CAO W. Preparation of liposome-coated oligonucleotide labeled with ^{99m}Tc and its uptake in vascular smooth muscle cells. *Nucl. Sc. Tech.*, 2007, vol 18, p 101–106.
- [Shullenberger 93] SHULLENBERGER D.F., EASON P.D. et LONG E.C. Design and synthesis of a versatile DNA-cleaving metallopeptide structural domain. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, vol 115, p 11038–11039.
- [Sieber 87] SIEBER P. An improved method for anchoring of 9-fluorenylmethoxycarbonyl-amino acids to 4-alkoxybenzyl alcohol resins. *Tet. Lett.*, 1987, vol 28, p 6147–6150.
- [Siegel 97] SIEGEL M.E., SIEGEL H.J. et LUCK J.V. Radiosynovectomy's clinical applications and cost effectiveness : A review. *Semin. Nucl. Med.*, 1997, vol 27, p 364–371.
- [Sipkins 98] SIPKINS D.A., CHERESH D.A., KAZEMI M.R. ; NEVIN L.M., BEDNARSKI M.D. et LI K.C. Detection of tumor angiogenesis *in vivo* by $\alpha_V\beta_3$ -targeted magnetic resonance imaging. *Nat. Med.*, 1998, vol 4, p 623–626.
- [Smith 03] SMITH J.W. Cilengitide. Merck. *Curr. Op. Invest. Drugs*, 2003, vol 4, p 741–745.
- [Strobel 07] STROBEL K., VEIT-HAIBACH P. et HANY T.F. Utilisation judicieuse du PET/CT en oncologie. *Forum Med. Suisse*, 2007, vol 7, p 270–277.
- [Sulyok 01] SULYOK G.A., GIBSON C., GOODMAN S.L., HÖLZEMANN G., WIESNER M. et KESSLER H. Solid-phase synthesis of a nonpeptide RGD mimetic library : new selective $\alpha_V\beta_3$ integrin antagonists. *J. Med. Chem.*, 2001, vol 44, p 1938–1950.
- [Syhre 98] SYHRE R., SPIES H., GUPTA A. et JOHANNSEN B. Stability versus reactivity of '3+1' mixed-ligand technetium-99m complexes *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Nucl. Med.*, 1998, vol 25, p 793–796.
- [Thakur 05] THAKUR M.L. Radionuclides and radiopharmaceuticals for 2005. *J. Nucl. Med.*, 2005, vol 46, p 13N.
- [Thompson 06] THOMPSON K.H. et ORVIG C. Metal complexes in medicinal chemistry : new vistas and challenges in drug design. *Dalton Trans.*, 2006, p 761–764.

- [Thouin 00] THOUIN E. et LUBELL W.D. Effective synthesis of enantiopure hydroxamates by displacement of resin-bound esters with hydroxylamine. *Tet. Lett.*, 2000, vol 41, p 457–460.
- [Tucker 02] TUCKER G.C. Inhibitors of integrins. *Curr. Op. Pharmacol.*, 2002, vol 2, p 394–402.
- [Urman 07] URMAN S., GAUS K., YANG Y., STRIJOWSKI U., SEWALD N., DE POL S. et REISER O. The constrained amino acid β -Acc confers potency and selectivity to integrin ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, vol 46, p 3976–3978.
- [van Essen 07] V ESSEN M., KRENNING E.P., D JONG M., VALKEMA R. et KWEK-KEBOOM D.J. Peptide receptor radionuclide therapy with radiolabelled somatostatin analogues in patients with somatostatin receptor positive tumours. *Acta Oncol.*, 2007, vol 46, p 723–734.
- [van Hagen 00] V HAGEN P.M., BREEMAN W.A., BERNARD H.F., SCHAAR M., MOOIJ C.M., SRINIVASAN A., SCHMIDT M.A., KRENNING E.P. et D JONG M. Evaluation of a radiolabelled cyclic DTPA-RGD analogue for tumor imaging and radionuclide therapy. *Int. J. Cancer*, 2000, vol 90, p 186–198.
- [van Well 03] V WELL R.M., OVERKLEEF H.S., V. D MAREL G.A., BRUSS D., THIBAUT G., D GROOT P.G., V BOOM J.H. et OVERHAND M. Solid-phase synthesis of cyclic RGD-furanoid sugar amino acid peptides as integrin inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, vol 13, p 331–334.
- [Volkert 99] VOLKERT W.A. et HOFFMAN T.J. Therapeutic radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.*, 1999, vol 99, p 2269–2292.
- [von Wallbrunn 07] V WALLBRUNN A., HÖLTKE C., ZÜHLSDORF M., HEINDEL W., SCHÄFERS M. et BREMER C. *In vivo* imaging of integrin $\alpha_V\beta_3$ expression using fluorescence-mediated tomography. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Im.*, 2007, vol 34, p 745–754.
- [Vonlaufen 01] VONLAUFEN A., WIEDLE G., BORISCH B., BIRRER S., LUDER P. et IMHOF B.A. Integrin $\alpha_V\beta_3$ expression in colon carcinoma correlates with survival. *Mod. Pathol.*, 2001, vol 14, p 1126–1132.
- [Wehrle-Haller 03] WEHRLE-HALLER B. et IMHOF B.A. Integrin-dependant pathologies. *J. Pathol.*, 2003, vol 200, p 481–487.
- [Wei 07] WEI L., BUTCHER C., MIAO Y., GALLAZZI F., QUINN T.P., WELCH M.J. et LEWIS J.S. Synthesis and biologic evaluation of ^{64}Cu -labeled rhenium-cyclized α -MSH peptide analog using a cross-bridged cyclam chelator. *J. Nucl. Med.*, 2007, vol 48, p 64–72.
- [Weissleder 08] WEISSLEDER R. et PITTET M.J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*, 2008, vol 452, p 580–589.
- [Wilson 01] WILSON A.A., JIN L., GARCIA A., DASILVA J.N. et HOULE S. An admonition when measuring the lipophilicity of radiotracers using counting techniques. *Appl. Rad. Isotopes*, 2001, vol 54, p 203–208.

- [Wu 05] WU Y., ZHANG X., XIONG Z., CHENG Z., FISHER D.R., LIU S., GAMBHIR S. et CHEN X. microPET imaging of glioma integrin $\alpha_V\beta_3$ expression using ^{64}Cu -labeled tetrameric RGD peptide. *J. Nucl. Med.*, 2005, vol 46, p 1707–1718.
- [Wu 07a] WU Z., LI Z.B., CAI W., HE L., CHIN F.T., LI F. et CHEN X. ^{18}F -labeled mini-PEG spacers RGD dimer (^{18}F -FPRGD2) : synthesis and microPET imaging of $\alpha_V\beta_3$ integrin expression. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Im.*, 2007, vol 34, p 1823–1831.
- [Wu 07b] WU Z., LI Z.B., CHEN K., CAI W., HE L., CHIN F.T., LI F. et CHEN X. microPET of tumor integrin $\alpha_V\beta_3$ expression using ^{18}F -labeled PEGylated tetrameric RGD peptide (^{18}F -FPRGD4). *J. Nucl. Med.*, 2007, vol 48, p 1536–1544.
- [Xiong 01] XIONG J.P., STEHLE T., DIEFENBACH B., ZHANG R., DUNKER R., SCOTT D.L., JOACHIMIAK A., GOODMAN S.L. et ARNAOUT M.A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_V\beta_3$. *Science*, 2001, vol 294, p 339–345.
- [Xiong 02] XIONG J.P., STEHLE T., ZHANG R., JOACHIMIAK A., FRECH M., GOODMAN S.L. et ARNAOUT M.A. Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_V\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*, 2002, vol 296, p 151–155.
- [Yang 94] YANG Y., SWEENEY W.V., SCHNEIDER K., THÖRNQVIST S., CHAIT B.T. et TAM J.P. Aspartimide formation in base-driven 9-fluoenylmethoxycarbonyl chemistry. *Tet. Lett.*, 1994, vol 35, p 9689–9692.
- [Zamora 96] ZAMORA P.O., GULHKE S., BENDER H., DIEKMANN D., RHODES B.A., BIRSACK H.J. et KNAPP F.F. Experimental radiotherapy of receptor-positive human prostate adenocarcinoma with ^{188}Re -RC-160, a directly-radiolabeled somatostatin analogue. *Int. J. Cancer*, 1996, vol 65, p 214–220.
- [Zanardi 08] ZANARDI F., BURREDDU P., RASSU G., AUZZAS L., BATTISTINI L., CURTI C., SARTORI A., NICASTRO G., MENCHI G., CINI N., BOTTONOCETTI A., RASPANTI S. et CASIRAGHI G. Discovery of subnanomolar arginine-glycine-aspartate-based $\alpha_V\beta_3/\alpha_V\beta_5$ integrin binders embedding 4-aminoproline residues. *J. Med. Chem.*, 2008, vol 51, p 1771–1782.
- [Zartman 05] ZARTMAN A.E., DUONG L.T., FERNANDEZ-METZLER C., HARTMAN G.D., LEU C.T., PRUEKSARITANONT T., RODAN G.A., RODAN S.B., DUGGAN M.E. et MEISSNER R.S. Nonpeptide $\alpha_V\beta_3$ antagonists : identification of potent, chain-shortened 7-oxo RGD mimetics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, vol 15, p 1647–1650.
- [Zhang 06] ZHANG X., XIONG Z., WU Y., CAI W., TSENG J.R., GAMBHIR S.S. et CHEN X. Quantitative PET imaging of tumor integrin $\alpha_V\beta_3$ expression with ^{18}F -FRGD2. *J. Nucl. Med.*, 2006, vol 47, p 113–121.
- [Zhang 07a] ZHANG C., JUGOLD M., WOENNE E.C., LAMMERS T., MORGENTERN B., MUELLER M.M., ZENTGRAF H., BOCK M., EISENHUT

- M., SEMMLER W. et KIESSLING F. Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res.*, 2007, vol 67, p 1555–1562.
- [Zhang 07b] ZHANG X. et CHEN X. Preparation and characterization of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-BPy-RGD}$ complex as $\alpha_V\beta_3$ integrin receptor-targeted imaging agent. *Appl. Rad. Isotop.*, 2007, vol 65, p 70–78.
- [Zhu 07] ZHU J. et MARCHANT R.E. Solid-phase synthesis of tailed cyclic RGD peptides using glutamic acid : unexpected glutarimide formation. *J. Pept. Sci.*, 2007, vol 14, p 690–696.
- [Zimmermann 06] ZIMMERMANN R. *La médecine Nucléaire. La radioactivité au service du diagnostic et de la thérapie*. EDP Sciences, 2006. L'imagerie par rayonnements gamma, p 62.

Chimiothèques de complexes du technétium et du rhénium ciblant l'intégrine $\alpha_V\beta_3$: développement de traceurs pour la détection précoce de la néoangiogenèse tumorale.

Les intégrines sont des protéines membranaires hétérodimériques impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire. Elles sont notamment surexprimées lors de la néoangiogenèse tumorale. Une dizaine d'entre elles reconnaît un motif peptidique RGD (Arg-Gly-Asp) structuré. Des analogues de cette séquence peuvent être utilisés pour la détection précoce de tumeurs et de métastases. Nous avons entrepris de développer de nouveaux traceurs, marqués au ^{99m}Tc , spécifiques de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$, et d'identifier les traceurs efficaces par un criblage *in vivo* qui permet de prendre en compte au plus tôt les aspects de biodistribution et de pharmacocinétique. Ne disposant d'aucun modèle prédictif fiable de la structure des complexes d'oxotechnétium au début de ce projet, nous avons préféré une approche combinatoire pour développer une série de ligands potentiels de l'intégrine $\alpha_V\beta_3$.

Les traceurs ont été obtenus selon deux stratégies : 1) cyclisation d'analogues linéaires de RGD par un motif NS_2/S coordiant un cœur oxotechnétium ; 2) assemblage combinatoire de motifs indépendants par coordination du cœur oxotechnétium par le motif NS_2+S . La stabilité des traceurs technétiés et de leurs analogues rhéniés a été testée en présence de glutathion et dans le plasma. Une première évaluation *in vitro* sur intégrine purifiée a montré que l'un des peptides RGD, cyclisé par le rhénium, se lie spécifiquement à $\alpha_V\beta_3$. Un modèle tumoral (tumeur U87-MG, implantée sur des souris nude) a été validé au laboratoire et une méthode d'analyse du criblage *in vivo* a été mise au point à l'aide de composés modèles marqués au ^{99m}Tc . Il s'avère que les données de biodistribution et le pourcentage d'activité retrouvé dans la tumeur sont encourageants pour les complexes cycliques, bien que l'identification des traceurs efficaces soit rendue difficile par leur instabilité dans les conditions d'analyse.

Mots clés : rhénium, technétium, chimie combinatoire, cancer, intégrine, imagerie moléculaire, *in vivo*.

Libraries of RGD analogs, labeled through ReO^{3+} or TcO^{3+} coordination, targeting $\alpha_V\beta_3$ integrin : development of tracers for the early detection of tumor neoangiogenesis.

Integrins form a family of heterodimeric integral glycoproteins which play a central role in cell-cell adhesion and cell-matrix interactions. In particular, they are overexpressed during tumor neoangiogenesis. About 10 of them recognize a structured RGD (Arg-Gly-Asp) sequence. Analogs of this sequence can be used for the early detection of tumors and metastases. We developed new tracers, labeled with ^{99m}Tc , for the molecular imaging of $\alpha_V\beta_3$ integrin. Until recently, there was no reliable *ab initio* structure prediction of complex molecules containing Re and Tc chelates. Therefore, we preferred a combinatorial approach to develop potential ligands of $\alpha_V\beta_3$ integrin and we attempted to identify efficient tracers by *in vivo* screening. This method would account for biodistribution and pharmacokinetics properties in the early steps of the study.

Tracers were obtained according two strategies : i) cyclization of linear RGD analogs ; ii) combinatorial assembling of independent modules through metal core coordination by the well-known NS_2+S motif. After synthesis and labeling, the stability of the tracers was investigated in presence of glutathione and in murine plasma. *In vitro* screening on purified integrin showed that a cyclic rhenium coordinate binds specifically $\alpha_V\beta_3$. A tumor model (U87-MG tumor on nude mice) was validated in the laboratory and a method was developed to analyze *in vivo* experiments. Biodistribution data and percentage of activity found in tumors are encouraging for cyclic compounds though identification of efficient tracers is difficult due to their instability in the conditions of analyses.

Key words : rhenium, technetium, combinatorial chemistry, cancer, integrin, molecular imaging, *in vivo*.

Laboratoire de Chimie pour le Vivant
CEA Saclay, DSV, iBiTec-S, SIMOPRO, LCV
91 191 Gif-sur-Yvette