



HAL
open science

Élaboration de vecteurs d'ADN, substrats de gélatinases

Yves Lelièvre

► **To cite this version:**

Yves Lelièvre. Élaboration de vecteurs d'ADN, substrats de gélatinases. Chimie. Paris 6, 2005. Français. NNT: . tel-03568281

HAL Id: tel-03568281

<https://hal.science/tel-03568281>

Submitted on 12 Feb 2022

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

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

Thèse de doctorat de l'Université de PARIS VI

Spécialité

Chimie Moléculaire

Présentée par

Yves LELIEVRE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique
INSERM U640 CNRS UMR 8151

Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris
Faculté des Sciences Pharmaceutiques Biologiques de Paris

Sujet de la thèse :

Elaboration de vecteurs d'ADN,
Substrats de gélatinases

Soutenue le 24 juin 2005, devant le Jury composé de :

| | | |
|---------------------------|---|--------------------|
| Mr Max Malacria | Professeur à l'Université de Paris VI | Président du Jury |
| Mr Otmane Boussif | Chercheur à la Société Serono S.A.(Suisse) | Rapporteur |
| Mr Benoît Frisch | Chargé de Recherche, CNRS, Strasbourg | Rapporteur |
| Mr Daniel Scherman | Directeur de Recherche, UPCG, Paris Directeur de l'Unité | Directeur de Thèse |

UPCG

UNITE DE PHARMACOLOGIE
CHIMIQUE ET GENETIQUE

U640 INSERM UMR 8151 CNRS

(Pr Daniel Scherman, Directeur)

tél. 01 53 73 95 59

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

4, Avenue de l'Observatoire 75270 Paris Cedex 06

Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris

11, rue Pierre et Marie Curie 75231 Paris Cedex 05

REMERCIEMENTS

Soutenir une Thèse d'Université au cours de sa préretraite, puis au début de sa retraite, n'est pas chose commune. Mais, aller jusqu'au bout d'une idée ne relève pas de l'âge. Cette démarche scientifique, née au sein de la recherche pharmaceutique, m'a été permise grâce à l'appui du Professeur Daniel Scherman, qui a bien voulu m'accueillir dans son Unité mixte INSERM / CNRS, l'Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique (UPCG), et s'intéresser à mon projet.

Je l'en remercie très vivement et j'espère que les résultats obtenus concernant l'utilisation des activités gélatinases de cellules cancéreuses pour la vectorisation de gènes thérapeutiques dans leur génome, seront bénéfiques pour son équipe et peut-être pour quelques approches thérapeutiques dans le traitement des cancers. Et j'ai été très heureux que la thématique envisagée ait pu s'intégrer dans la stratégie de son équipe, dans le cadre de la thérapie génique.

Je remercie Monsieur le Professeur Max Malacria d'avoir bien voulu accepter d'être le Président de cette soutenance, et de m'avoir accueilli au sein de l'Ecole doctorale de Chimie moléculaire de Paris VI, dont il est le Directeur. Biochimiste de profession, j'ai beaucoup appris de la Chimie Organique actuelle, au sein des multiples conférences dont j'ai pu bénéficier pendant 4 ans. J'espère que la chimie développée dans ces travaux, essentiellement peptidique, apportera une contribution à la panoplie de ses connaissances scientifiques.

Que, les Docteurs Benoît Frisch et Otmane Boussif, rapporteurs de cette Thèse, soient vivement remerciés, pour avoir bien voulu évaluer ce travail de recherche. Je les remercie d'avoir accepté de se déplacer spécialement de Strasbourg et de Suisse. J'avais beaucoup apprécié leurs remarques et leurs questions opportunes et pertinentes lors de soutenances de précédentes Thèses. J'ai pensé que mon sujet les intéresserait et j'espère que le contenu de cette Thèse apportera une contribution à leurs travaux.

Je remercie vivement le Docteur Jean Herscovici de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de chimie organique au sein de l'ENSCP. Je remercie également Madame la Directrice de l'Ecole de Chimie, Mme Danièle Olivier, de m'avoir accepté dans sa Grande Ecole de Chimie de Paris.

Recevoir un étudiant de mon âge était peut-être un risque. J'espère que Jean ne regrette pas de l'avoir pris. En tout cas, je lui dois beaucoup, à lui et à toute son équipe. En effet, malgré un emploi du temps très chargé, Jean, a toujours répondu avec beaucoup de compétence aux innombrables questions que je lui ai posées. Je l'assure de toute mon amitié.

Je remercie particulièrement le Docteur Françoise Leclerc, pour m'avoir aidé à refaire mes premiers pas en chimie organique, après une aussi longue absence. Je remercie Françoise pour ses conseils concernant les poly(éthylèneimines) et pour son aide dans la stratégie initiale du projet.

J'adresse tous mes remerciements au Docteur Michel Bessodes, qui m'a beaucoup aidé et conseillé dans la chimie peptidique, et toujours avec le sourire. Sans lui ce travail n'aurait pu être réalisé. Merci Michel. Merci aussi à François Clerc, mon ancien collègue d'Aventis-Pharma, pour son cours de chimie peptidique à l'ENSCP. Merci à Mme Thérèse Halmost pour son aide dans la technologie HPLC.

Et puis surtout, je dois ces résultats à mes collègues de Biologie Cellulaire, sans les travaux desquels ce projet n'aurait pu être valorisé. Je remercie très vivement Céline Largeau et le Dr Virginie Escriou. Céline a effectué tous les tests sur cellules et les tests physico-chimiques sous les conseils de Virginie. Cela été un vrai plaisir de travailler ensemble. J'espère que ces travaux vous seront, à toutes les deux, profitables. Je remercie aussi le Dr Nathalie Mignet pour ces conseils dans le domaine physico-chimique. Que Manuel das Neves, qui a partagé nom travail dans un stage de chimie, soit remercié pour sa contribution à l'optimisation du couplage avec le SPDP.

Que Madame le Professeur Nicole Moreau et son équipe soient remerciés pour m'avoir permis d'utiliser leur équipement de laboratoire. Merci à Bertrand Alluis, Carla Prata, Nelly Morelet, Maria-Vittoria Spanedda pour leur aide en RMN. Je remercie également Claudine Keil pour ses analyses en spectrométrie de masse. Merci à Jeanne Chain et à Esra Önen pour leur aide en LC/MS, puis à Marie Aafort pour ses conseils en informatique.

Je n'oublie pas Marie-Jo Egron, avec qui j'ai partagé le travail quotidien. Je la remercie vivement pour ses conseils. Je remercie le Dr Christian Girard, chargé de recherches, dans le laboratoire de Jean Herscovici. A partir des questions que je lui ai posées, il m'a beaucoup aidé dans la compréhension des mécanismes chimiques. Et j'ai pu profiter de sa grande expérience.

Je n'oublie pas Patrick Donnet qui m'a fait renouer avec la verrerie et avec l'azote liquide. Merci beaucoup, Patrick, pour votre aide et pour vos tuyaux en bricolage.

Et puis beaucoup de chercheurs ont traversé notre équipe. Et toujours des personnes sympathiques. Je pense à Isabelle Tranchant, Stéphanie Leue, Marie Laure Miramon, Laurence Morellato, Betty Smith, Pierre-Antoine Niore... Qu'elles soient toutes remerciées pour leurs conseils avisés et leur aide. Ce sera toujours pour moi un plaisir de les rencontrer de nouveau. Je leur souhaite bonne chance et bonne réussite.

J'offre ce travail aux miens, à mon épouse, Renée, et à nos deux filles, Edwige et Lucie. Elles m'ont beaucoup soutenues dans ce projet et s'y sont beaucoup intéressées. J'espère que le temps que je n'ai pu consacrer à notre quotidien, sera utile à tous.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

| | | |
|---------------------------------|----------|--|
| 3T3 | | cellules de fibroblastes humains du NIH |
| AcOH | | acide acétique |
| EtOAc | | acétate d'éthyle |
| Acm | | acétamidométhyl- |
| ADN | | acide désoxyribonucléique |
| Ala | A | alanine |
| Arg | R | arginine |
| Boc | | t-butyloxycarbonyl |
| APMA | | 4-aminophenylmercuric acetate |
| ATP | | adénosine 3' 5' triphosphate |
| BCA | | bicinchoninic acide |
| BOP | | benzotriazole-1-yloxy-tris(diméthylamino)- phosphoniumhexafluorophosphate |
| B-PEI | | poly(éthylèneimine) ramifiée |
| B16 | | lignée cellulaire de mélanomes de souris |
| CCM | | chromatographie sur couche mince |
| CDCl ₃ | | chloroforme deutéré |
| CH ₂ Cl ₂ | | dichlorométhane, chlorure de méthylène ou DCM |
| CLHP | | chromatographie liquide haute performance |
| cm ⁻¹ | | fréquence en unités de nombre d'onde, en IR |
| CO ₃ HNa | | carbonate acide de sodium, bicarbonate de sodium |
| CO ₃ Na ₂ | | carbonate de sodium |
| CPG | | chromatographie de perméation sur gel |
| Cys | C | cystéine |
| D ₂ O | | eau deutérée |
| DCC | | dicyclohexyl carbodiimide |
| DCM | | dichlorométhane, chlorure de méthylène |
| DiPEA | | diisopropyléthylamine |
| Di-BDC | | Di-t-butyl dicarbonate |
| DMEM | | Dulbecco Modified Eagle's Medium |
| DNP | | dinitrophenol |
| D.O. | | densité optique, valeur de l'absorption de la lumière |
| DCC | | N,N' dicyclohexylcarbodiimide |
| DCU | | dicyclohexylurée |
| DiPEA | | diisopropyléthylamine |
| DMAP | | 4-diméthylaminopyridine |
| DMF | | diméthylformamide |
| DMSO | | diméthylsulfoxyde |
| δ | | déplacement chimique en RMN, exprimé en ppm |
| λ | | longueur d'onde exprimée en nanomètres |
| ém. | | émission (λ d'émission en fluorométrie) |
| exc. | | excitation (λ d'excitation en fluorométrie) |
| EDC | | 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide |
| EDT | | éthanedithiol |
| Et ₂ O | | éther diéthylique |
| Et ₃ N | | triéthylamine |
| Eq | | équivalent |
| EtOH | | éthanol |

| | | |
|--------------------|----------|--|
| FITC | | fluoresceine isothiocyanate |
| Fmoc | | 9-fluorenylmethoxycarbonyl |
| FCS | | fœtal calf serum |
| FDA | | Federal Drug Association |
| FRET | | fluorescence resonance energy transfer |
| Gly | G | glycine |
| HCl | | acide chlorhydrique |
| HEPES | | acide (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethane-sulfonique]) |
| HOBt | | N-hydroxybenzotriazole |
| HBTU | | 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,3,3 tetramethyluronium |
| H- | | groupement amino-terminal d'un peptide :H-peptide |
| HT1080 | | lignée cellulaire de fibrosarcome humain |
| I ₂ | | iode |
| IK | | iodure de potassium |
| IR | | infrarouge |
| Leu | L | leucine |
| LC / MS | | chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse |
| L-PEI | | poly(éthylèneimine) linéaire |
| m-PEG | | methoxy-poly(éthylèneglycol) |
| M | | Molaire (Molarité) |
| MMP | | Matrix Metalloprotease |
| MS | | Mass spectrometry |
| M/z | | Masse atomique par charge ionique |
| N | | Normal (Normalité) |
| MeOH | | méthanol |
| MHz | | mégahertz |
| NH ₃ | | ammoniaque gaz |
| NHS | | N-hydroxy-succinimide |
| NH ₄ OH | | ammoniaque liquide |
| NIRF | | Near Infrared Fluorescence |
| NaOH | | soude |
| N / P | | rapport des atomes d'azote du PEI et des atomes de phosphore de l'ADN |
| nm | | nanomètres (en spectrophotométrie UV-visible) |
| NMP | | N-méthylpyrrolidinone |
| OMe | | ester méthylique |
| ON | | oligonucléotide |
| OEt | | ester éthylique |
| -OH | | groupement carboxylique terminal d'un peptideOH |
| PBS | | phosphate buffer saline |
| PCR | | polymerase chain reaction |
| pH | | - colog de la concentration en protons (1 à 12) |
| PEG | | poly(éthylèneglycol) |
| PEI | | poly(éthylèneimine) |
| P.M. | | Poids Moléculaire |
| PMA | | phorbol 12 myristate 13-acétate |
| PyBOP | | benzotriazole1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium |
| ppm | | parties par millions |
| Pro | P | proline |
| Rdt | | rendement (en %) |
| Rf | | coefficient de rétention frontal en CCM |
| RGD | | peptide comportant la séquence Arg-Gly-Asp, ligand des récepteurs intégrines |
| RMN | | résonance magnétique nucléaire |
| Rt | | temps de rétention frontal (en minutes) en CLHP |
| RPM | | révolutions par minute |
| T.A. | | température ambiante |

| | | |
|------|----------|---|
| SM | | spectrométrie de masse |
| SPDP | | N-sucinimidyl-3-(2-pyridyl)dithiopropionate |
| SVF | | sérum de veau fœtal |
| TEA | | triéthylamine |
| TFA | | acide trifluoroacétique |
| TFE | | 2,2,2-trifluoroéthanol |
| TIMP | | Tissue Inhibiteur of Metalloproteinases |
| TIS | | triisopropylsilane |
| TMS | | triméthylsilane |
| TNBS | | acide trinitrobenzenesulfonique ou acide picrylsulfonique |
| TRIS | | tris(hydroxyméthyl)aminométhane |
| Trt | | trityl |
| Trp | W | tryptophane |
| UV | | ultra-violet |

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| Coordonnées de l'UPCG | 2 |
| Abréviations | 5 |
| Chapitre 1 : <u>Introduction</u> | 11 |
| 1.1 La thérapie génique | 12 |
| 1.2 La thérapie génique anticancéreuse | 13 |
| 1.3 Les vecteurs synthétiques | 18 |
| 1.4 Cancers et gélatinases | 20 |
| 1.5 Stratégie de ciblage | 24 |
| Chapitre 2 : <u>Objectif et plan de travail</u> | 28 |
| Chapitre 3 : <u>Mise en œuvre</u> | 29 |
| 3.1 Conception des vecteurs | 29 |
| 3.1.1 Eléments constitutifs | 29 |
| 3.1.1.1 Substrats peptidiques | 29 |
| choix du substrat | 29 |
| synthèse peptidique | 34 |
| 3.1.1.2 Poly(éthylèneglycol), PEG | 39 |
| Généralités | 39 |
| Propriétés physico-chimiques | 40 |
| Utilisation chimique | 41 |
| Propriétés biologiques de biochimiques | 42 |
| Synthèse des mPEG-NH ₂ | 44 |

| | |
|--|----|
| 3.1.1.3 Poly(éthylèneimine), PEI | 46 |
| Généralités | 46 |
| Structure des PEI | 46 |
| Physico-chimie des PEI | 47 |
| Capacité de transfection de l'ADN et des oligonucléotides | 49 |
| Ciblage des cellules | 51 |
| Caractères toxiques | 52 |
| Synthèse du L-PEI | 53 |
| 3.1.2 Effets du mPEG-OH, et du L-PEI sur l'activité gélatinase | 55 |
| 3.2 Assemblage chimique des vecteurs | 57 |
| 3.2.1 Réactions-clefs | 57 |
| 3.2.1.1 Couplages EDC / HOBt | 57 |
| 3.2.1.2 Couplages directs avec les dérivés benzotriazole | 59 |
| 3.2.1.3 Réactions secondaires | 61 |
| 3.2.1.4 Couplages avec le SPDP | 62 |
| 3.2.2 Synthèse des vecteurs dérivés du PEI | 63 |
| 3.2.2.1 Vecteurs-substrats sources de (H-L-W-A)_n-PEI | 63 |
| 3.2.2.2 Vecteurs-substrats, sources de L-PEI-succ(A)₃-P-L-G-OH | 74 |
| 3.2.2.3 Vecteurs-substrats-témoins non hydrolysables | 78 |
| 3.2.2.4 Vecteurs témoins | 83 |
| 3.2.2.5 Produits de la réaction enzymatique | 84 |

| | |
|--|-----|
| 3.3 Evaluation biochimique et biologique des vecteurs | 87 |
| 3.3.1 Cinétique d'hydrolyse de substrat synthétique | 87 |
| 3.3.2 Hydrolyse de ce substrat par les surnageants cellulaires | 90 |
| 3.3.3 Evaluation physico-chimique des vecteurs | 93 |
| 3.3.4 Transfections du gène de la luciférase par les polyplexes vecteurs-substrats | 96 |
| 3.3.4.1 Transfection du PEI et effet de l'actinonine | 96 |
| 3.3.4.2 Effets du rapport N / P | 99 |
| 3.3.4.3 Comparaisons des transfections dans 2 types de cellules, en NaCl 0,15M | 101 |
| 3.3.4.4 Comparaison de transfections dans 2 types de cellules en NaCl glucosé | 103 |
| 3.3.4.5 % de restauration de transfections dans 3 types de cellules | 105 |
| 3.3.4.6 Comparaison de transfections avec différents témoins et vecteurs substrats | 107 |
| Chapitre 4 : <u>Conclusions, Perspectives</u> | 117 |
| Chapitre 5 : <u>Méthodes expérimentales</u> | 124 |
| 5.1 Méthodes biochimiques | 124 |
| 5.2 Méthodes biologiques | 127 |
| 5.3 Méthodes analytiques et préparatives | 128 |
| 5.4 Méthodes de synthèses chimiques | 132 |
| Bibliographie | 153 |
| Résumé des figures et des tableaux | 167 |
| Abstract / Résumé | 171 |

Chapitre 1 : INTRODUCTION

L'incorporation de certaines molécules ou de certains gènes dans les cellules cancéreuses est destinée à permettre leur apoptose. Mais, cette mort cellulaire ne doit pas s'accompagner de celle d'autres cellules vitales de l'organisme.

Or, de nombreux anticancéreux s'avèrent cytotoxiques pour des cellules sanguines, comme, par exemple, les leucocytes. Leur utilisation nécessite alors des arrêts réguliers de traitement. De la même manière, la thérapie génique utilisant des membranes virales pour transporter des plasmides d'ADN, est responsable d'effets nocifs importants. Dans les deux types de traitements, le manque de ciblage peut s'avérer catastrophique.

Une stratégie de thérapies géniques anticancéreuses doit donc intégrer un processus de ciblage vers les cellules transformées, appartenant ou non à des tumeurs. L'objet de cette Thèse est de proposer une forme de vectorisation de gènes dans ces cellules en utilisant l'activité enzymatique spécifique de gélatinases, qu'elles sur-expriment. Des vecteurs, substrats de ces enzymes, ont donc été synthétisés à cette fin.

1.1 La Thérapie génique

La thérapie génique consiste à introduire un gène dans des cellules somatiques (non germinales) pour traiter une maladie due au déficit ou au dysfonctionnement d'un gène essentiel.

En pratique, elle consiste à introduire dans le noyau de cellules à caractère pathologique, de l'ADN manquant, ou, au contraire, de bloquer la traduction ou la transcription d'un ADN, normalement non exprimé dans une cellule normale, par un oligonucléotide anti-sens. Cela aboutira à favoriser, dans certains cas, la production de protéines manquantes (par exemple la dystrophine dans la myopathie de Duchesnes) ou dans d'autres cas, à inhiber la production de protéines à caractère pathologique. Ces protéines peuvent être constitutives, structurelles, ou, avoir un rôle fonctionnel tel une activité enzymatique.

Ainsi, la carence en une enzyme peut avoir des conséquences pathologiques graves, en empêchant, par exemple, la production d'un métabolite essentiel. Au contraire leur surproduction anormale peut engendrer de profonds désordres métaboliques dont les conséquences peuvent être létales.

La réussite de la thérapie génique dépend donc de la capacité à introduire de l'ADN, ou, un oligonucléotide antisens, d'abord dans le cytoplasme cellulaire à travers la membrane cellulaire, puis dans le noyau cellulaire par les pores de la membrane nucléaire. Un processus de fusion membranaire ou d'endocytose, source d'endosomes, est donc d'abord nécessaire. Seul, « l'ADN nu » peut pénétrer directement dans les cellules et les tissus, sa pénétration étant favorisée par la technique d'électrotransfert en cours de développement. L'ADN classique, sous forme de plasmides, ou, les oligonucléotides, peut être introduit par des transporteurs biologiques comme des virus (rétrovirus, adénovirus ...) débarrassés de leur génome viral. Ils peuvent être également transportés par des vecteurs chimiques, sous formes de complexes, soient lipidiques (lipoplexes), soient formés avec des polymères cationiques (polyplexes).

Ce sont les transporteurs viraux qui, pour le moment, apportent la meilleure efficacité de transfection. Cependant, leurs effets secondaires apparaissent majeurs. Ainsi, les rétrovirus provoqueraient une intégration de l'ADN transporté dans le génome du receveur, intégration qui semblerait définitive. Des restes minimes d'ADN rétroviral seraient ainsi, de ce fait, intégrables au génome du receveur.

Les adénovirus n'ont, semble-t-il, pas cet inconvénient. Cependant, ils produisent une réponse immunitaire pouvant provoquer leur rejet et un risque de choc anaphylactique si plusieurs injections devaient être effectuées. L'utilisation d'immunosuppresseurs pourrait être mise en œuvre pour palier à cet inconvénient, avec le risque de voir des adénovirus ambiants, normalement inoffensifs, devenir pathogènes. De plus, la thérapeutique anticancéreuse demanderait au contraire, en elle-même, une immunostimulation.

Autre inquiétude : des cas d'angiosarcomes ont été mis en évidence chez la souris avec des adénovirus (rAAV), témoignant d'un effet mutagène. (Donsante et *al.*)[1]. Enfin, chez un individu décédé après thérapie génique utilisant un vecteur adénoviral, puis autopsié, le dit-vecteur a été retrouvé dans le foie, la rate, les ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, traduisant sa dissémination générale dans l'organisme. Dans tous les cas, l'utilisation de ces virus impose que leur purification et leur préparation garantissent totalement leur innocuité.

La thérapie génique peut aussi utiliser des cellules elles-mêmes, comme « transporteur ». Ce sont en particulier des cellules-souches (stem cells), par exemple transfectées avec des vecteurs adénovirus, et utilisées dans la « thérapie génique *ex-vivo* ». Mais leur intense capacité proliférative semblerait poser des problèmes incontrôlables.

1.2 La Thérapie génique anticancéreuse

Le traitement du cancer par thérapie génique suscite actuellement dans la communauté scientifique, et encore plus en oncologie clinique, un certain scepticisme. Pour plusieurs raisons. Les différents cancers impliquent toujours plusieurs gènes mutés (oncogènes). Il faut, au moins, deux gènes mutés pour qu'un cancer puisse démarrer. Puis, au fur et à mesure qu'un cancer se développe, d'autres mutations surviennent. Un cancer identifié trop tard apparaîtrait alors comme incurable par thérapie génique. Alors qu'une maladie mono-génique (myopathie de Duchesnes, ...) semble devoir soignée par cette voie, des maladies multigéniques, comme les cancers, semblent plus difficiles à traiter. Certains Cliniciens affirment, qu'éventuellement, l'utilisation de trois gènes différents, et convenablement choisis, chez un patient, pourraient fournir des résultats positifs, à l'image des tri-thérapies utilisées dans le traitement du SIDA. En effet, la thérapie génique anticancéreuse apparaît comme une thérapie à la carte. Du fait de l'implication de plusieurs gènes sur-exprimés ou apparus (oncogènes), ou absents, la carte génétique d'un patient, et particulièrement le phénotype des tumeurs qu'il porte le cas échéant, devraient impérativement être effectuée par l'utilisation des puces à ADN et de la PCR, afin de développer une stratégie de thérapie génique personnalisée et cohérente.

Par ailleurs, l'introduction de gènes dans les cellules cancéreuses devrait être facilitée, par l'intense activité de division cellulaire qui les caractérisent : l'état de mitose est beaucoup plus favorable à la transfection de gènes que celui de la quiescence cellulaire.

Quelles sortes de gènes doit-on sélectionner pour cette thérapie ? Plusieurs revues générales sur ce sujet ont été publiées (F.McCormik) [2] (P.D.Wadhwa et al.) [3] Plusieurs types de gènes, impliquant des approches différentes ont été étudiées :

- **Les gènes manquants ou altérés par mutation, ou bien sous-exprimés.** C'est le cas de « gènes suppresseurs ». Ainsi, celui de la protéine p53 (P.Seth et al) [4] qui, muté ou sous-exprimé, ne permet plus à la protéine qu'il exprime, de jouer son rôle de protection. Ces gènes sont

souvent destinés à la restauration de l'apoptose (mort cellulaire), normalement présente dans les cellules non transformées. Outre p53, citons, par exemple, comme autres gènes suppresseurs :

- INK4A (Sumimoto et *al.*)[5] qui bloque le cycle cellulaire en inhibant les kinases CDK4
- RB (Demers et *al.*)[6]
- PTEN (Cheney et *al.*)[7] qui exprime une enzyme dégradant les phosphoinositides 3'phosphate responsables de la croissance et de la survie cellulaires.

- **Les gènes nouveaux ou soudain sur-exprimés après mutation,** connus comme responsables de l'activation et de la transformation cellulaires. Il convient alors de vectoriser des oligonucléotides anti-sens bloquant la transcription ou la traduction de l'ADN concerné. Ainsi, une réduction de la croissance tumorale a pu être obtenue avec un anti-sens inhibant l'expression de la protéine *MDB2* qui régule la méthylation de l'ADN (A.Slack et *al.*)[8]

- **Les gènes restaurant des défenses immunitaires.**

Parfois, le système immunitaire du patient est devenu déficient, rendu éventuellement comme tel, à la suite d'un stress majeur. Une re-stimulation de l'immunité a, par exemple, été rendue possible par une thérapie génique avec le gène de l'interleukine IL12 qui a semblé fournir des résultats intéressants dans le traitement de l'ostéosarcome pulmonaire[10].

- **Les gènes inhibant l'angiogenèse tumorale.** La multiplication de micro-angiomes autour des tumeurs, permet d'une part, l'apport de nutriments à la tumeur, d'autre part, la dissémination des cellules tumorales dans l'organisme, responsable de la formation de métastases. Citons, comme gènes thérapeutiques réduisant cette angiogenèse :

- les gènes de l'angiostatine et de l'endostatine, protéines inhibitrices de la prolifération des cellules endothéliales. [11]

- les gènes des TIMP-1, 2 et 3, protéines inhibitrices des gélatinases MMP2 et MMP9, enzymes clivant les collagènes IV des membranes basales des vaisseaux sanguins [12] [13] [14]
- le gène mutant de *Raf*: ATP^{μ} -*Raf*, ciblé sur les récepteurs intégrines $\alpha\nu\beta3$, des cellules endothéliales, avec un vecteur constitué de lipide cationique [15]
- le gène p53 qui diminue l'expression du facteur de croissance VEGF et induit une sur- expression de la thrombospondine, puissant inhibiteur de l'angiogénèse. (Bouvet et *al.*)[16]

Il est également possible, par des « polynucléotides anti-sens », d'inhiber la production de facteurs de croissance des cellules endothéliales impliqués dans l'angiogénèse. Ainsi I.Sa et *al.* [17] ont obtenu une inhibition de la croissance antitumorale en transfectant des « anti-sens » du gène VEGF dans les cellules tumorales.

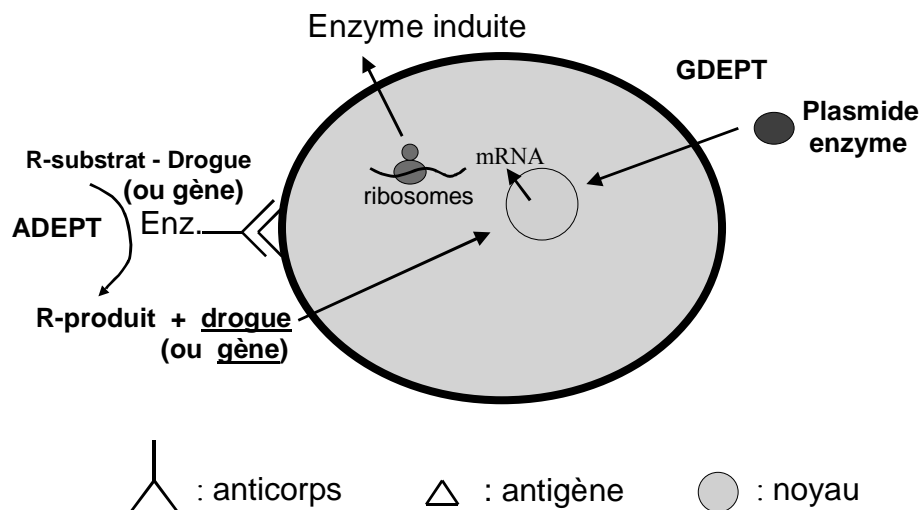


Fig.1 Vectorisation de drogues ou de gènes par des enzymes péricellulaires

Dans le système ADEPT [18], un antigène spécifique est identifié à la surface de cellules à cibler. Les anticorps produits à partir de cet antigène sont fixés par liaison covalente à une enzyme qui pourra transformer une prodrogue en drogue anticancéreuse, cette prodrogue comportant, outre la drogue, le substrat de cette enzyme. La libération de la drogue en surface, avant sa pénétration intracellulaire, est permise par l'hydrolyse enzymatique du substrat. Ainsi, dans ce cas de figure, l'enzyme est fixée à la surface de la cellule-cible à l'aide d'une liaison « antigène-anticorps ».

Cette technique peut être modifiée, en apportant non pas l'enzyme de l'extérieur, mais en induisant sa production par la cellule cible. C'est la **thérapie génique suicide**, (système GDEPT). La transfection préalable du gène de l'enzyme dans la cellule permet la sur-sécrétion de cette enzyme à la surface de la membrane cellulaire. L'enzyme ainsi exprimée peut hydrolyser le substrat contenu dans la prodrogue en libérant la drogue cytotoxique[10].

Cette opération a ainsi été effectuée avec le gène de la β glucuronidase, Celle-ci peut alors hydrolyser le substrat " prodrogue ", dans ce cas, la [N-(4- β -glucuronyl-3-nitrobenzyloxycarbonyloxycarbonyl)-doxorubicine], pour libérer la doxorubicine, anticancéreux cytotoxique[19].

Autre exemple en cancérologie : la transfection du gène de la cytosine déaminase de *E.Coli* par vecteur adénoviral introduit dans des cellules tumorales. Le gène transcrit et traduit, permet la production de cette enzyme hydrolysant la 5-fluorocytosine en 5-fluorouracile, cytotoxique [20] [21]

Il est évidemment beaucoup plus simple d'utiliser une ou des enzymes spécifiquement et naturellement hyper secrétées, dans une pathologie donnée et sur une cible donnée, quand ces enzymes existent. C'est le cas de nombreuses cellules cancéreuses dans des cancers à caractère tumoral ou non tumoral...Ainsi, Cavarallo et al.[22] utilisent l'activité plasmine des tumeurs. Ils ont, à cet effet, synthétisé une prodrogue, substrat de la plasmine : " PHEA-D-Val-Leu-Lys-cytarabine ", où le peptide substrat est inséré entre un polymère : le PHEA, et l'anticancéreux : la cytarabine.

Le clivage de ce peptide à la surface de la cellule cancéreuse libère *in situ* la cytarabine. Mais ce système est imparfait, car le plasma, contenant une activité plasminique (fibrinolyse) résiduelle, est parfois le siège de fibrinolyse. Dans ce cas, il peut y avoir libération prématurée de la drogue dans le plasma, ce qu'il faut absolument éviter. Le problème serait exactement le même s'il s'agissait d'un gène vectorisé.

1.3 Les Vecteurs synthétiques

Les travaux de l'Unité de Vectorologie chimique de gènes ont progressé depuis plusieurs années et ont montré qu'il était possible de faire pénétrer un plasmide en utilisant des vecteurs synthétiques comme des lipofectamines dont la partie polycationique est liée au plasmide par les groupements phosphates de l'ADN à caractère anionique. Ces lipoplexes traversent la membrane cellulaire par endocytose et formation d'endosomes intracellulaires. Ces transporteurs sont plus efficaces s'ils sont porteurs d'un ligand qui peut se fixer sur un récepteur localisé en surface cellulaire. Cependant le taux de transfection est faible comparativement à la thérapie génique utilisant des enveloppes virales (retrovirus, adénovirus...). Par ailleurs les polycations utilisés (polylysines, ...) donnent à ces vecteurs la propriété de se fixer non spécifiquement, sur des protéines du sérum et à la surface de cellules sanguines, perdant ainsi de leur efficacité et de la spécificité. Ils leur confèrent, en outre, un caractère cytotoxique.

Une meilleure efficacité de transfection, par exemple du "gene reporter" de la luciférase, a pu être obtenue avec d'autres polymères cationiques pouvant fixer l'ADN : les poly(éthylèneimines) (PEI)[23][24][25].

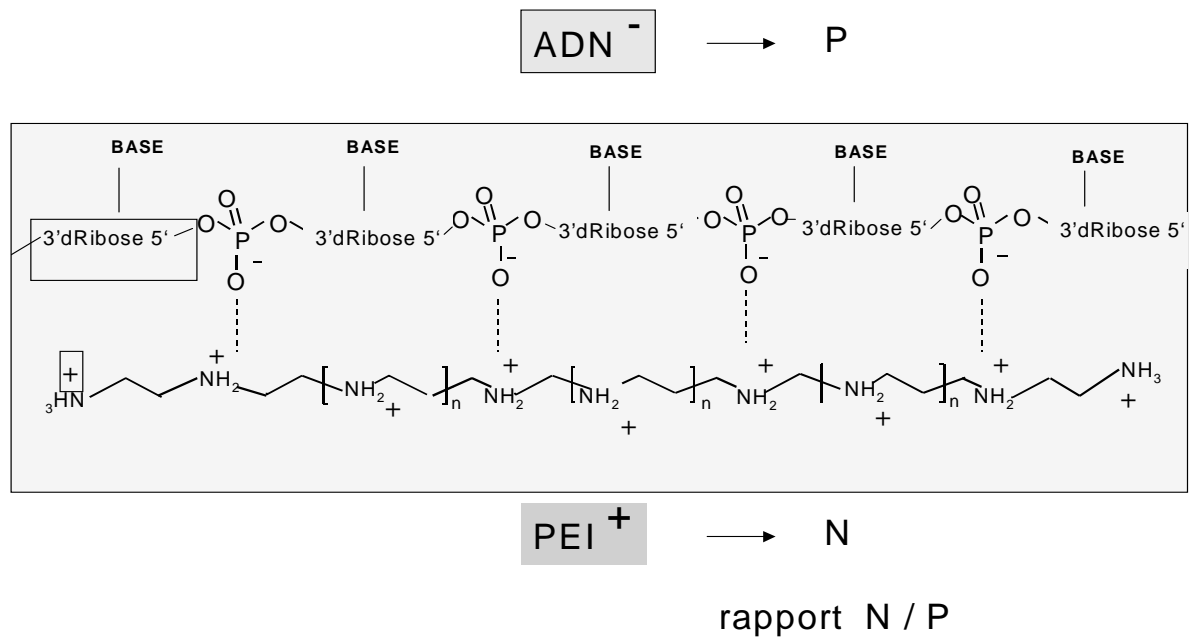


Fig. 2 Interaction de l'ADN avec la L-Poly(éthylèneimine)

Leur effet “ éponge à protons ”[26], provoque un gonflement et un éclatement des endosomes (par lesquels ils ont pénétré dans la cellule), lors de la baisse du pH intracellulaire, et donc leur libération facile avec l'ADN plasmidique qu'ils transportent, dans le milieu intracellulaire. Mais un des rôles bénéfiques des PEI, serait alors, en fixant les protons, d'éviter la diminution du pH au niveau des lysosomes et donc d'altérer le fonctionnement d'enzymes comme des nucléases lysosomales fonctionnant normalement à pH acide. Ces polymères éviteraient ainsi en partie la perte intracellulaire d'ADN plasmidique. Par ailleurs, Moret *et al* [27] ont montré que le PEI empêchait également la dégradation de l'ADN dans le sérum total.

Un autre avantage des polymères cationiques comme les PEI, est que selon Bahnson *et al* [28] les lymphocytes et les monocytes ne possèdent pas de

récepteurs de surface aux cations, contrairement aux cellules cancéreuses, aux cellules épithéliales et endothéliales.

Malheureusement, comme toutes les molécules cationiques, les PEI sont aussi cytotoxiques, par exemple, en s'adsorbant non spécifiquement aux protéines sériques et membranaires. Tels quels, ils peuvent provoquer l'activation du complément, l'agrégation des érythrocytes et une occlusion des capillaires avec risque d'embolie pulmonaire [29][30]. En outre, complexés à l'ADN, ils forment des polyplexes qui peuvent être captés par opsonisation par les cellules du système réticulo-endothéliale (RES), et donc être éliminés prématurément dans le sang et le foie.

Une des solutions pour éliminer efficacement tous ces effets secondaires, a été de coupler du poly(éthylène glycol) (PEG) au transporteur PEI, pour masquer ses charges positives [29][31][32][34]. Si les effets secondaires comme la toxicité, ont pu être annulés efficacement par ce couplage de poly(éthylène)glycols au PEI, il s'en est suivi, par contre, une perte d'efficacité de la transfection [31].

1.4 Cancer et Gélatinases

De très nombreux travaux font état d'une hypersecretion de collagénases de type IV par les cellules tumorales, en particulier deux gélatinases : la gélatinase A (MMP2, 66 KDa) (EC 3.4.24.24) ou, matrix métalloprotéase 2, et la gélatinase B (MMP9, 68 KDa) (EC 3.4.24.35) ou " matrix métalloprotéase 9 " [35].

Par exemple, la gélatinase B est surexprimée par les tumeurs du cancer du sein[45], mais pas la gélatinase A [36]. Au contraire, dans les carcinomes gastriques[34], c'est la gélatinase A (MMP2) qui est hypersecrétée. La gélatinase A est augmentée de 3 à 10 fois et la gélatinase B de 2 à 30 fois dans les tumeurs gliales, comparativement à celles des tissus normaux [37]. La sécrétion de ces enzymes est la conséquence de processus complexes dans la cellule cancéreuse, en particulier " d'activation cellulaire " anormalement accélérée après apparition ou formation d'oncogènes.

La surproduction de ces deux enzymes n'est qu'un des multiples aspects du processus cancéreux extrêmement complexe. Pour la gélatinase B, sa surproduction est la conséquence de la fixation de prourokinase au « récepteur de la prourokinase » (UPAR). La formation d'urokinase[46] permettrait la transformation de proenzymes en enzymes protéolytiques dont la MMP3 qui transforme le plasminogène en plasmine, laquelle active la progélatinase B en gélatinase B.

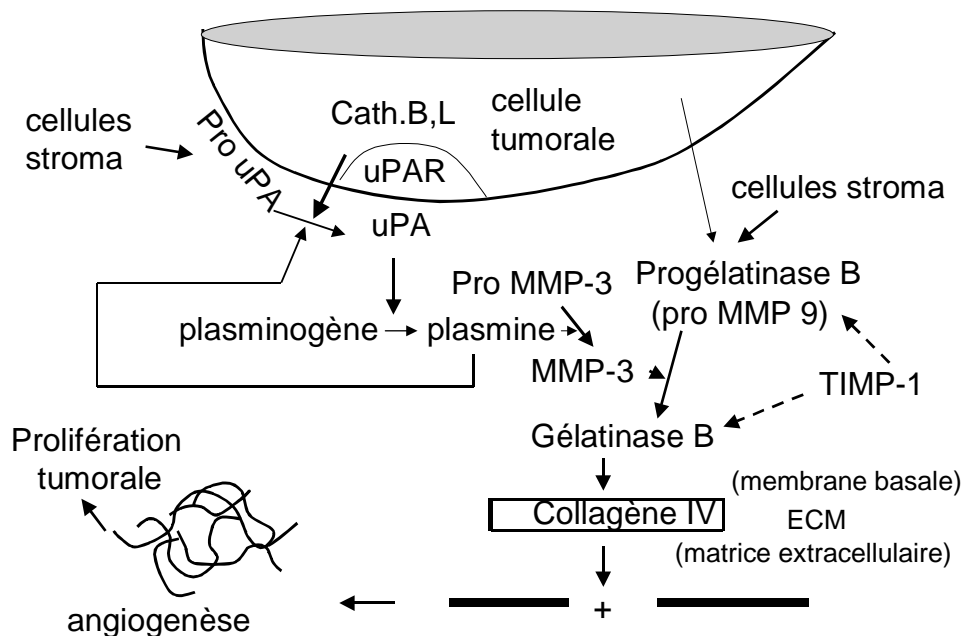


Fig.3 Mécanisme du processus d'angiogénèse liée à la production de gélatinase B

Par ailleurs, une “ matrix métalloprotéase ” membranaire (MT1-MMP) a été décrite comme activant, la progélatinase A en gélatinase A (l'autre collagénase IV) à la surface de cellules tumorales[38][39]. La MT1-MMP fonctionnerait comme un récepteur de gélatinase A. L'on observe aussi sa présence dans les cellules endothéliales et dans les cellules épithéliales transformées.

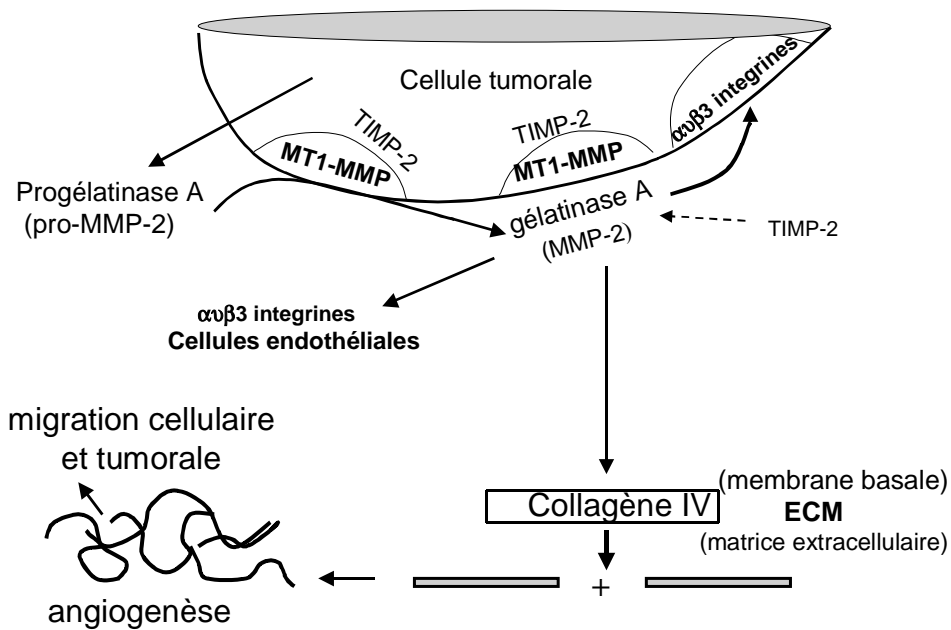


Fig.4 Mécanisme du processus d'angiogenèse liée à la production de gélatinase A

Emonard et *al.* ont montré que ces collagénase IV activées se liaient avec une affinité importante (K_d 2 nM)(11) [40] à un récepteur spécifique associé à la membrane cellulaire [7][37]. Cette notion de récepteur est importante dans la mesure où l'on désire un ciblage spécifique en surface des tumeurs à partir desquelles ces deux collagénase IV sont hypersecrétées.

Au contraire, dans un état non cancéreux, elles sont peu secrétées et inhibées par des protéines appelées TIMP (type 1 ou 2 ou 3)[133] d'une manière stoechiométrique, mole à mole. Par contre dans un état cancéreux, même si les TIMP augmentent pour réguler l'effet des augmentations des collagénases, le rapport "collagénase / TIMP" augmente, par surproduction de ces collagénases IV (gélainase A ou B)[41][32][43] [44] [48][49][50][51]

Quels sont le rôle et le mode de fonctionnement de ces gélatinases dans la prolifération tumorale ? Elles hydrolysent le collagène IV de la membrane basale des capillaires sanguins, permettant ainsi leur multiplication et donc l'**angiogénèse**. Elles hydrolysent le collagène IV de la matrice extracellulaire (ECM) entourant les cellules endothéliales constitutives des capillaires. Ce phénomène permet aux cellules cancéreuses et aux cellules endothéliales de proliférer dans leur environnement mais aussi aux nutriments cellulaires d'alimenter ces cellules en multiplication. L'implication de la gélatinase A (MMP-2) a pu être montrée par S.J.Lee et *al.* [52] avec un inhibiteur de l'angiogénèse, l'endostatine. Selon ces auteurs, cette molécule se fixe, en effet sur le site catalytique de cette enzyme et est déplacée par l'actinonine, molécule inhibitrice de matrix métalloprotéases (MMP) [53] [54].

Le rôle des gélatinases dans le processus cancéreux a pris encore plus d'importance, depuis que l'on sait que l'angiogénèse est aussi accrue par l'interaction de la gélatinase A avec les intégrines $\alpha v \beta 3$ [55]. Il est donc indiqué d'utiliser comme cibles les deux gélatinases A et B sur-sécrétées localement autour des tumeurs. Une drogue, un gène déficient, un " antisens " d'un gène pathologique, couplés sous forme de pro-droque ou de pro "anti-sens ", ou de pro-gène à un de leurs substrats, pourraient être libérés par leur activité enzymatique spécifique à proximité de la cellule tumorale, afin qu'ils y pénètrent spécifiquement.

L'on observera que si les gélatinases sont libérées dans le plasma, la drogue issue de la pro-droque, ou le complexe " vecteur/gène " issu du pro-vecteur, pourrait être libéré prématurément dans ce plasma. Tel n'est pas le cas car, contrairement à l'environnement tumoral, il n'a pas été trouvé d'élévation de gélatinases A (MMP2) dans le plasma de patients cancéreux [56].

Ces auteurs indiquent que, si l'on avait pu observer dans d'autres travaux, dans le plasma de quelques patients, une élévation de quelques enzymes, comme la MMP2, la MMP9, la MMP3, des sérines protéases, des cystéine protéases, c'est qu'il s'agissait d'échantillons du sérum – et non du plasma – obtenu après coagulation sanguine avec une dégranulation possible des granulocytes (qui contiennent aussi, entre autres, comme les neutrophiles, des collagénases IV).

L'utilisation d'un substrat peptidique exogène de collagénases IV (gélatinases A et B), porté par un vecteur chimique synthétique, n'a pas été jusqu'à ce jour développé. Par contre, Peng et *al.* [57][58] l'ont utilisé indirectement en la faisant exprimer au sein d'une « protéine-chimère » dans un vecteur rétroviral, après clonage du plasmide correspondant. La vectorisation du gène d'intérêt s'en est trouvée accrue d'une manière significative. Mais le défaut de ce système réside dans l'utilisation d'outils rétroviraux, d'exploitation lourde avec risque biologique (intégration au génome...). Néanmoins, elle a accredité la pertinence de l'utilisation du substrat de gélatinases pour la transfection de gènes ou de drogues.

1.5 Stratégie de ciblage

Si l'on choisit le PEI comme vecteur synthétique de l'ADN ou d'oligonucléotides, il serait intéressant de faire circuler dans le sérum, un système " plasmide⁻ / PEI⁺-PEG " et de pouvoir éliminer le PEG à la surface des cellules à cibler pour permettre *in situ* une bonne incorporation du PEI transportant le plasmide dans ces cellules. Mais il faudrait ajouter un « effet-ciblage » antérieur à ce processus. Un ciblage des gélatinases a été obtenu par Koivunen et *al* [59], avec un inhibiteur synthétique, de séquence CTTHWGFTLC de ces enzymes. Mais le peptide utilisé n'est en aucun cas clivable comme un substrat peptidique. Nous devons concevoir un système qui puisse éliminer le PEG à la surface des cellules cancéreuses.

Un tel système d'élimination du PEG en surface de cellules tumorales a été utilisé par Suzawa *et al* [60] dans une stratégie " pro-drogue ". Le vecteur qui transporte un anticancéreux cytotoxique, l'adriamycine (ADM), est un immunoconjugué " ADM-peptide-PEG-anticorps ", l'anticorps apportant l'effet cible sur un antigène spécifique en surface des cellules transformées. Ce vecteur, grâce au PEG, a beaucoup moins de cytotoxicité que l'ADM libre, ce qui peut signifier qu'il ne peut pénétrer dans les cellules. Mais le PEG a aussi comme rôle d'éloigner l'anticorps de l'ADM pour qu'il soit mieux reconnu par les antigènes en surfaces des cellules cancéreuses comme CALLA. Il permet de diminuer l'immunogénicité de la partie " ADM-peptide " et d'augmenter sa solubilité. Il permet surtout l'augmentation de la durée de vie du vecteur dans le sang. Puis, il permet d' " exposer " le peptide-

substrat à ses enzymes spécifique de surface pour qu'il puisse être clivé, provoquant *in situ* une libération d'adriamycine et sa pénétration cellulaire.

Ces modèles utilisés avec des dipeptides sont clivables par la proline endopeptidase et la thermolysine, métalloprotéase ressemblante aux NEP (neutral endopeptidase, EC 3.4.24.11) qui sont surproduites par des cellules cancéreuses.

La capacité de surproduction d'une autre protéase, la cathepsine D, dans le cancer du sein [61] a fait utiliser le clivage spécifique de son substrat peptidique GPIC(Et)FFRLGK(FITC)C, inséré entre une polylysine PEGylée et une molécule fluorescente dans le proche infra-rouge Cy5.5, afin d'obtenir une image fluorescente spécifique de la tumeur (C-H Tung *et al*)[62]. Le clivage supprime ici le « quenching » de la fluorescence du Cy5.5 par le FITC.

La capacité de surproduction des gélatinases (dont les MMP-2) par les cellules cancéreuses des tumeurs a, de la même manière, été utilisée pour détecter ces tumeurs avec un système identique, en utilisant un de leurs substrats peptidique GPLG-VRGK(FITC)C, inséré entre du fluorochrome Cy5.5 et de la polylysine PEGylée [63]. L'on a pu ainsi évaluer l'effet d'inhibiteurs de MMP (gélatinases, par exemple) sur l'angiogénèse et donc sur la progression tumorale [64].

Il serait donc intéressant d'utiliser ainsi ce système “ **prodrogue** ” pour transporter, non pas une drogue ou une molécule de marquage, mais un gène, dans une cellule cancéreuse, en utilisant les activités gélatinases A et B libérées en surface de ces cellules, c'est à dire d'incorporer dans le vecteur le substrat peptidique de ces enzymes. Comme ces deux enzymes ont la même spécificité, ce substrat pourra être le même. Ces gélatinases constituent alors la cible du « vecteur-substrat », comme des récepteurs pour leur ligand spécifique. Mais cette cible enzymatique permet, par son action catalytique d'hydrolyse du substrat, la pénétration du vecteur qu'il transporte avec lui.

Nous pouvons concevoir d'incorporer le peptide-substrat de gélatinase entre le PEI et le PEG en formant un « macrosubstrat » : « **plasmide / PEI - peptide – PEG** » que la gélatinase clivera au sein du peptide. Cela libérerait le « plasmide/ PEI » dans l'environnement immédiat de la cellule, lequel plasmide porté par le PEI, en l'absence de PEG, pourrait facilement transfecter la cellule cancéreuse. Au

contraire, en l'absence de ces protéases, le PEG lié au vecteur empêchera, théoriquement, la pénétration cellulaire de l' « ADN / PEI ». De plus, dans le plasma, le « macrosubstrat » « plasmide/ PEI - peptide – PEG » n'aurait pas, de par la présence de PEG, les effets secondaires toxiques du PEI libre.

La stratégie de cette thèse consiste donc à incorporer d'une manière covalente le substrat peptidique des gélatinases entre deux polymères de nature différente, le PEI et le PEG, mais de telle manière que :

- le substrat peptidique soit hydrolysable par ces enzymes
- le complexe " Plasmide⁻ / PEI⁺ " ne puisse pénétrer dans la cellule qu'après la libération du PEG à la surface des cellules " transformées "

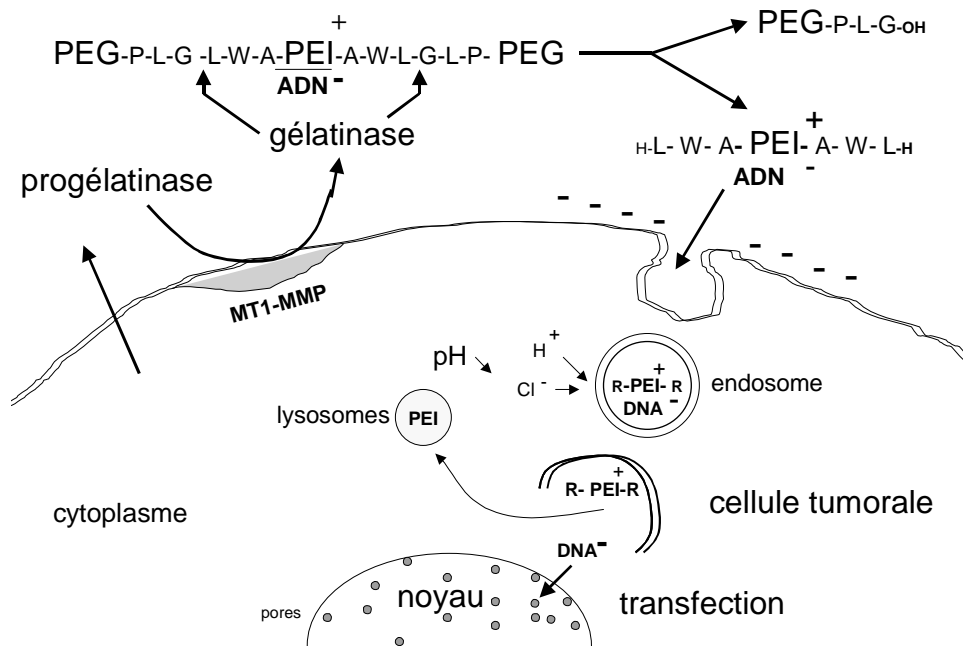


Fig.5 Transfection ciblée d'ADN par les gélatinases

Plusieurs difficultés peuvent contrevenir au succès de cette approche :

La présence de PEG peut, par sa propriété de masquage de charges et donc des interactions, gêner la lyse du peptide, inséré entre le PEG et PEI, par les gélatinases. Cependant, un certain nombre d'enzymes commercialisées, couplées à du PEG (PEG-chymotrypsine, PEG-subtilisine, PEG-asparaginase ...), gardent leur activité enzymatique. L'on peut donc supposer que le PEG couplé à leur substrat ne puisse pas gêner, outre mesure, l'activité enzymatique des gélatinases.

Le PEI à caractère basique peut également gêner l'activité enzymatique, le pH optimum des activités gélatinase se situant aux environs de 7,5. On peut penser que la présence de PEG masquera partiellement ces charges positives du PEI et que précisément, le clivage du peptide par les gélatinases s'en trouvera favorisé. En outre, ces charges positives du PEI seront en partie masquées par l'ADN ou les oligonucléotides transportés.

Cependant, pour qu'il y ait transfection, seulement une partie des charges positives du PEI doit être bloquée par les charges négatives de l'ADN plasmidique transporté (rapport N/P optimal, N étant l'azote du PEI et P le phosphore de l'ADN ou des oligonucléotides). En effet, Il faut garder un compte global de charges positives sur le PEI car la transfection est rendue possible par l'attraction de ces charges positives avec les charges négatives des surfaces cellulaires.

L'encombrement stérique important du PEG, du PEI et du DNA plasmidique peut gêner l'activité enzymatique des gélatinases. Mais, par ailleurs, le " peptide substrat " bloqué en N terminal et en C terminal est mieux hydrolysé (avec un k_{cat}/K_m supérieur) qu'un peptide natif [65]. Une macromolécule comme le collagène, ou, un fragment important de collagène, est mieux hydrolysé (k_{cat}/K_m plus élevé), qu'un peptide seul entourant le site de clivage.

Pour toutes ces raisons, le fonctionnement de ces gélatinases *in vitro* et *in vivo* doit être vérifié avec ce modèle, avant d'évaluer la transfection qui devra s'en suivre.

Le couple PEG-PEI relié par un " linker " enzymatiquement clivable n'a, à notre connaissance jamais été synthétisé et utilisé à ce jour.

Chapitre 2 : Objectif et plan de travail

Le but de cette Thèse est de vérifier si le concept théorique de « vecteurs d'ADN », substrat de gélatinases, peut s'appliquer à la transfection spécifique d'ADN dans les cellules transformées.

Un substrat peptidique est choisi comme étant spécifique des gélatinases A et B. Puis, des opérations préliminaires de vérifications d'hydrolyse de ce substrat, en présence de PEG et de PEI seront effectuées, ces polymères pouvant inhiber l'activité enzymatique à un taux rédhibitoire.

Si ces résultats s'avèrent acceptables, différents travaux de synthèse seront mises en œuvre, utilisant principalement de la chimie peptidique. Le peptide choisi sera couplé « covalamment » entre du PEG et du PEI. Deux sens de couplage seront possibles et le sens du peptide couplé, fournira un dérivé PEI différent, qui pourra influencer la transfection. Plusieurs « peptides substrats » pourront également être insérés entre des PEG et le PEI grâce à un répartiteur, par exemple une polylysine, pour former un polysubstrat. Enfin des synthèses de témoins négatifs, comportant un substrat peptidique théoriquement non hydrolysable, seront effectuées pour valider totalement les résultats expérimentaux.

Avant d'évaluer leur capacité de transfection du gène de la luciférase, ces molécules seront testées dans différents protocoles physico-chimiques. En particulier, leur capacité de compactage de l'ADN, sera mesurée. Seules celles qui compactent, seront testées en cultures cellulaires, pour mesurer leur capacité de transfection, évaluée par un test fluorométrique de l'activité luciférase.

Des essais d'hydrolyses enzymatiques *in vitro*, seront réalisés parallèlement aux tests cellulaires. Des surnageants de différents types de cellules seront testés sur les différents « vecteurs-substrats », sur les témoins négatifs et sur un « vecteur-produit » synthétique, de la réaction enzymatique.

Les comparaisons des résultats obtenus, permettront, d'évaluer la spécificité de transfection vers des cellules cancéreuses.

Chapitre 3 : MISE EN ŒUVRE

3.1 CONCEPTION DE VECTEURS

3.1.1 Eléments constitutifs

Ces molécules seront globalement constituées d'un « peptide substrat » entouré de deux polymères, le PEG et le PEI, qui lui sont liés par liaison covalente sur sa partie N et C terminale, avec éventuellement des « bras de couplage » intermédiaires.

3.1.1.1 Substrat peptidique

Choix du substrat

Ce substrat à insérer entre le PEG et le PEI sera un peptide bien que le substrat normal de la gélatinase soit la gélatine, qui est du collagène dénaturé. Ainsi la chaîne α de gélatine type I (100kD), substrat de la gélatinase (collagénase IV) a un k_{cat}/K_m 76 supérieur à un de ses substrats synthétiques comme acPro-Leu-Gly-Leu-Ala-Gly-OC₂H₅ [65]. Cependant, la gélatine peut potentiellement être hydrolysée par beaucoup de protéases sur toute sa longueur de chaîne. L'on peut penser, dans ce cas, qu'un peptide de 10 amino-acides soit plus spécifiquement clivable. De toute façon, dans les conditions non pathologiques, les protéases sont inhibées par des protéines spécifiques (TIMP pour les collagénases, α_2 macroglobulines pour les autres protéases, α_1 antitrypsine pour la trypsine et l'élastase ...). Cela restreint d'autant plus le clivage d'un tel peptide.

La spécificité d'un substrat gélatinase (A et B) est de posséder la séquence Pro-Leu-Gly sur les sites P3-P2-P1 (nomenclature de Schechter et Berger[66] par rapport au site de clivage ... P3-P2-P1-P'1-P'2-P'3...), selon S. Netzel-Arnett *et al* [67].

MATR IX METALLOPROTEASES (MMP)
(CLASSE DES METZINCINES)

| MM P | E.C. | NO M | SEQ .PEPT . SUB STRAT | SUB STRAT MACRO MOL. | OR IGINE |
|---------|-----------|------------------------|--------------------------|--|---------------------------------|
| MM P-1 | 3.4.24.7 | interstit. Collagénase | -PLA-LWAL- | collagène I, II, III | fibroblastes (synoviales...) |
| MM P-2 | 3.4.24.24 | Gélatinase A | -PLG-LWSR- -PQI-AGQ- | gélatines, coll.IV | cell.tumorales |
| MM P-3 | 3.4.24.17 | Stromelysine I | -PYA-YWMR- | protéoglycane s Coll. III, IV, V, IX | carcinome mammaire |
| MM P-7 | 3.4.24.23 | Matrilysine (PUMP -1) | -A-L- | insuline (chaîne B) Gélatines α 2(I) | |
| MM P-8 | 3.4.24.34 | neutroph .Collagénase | -PLA-YWAR- | collagène s III, I | neutrophiles |
| MM P-9 | 3.4.24.35 | Gélatinase B | -PLG-LWSR A | collagène s IV, V Gélatines I, V | cell. Tumorales granulocytes |
| MM P10 | 3.4.24.22 | Stromelysine II | | | |
| MM P-11 | | Stromelysin III | | | |
| MM P-12 | | Métalloélastase | | | macrophages |
| MM P-13 | | Collagénase III | | | cell. Tumorales |
| MM P-14 | | MT 1-MMP | | progélatinase A | cell.tumorales |

Tableau 1. Métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP)

Ce substrat de gélatinase A et B, pourrait avoir selon ces auteurs la séquence Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser. Au contraire, les collagénases de neutrophiles et de fibroblastes ont plus une spécificité P3-P2-P1 : Pro-Leu-Ala. La partie P'1-P'2-P'3 de clivage est moins spécifique. En effet, pour les gélatinases A et B, elle peut être Leu-Trp-Ala, ou Met-Trp-Ser, ou Leu-Ala-Gly.

M.S.Stack et R.D.Gray [68] ont montré que le substrat DNP-Pro-Leu-Gly-Trp-Ala-D-Arg-NH₂ a un kcat/Km 81 plus élevé avec la gélatinase qu'avec la collagénase des fibroblastes synoviaux de porc.

Nous choisirons, comme Peng *et al.* [57], la séquence **Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala**, à laquelle nous ajouterons un bras, par exemple de 3 Alanine, pour donner plus d'accessibilité à l'enzyme entre les deux polymères.

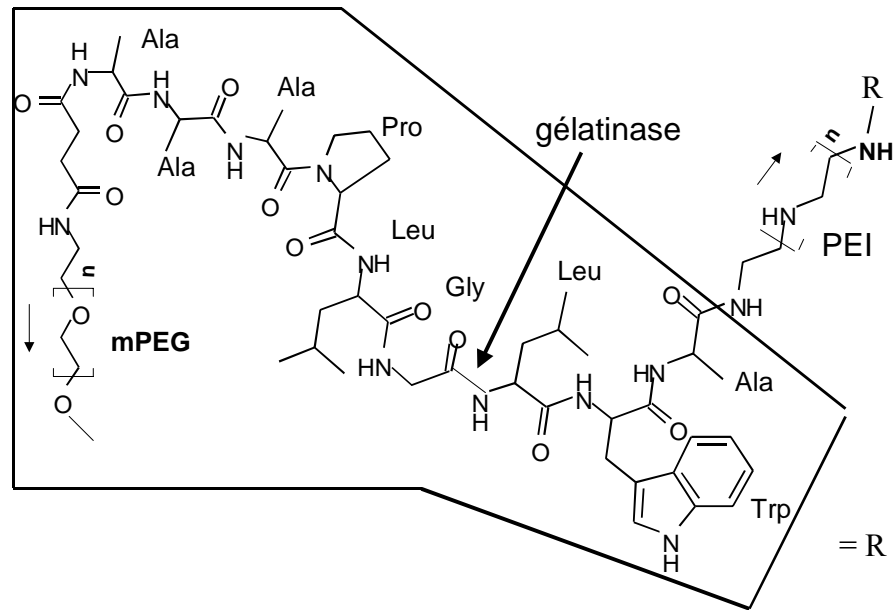
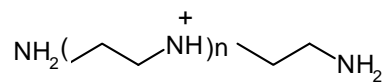


Fig.6 Structure type du « vecteur-substrat, dont un peptide situé entre le PEI et le mPEG est clivable par les gélatinases

Certaines molécules, construites à partir du PEI qui possède deux groupements aminés libres (structure ci-contre),



seront donc symétriques comme le sens de leurs liaisons amide.

Le clivage par les gélatinases, fournira des dérivés PEI accompagnés d'une séquence peptidique différente, selon le sens dans lequel le peptide sera inséré entre les deux « polymères substrats » :

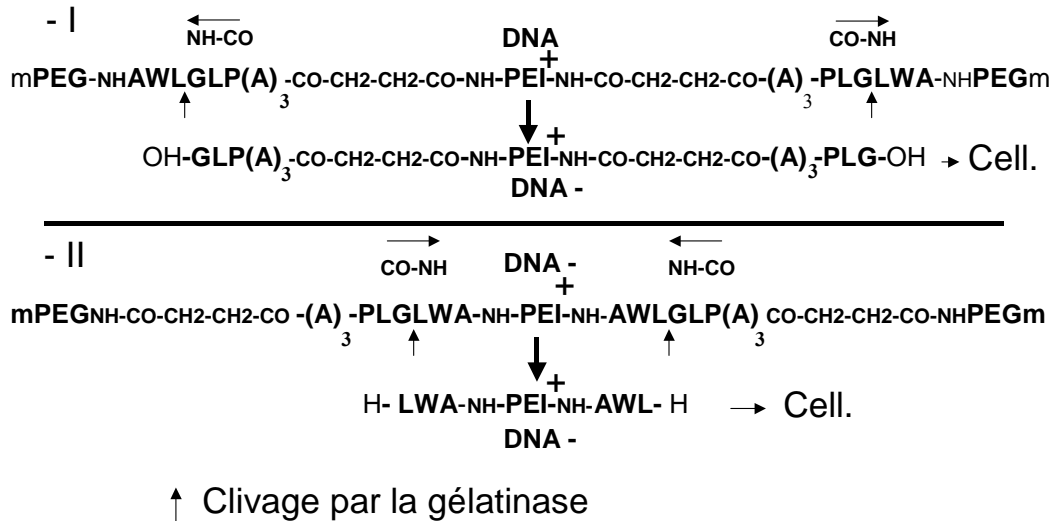


Fig.7 Dérivés PEI différents obtenus par des substrats de sens peptidique inverse

Par conséquent, le sens initial de ces bras peptidiques, pourra influencer le taux d'insertion du PEI portant l'ADN dans l'endosome, lors de la pénétration cellulaire. Selon le dérivé PEI obtenu, dont la structure dépendra du sens du « peptide-substrat » initialement inséré entre les deux polymères, le transport intracellulaire, le passage des pores nucléaires et donc globalement le taux de transfection de l'ADN, pourront être différents.

Plusieurs paramètres pourront être modifiés en fonction de la réponse obtenue. Il faudra peut-être mettre des bras plus longs ou différents dans la liaison du peptide avec les polymères lors de la construction du substrat. De plus, la présence de plusieurs substrats peptidiques identiques dans le « vecteurs substrats » (poly-substrats) pourraient augmenter la vitesse de la réaction gélatinase, la vitesse étant proportionnelle à la concentration du substrat et de l'enzyme.

Le tryptophane **Trp** a été montré comme facteur important pour faciliter la pénétration cellulaire. Mais, il peut poser quelques problèmes lors du couplage au polymère car il possède une amine secondaire qui peut être chimiquement réactive. Il pourrait être remplacé par le résidu Tyrosine.

En effet, Berman *et al* [69] ont montré que, avec une collagénase recombinante de fibroblaste, le k_{cat}/K_m du substrat Dnp-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-(D)Arg-NH₂, substrat de gélatinase, était presque doublé quand le tryptophane était remplacé par la Tyrosine.

Si cette activité était également augmentée avec les gélatinases, la présence de tyrosine pourrait améliorer le passage des pores nucléaires.

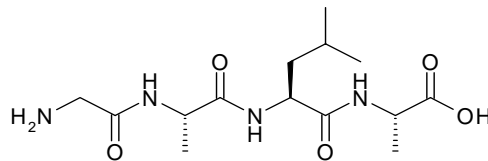
En effet, La tyrosine au sein d'un peptide basique est potentiellement phosphorylable par la proteine kinase C.[70] [71]. Or il a été montré par plusieurs auteurs qu'une proteine kinase C appartenant à la membrane nucléaire faciliterait la translocation d'acides nucléiques à travers les pores nucléaires [72][73]. Cette phosphorylation des queues peptidiques du PEI (basique), pourrait-elle faciliter le passage des pores nucléaires des plasmides transportés ? Dans ce cas de figure, le produit de la réaction gélatinase deviendrait le substrat de la proteine kinase C de la membrane nucléaire.

Leu-Tyr-Ala-**PEI**-Ala-Tyr-Leu serait donc à comparer à Leu-Trp-Ala-**PEI**-Ala-Trp-Leu, comme transporteur de plasmides. Et si le dérivé Tyrosine s'avérait supérieur, le substrat correspondant de la gélatinase devrait être modifié en conséquence. Les premiers essais de transfection devront donc d'abord être effectués avec les dérivés peptidiques du PEI, théoriquement issus des réactions enzymatiques des gélatinases, avant d'optimiser le substrat initial de ces gélatinases.

Synthèse peptidique :

Généralités et réactions – clefs :

La synthèse peptidique consiste à créer de manière ordonnée des liaisons amides entre acides aminés. Les acides aminés généralement utilisés sont sous forme L. Ils constituent le monde du vivant. Les acides aminés sont couplés par étapes successives, pour former un peptide P dont une extrémité est N-terminale (H-P), et l'autre extrémité C-terminale (P-OH), tel le peptide H-Gly-Ala-Leu-Ala-OH :



Mais, pour que deux acides aminés puissent être couplés, il faut qu'un groupement carboxyle de l'un (AA₁), et qu'un groupement aminé de l'autre (AA₂) soient bloqués.

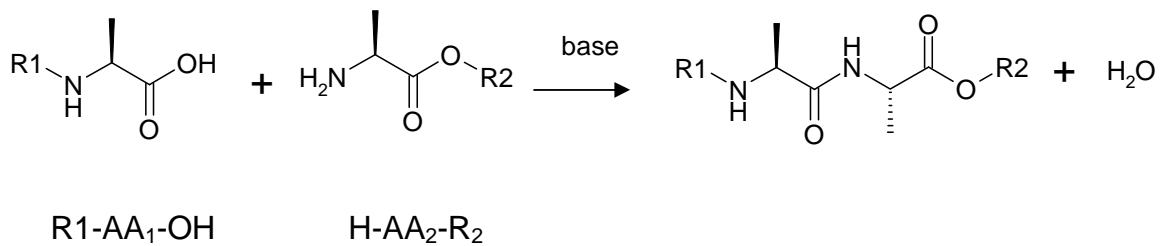


Fig.8 Principe de synthèse peptidique

Les groupements protecteurs les plus utilisés en synthèse peptidique sont les groupements Boc (Butyl-oxycarbonyl) et Fmoc (Fluorenyl-oxycarbonyl)[74]. Ainsi, l'on utilise ainsi le terme de « chimie Boc » et de « chimie Fmoc ». Dans tous les cas il se forme des fonctions carbamates ou uréthanes, après réaction avec l'acide aminé à protéger.

L'introduction d'un groupement Boc sur les groupements aminés des amino-acides peut s'effectuer avec le « di ter-butyl di carbonate » et celle d'un groupement protecteur Fmoc avec Fmoc-Cl en milieu basique. L'intérêt de disposer de groupements protecteurs différents, provient de leur instabilité chimique différente, comme le montre ce tableau :

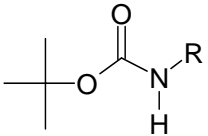
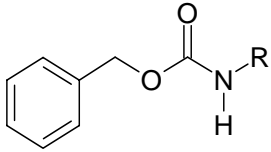
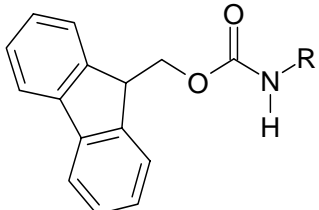
| Groupement protecteur | Conditions de clivage | | | |
|---|-----------------------|---------|----------------------|------------|
| | TFA | HBr/TFA | H ₂ /Pd-C | Pipéridine |
| Boc  | + | + | - | - |
| Z  | - | + | + | - |
| Fmoc  | - | + | - | + |

Fig.9 Groupements protecteurs des groupements aminés

Des protections orthogonales des acides aminés N protégés sont également nécessaires. Par exemple l'on utilise de la Fmoc-Lysine(Boc)-OH, où le groupement Boc protège le groupement ϵ NH₂ de la lysine. L'amine secondaire du tryptophane peut être bloquée par un groupement Boc. Le thiol de la cystéine peut être protégé par un groupement trityl (trt) ou acétamidométhyle (acm).

La synthèse peptidique peut s'effectuer en milieu liquide, en isolant le peptide formé en phase organique et en éliminant les acides aminés protégés non couplés,

dans des phases aqueuses, après salification des fonctions acides (carboxyliques) et basiques (aminées).

Mais cette méthode fastidieuse a été remplacée par des synthèses de peptides en phase solide (SPPS, B.Merrifield [75]), qui permettent une élimination aisée des réactifs de couplage par lavage.

Dans ce cas, le premier acide-aminé AA1, bloqué sur son groupement N-terminal, est couplé par son groupement carboxyle, à une molécule chimiquement liée à une résine servant de support solide. Souvent, l'on utilise une résine commerciale déjà couplée à un acide aminé N-bloqué par un groupement Fmoc ou Boc.

La déprotection du N-terminal de AA1 immobilisé, permet alors de présenter un groupement aminé libre et d'initier l'élongation du peptide. Celle-ci s'effectue donc par les côtés N-terminaux des amino-acides. Les processus successifs « couplage, lavage, déprotection, lavage » sont répétés n fois pour n acides aminés d'un peptide. Ce processus itératif aboutit à la synthèse d'un peptide N et C protégés.

Déprotection et clivage terminaux, libèrent alors le peptide. L'ensemble de ce processus est maintenant automatisé sur robot de synthèse (par exemple sur synthétiseur Applied Biosystems) :



Fig.10 Synthétiseur peptidique (Applied Biosystem)

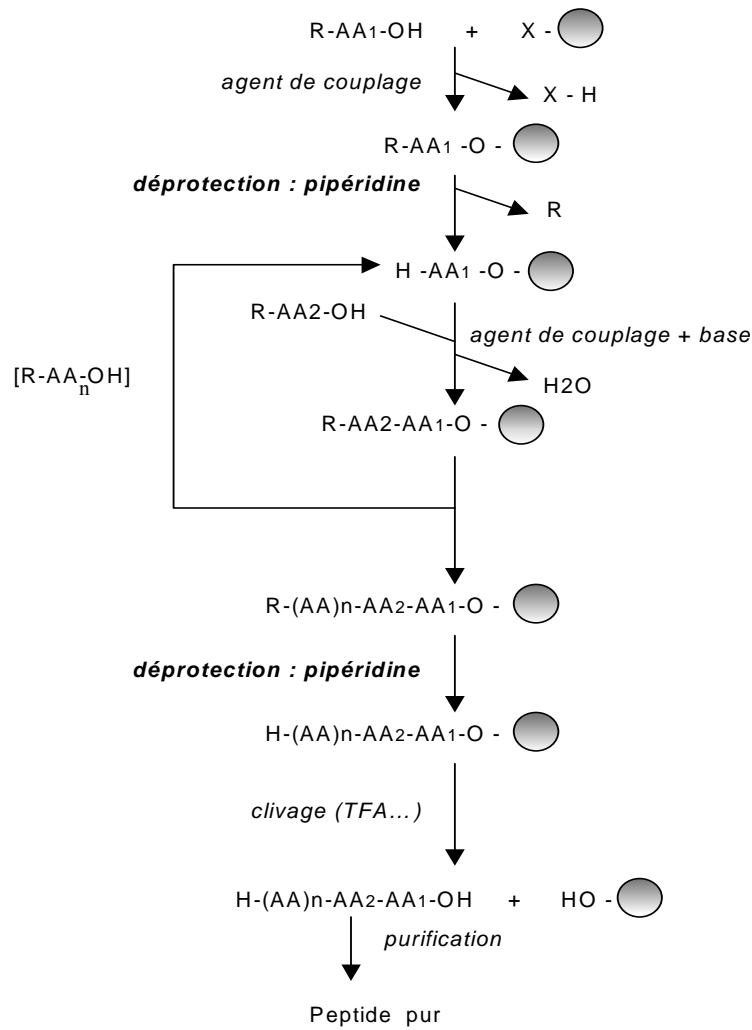
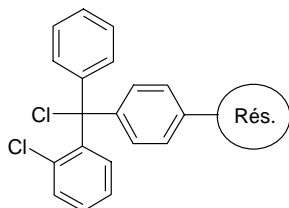


Fig.11 Schéma-type de synthèse peptidique

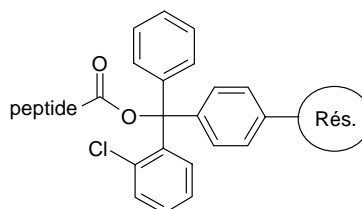
Une fois l'élongation désirée des n acides aminés effectuée, le clivage à partir de la résine du peptide synthétisé peut être effectué. Le réactif utilisé dépend du type de liaison entre la fonction carboxyle du premier acide aminé AA1 avec le support solide et de la nature de la partie C terminale du peptide que l'on veut obtenir (carboxyle libre, carboxamide, alcool etc....).

Essentiellement deux types de résine seront utilisés dans ces travaux :

une résine « 2-chlorotrityl » pour synthétiser des peptides avec un carboxyl terminal.



résine « 2 - chlorotrityl »

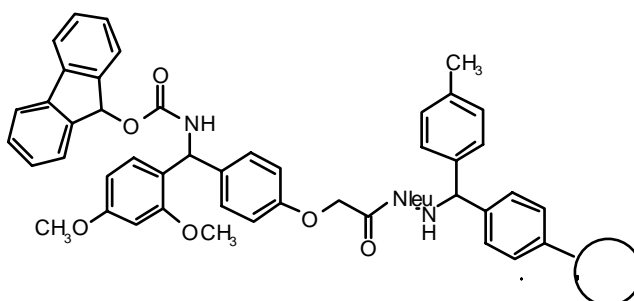


peptide liée à une résine « 2-chlorotrityl »

La liaison du peptide au groupement fonctionnel de la résine est alors de type ester et le TFA 95 % est alors utilisé pour obtenir un peptide avec un carboxyle terminal. Mais il déprotège le peptide de ses groupements protecteurs Boc éventuels. Ceci peut être évité en utilisant du Trifluoroéthanol dans l'AcOH comme agent de clivage.

Par ailleurs, si le TFA est utilisé et si le peptide synthétisé contient certains acides aminés oxydables comme le tryptophane, des « scavengers » de carbocations sont additionnés au TFA comme le thioanisole et le triisopropylsilane (TIS).

Une résine Rink Amide pour synthétiser des peptides avec une carboxamide terminale.



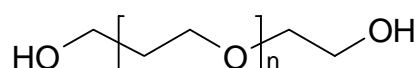
résine « Rink Amide MBHA » sous forme Fmoc

Cette résine est vendue sous forme Fmoc couplée par liaison carbamate. Une déprotection avec la pipéridine, puis un couplage au premier acide aminé AA1 sont les étapes préliminaires avant d'initier la synthèse peptidique habituelle. Une fois le peptide synthétisé, le clivage de la liaison amide qu'il forme avec la résine substituée grâce à du TFA 95%, libère un peptide carboxamide terminal. Cette fonction constitue un groupement protecteur, non réactif pour les étapes de synthèses suivantes.

Des problèmes d'isomérisation de l'acide-amino C-terminal peuvent se produire lors du clivage du peptide formé, de la résine. L'HOBt est destiné à empêcher ce processus.

Par ailleurs, l'utilisation de « Scavengers » éliminant la formation de radicaux libres responsables de réactions secondaires, est recommandé, lors du clivage avec le TFA. Ce sont en particulier, des composés réducteurs comme l'éthanedithiol (EDT), des dérivés du silane tels le triisopropylsilane (TIS), le phénol. L'opération doit s'effectuer à l'abri de l'air (azote, argon).

3.1.1.2 Poly(éthylèneglycol)



Généralités

Le poly(éthylèneglycol)(PEG) est un polymère de l'éthylène glycol, aussi appelé poly(éthylèneoxide)(PEO). Initialement synthétisé par Fordyce et Hibbert en 1905 [76], il est utilisé dans de nombreuses applications industrielles : lubrifiant dans l'industrie du caoutchouc, dans la fabrication des fibres textiles et dans les opérations de carrossage des métaux. Il est utilisé comme solubilisant de pigments

pour les peintures à l'eau, le revêtement de papiers, le polissage des peintures, dans l'industrie des céramiques etc... Il est largement utilisé dans la fabrication des cosmétiques et comme excipient en galénique pharmaceutique.

Les poly(éthylèneglycol)s sont des polyether diols. Ils ont été synthétisés en différentes tailles allant de 200 Daltons à 35kD. Ils peuvent s'appeler poly-oxyrane quand leur poids moléculaire dépasse 20 kD. Mais, ils sont souvent utilisés sous forme de méthoxyPEG (mPEG).

Propriété physico-chimiques

Alors que les PEG de petits poids moléculaires sont des liquides visqueux, ils sont sous forme solide à partir d'un poids moléculaire de 600 daltons. En effet, leur point de fusion augmente avec leur taille moléculaire. Les poly(éthylèneglycols) sont solubles dans l'eau (qu'ils absorbent en quantité importante et qui les fait augmenter de volume), les solvants polaires et dans des solvants comme le dichlorométhane, le toluène, traduisant à la fois un caractère hydrophile et moyennement hydrophobe, donc amphiphile. Ils sont insolubles dans l'éther diéthylique et le cyclohexane, l'hexane, et dans l'eau à température élevée ($\geq 100^\circ\text{C}$), permettant leur isolement par précipitation.

Ils ont un effet de masquage des charges électriques, diminuant le potentiel ξ . Ceci peut expliquer leur effet ralentissant sur les débits électroosmotiques.

Les PEGs diminuent les interactions ioniques non spécifiques, telle l'adhésion à différentes surfaces (les protéines au polystyrène, au verre) au même titre que des tensio-actifs comme les Brij[®], qui sont des dérivés des PEGs.

Les PEGs présentent une certaine polydispersité (traduite par le rapport M_w / M_n), qui, cependant, normalement, n'est pas supérieure à 1,1. Elle est visualisable en spectrométrie de masse Maldi-tof : Les spectres présentent une certaine quantité de pics dont l'ensemble des sommets a une forme gaussienne et dont le maximum fournit le poids moléculaire M/z moyen.

Les PEG sont aisément identifiables et quantifiables en H-1-RMN. Les groupements CH₂ du PEG donnent un pic à 3,53 ppm, et les CH₃ du methoxy du mPEG en donnent un faible à 3,49 ppm, en D₂O.

Utilisations chimiques

Les PEG, ou, les mPEGs, possèdent un squelette relativement inerte. Ils sont seulement « fonctionnalisables » sur leur groupement hydroxyle pour permettre des couplages à d'autres molécules.

S.Zalipsky [77] a effectué une revue des différents types de fonctionnalisation. L'on a ainsi synthétisé des amino-PEG, carboxyl-PEG et leurs dérivés activés (succinimide, maléimide), succinyl-PEG et leurs dérivés activés, halogéno-PEG(Bromo-, chloro-), PEG-ester sulfonates (mesylates, tosylates, tresylates...), hydrazido-PEG, azido-PEG, mercapto-PEG, dichlorotriazine-PEG, PEG-carbonates et leurs dérivés (succinimidylcarbonates...), PEG-carbamates, PEG-chloroformiates, PEG-aldehydes, PEG-époxydes. Il a également été fonctionnalisé en PEGvinylsulfone (Morpurgo et *al.*)[78] qui présente une certaine spécificité de couplage sur les dérivés thiols.

Les dérivés mPEG fonctionnalisés sont le plus souvent utilisés, car ils empêchent la formation de maillons enchevêtrés (cross-links) non spécifiques. Lorsque la taille des PEGs utilisés, est suffisante, (i.e. P.M = 5000), les produits de la réaction chimiques de petits poids moléculaire peuvent être aisément séparés par perméation sur gel (Sephadex G25[®], Biogel P6[®]...), les PEGs sortant en premier par exclusion. Lorsque les réactions sont effectuées en solvants, les PEGs sont aisément séparables des réactifs solubles dans l'éther, par précipitation dans ce solvant.

La PEGs ont la capacité de fixer les métaux et de permettre leur transfert d'une phase aqueuse à une phase organique. Ainsi, des « éther-couronnes », utilisés à cet effet, sont des dérivés PEGs.

Les PEGs de petits poids moléculaires sont souvent utilisés comme « espaceur » dans la construction de molécules complexes. Le choix des petits polymères, permet de faire varier la longueur de la chaîne et de vérifier l'effet de

l'éloignement de molécules qu'ils lient entre elles. Leur caractère chimique relativement inerte en fait un outil de choix à cet usage.

Les PEGs ont été utilisés avec succès dans la synthèse peptidique homogène en tant que support de greffage initial. La précipitation à l'éther entre les différentes étapes permet aisément de séparer les PEG-peptides formés par précipitation à l'éther diéthylique.

Propriétés, utilisations biochimiques et biologiques

Les PEGs [87], sont utilisés à concentrations élevées pour précipiter des protéines, des acides nucléiques, des virus, à des fins de purification. Ces précipitations peuvent avoir pour cause un effet de masquage de charges, mais seraient surtout dues à un phénomène d'exclusion car les PEGs occupent un très gros volume dans l'eau qu'ils absorbent en quantité importante, provoquant une variation de pression osmotique. Ils sont parfois employés avec d'autres polymères dans des systèmes biphasiques aqueux, dans le même objectif de purification.

Comme les PEGs sont capables de former des complexes avec les métaux, l'adjonction de ceux-ci peut améliorer ces purifications. Cette capacité des PEGs pourrait être liée à la formation de structure hélicoïdale insérant le métal.

Le caractère amphiphile des PEGs leur confère des propriétés solubilisantes des molécules auxquelles ils sont couplés. A très faible concentration, ils ont, comme les Brij®, un effet de changement de conformation des protéines, permettant la disparition de leur structure en pelote, et, par exemple, le démasquage de sites catalytiques d'enzymes. Au contraire, à concentration plus élevée, leur capacité de masquer les charges, peut provoquer une inhibition de l'activité enzymatique. Des paramètres cinétiques comme le k_{cat} et le K_m peuvent être modifiés.

Cependant, de nombreuses enzymes couplées chimiquement à des PEG, n'ont pas leur activité enzymatique globalement affectée, car le degré de substitution de la protéine par les PEG n'est pas suffisamment élevé pour avoir une incidence. Le couplage des PEG à des enzymes augmente leur solubilité d'une manière telle qu'elles peuvent rester actives en milieu solvant anhydre, comme dans le chloroforme ou le dichlorométhane.

Le couplage des PEG à des ligands, à des enzymes, à des anticorps ne gêne pas, dans des proportions importantes, leurs fixations respectives à leur récepteur, leur substrat, leurs antigènes.

Les PEG-protéines (albumine, anticorps, enzymes...), ont une durée de vie augmentée dans la circulation sanguine, comparativement à la protéine non couplée [79]. En effet, le squelette des PEG, constitué d'oxyde d'éthylène, est non dégradé par les enzymes de mammifères. Les protéines, peptides ou petites molécules couplées au PEG, sont moins éliminés par le système rénal, et par les cellules du système réticulo-endothélial que lorsqu'ils sont non couplés. Il en est de même pour les liposomes habillés de PEG [80]. Cette durée de vie dans le système circulatoire augmente avec le poids moléculaire des PEG.

Le couplage des protéines, peptides et petites molécules organiques au PEG, diminue leur interaction avec d'autres protéines. L'effet éponge de l'albumine sur les petites molécules est diminué. En outre, le couplage des protéines au PEG diminue leur immunogénicité, au même titre que celle des peptides, par rapport aux mêmes protéines ou peptides non couplés [81][82][79][83].

Ils ont un pouvoir « fusogène » dans les membranes cellulaires, qui pourrait être dû à leur effet déshydratant [84]. Cette propriété décrite par Yamazaki *et al* [85], est utilisée pour la production d'hybridomes dans la préparation d'anticorps monoclonaux.

Les PEG sont non toxiques au regard de la FDA. Ils diminuent quelquefois aussi la toxicité des molécules auxquelles ils sont conjugués, grâce, parfois, à leur effet potentiel de masquage (shielding) de charges. Cependant, les PEG de petits poids moléculaires (*i.e.* 400) sont oxydés au niveau du foie par une alcool-déshydrogénase en formant des diacides et des hydroxy-acides toxiques (Herold *et al*)[86].

Synthèse du mPEG-NH₂ (Fig.12)

Plusieurs techniques de synthèse du methoxy-PEG-NH₂, (mPEG-NH₂), sont utilisables. Dans notre cas, nous avons initialement utilisé un mPEG-NH₂ dont les rendements de synthèses n'avait été que de 50% environ.

Les auteurs avaient utilisé le procédé de synthèse suivant : le mPEG₅₀₀₀-OH, commercial initial est transformé sous forme Tosyl avec le p-toluène sulfonyl chlorure. Ensuite, ce produit est transformé en mPEG-N=N⁺=N⁻ avec de l'azide de sodium. Puis, une réaction de réduction de Staudinger [88] est effectuée avec de la triphénylphosphine pour obtenir du mPEG-NH₂. Mais cette voie de synthèse, donnant un rendement moyen, nécessite une purification de produit obtenu avec un échangeur de cations, pour éliminer les impuretés non accrochées.

Nous avons utilisé une autre technique qui utilise la triphénylphosphine et la N-bromosuccinimide pour former du mPEG-Br, qui en présence d'azide de Na, permet la formation du mPEG-N=N⁺=N⁻. Comme précédemment une réduction de cette molécule par la triphénylphosphine permet d'aboutir à mPEG-NH₂ **1**.

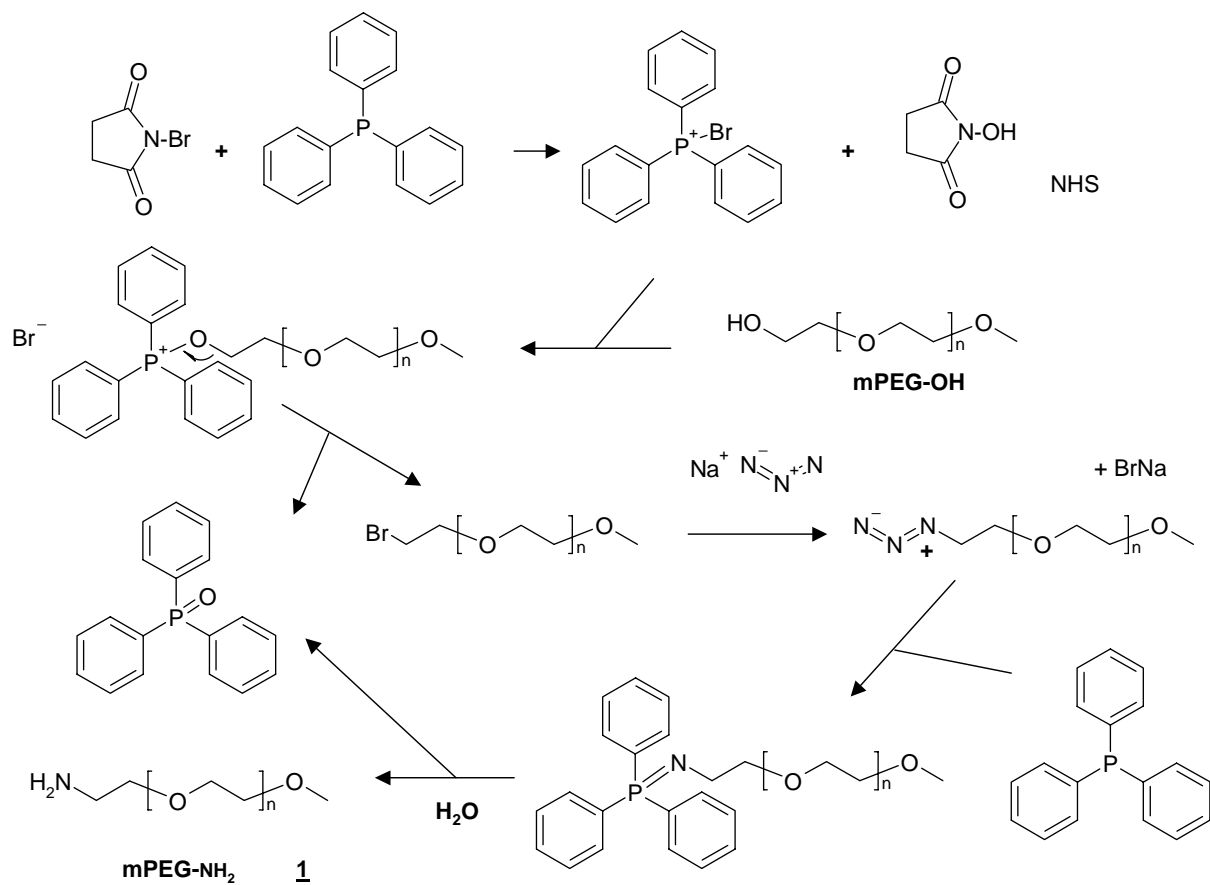


Fig.12 Synthèse du mPEG-NH₂ 1

3.1.1.3 Poly(éthylèneimine)

Généralités

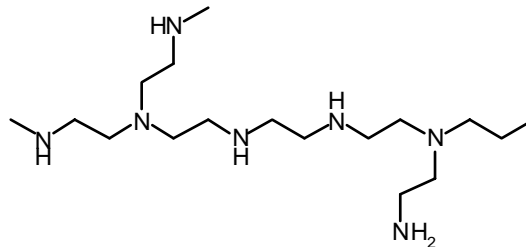
Une revue générale sur les PEI en rapport avec la thérapie génique a été documentée par W.T.Godbey et *al.* [89] concernant leur chimie, leur capacité à former de complexes avec l'ADN, leur capacité de transfection, le ciblage de leurs dérivés, leur mécanisme et leur toxicité.

Structure

Une description chimique précise en a été effectuée par H.F.Marks et *al.* [90]. Ainsi, les PEI sont des polymères du groupe éthylèneimine : $[-CH_2-CH_2-N-]_n$. Ce sont des bases faibles dont le caractère cationique dépend de leur degré de protonation. Ils ont la propriété de se fixer à des molécules anioniques, organiques ou inorganiques. Ils sont utilisés depuis des années dans la production de papier, la fabrication de shampoings et la purification de l'eau.

Deux catégories de polymères PEI existent :

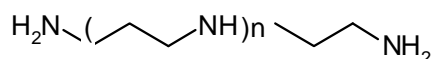
- **les PEI branchés (B-PEI)**



Ils comportent des amines primaires, secondaires et tertiaires, dont les rapports varient selon le choix des synthèses et de leurs modalités. Les chaînes latérales sont branchées sur quelques azotes secondaires dans un processus de synthèse

partant de l'aziridine et présentant une propagation par interactions spécifiques entre deux molécules de polymères en croissance, la polymérisation se terminant par formation intramoléculaire d'un anneau macrocyclique. Plusieurs sortes de B-PEI sont disponibles sur le marché et varient selon leur poids moléculaire : Polysciences (P.M.70000), Sigma (PM.25000), Fluka (P.M.600.000 à 1000000). Les B-PEI de P.M. 25000, ont environ 30% de groupements aminés libres. Ils ont été testés par Godbey et *al.*

- les **PEI linéaires** (L-PEI) comportent, seulement 2 amines primaires à leurs extrémités :



Les poids moléculaires varient selon le nombre d'unités mère introduits dans les synthèses. 511 unités de ces unités « CH₂-CH₂-N », de poids moléculaire 42, peuvent être dénombrées pour le L-PEI de Poids Moléculaire 22000.

Physico-chimie

Des différences notables de propriétés physico-chimiques existent entre les deux types de PEI.

Les PEI branchés solubles dans l'eau, présentent plusieurs pics (2,59, 2,7, 2,84, 2,94 ppm) en RMN du proton, en D₂O.

Au contraire les PEI linéaires (L-PEI) sont insolubles dans l'eau et ne présentent qu'un seul pic en 1-H RMN (2,92 ppm) et en RMN 13-C (49,4 ppm) en CDCl₃.

Les poids moléculaires des PEI dépendent de leur degré de polymérisation. Mais il s'agit d'une répartition statistique, avec une courbe de Gauss présentant un maximum, dit « poids moléculaire moyen (Mw) », déterminable par technique de diffusion de la lumière. Le nombre moyen Mn, déterminable par osmométrie de membrane, peut permettre l'évaluation de la répartition gaussienne traduite par le rapport « Mw/Mn », fournissant un index de polydispersité moléculaire (P.I.) du

produit. Celle-ci peut être mise en évidence par la chromatographie de perméation sur gel basse pression (CPG).

Ce système permet de les purifier et de les séparer des réactifs de couplage éventuels. Le Sephadex G50 (Pharmacia ®) et le Biogel P30 (Biorad®) conviennent ainsi à leur purification. Les fractions des éluats sont identifiées au papier pH et au réactif de Dragendoff (spécifique des amines secondaires) à partir de fractions collectées.

Si le L-PEI est insoluble dans l'eau à température ambiante, il devient soluble lorsque la température est élevée à 55°C et au-delà, probablement par rupture des liaisons hydrogène. Il le devient aussi à température ambiante si, au moins un tiers de ses amines secondaires est amené sous forme chlorhydrate (telle, environ, une solution à 2,5 mg/ml neutralisée à pH 7-8 avec HCl 0,1N). Cette solubilisation nécessite néanmoins un cycle de passage à 55°C et est favorisée par un traitement aux ultrasons. La solubilité est donc liée à un certain degré de protonation des amines essentiellement secondaires. Mais cette forme, une fois lyophilisée, est extrêmement hygroscopique. Le L-PEI / HCl redevient insoluble dans l'eau si son pH est élevé à 10 et au-delà, en reformant les amines libres. Ce système constitue également un moyen de purification du polymère.

Le degré de protonation des PEI et leur pouvoir tampon, peuvent être évalués par courbe de titration avec du HCl, la solution de PEI étant préalablement ajustée à pH 10. Mais cette technique est difficile à appliquer pour les L-PEI qui sont plus insolubles en milieu basique.

Une grande différence entre les L-PEI et les B-PEI réside dans leur nombre de groupements aminés libres. Le L-PEI (P.M.22000) ne possède que 2 groupements aminés libres par mole, alors que 30% des amines du B-PEI (P.M. 25000) sont primaires. Les B-PEI sont beaucoup plus substituables que les L-PEI.

Le « L-PEI base » est soluble dans les solvants polaires comme le méthanol, l'éthanol, le DMF, le DMSO, l'acétonitrile à 55%. Il est insoluble dans l'éther diéthylique (Et₂O).

Lorsque les L-PEI sont rigoureusement anhydres, ils ont la propriété de former des structures hélicoïdales à double chaîne, stabilisées par des liaisons hydrogène.

Capacité de transfection de l'ADN et des oligonucléotides

Les deux types de polymères PEI fixent l'ADN par des liaisons hydrogène, entre l'oxygène des phosphates (négatif) de l'ADN et les azotes secondaires protonés, donc positifs, du PEI. Ainsi, ces deux types de PEI transfectent l'ADN dans les noyaux cellulaires avec une efficacité identique. Cependant, une proportion limitée du PEI doit fixer l'ADN afin que la charge du complexe ADN / PEI puisse rester positive pour se fixer sur le pourtour des membranes cellulaires chargées négativement. Une endocytose du complexe se produit, formant d'abord une invagination de cette membrane puis un endosome isolé.

Selon J.P.Behr [26], la poly(éthylène)imine, interne à l'endosome, a la propriété de capter les protons intracellulaires du cytoplasme, formant ainsi une « éponge à protons », fournissant en quelque sorte un effet tampon. Ceci entraîne également une pénétration d'ions chlorure qui fait augmenter la pression osmotique intra-endosomiale et donc l'éclatement de l'endosome, libérant l'ADN.

Cette augmentation de pH intracellulaire autour de l'endosome éviterait partiellement la transformation des endosomes en endolysosomes et donc l'action de nucléases qu'ils contiennent. Mais, contrairement aux vecteurs polylysine, l'action des nucléases lysosomiales est inhibée en elle-même, par les PEI, ce qui peut expliquer en partie leur meilleur pouvoir transfectant.

Godbey [24][25] affirme qu'il n'y aurait pas implication des lysosomes dans les transfections par les PEI. Cependant, la chloroquine et le glycérol augmentent le pouvoir transfectant des PEI, en favorisant l'éclatement des lysosomes, qui ont pu, en définitive, « phagocyter » ces endosomes. T.Biber et al [91] ont en effet montré plus tard, que les complexes PEI-DNA s'accumulent dans les compartiments lysosomaux.

Le mode de « libération » de l'ADN du PEI n'est pas connu : l'accumulation des ions chlorure, provoque-t-elle un déplacement des groupements phosphates de l'ADN sur le PEI ? Ensuite, la traversée des pores nucléaires par l'ADN libéré, est aussi un processus inconnu. Les PEI, se complexeraient-ils aux importines α , comme les peptides basiques NLS (nuclear localisation signal peptides) [135], facilitant ainsi la pénétration des pores nucléaires par l'ADN ? Il est possible,

ensuite, qu'une partie minime de PEI, puissent pénétrer dans le noyau intracellulaire. Mais, Biber *et al.* [91] n'ont pas réussi à mettre en évidence la présence d'agrégats PEI-DNA dans le noyau.

L'ADN transfecté par les PEI ne s'intègre pas au génome contrairement à l'ADN rétroviral. En outre, les PEI présentent l'avantage d'avoir un potentiel de transfection possédant un éventail en matériel génétique beaucoup plus grand que celui des adénovirus modifiés.

Le **rapport N / P** (azote des PEI / phosphate des ADN et ON) doit être ajusté afin d'obtenir une transfection optimale sans pour autant être cytotoxique. Mais, la transfection ne s'effectue que s'il y a un excès cationique. Des rapports de 5 : 1 à 13,5 : 1, ont été cités dans la littérature. O.Boussif *et al.* [23] obtinrent de bonnes transfections, pour des rapports allant de 9 :1 à 13,5 :1 avec du B-PEI. En effet, plus l'effet « éponge à proton » du PEI est important, plus la transfection devrait théoriquement être importante.

Cependant, Ferrari *et al* [92] obtient une bonne transfection avec du L-PEI ayant un rapport N / P de 5 : 1. Goula *et al* [93] obtiennent une bonne transfection du gène de la luciférase (Luc) dans les poumons avec du L-PEI avec un rapport N / P de 4 : 1. Plus le rapport « N / P » est élevé, plus la taille des polyplexes « ADN / PEI » est petite, mais plus la « toxicité cationique » augmente pour les cellules. Ainsi, la toxicité supérieure de B-PEI, peut être due à la nécessité d'utiliser un rapport N / P supérieur à celui L-PEI pour obtenir une transfection identique.

Le taux de transfection est aussi dépendant de l'environnement cellulaire, (sérum, glucose, nature des ions, force ionique...). Il peut être modulé, en plus du **rapport « N / P »**, par le taux de charges réellement disponibles (traduite par le **potentiel ξ**) et la **taille** des polyplexes. La présence de glucose 5% donne une petite taille au polyplexe et empêche la formation d'agrégats [93]. Mais il semble qu'une taille trop petite (500 nm) donne une moins bonne transfection qu'une taille de 1500 nm. La capacité de transfection des PEI et de ses dérivés dépendra, en premier, de son degré de **compactage de l'ADN** qui sera évalué par le test de fluorescence de l'intercalant picogreen.

Ciblage de cellules

L'augmentation du taux de transfection *in vitro* et *in vivo* de l'ADN que les PEI transportent, peut être obtenu par leur couplage à des ligands, permettant un tropisme vers un type de cellules donné, portant les récepteurs correspondants à leur surface.

L'efficacité d'un tel système dépend de la capacité des cellules impliquées à sur-exprimer à leur surface le récepteur ciblé, de l'affinité connue du ligand choisi pour son récepteur, enfin de la capacité d'internalisation du complexe ligand-récepteur formé. Un substrat d'enzyme lié au PEI pourrait également convenir, si l'enzyme était sur-exprimé à la surface cellulaire, et si le produit de la réaction lié au PEI pouvait pénétrer dans la cellule.

Mais, dans tous les cas, il ne faut pas que le PEI inhibe l'interaction « ligand / récepteur » ou « substrat / enzyme ».

Ainsi, des ligands de cellules cancéreuses ont été fixés chimiquement sur le PEI. La transferrine a été couplée sur les deux types de PEI [30], pour se fixer préférentiellement sur des tumeurs sur-exprimant son récepteur. Ce ciblage sur les tumeurs, s'accompagne d'une diminution des interactions non spécifiques de ce polymère avec les érythrocytes. Le PEI, ainsi modifié, voit diminuer son tropisme pulmonaire.

Le « peptide RGD », ligand du récepteur intégrine $\alpha v \beta 3$, sur-exprimé par des cellules épithéliales (HeLa) et de fibroblastes (MRC5), a été couplé au PEI par un pont disulfure (Erbacher et al) avec un taux de transfection du gène de la luciférase augmenté de 50 à 100 fois par rapport PEI seul. Il a également couplé au PEI par Kunath et al. [94]. Le peptide RGD-PEI obtenu, avec un rapport N / P aussi bas que 3,3 : 1, transfecte 50 fois plus le gène de la luciférase que le PEI seul, dans des cellules Mewo.

Des ligands « sucres » ont été couplés avec succès aux PEI.

Ainsi, les « récepteurs mannoses » de cellules dendritiques ont pu être ciblés avec du « PEI-mannose » dont le sucre a été couplé avec du mannopyranosylphenylisothiocyanate[95]. Des récepteurs d'hépatocytes ont aussi été ciblés avec du PEI couplé à une chaîne tétra-galactose [96].

Caractères toxiques

Les PEI sont des transporteurs synthétiques D'ADN et d'oligonucléotides permettant leur transfection dans le noyau cellulaire. Leur caractère cationique, qui permet la fixation de l'ADN, apporte un élément de toxicité, en provoquant des fixations non spécifiques sur les protéines et sur les surfaces de certaines cellules à propriétés anioniques. Celles-ci possèdent des groupements sulfatés ou carboxyliques apportés par des hétéropolyglycosides. Ce processus aboutit, par exemple, à l'agrégation d'érythrocytes, qui, *in vivo*, peut se traduire par une occlusion des capillaires des poumons[30], pouvant provoquer des embolies pulmonaires. Ainsi, les PEI ont, selon P.Chollet et *al.*[97], un tropisme vers l'endothélium pulmonaire en y induisant l'adhésion plaquettaire. Des antithrombotiques, comme l'aspirine, diminueraient la transfection au niveau pulmonaire et l'augmenteraient dans les autres organes.

Le caractère polycationique des PEI pourrait provoquer leur fixation sur les protéines du « complément », en provoquant son activation et les processus pathologiques qui s'en suivent : inflammation, allergie, coagulation, mort cellulaire [98]. La fixation directe sur le fibrinogène peut également expliquer son influence sur la coagulation sanguine. Les agrégats formés peuvent être, de plus, opsonisés par les cellules du système réticulo-endothélial dont les phagocytes sanguins et les cellules de Kuppfer du foie. En, outre, ces fixations non spécifiques, éliminent les PEI du circuit sanguin, en les rendant indisponibles pour leur destination finale.

Les L-PEI ont été évalués expérimentalement moins toxiques que les B-PEI [94]. Récemment des dérivés PEI biodégradables, réticulés avec des petits diacrylates ont été synthétisés par Forrest et *al.* [99]. Ces polymères de taille de 14000 à 30000, possèdent une basse toxicité et un pouvoir de transfection 16 fois supérieur au B-PEI.

Synthèse du L-PEI 2

Deux méthodes de synthèses sont utilisables :

- Une méthode utilisant l'aziridine mais à une température de 40°C suivie d'une purification par précipitation de cristaux hydratés en milieu aqueux (Tomalia et *al.*)[100]. Seul le L-PEI précipite, le B-PEI restant en solution. Mais cette technique apparaît délicate à contrôler.
- Une méthode utilisant les précurseurs de monomère dérivé d'oxazoline comme la 2-phenyl-2-oxazoline (POX) [101] ou de polymères comme la polyethyl-2oxazoline (PEOX) ou oxazole, 2-ethyl-4,5-dihydrohomopolymer [102].

La synthèse du L-PEI consiste alors en une hydrolyse acide du PEOX dans HCl 0,1N (ou par 1,5 eq. de H₂SO₄) à 100°C pendant une durée de 6H à 18H selon les auteurs. L'acide propionique libéré est éliminé par distillation. Le produit neutralisé par NaOH est purifié par plusieurs cristallisations dans l'eau froide. Le taux de groupement propionyl restant sur le PEI peut avoir une influence sur le taux de transfection de l'ADN qu'il fixe. Ainsi, J.H.Jeong et *al.* [103] ont montré qu'une hydrolyse de seulement 88% des groupements propionyl correspondait à des taux de transfusions maximum.

Le L-PEI **2** que nous avons synthétisé par cette méthode, présente un pic maximum, en 1-H RMN de 2.7 ppm correspondant aux protons des unités de polymères CH₂-CH₂-N. Des traces de propionyl sont également visibles, à la fois en 1-H RMN et 13-C RMN, signifiant que la molécule n'a pas été totalement hydrolysée en milieu chlorhydrique. Cependant, dans la mesure où ces groupements résiduels peuvent améliorer la transfection, il n'apparaît pas utile de compléter totalement cette hydrolyse. Mais, une bonne reproductibilité de la synthèse de ce polymère peut devenir difficile à obtenir, quant à sa teneur en traces de groupements propionyle.

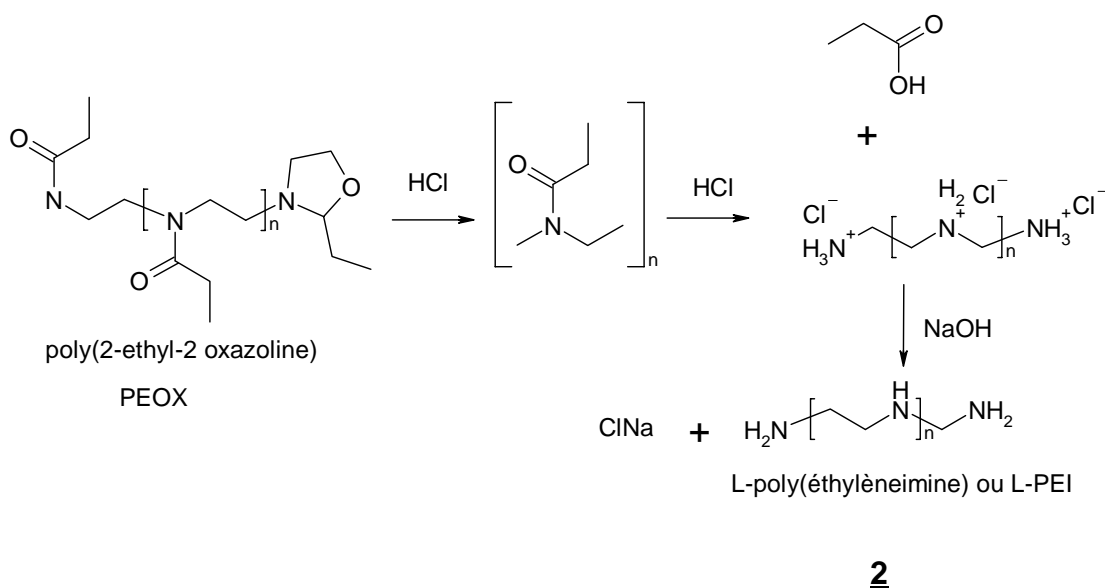


Fig.13 Synthèse du L-PEI **2**

3.1.2 Effets du mPEG-OH et du L-PEI sur l'activité gélatinase

La condition nécessaire pour l'utilisation de substrats de gélatinases, entourés par du mPEG et du L-PEI, est que ces deux polymères n'inhibent pas, d'une manière rédhibitoire, l'activité de ces enzymes.

Pour cela nous avons utilisé un substrat synthétique de gélatinase dont la séquence est proche de celle du substrat que nous voulons utiliser. L'hydrolyse de ce substrat par la gélatinase activée à l'APMA, peut être mesurée en fonction du temps, par la mesure en CLHP, de la surface à 220 nm du produit formé. (Fig. 14)

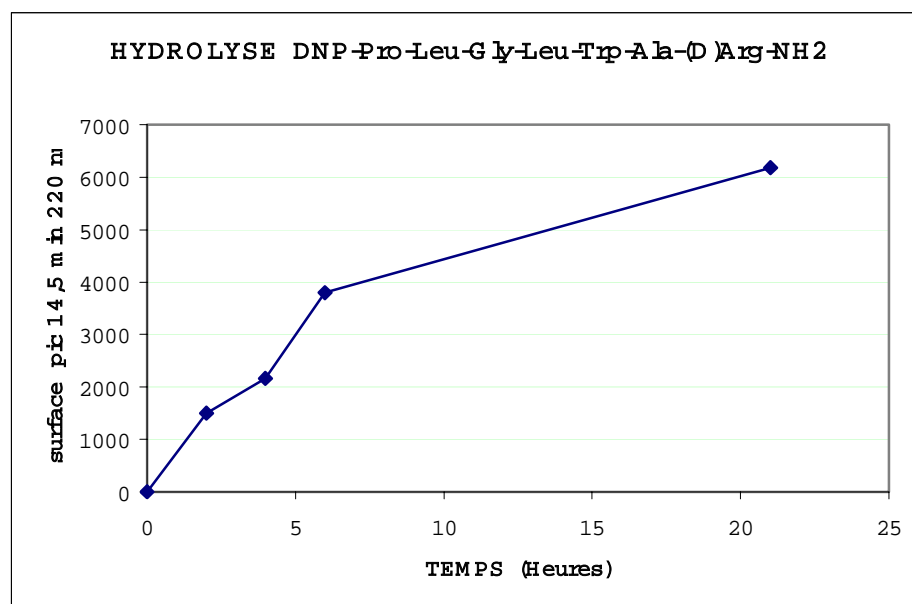
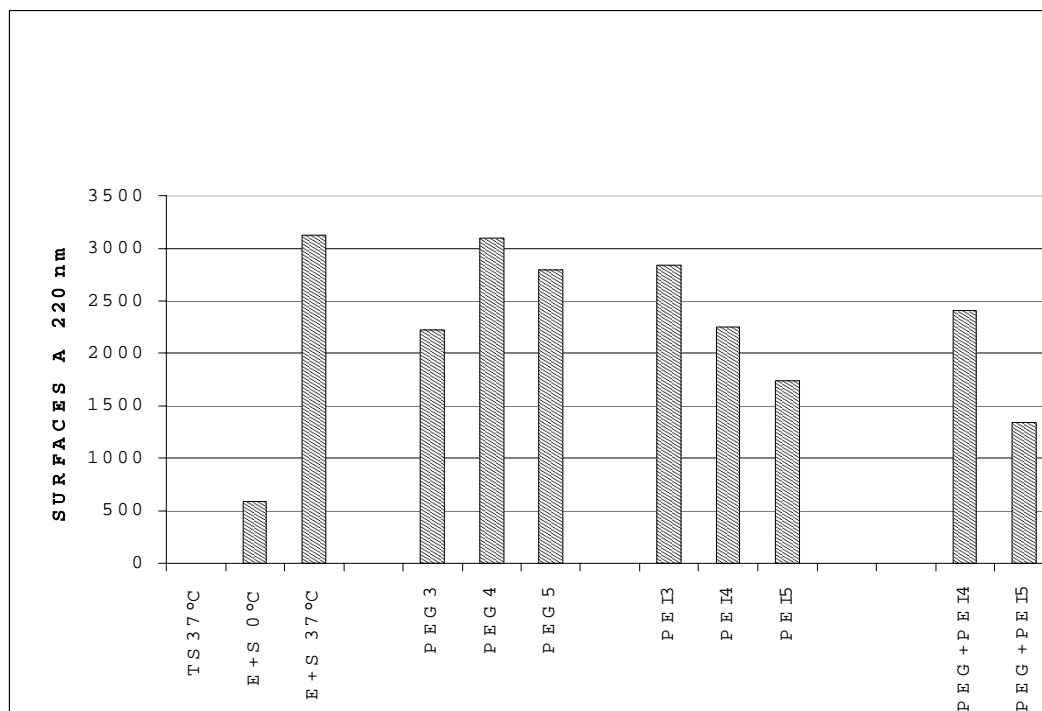


Fig.14 Cinétique d'hydrolyse du substrat synthétique par la gélatinase B

Différents rapports molaires « polymère / enzyme » ont été utilisés pour vérifier l'inhibition de la gélatinase au bout de 18 H. (Fig. 15)

Si le mPEG-OH inhibe peu, une inhibition plus nette est obtenue avec le L-PEI : jusqu'à environ 40 % lorsque l'on met en présence 1240 moles de PEI pour une mole de gélatinase.

Le mPEG n'a pas, semble-t-il d'influence marquante sur cette inhibition du L-PEI. Le tampon « Tris / HCl » 0.1 M pH 7.4, ne neutralise pas suffisamment les charges positives du L-PEI.



3 : Rapport Molaire PEG ou PEI / Gélatinase : 5,6

4 : Rapport Molaire PEG ou PEI / Gélatinase : 44

5 : Rapport Molaire PEG ou PEI / Gélatinase : 1240

Fig.15 Effets du mPEG-OH et du L-PEI sur l'activité gélatinase

Mais, *in vivo*, tout macro-substrat (mPEG-X-peptide-X)_n-PEI sera porteur D'ADN. Une partie des charges positives sera alors neutralisée par les charges négatives des phosphates de l'ADN.

Cette vérification faite et ce facteur pris en compte, les synthèses de ces macro-substrats, potentiellement vecteurs d'ADN, ont donc été mises en œuvre.

3.2 Assemblage chimique des vecteurs

3.2.1 Réactions – clefs

Les couplages des éléments constitutifs des vecteurs utilisés sont essentiellement des réactions de chimie peptidique. Plusieurs types de couplage ont été utilisés.

3.2.1.1 Couplage EDC / HOBt

La DCC (N,N' dicyclohexylcarbodiimide) [104] [105] est souvent utilisée pour le couplage ou la synthèse de peptide car elle forme de la réaction de la dicyclohexylurée facilement éliminée par filtration ou par centrifugation. Mais cette molécule n'est pas adaptée au couplage de peptides solubles dans l'eau.

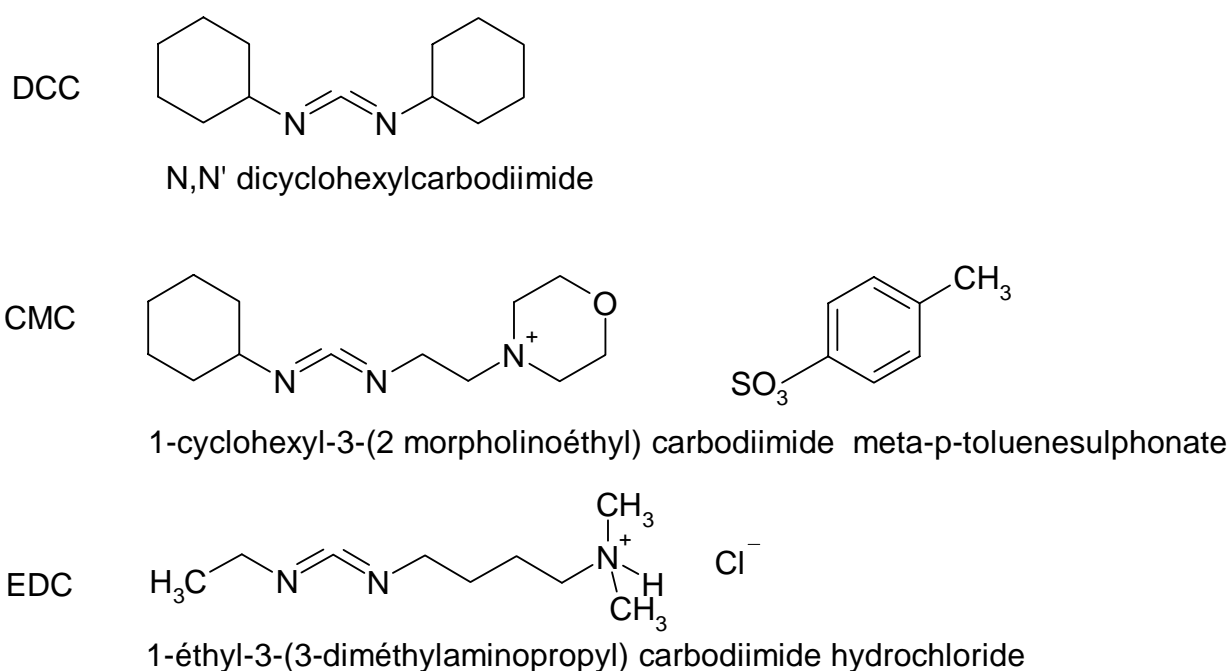


Fig.16 Carbodiimides utilisées pour les couplages

La carbodiimide la plus adaptée pour coupler de tels peptides est l'EDC [106]. Elle peut s'utiliser dans du DMF avec une petite quantité d'eau avec des rendements de couplage pouvant aller jusqu'à 80%. L'HOBt [107] est utilisé pour augmenter le rendement de couplage en empêchant la formation de N-acyl urée mais surtout pour éviter l'énantiomérisation de l'acide aminé C-terminal à coupler. Cette propriété appartient également à la N-hydroxy-succinimide ou NHS [108], qui, comme le HOBt, permet la formation d'un ester activé intermédiaire sur lequel se fixera le groupement aminé de la molécule à coupler. Le mécanisme global proposé de la réaction de couplage avec les carbodiimides est décrit dans le schéma ci-après :

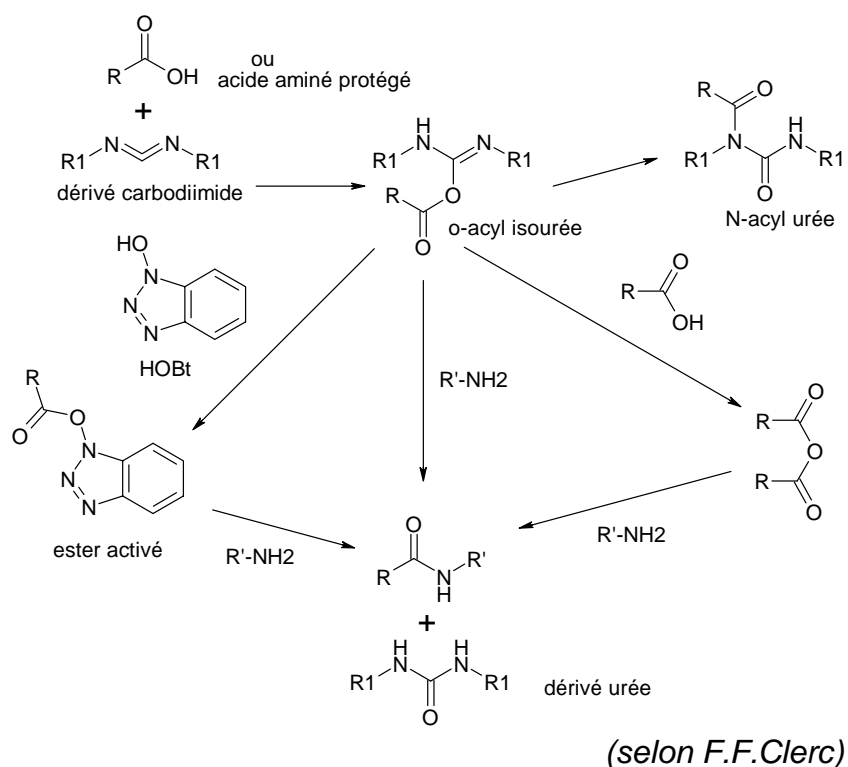


Fig.17 Modes de couplages possibles avec les carbodiimides

Lorsque l'EDC et l'HOBt sont utilisés en couplages peptidiques, ils peuvent être éliminés par perméation sur gel (Sephadex G50, Biogel P6 ...), si le poids moléculaire du produit synthétisé est suffisamment important et différent en P.M de ces réactifs.

Les esters de HOBt sont moins stables que les esters de NHS et sont généralement utilisés en une seule étape (« one pot ») avec l'EDC et la molécule aminée à coupler. Cependant, un ordre de la réaction est respecté. D'abord, le peptide N-protégé avec son carboxyle terminal est mis à incuber 15 min avec le HOBt, puis l'EDC et la base sont ajoutés. Enfin, la molécule aminée à coupler est rajoutée goutte à goutte avant la mise en œuvre de la réaction chimique

3.2.1.2 Couplage direct avec les dérivés du benzotriazole

B.Castro [109][110] a élaboré un réactif, le BOP, liant de l'hydroxybezotriazole à du phosphonium qui évite la formation d'insoluble dicyclohexylurée dans le couplage peptidique lorsqu'on utilise du DCC. Il se forme dans la réaction le même ester activé que dans la réaction EDC/HOBt. Ce système de couplage est largement utilisé dans la synthèse peptidique en phase solide qui permet aisément d'éliminer les réactifs.

Mais la formation dans cette réaction d'hexaméthyltriphosphamide cancérigène a amené à la synthèse et à l'utilisation de réactif moins nocif d'un autre dérivé phosphonium comme le PyBOP (ou d'un dérivé uronium comme l'HBTU [111]:

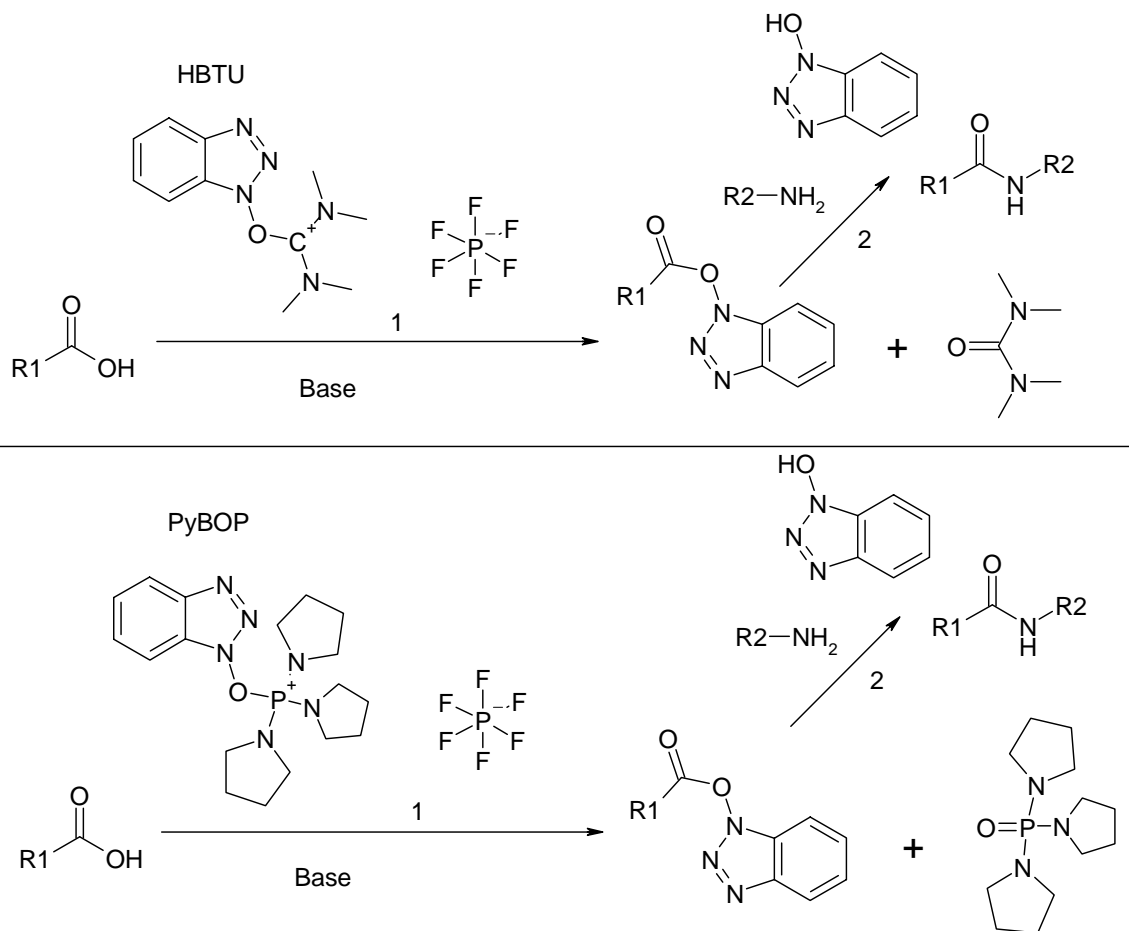


Fig.18 Couplage peptidique par les analogues du BOP

Si ces réactifs sont utilisés en phase homogène, leur séparation des produits synthétisés peut être problématique. Ainsi les dérivés BOP précipitent à l'éther diéthylique comme les PEG ou les PEI.

3.2.1.3 Réactions secondaires

Lorsque la partie C-terminale d'un peptide N-protégé, est couplé à un groupement aminé d'une autre molécule (H-PEI-H, mPEG-NH₂ ...), le rendement de couplage peut être affecté par la formation d'une oxazolidinone :

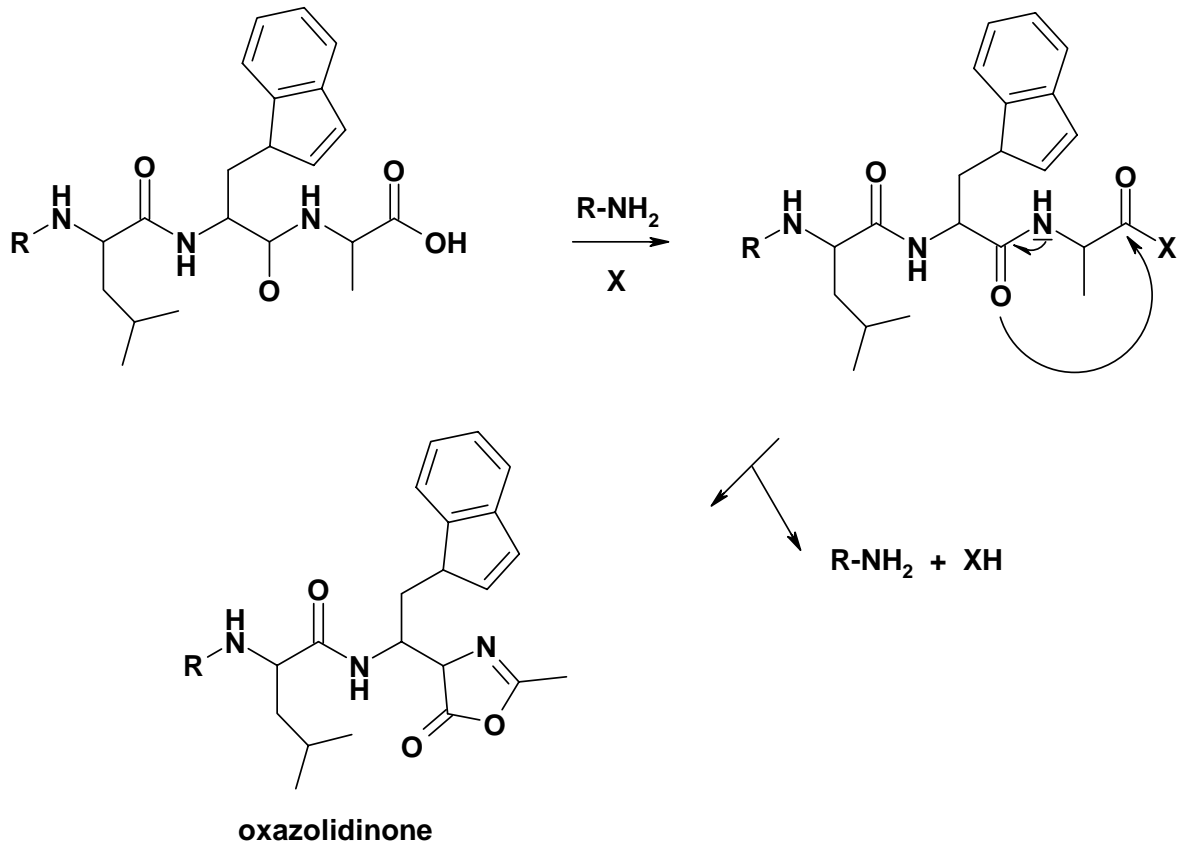
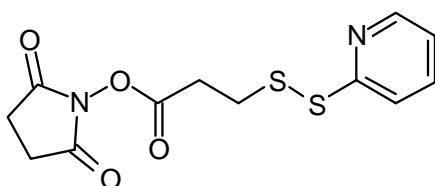


Fig.19 Formation d'oxazolidinone lors d'un essai de couplage de la partie C-terminale d'un peptide à une amine.

Cette réaction secondaire peut être à l'origine d'une racémisation de l'acide aminé C-terminal, si le couplage s'effectue malgré tout. Mais, en principe, l'utilisation d'HOBt évite ce processus, ainsi naturellement que la présence d'une glycine en C-terminal. Il est aussi souvent observé que la présence de deux glycine en C-terminal rende le couplage difficile.

3.2.1.4 Couplage avec le SPDP

Cette molécule hétéro-bifonctionnelle, le N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), permet, de coupler, d'un côté, une molécule contenant un thiol grâce à sa fonction dithiopyridyl, et de l'autre côté une amine primaire par une fonctionnalisation d'ester d'hydroxysuccinimide [112]. Elle nécessite l'introduction d'un groupement thiol dans une molécule, par exemple d'une cystéine dans un peptide.



L'échange d'un thiol avec les soufres du pont disulfure, s'accompagne de libération de 2-pyridithione.

3.2.2. Synthèse des vecteurs dérivés de L- Poly(éthylèneimine)

La synthèse de ce polymère, L-PEI **2**, a déjà été décrite, dans le chapitre particulier consacré aux poly(éthylèneimines). La synthèse chimique du mPEG-NH₂ **1**, qui est utilisé dans les différentes synthèses, a été décrite dans le chapitre consacré aux poly(éthylèneglycols). Les acides aminés décrits dans ces synthèses sont, par défaut, sous forme L. La forme D éventuelle sera spécifiquement mentionnée.

3.2.2.1 « Vecteurs substrats » devant fournir : (H-Leu-Trp-Ala)_n - PEI :

[mPEG-succinyl-(Ala)₃ Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-]_n-PEI (**8**)

Dans cette molécule, le clivage par les gélatinases s'effectue, en effet, entre les résidus Gly et Leu. La valeur de n, est normalement égale à 2 si les seuls groupements aminés libres du L-PEI sont substitués. La stratégie de synthèse consiste à greffer le PEI en dernier, étant donné la réactivité éventuelle de ses amines secondaires, son encombrement moléculaire (P.M. 22000), son caractère polycationique et éventuellement son insolubilité potentielle.

La première étape de synthèse consiste à succinyliser le groupement aminé du mPEG-NH₂. Cette réaction chimique peut être effectuée en milieu anhydre ou en milieu aqueux. Le meilleur rendement a été obtenu en milieu aqueux (93%), en utilisant un excès de 200 fois d'équivalents anhydride succinique par rapport aux groupements aminés du mPEG-NH₂. Cette molécule est initialement solubilisée par chauffage à 40-50°C. Sa solubilisation est probablement aussi permise par la présence de formes chlorhydrates résiduels. L'opération est effectuée ensuite à T.A. pendant 2H, en ajoutant de petites quantités d'anhydride tout en maintenant le pH à 8.5-9 avec NaOH N sous agitation, en utilisant un pHmètre.

Le dosage des groupements aminés libres au TNBS permet d'évaluer le rendement de couplage. Une purification par passage sur résine échangeuse de cations (Amberlyst (H+)) permet d'éliminer le mPEG-NH₂ résiduel.

Plusieurs méthodes de couplage du mPEG-NH-succ-OH au peptide H-(Ala)₃ Pro-Leu-Gly-Trp-Ala-OH sont possibles. Une première méthode consiste à utiliser le peptide sous forme d'ester (éthylque, par exemple) et de le coupler au mPEG-NH-succ-OH, par avec une carbodiimide et du HOBt. Cette méthode fournit de faibles rendements. Une autre méthode permettant d'utiliser le peptide natif H-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-OH sans protection de son groupement C terminal, est de synthétiser l'ester succinimide du mPEG-NH-succ-OH. Cette synthèse a été effectuée avec le N-hydroxysuccinimide (NHS), en présence d'une carbodiimide, le DCC, avec un rendement seulement de 30%. Le couplage au peptide du mPEG-NH-succinylsuccinimide isolé ne fournit pas non plus un bon rendement (20 %), sans doute par son manque de stabilité.

La méthode la plus satisfaisante consiste à effectuer le couplage direct enchaîné : le mPEG-NH-succinylsuccinimide est d'abord synthétisé avec NHS, EDC en milieu semi-aqueux (DMF/H₂O 1/1 (v/v)). Les réactifs sont éliminés aussitôt dans le même milieu par perméation sur gel du milieu réactionnel avec du Sephadex LH20. Les fractions du dérivé PEG, détectées sont aussitôt rassemblées et additionnées du peptide en tampon phosphate pH 8. Le rendement global est de 43 % après réaction. Ce procédé permet de limiter l'instabilité dans le temps du mPEG-NH-succinylsuccinimide.

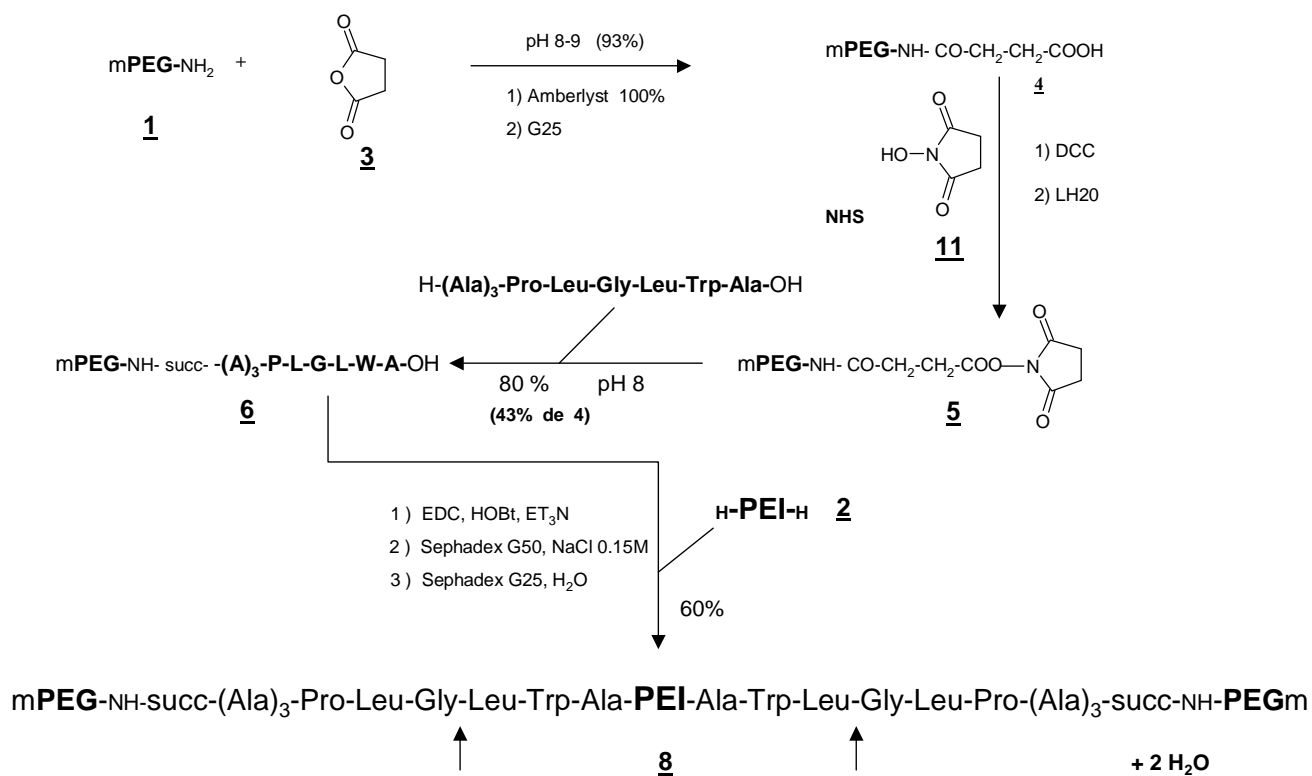


Fig.20 Synthèse du vecteur-substrat 8

La molécule $m\text{PEG-NH-succinyl-(A)}_3\text{-P-L-G-L-W-A-OH}$ est ensuite couplée à du L-H-PEI-H préalablement rendu soluble dans l'eau par addition de HCl : environ 1/3 de ses amines secondaires est alors sous forme chlorhydrate. La réaction de couplage est effectuée, en milieu $\text{DMF / eau (1/1, v/v)}$ grâce à une carbodiimide, l'EDC, en présence de Et_3N , et de HOBt pour éviter une énantiomérisation de l'alanine et la formation d'oxazolidinone par cyclisation des deux derniers aminoacides. Un rapport stoechiométrique d'équivalents est normalement utilisé, soient 2 moles de $m\text{PEG-NH-succinyl-(A)}_3\text{-P-L-G-L-W-A-OH}$ pour 1 mole de L-H-PEI-H .

Un trop grand excès du peptide « PEGylé » par rapport au PEI, peut, en effet, provoquer un couplage sur les amines secondaires du PEI et obtenir un rapport PEG / PEI trop élevé (sa valeur théorique ne devrait être que de 2). Certes, la réactivité des amines secondaires est moins élevée que celle des amines primaires, mais leur « déprotonation » s'effectue à un pH moins basique que celle des amines primaires, en accord avec leurs pK respectifs.

La réaction de couplage a été effectuée à 40°C (pour éviter la réprécipitation du PEI), pendant un temps de 24 à 72H selon les lots. Le rapport des réactants ne permettant pas une réaction complète, le mPEG-NH-succinyl-(A)₃-P-L-G-L-W-A-OH non couplé est donc éliminé, comme les réactifs de couplage, par une CPG sur Sephadex G50 équilibré avec du NaCl 0,15M, ce NaCl étant éliminé ensuite par un Sephadex G25. La technique de purification utilisée ne permet pas d'éliminer d'éventuelles molécules PEI non couplées, mais leur présence éventuelle traduite par un potentiel ζ élevé, est aisément repérable.

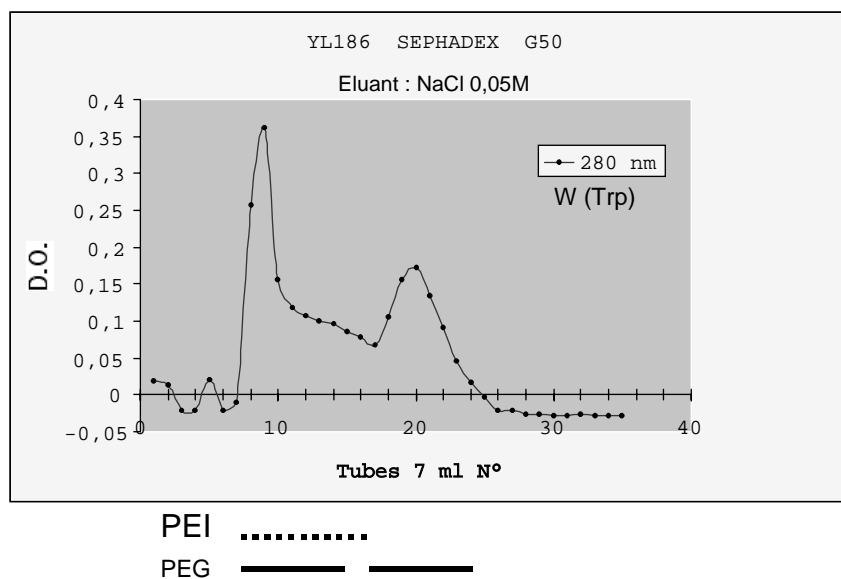


Fig.21 Purification de 8 : [mPEG-NH-succ-(A)₃-P-L-G-L-W-A]_n-PEI (lot YL186)

L'absorption à 280nm des éluats chromatographiques témoigne de la présence de tryptophane et donc du peptide-substrat dans le premier pic correspondant au produit synthétisé.

La présence du peptide dans la molécule est aussi qualitativement mise en évidence par la RMN du proton, où, entre autres, les groupements méthyles de l'alanine et de la lysine sont visibles. Les importants pics des protons du PEG et du PEI, permettent d'évaluer, par leur rapport de surfaces, le rapport molaire de ces deux polymères dans la molécule. (calcul dans Méthodes Expérimentales).

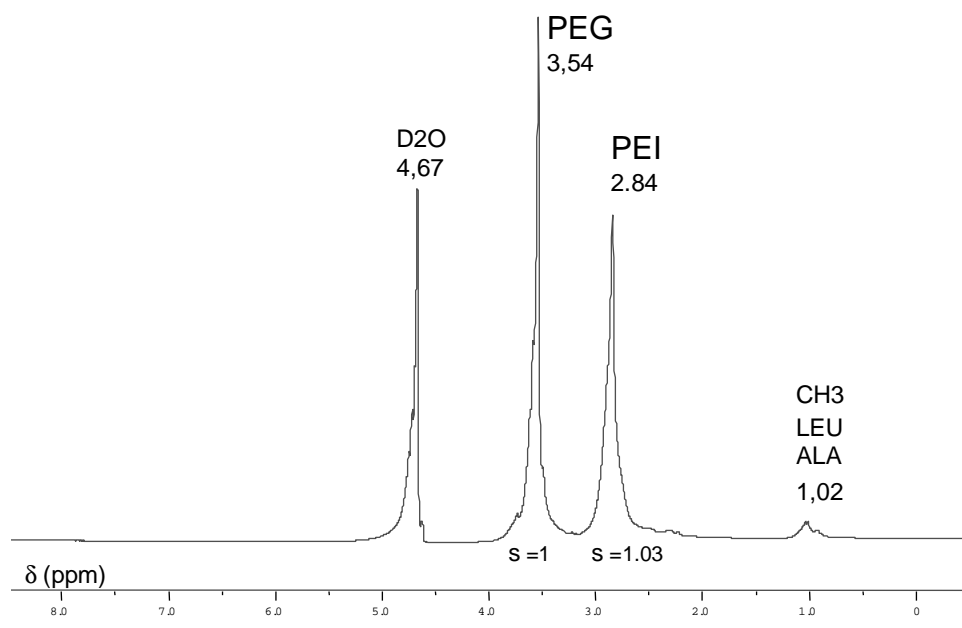


Fig.22 Spectre 1-H RMN de : [mPEG-NH-succ-(A)₃-P-L-G-L-W-A]_n-PEI 8

Plusieurs lots de la molécule 8, (mPEG-NH-succinyl-(A)₃-P-L-G-L-W-A)_n-PEI, YL069 et YL186, ont été synthétisés en obtenant des rapports PEG / PEI de 2 à 4,4 environ.

Polysubstrat :

[mPEG-NH-succinyl-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-]₄-(Lys-Lys-Lys)]_n- PEI

12c

L'intérêt de construire un poly-substrat réside dans le concept selon lequel la vitesse de la réaction gélatinase est proportionnelle, non seulement à la concentration en enzyme E, mais aussi à la concentration en substrat S, selon l'équation de Michaëlis :

$$V = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S} = \frac{k_{cat} \cdot E \cdot S}{K_m + S}$$

V_m étant la vitesse maximum de la réaction, proportionnelle à la constante de vitesse de formation du produit k_{cat} (en sec^{-1} ou min^{-1}) et à la concentration en enzyme **E**.

Dans une mole de poly-substrat, nous pouvons ainsi disposer, par exemple de 8 moles de substrats effectifs (peptides de gélatinases), la molécule contenant un répartiteur. Initialement, nous avons conçu un répartiteur contenant 3 lysines et une cystéine. Les groupements ϵ aminés des lysines du répartiteur, H-Lys-Lys-Lys-Cys-NH₂ **10** servent à coupler les mPEG-NH-succ-peptide-OH **6** et les groupements thiols de la cystéine servent à coupler le PEI dont les groupements aminés seront fonctionnalisés avec un dérivé comportant un pont di-sulfure grâce au réactif SPDP (Fig.23)

La présence d'un groupement carboxamide du répartiteur est rendue nécessaire pour bloquer le groupement carboxyle du peptide répartiteur, qui pourrait être impliqué dans les couplages ultérieurs. (Fig.24). Une première synthèse du répartiteur **10** a d'abord été tentée à partir du peptide H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Cys(Acm)-OH **9**, synthétisé sur une résine substituée H-Cys(Acm) 2-Cl-trityl résine, par ajouts successifs de Fmoc-Lys(Boc)-OH en présence de l'agent de couplage PyBOP et de la base DiPEA. Après « capage » des groupements aminés non couplés, à l'(AcO)₂O, chaque cycle se termine par une déprotection du groupement Fmoc de l'acide aminé couplé, par la pipéridine, avant de passer à l'acide aminé protégé suivant. Après clivage du peptide protégé synthétisé, à partir de la résine, avec du TFE, l'amidation du groupement carboxyle libéré a été tentée avec de l'ammoniaque en présence de PyBOP à deux excès d'équivalents par rapport à la molécule **9**. Mais, la réaction s'est avérée incomplète et la séparation sur cartouche C8 insatisfaisante.

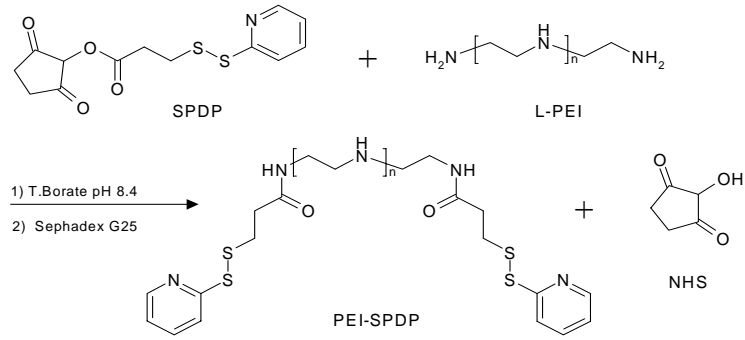


Fig.23 Synthèse de N N'(2-pyridyldithiopropionyl) L-poly(éthyléimine (L-PEI-PDP)

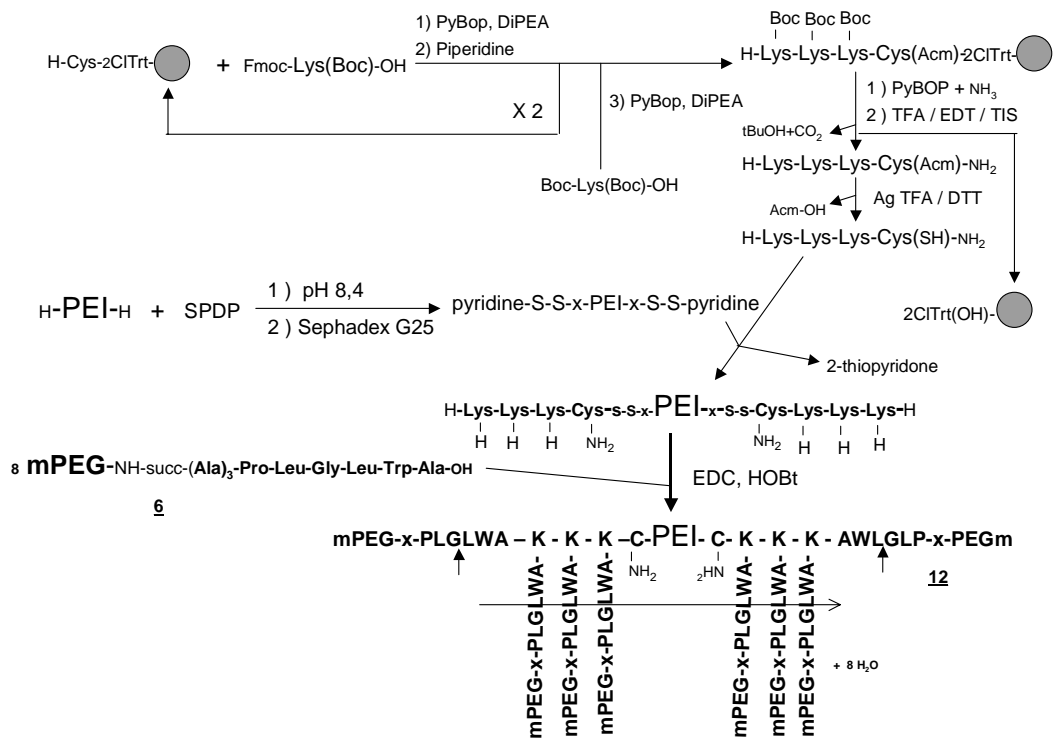


Fig. 24 Projet de synthèse de polysutrat avec pont di-sulfure

Nous avons donc opté pour la synthèse du peptide sur résine Rinkamide, qui permet d'obtenir le peptide sous forme carboxamide, directement par clivage du peptide couplé. (Fig.25)

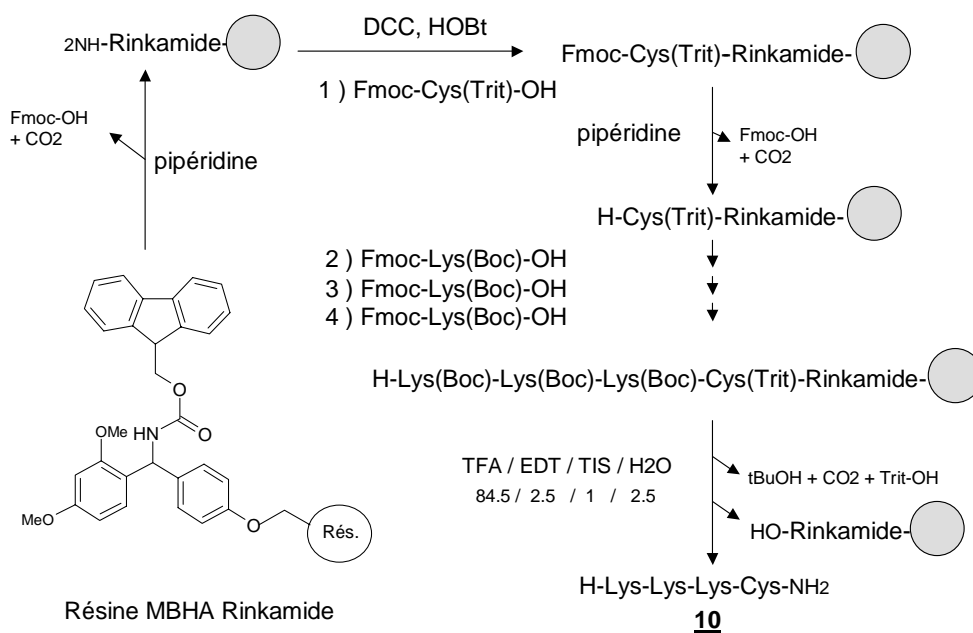


Fig.25 Synthèse directe de H-Lys-Lys-Lys-Cys-NH₂ sur résine Rinkamide

La synthèse a été effectuée sur synthétiseur Applied Biosystem, avec le DCC en présence de HOBt, selon la technique standard de l'appareil. Le clivage du peptide protégé, à partir de la résine a été permis par l'addition d'un cocktail, comprenant, outre du TFA, des « scavengers » de carbocations, le TIS et l'EDT. Le produit **10** attendu est obtenu avec un m / z égal à 505,7, mais avec 40 % d'un composé de P.M.562, qu'il a été impossible d'éliminer par purifications diverses, ultérieures. Il est possible que la présence du groupement thiol soit à l'origine de composés secondaires.

Un schéma plus simple, de composé « poly-substrat » ne comportant pas de pont di-sulfure, a donc été élaboré, en utilisant seulement une tri-Lysine (Fig.26). Pour cela, nous avons synthétisé une tri-Lysine dont toutes les amines ont été

substituées par un groupement Boc : Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH **11**, afin de coupler la seule fonction libre restante, la fonction carboxyle, aux groupements aminés du PEI **2**. Cette synthèse a donc été initialisée par celle de H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH, en synthèse manuelle, sur résine déjà substituée H-Lys(Boc)₂-Cl-trityl-résine. Dans ce cas, l'agent de couplage est le HBTU en présence de HOBt et de la base DiPEA. Après le dernier couplage, le dernier groupement protecteur Fmoc, a été enlevé avec de la pipéridine 20%, et remplacé par un groupement BOC, par avec le Di-t-BDC. Lors du clivage de la résine, les groupes protecteurs Boc, sont conservés grâce à l'utilisation du TFE, au lieu du TFA.

La molécule **11** (Fig.27) obtenue, est alors couplée au L-PEI par la carbodiimide soluble habituelle, l'EDC en présence de HOBt. Le [Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)]₂-L-PEI **12a** purifié obtenu, est ensuite déprotégé avec le cocktail « TFA, EDT, TIS, H₂O », pour démasquer les groupements aminés, qui ainsi libres, dans la molécule **12b**, pourront être couplés à 8 mPEG liés chacun au substrat peptidique terminé par un carboxyle dans la molécule **6**, pour former, avec l'EDC, HOBt, finalement, le poly substrat **12c** (Fig.27). L'incorporation du peptide dans cette molécule a été vérifiée en RMN et en UV avec la présence du tryptophane par l'absorption à 280 nm. L'incorporation du peptide a aussi été montrée par l'hydrolysat HCl de cette molécule, qui contient au moins de la proline, de la leucine, par contrôle en LC / MS.

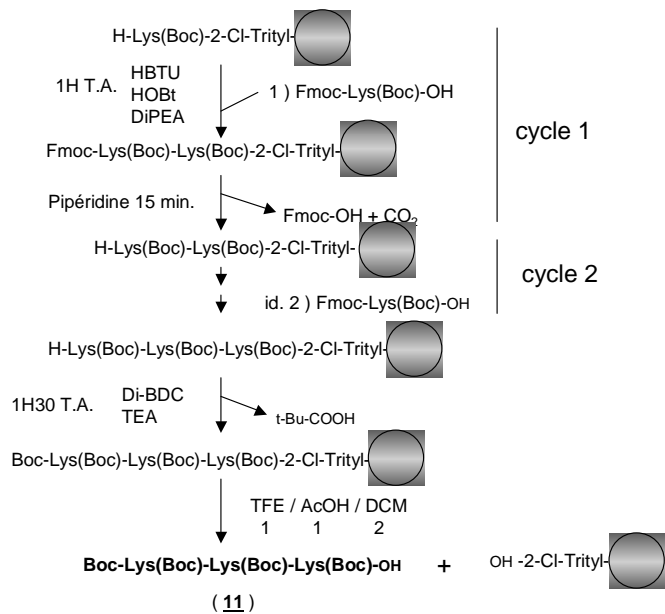


Fig.26 Synthèse de Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH

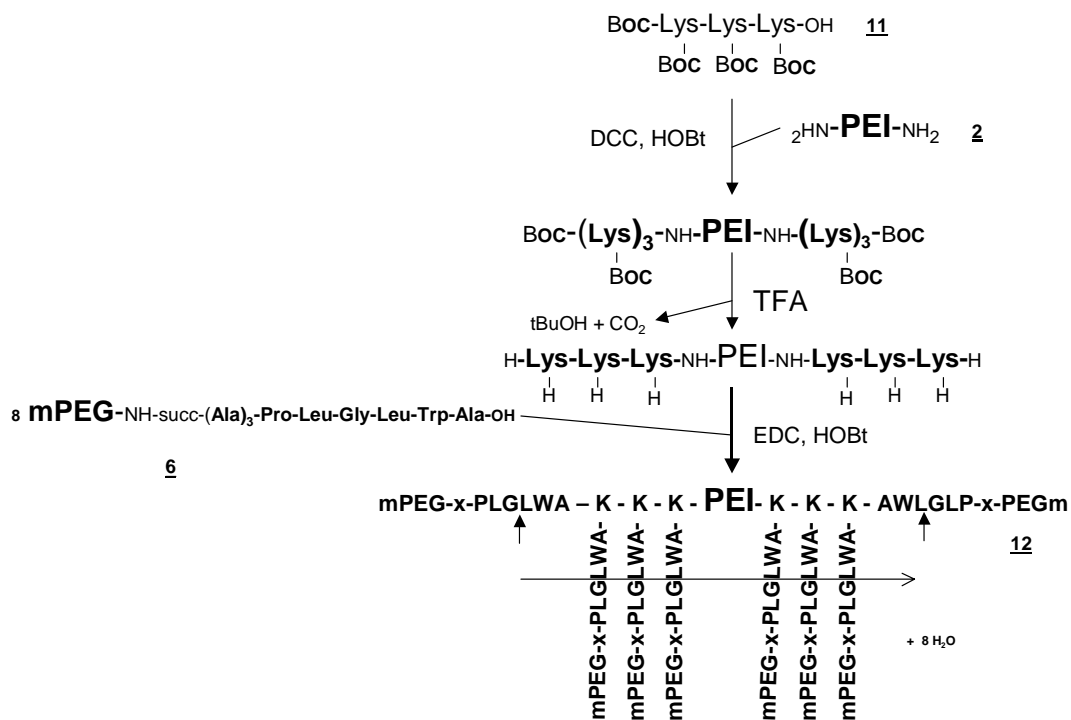


Fig. 27 Synthèse de Polysubstrat 12 :



**3.2.2.2 « Vecteurs substrats » devant fournir :
PEI-succ-(Ala)₃- Pro- Leu-Gly-OH (substrats inverses)**

[mPEG-NH-Ala-Trp-Leu-Gly-Leu-Pro-(Ala)₃-succ]_n-PEI 16

Le produit de la réaction enzymatique gélatinase donnera avec ce « substrat vecteur » le dérivé PEI suivant : [OH-Gly-Leu-Pro-(Ala)₃-succ]_n-PEI. Dans ce vecteur, l'inversion du sens des liaisons amides du peptide, est obtenu par insertion du groupement succinyl entre le peptide et le PEI.

La première étape consiste à introduire un groupement Fmoc sur le groupement aminé terminal du peptide avec du Fmoc-Cl. Cette étape, fournissant la molécule 13, s'effectue avec un rendement proche de 100%. Par contre, le couplage au mPEG-NH₂ 1, avec la carbodiimide EDC et l'HOBT, fournit un rendement médiocre de 20%.

En effet, le couplage de peptide sur leur côté carboxyle est extrêmement difficile, en partie par la probable cyclisation des deux derniers amino-acides en C terminal, aboutissant à la formation d'oxazolidinone. Au lieu d'utiliser un dérivé peptidique comme le Fmoc-peptide-OH qui aboutit à ce rendement faible, une solution serait de construire ce peptide par élancement d'acides aminés, à partir du groupement aminé du mPEG-NH₂, comme pour la synthèse d'un peptide en phase solide, sur résine substituée. Nous avons effectué cette synthèse, en précipitant à chaque étape, le dérivé mPEG formé, avec Et₂O. Les premières étapes ont été satisfaisantes. Mais, au fur et à mesure de l'élancement des amino-acides, la précipitation à l'éther devenait de moins en moins efficace, sans doute en raison de l'augmentation de l'hydrophobicité de la chaîne peptidique synthétisée.

La molécule **14** a été malgré tout purifiée, le mPEG-NH₂ non couplé, étant retenu sur résine Amberlyst [H⁺]. La molécule **14** est ensuite recueillie dans le premier pic de Sephadex G25, puis déprotégé du groupement Fmoc à la pipéridine (Fig.28). Celle-ci, est alors couplée à du L-PEI-succinylé **7**, avec de l'EDC et du HOBt, pour fournir le « vecteur-substrat » inverse **16**.

Les résultats de 1-H RMN permettent de mettre en évidence pour cette molécule **16** un rapport molaire du PEG par rapport au PEI très élevé (20), à partir du calcul du rapport des surfaces intégrées de leurs protons. Cela peut être dû à un mauvais couplage de **14** avec les deux amines primaires du L-PEI. Mais, ce qui apparaît plus probable, c'est qu'une succinylation des amines secondaires du L-PEI se soit produite. En effet, le spectre 1-H RMN du L-PEI-succinylé **15**, fournit, non seulement le pic des unités « aminoéthane » du PEI (2,87 ppm), mais un autre nouveau pic à 3,49 ppm, qui correspondrait peut-être à des amines secondaires substituées par les groupements succinyl et protonées. Ainsi, un certain nombre de molécules **14**, (H-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-NH-PEGm), pourraient peut-être substituer les groupements succinyl couplés aux amines secondaires du L-PEI, dans le L-PEI succinylé **15**.

Ce rapport PEG / PEI élevé, a ainsi empêché le compactage de l'ADN sur le PEI de ce vecteur-substrat, probablement par l'important encombrement des nombreux PEG. Une solution pour éviter ce processus, serait de succinyliser, non pas le L-PEI, mais le groupement amino-terminal de la molécule **14**, H-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-NH-PEGm.

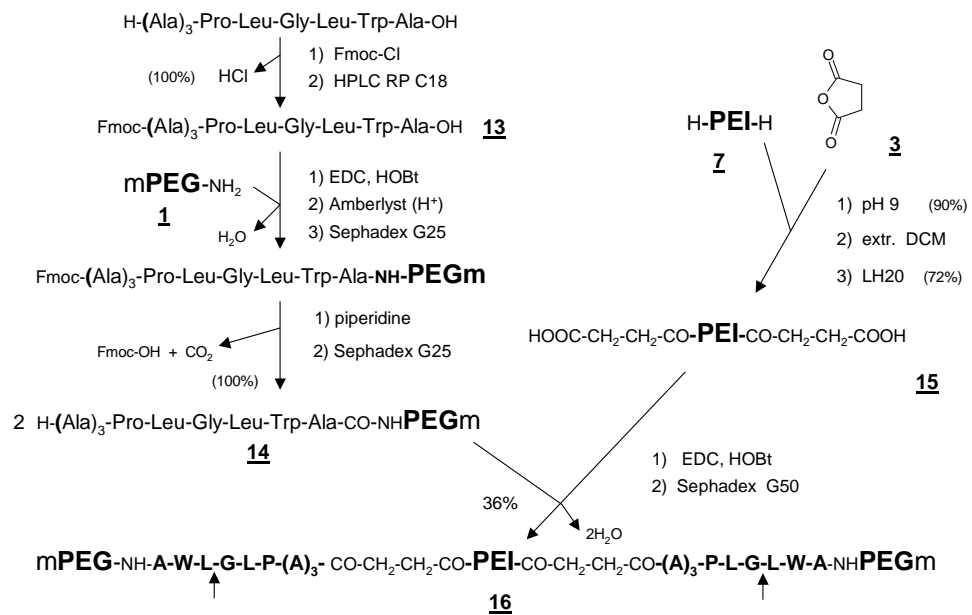


Fig.28 Synthèse de 16 : [mPEG-NH-Ala-Trp-Leu-Gly-Leu-Pro-(Ala)₃-succ]_n-PEI

PEI-[succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys(NH₂)-S-S-CH₂-CH₂-CO-NH-PEGm]_n **21**

Le faible rendement de couplage entre le Fmoc-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-OH avec le mPEG-NH₂, dans la voie de synthèse de la molécule **16**, a incité à imaginer un autre type de liaison qu'une liaison amide. L'utilisation de la molécule hétéro-bifonctionnelle SPDP, permet, nous l'avons vu, de coupler d'un côté, une molécule contenant un thiol grâce à fonction dithiopyridyl, et de l'autre côté, une amine primaire par une fonctionnalisation d'ester d'hydroxysuccinimide.

Nous avons d'abord synthétisé un peptide contenant notre séquence habituelle de substrat de gélatinase, auquel nous avons adjoint une Cystéine en C-terminal.

Cette opération a été effectuée sur synthétiseur Applied Biosystem. La résine Rinkamide commercialisée sous forme Fmoc, est débarrassée de son groupement protecteur par un traitement à la pipéridine. Les amino-acides sont chargés sur la résine, dans le réacteur, dans l'ordre inverse de la séquence peptidique. (Fig.11). Après la dernière déprotection, le peptide H-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys-NH₂ **17**, est libéré de la résine par clivage avec le cocktail « TFA / EDT / TIS / eau » habituel, puis purifié.

Le mPEG-NH₂ est ensuite fonctionnalisé en N-(2-pyridyldithiopropionyl)-amino-PEGm **18**, tout en produisant de la 2-thiopyridone (Fig.30). La molécule **18** est ensuite mise à réagir avec le peptide **17** contenant le thiol de la cystéine, pour obtenir un échange des ponts di-sulfure. La molécule est ensuite succinylée avec de l'anhydride succinique à pH 8,5 pour obtenir la molécule **20**. Celle-ci, enfin, est couplée aux groupements aminés du L-PEI, avec l'EDC et l'HOBt, pour obtenir le « vecteur-substrat » inverse attendu **21** (Fig.30)

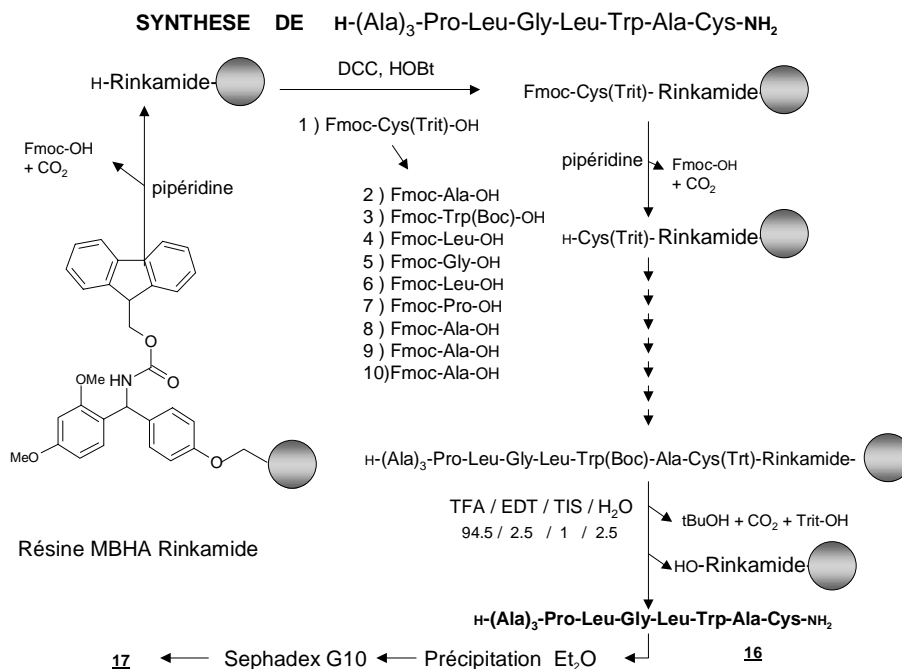


Fig.29 Synthèse de **17 : H-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys-(NH₂)**

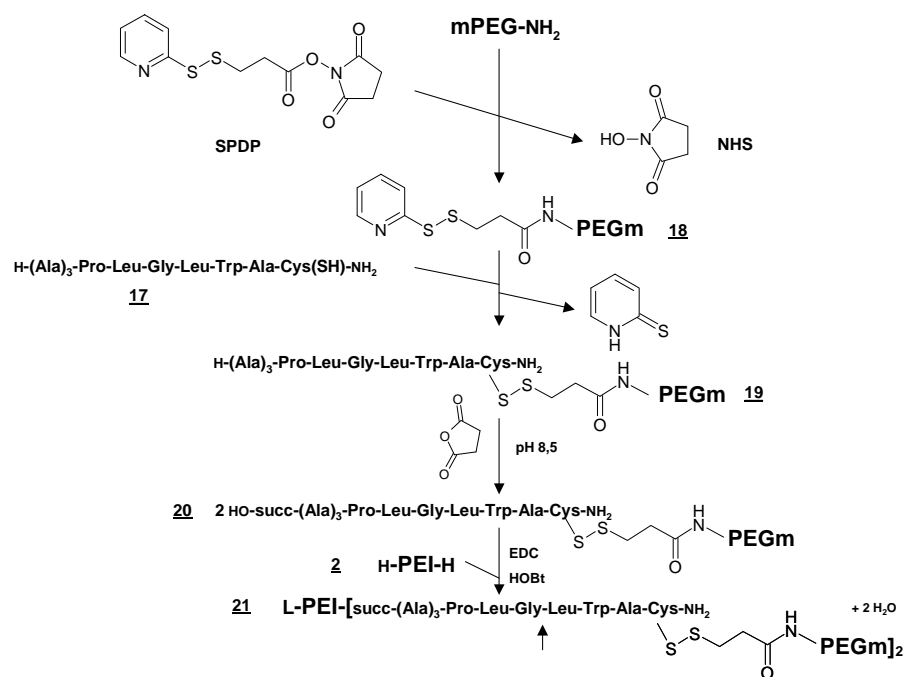


Fig.30 Synthèse de 21 : PEI-[succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys(NH₂)-S-S-CH₂-CH₂-CO-NH-PEGm]_n

3.2.2.3 « Vecteurs substrats » témoins, théoriquement non enzymatiquement hydrolysables

Plusieurs types de témoins ont été synthétisés pour valider le rôle des substrats de gélatinases dans le ciblage des cellules transformées. Il s'agit de substrats théoriquement non clivables par ces enzymes.

Ce seront d'abord des vecteurs contenant des séquences peptidiques différentes de celle des gélatinases.

Il s'agira d'abord d'une séquence polyGly. En effet, les gélatinases A et B, reconnaissent particulièrement les séquences de type -Pro-Leu-Gly-Leu-, clivant normalement le site P1-P'1, c'est à dire la liaison amide entre Gly et Leu, le résidu P'1 devant être hydrophobe. Ainsi, nous avons également synthétisé un témoin substrat contenant la séquence -(Ala)₃-(Gly)₄- comme dans les travaux de Peng et al [57][58]. Et puis, nous avons synthétisé un vecteur contenant un substrat dont la séquence peptidique est identique à celle du substrat, mais dont le site de clivage normal Gly-Leu est transformé en site non clivable par remplacement de la L-Leucine en D-Leucine. Enfin, un témoin-vecteur sans peptide a été synthétisé.

[mPEG-NH-succ-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly]_n-PEI 23

La construction de ce témoin, est effectuée à partir de sous unités commercialement disponibles, H-(Gly)₃-OEt. Le premier couplage s'effectue sur l'amine primaire du mPEG-suc-OH 4 avec la carbodiimide EDC, en présence de HOBt en milieu tamponné à pH 8, pour éviter l'estérolyse du groupement Ethyl

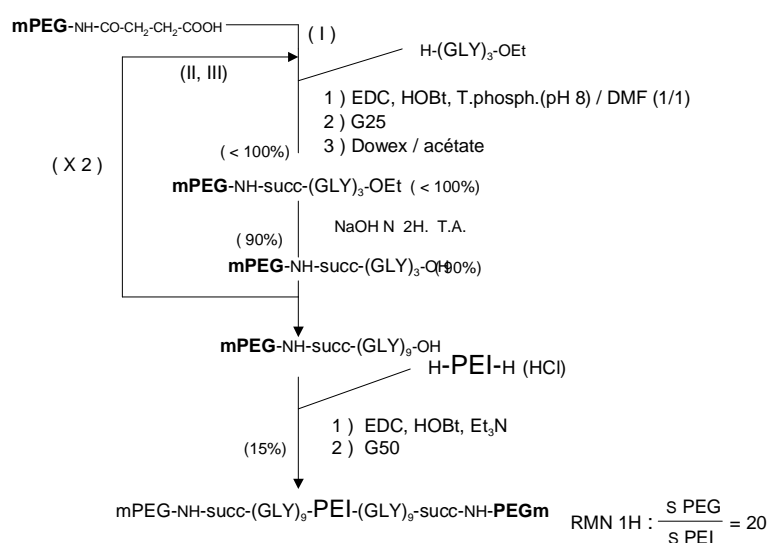


Fig.31 Synthèse de 23 : [mPEG-NH-succ-(Gly)₉]_n-PEI

ester que pourrait provoquer l'addition d'une base. Le produit 22a obtenu purifié après élimination des réactifs et des composés non couplés, est soumis à une estérolyse avec NaOH 2N. Ce processus entraîne souvent une énantiomérisation du résidu C-terminal, mais, la présence de glycine - n'ayant pas d'énantiomères - à cette position, évite ce genre de problèmes. Ce processus d'allongement est répété deux fois pour aboutir à la molécule 22 .

La molécule dérivée mPEG contenant le peptide polyGly, **22c**, est ensuite couplée aux groupements aminés du L-PEI **2** avec l'EDC, l'HOBt. Mais le rendement de couplage obtenu est très faible (20%), sans doute encore par la probable cyclisation de deux résidus glycine terminaux. La molécule couplée a pu néanmoins être purifiée par passage sur Sephadex G50 en NaCl 0.15M puis G25 avec l'eau comme éluant. L'absence constitutive de chaîne latérale dans la glycine, pouvant apporter un encombrement stérique, favorise probablement ce genre de processus. Le rapport molaire PEG / PEI de l'ordre de 20, calculé à partir de la surface des protons en RMN, laisse penser, par ailleurs, à une substitution de certaines amines secondaires du L-PEI par le dérivé PEG-peptide-OH.

[mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Gly-GlyGly-Gly-Ser]_n-PEI 27

Initialement, le peptide de même séquence que celle utilisée par Peng et *al.* [57][58] (Ala)₃-Gly-Gly-Gly-Gly. Mais encore une fois, le couplage de résidus polyGly terminaux donna un très mauvais rendement de couplage au L-PEI, même si l'on forme, avec le NHS, un ester de succinimide, réputé plus stable qu'un ester de HOBt. Un nouveau résidu substitué –Ser-O(tBu)-OH a donc été ajouté à cette séquence, afin d'apporter un encombrement stérique, pouvant éviter une cyclisation des deux résidus terminaux lors du couplage au L-PEI.

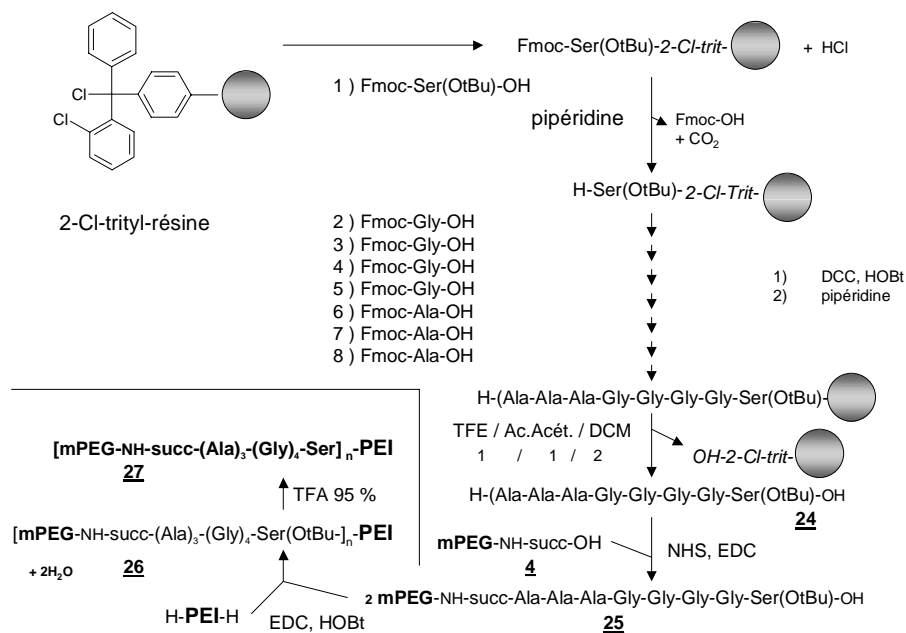


Fig.32 Synthèse de 27 : [mPEG-NH-succ-(Ala)₃-(Gly)₄-Ser]_n - PEI

Une synthèse peptidique du peptide H-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-(OtBu)-OH **24** a donc été mise en oeuvre, à partir d'une résine 2-Cl-trityle.

Le « chargement » de la résine a été effectué manuellement. Le couplage est effectué en milieu basique pour déplacer un chlore substitué à la résine en libérant HCl, lors de la mise en présence de la 2-Cl-trityl-résine et de la molécule H-Ser-(OtBu)-OH. A ce stade, le taux de couplage est faible : 20%. Les autres acides aminés, protégés par le groupement protecteur Fmoc, sont ensuite additionnés successivement et automatiquement dans le synthétiseur Applied Biosystem et couplés par le DCC en présence de HOBT.

Le dérivé peptidique **24** est ensuite couplé au mPEG-NH-succ-OH **4** activé sous forme d'ester de succinimide avec le NHS pour fournir le composé mPEG-NH-succ-(Ala)₃-(Gly)₄-Ser(OtBu)-OH **25**. Cette molécule est couplée aux groupements aminés du L-PEI avec l'EDC, en présence de HOBT, en milieu basique. Le processus habituel de purification sur Sephadex G50, puis sur Sephadex G25 aboutit à la molécule [mPEG-NH-succ-(Ala)₃-(Gly)₄-Ser]_n-PEI **26**.

Le groupement t-butyl est ensuite libéré par l'action du TFA 95%. Comme les amines secondaires du L-PEI se trouvent être salifiées par du TFA, il est nécessaire de les transformer, ensuite en forme chlorhydrate, forme utilisée pour les tests cellulaires.

[mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-(D)Leu-Trp-Ala]_n-PEI 30

Les techniques de synthèse de ce vecteur substrat-témoin, sont les mêmes que celle de la molécule 8. Le peptide H-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-(D)Leu-Trp-Ala-OH 28, a été synthétisé sur le synthétiseur Applied Biosystem à partir d'une résine commerciale substituée « H-Ala-2-Cl-trityl-résine » selon la technique habituelle utilisant la carbodiimide DCC, en présence de HOBt, en utilisant le dérivé Fmoc-(D)Leu-OH pour le 3^e aminé à incorporer, tous les autres aminés étant sous forme L.

Le peptide formé est couplé à la molécule mPEG-NH-succ-OH 4 en formant un ester de succinimide avec le NHS et l'EDC. La molécule formée, mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-(D)Leu-Trp-Ala-OH 29, est ensuite couplée aux groupements aminés du L-PEI avec l'EDC et l'HOBt.

Il semble qu'un couplage avec des amines secondaires puisse s'être produit dans la mesure où un pic supplémentaire à 3,79 ppm en 1-H RMN est apparu, le pic normal des protons du PEI ayant apparu à 2,8 ppm et ceux du PEG à 3,48-3,59 ppm. La forme D de la leucine change peut-être la conformation la molécule 29 en modifiant le couplage au L-PEI.

3.2.2.4 Vecteurs témoins

[mPEG-NH-succinyl] _n- L-PEI 31

[mPEG-NH-succinyl] _n- B-PEI 31b, 31c, 31d

Ces témoins, sans « peptide-substrat », complètent la série des « vecteurs-substrats » témoins, théoriquement non hydrolysables. Leur procédé de synthèse commun, est identique à celui utilisé au sein des autres synthèses :

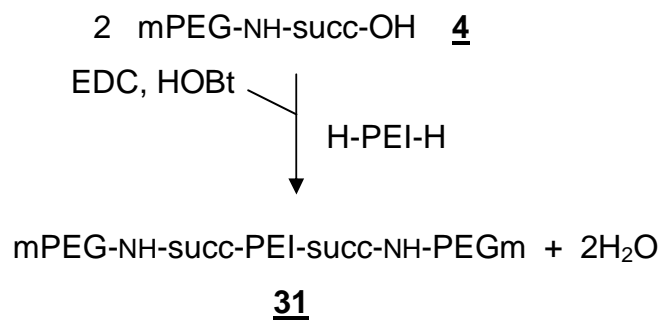


Fig.33 Synthèse de 31 : [mPEG-NH-succ)₂-PEI

Cette technique a été utilisée à la fois pour les L-PEI et les B-PEI. Dans ce dernier cas, une quantité croissante de mPEG-NH-succ-OH a été rajoutée, correspondant à des taux croissants de « Pegylation » du B-PEI.

3.2.2.5 Produits de la réaction enzymatique

Ces synthèses s'avèrent nécessaires pour obtenir des témoins de transfections. Il n'est pas certain en effet que, à quantités de L-PEI égales, les dérivés peptidiques du PEI soient aussi efficaces en transfection de l'ADN qu'ils transportent, que le L-PEI seul.

(H-Leu-Trp-Ala)_n - PEI **33**

Cette molécule est le produit théorique de la réaction enzymatique des gélatinases sur le vecteur-substrat [mPEG-NH-succ-(Ala)₃Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala]₂-PEI **8**. Il apparaît irréaliste de synthétiser le tripeptide directement à partir des groupements aminés primaires du L-PEI, en ajoutant les acides aminés les uns après les autres. En effet, des précipitations successives à l'éther, pour la purification, pourraient s'avérer inefficaces étant donné l'hydrophobicité des acides minés. Le couplage au L-PEI en fin de synthèse, s'est toujours avéré souhaitable. Une synthèse séparée du tripeptide a donc été effectuée à partir de la résine substituée H-Ala-2-Cl-trityle. Les deux acides aminés sous forme Fmoc, Fmoc-Trp(Boc)-OH puis Fmoc-Leu-OH, ont donc été ajoutés successivement, selon le schéma standard ci-dessous :

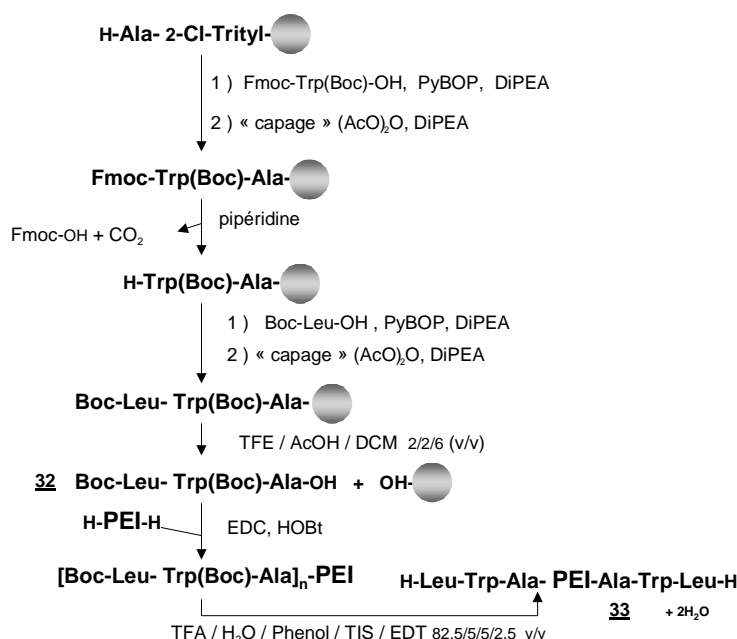


Fig.34 Synthèse de **33** : [Leu-Trp-Ala]₂-PEI

Le tripeptide couplé sous forme Boc, a été clivé de la résine avec du TFE, pour éviter la déprotection du Boc. En effet, c'est la molécule Boc-Leu-Trp(Boc)-Ala-OH **32** obtenue, qui est couplée sur les groupements aminés du polymère L-PEI. Ce n'est que couplé au L-PEI, qu'elle est déprotégée par le cocktail TFA contenant les « scavengers » de carbocations, phenol, TIS et EDT. En effet, ces carbocations peuvent réagir avec l'amine secondaire du tryptophane pour produire un composé de coloration bleue.

Lors de ce clivage, les anions TFA salifient les amines secondaires du L-PEI couplé. Il est donc nécessaires d'éliminer ces sels et de transformer le dérivé PEI obtenu, en forme chlorhydrate, pour les essais cellulaires.

(OH-Gly-Leu-Pro-succ)_n-PEI 34

Cette molécule, est l'autre produit (dérivé du L-PEI) théorique de la réaction gélatinase, lorsque le peptide substrat du « vecteur-substrat » est inversé, quant au sens de ses liaisons amides, dites « liaisons peptidiques ». Elle provient théoriquement des molécules « inverses » L-PEI-[succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-NH-PEGm] **16**, et L-PEI-[succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys(NH₂)-S-S-succ-NH-PEGm]_n **21**.

La synthèse de cette molécule a été effectuée, à partir du tripeptide commercial protégé sous forme d'éthyl ester : H-Pro-Leu-Gly-OEt, qui a été couplé en milieu tamponné à pH 8 à du L-PEI-(succ-OH)_n **15**, pour éviter l'estérololyse du groupement -OEt que pourrait provoquer l'utilisation d'une base.

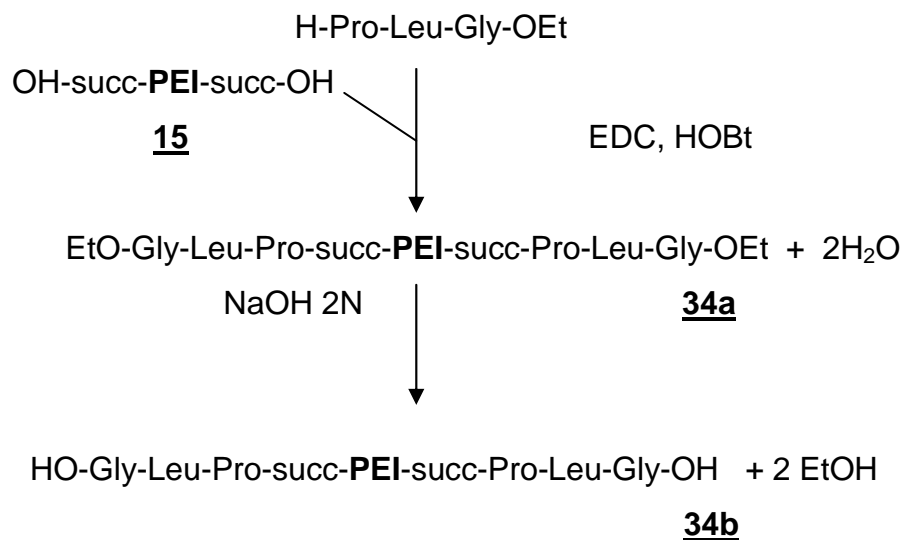


Fig.35 Synthèse de 34b : L-PEI-[succ-Pro-Leu-Gly-OH]

Le groupement Ethylester du L-PEI-[succ-Pro-Leu-Gly-OEt]_n 34a, est ensuite clivé par de la soude 2N. Le produit purifié obtenu ne contient plus les groupements méthyl de l'éthylester (1.12 ppm), après visualisation en 1H-RMN. Le pic principal des protons du L-PEI (2.87 ppm) est accompagné d'un pic à 3.51 ppm qui pourrait correspondre aux protons des amines secondaires du L-PEI, substitués initialement par des groupements succinyl.

Il eut été probablement plus opportun de succinyler, non pas le L-PEI mais le tripeptide substitué : H-Pro-Leu-Gly-OEt. Cependant, le procédé, aurait dû tenir compte alors, du risque d'estérolyse du groupement -OEt, lors de la succinylation.

3.3 EVALUATION BIOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES VECTEURS

La mise en évidence d'un effet non rédhibitoire du PEG et du PEI sur l'hydrolyse du substrat peptidique de gélatinase étant acquise (3.1.2), il apparaît indispensable, avant d'effectuer des tests cellulaires, de vérifier si les « substrats-vecteurs » liés à leur PEG(s) et à leur PEI sont hydrolysables *in vitro*. Plusieurs outils d'analyse de cette hydrolyse ont été développés, d'une part, avec une gélatinase commerciale, d'autre part avec des surnageants de cellules cancéreuses ou non cancéreuses.

3.3.1 Cinétique d'hydrolyse d'un substrat peptidique des gélatinases

Le « vecteur-substrat » [mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala]_n-PEI (**8**, lot YL143) a été soumis à hydrolyse avec de la gélatinase B activée à l'APMA. Les groupements aminés apparus ont été dosés à la fluorescamine ; S'il n'apparaît pas d'hydrolyse avant 20H, une légère différence apparaît au-delà de 20H. Mais elle est faible et ne semble pas significative. Le « bruit de fond » de ce type de dosage est trop important.

Une autre technologie plus adaptée pour visualiser l'hydrolyse de ce substrat devrait être développée. Un marquage du PEG par un « quencheur » de la fluorescence du Tryptophane Trp, tel le Dnp, pourrait, par exemple permettre la réapparition de la fluorescence du Tryptophane à 280 nm, grâce à l'hydrolyse d'une liaison amide du peptide par la gélatinase.

Une autre possibilité serait de développer une technologie de type FRET en marquant le PEG par un donneur de fluorescence et le PEI par un accepteur de fluorescence. Dans ce cas, c'est une diminution de la fluorescence que l'on observerait.

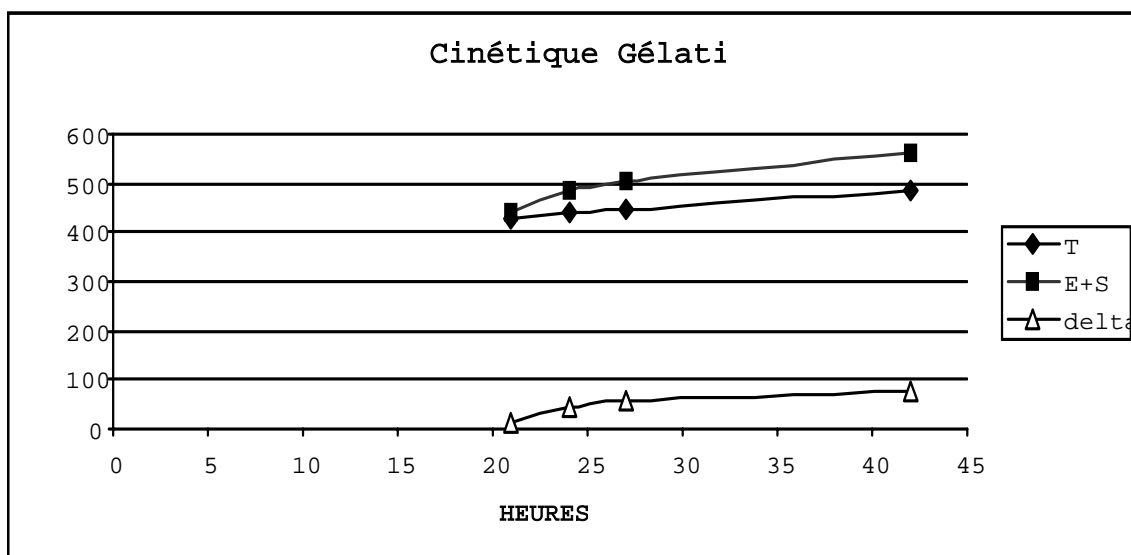


Fig.36 Cinétique d'hydrolyse de 8 : [mPEG-NH-succ(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala]_n-PEI, par la Gélatinase B

La même molécule, [mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala]_n-PEI 8 a également été incubée avec de la gélatinase B pendant un temps très long (48H) à 37°C, puis le mélange réactionnel a été déposé sur une colonne de Sephadex G50, pour voir si le profil du « vecteur-substrat », contenant à la fois du PEG et du PEI, évoluait vers de plus petits poids moléculaires. Le profil CPG obtenu (Fig.37), montre un très léger déplacement, pouvant signifier une petite hydrolyse. Celle-ci est beaucoup plus importante et significative, lorsque la gélatinase est remplacée par de l'élastase (Fig.38). En effet, cette enzyme est connue comme pouvant cliver des substrats contenant un ou plusieurs résidus Ala, tels succ-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide [114].

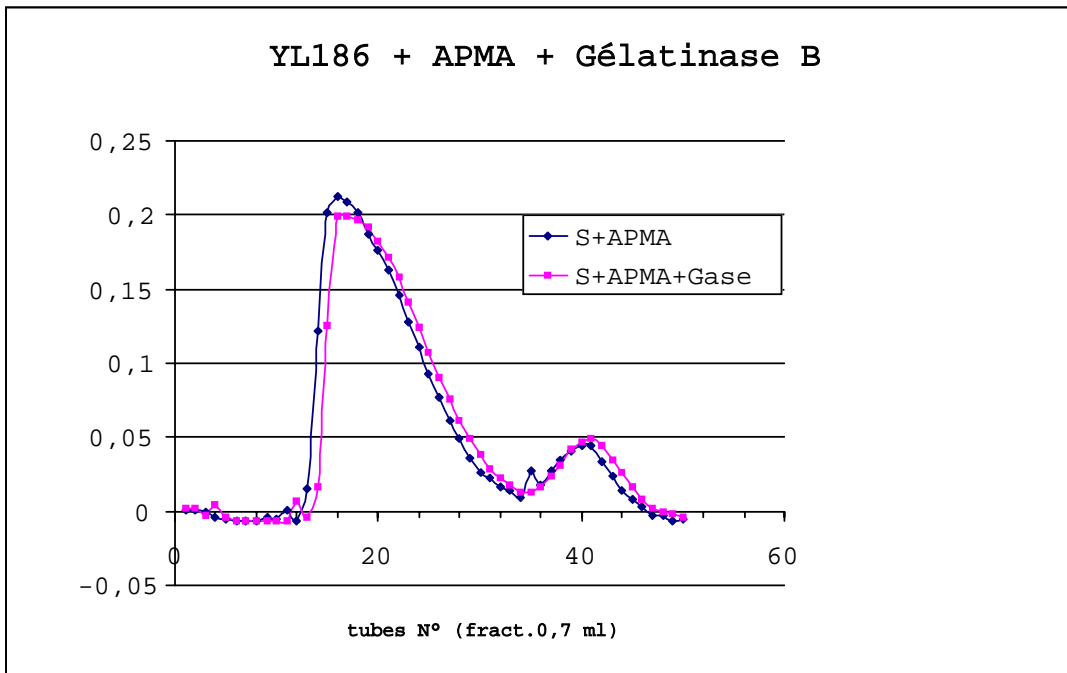


Fig.37 Analyse CPG de l'hydrolysat de $\underline{\delta}$: [mPEG-NH-succ(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala]_n-PEI (lot YL 186) par la Gélatinase B, obtenue en 43H. à 37°C

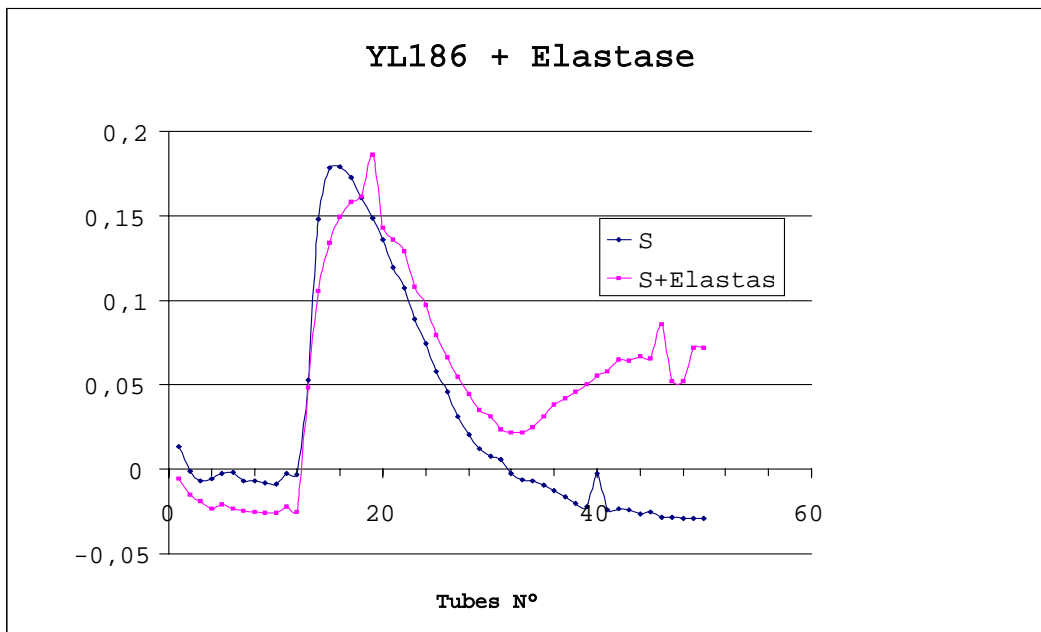


Fig.38 Analyse CPG de l'hydrolysat de $\underline{\delta}$: [mPEG-NH-succ(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala]_n-PEI (lot YL186) par l'élastase, obtenue en 43H. à 37°C

3.3.2 Hydrolyse d'un substrat peptidique des gélatinases A et B par des surnageant cellulaires avec et sans sérum

Les activités des gélatinases commerciales, dosées avec substrats synthétiques, étant très faibles (ces enzymes ne peuvent être recongelées), il a paru opportun de tester les « vecteurs-substrats » synthétisés directement avec les différents surnageants cellulaires, contenant ou non, du sérum. Mais d'abord, même si la gélatinase B (MMP9), a été mise en évidence et purifiée des cellules HT1080 [115][116], nous devons montrer que le surnageant des cellules cancéreuses HT1080 en notre possession hydrolyse un ou des substrats peptidiques de gélatinase.

Trois types de cellules ont été cultivés : a) des fibroblastes humains 3T3 censées ne pas produire de gélatinases, b) des cellules B16 de mélanomes de souris, transformées, mais censées sécréter peu d'activité gélatinase, .c) des cellules transformées HT1080 humaines, connues pour libérer de la gélatinase après activation (sérum, PMA, APMA[47]).

L'activation par l'APMA permet l'activation de la progélatinase en gélatinase : l' « aminophénylmercuric acetate » empêche l'interaction du thiol de la pro-enzyme avec le zinc du site catalytique[130] et, par là, provoque un « autoprocessing » de la pro- enzyme en enzyme. L'activation directe de la progélatinase, s'effectue *in vivo*, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, par protéolyse, par d'autres MMP (stromelysine...), ces enzymes étant, elles-mêmes, le fruit de cascades protéolytiques.

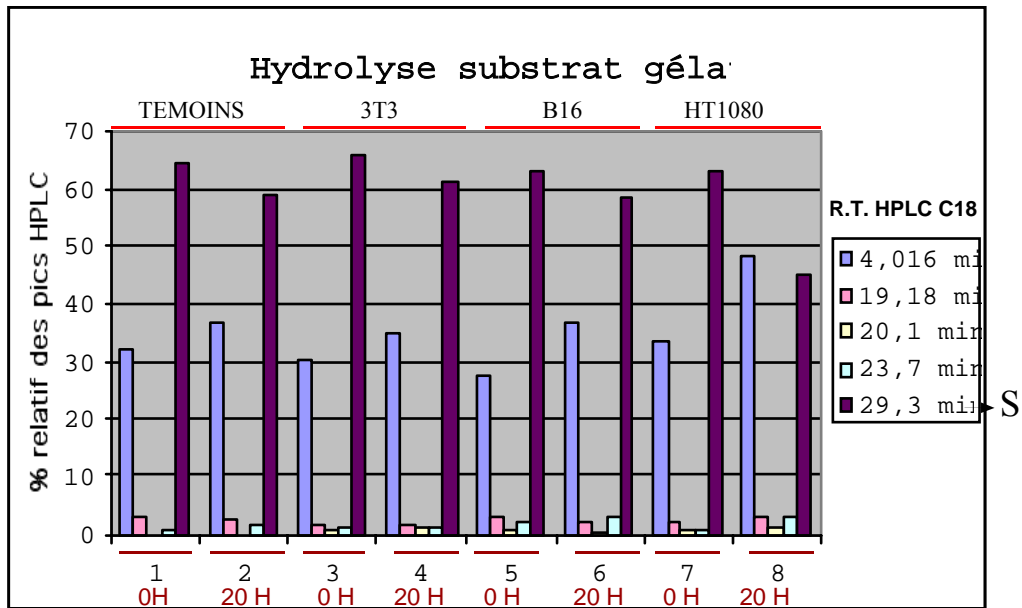
Un autre type d'«activation », cette fois cellulaire, est obtenu artificiellement avec le PMA (phorbol-myristoyl acétate) qui mimerait le rôle de l'activateur naturel, le diacylglycérol (DAG). En effet, cette molécule, est produite, par exemple lors de l'interaction de l' « urokinase de type activateur du plasminogène » (uPA) avec son récepteur. Elle produit alors l'activation de protéine kinase C, puis l'angiogenèse [136] et donc probablement la production de gélatinases.

Le sérum contient-il ce type d'activateur naturel favorisant, avec de nombreux autres facteurs internes à la cellule, la prolifération des cellules transformées ?

Dans certains cas, cette question se pose, dans la mesure où l'on obtient une hydrolyse de substrat de gélatinase, seulement lorsque les cellules HT1080 ont été cultivées en présence de sérum (Fig. 39). Plusieurs publications mentionnent que certaines cellules ont la capacité, d'être activées par des composants du sérum. Ainsi J.H.Guh et *al.* [117] ont montré que du sérum de veau fœtal (FCS) stimule la prolifération de cellules de muscle lisse prostatiques. Ce processus serait catalysé par la protéine kinase C. Il est en effet, bloqué par un inhibiteur spécifique de cette enzyme. S.Selvey a, par la suite, montré que des composants potentiels du sérum, comme la fibronectine, le collagène V, des cytokines (IL-1 β , IL-2, TGF- α) provoquait dans des lignées cellulaires du cancer du sein (HBC cell lines) une sur-expression de stromélysine-3 (MMP-11)[124], enzyme d'activation de la pro-métalloprotéase, provoquant probablement une augmentation de la production de gélatinases .

Au contraire, lorsque les cellules sont débarrassées de sérum, seules les cellules 3T3 hydrolysent le substrat des gélatinases. (Fig.39) Et lorsque ces cellules 3T3 sont mises en présence de sérum de veau (non fœtal), elles perdent leur capacité d'hydrolyse (Fig. 39). L'on peut alors supposer que des inhibiteurs du sérum (α 2-macroglobulines, α 1 anti-trypsine ...), inhibent l'activité protéolytique des cellules 3T3, peut-être de type élastase.

**Surnageants cellulaires + Dnp-Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His-Ala-(D)Arg-NH2
+ SERUM**



Surnageants cellulaires + Dnp-Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His-Ala-(D)Arg-NH2

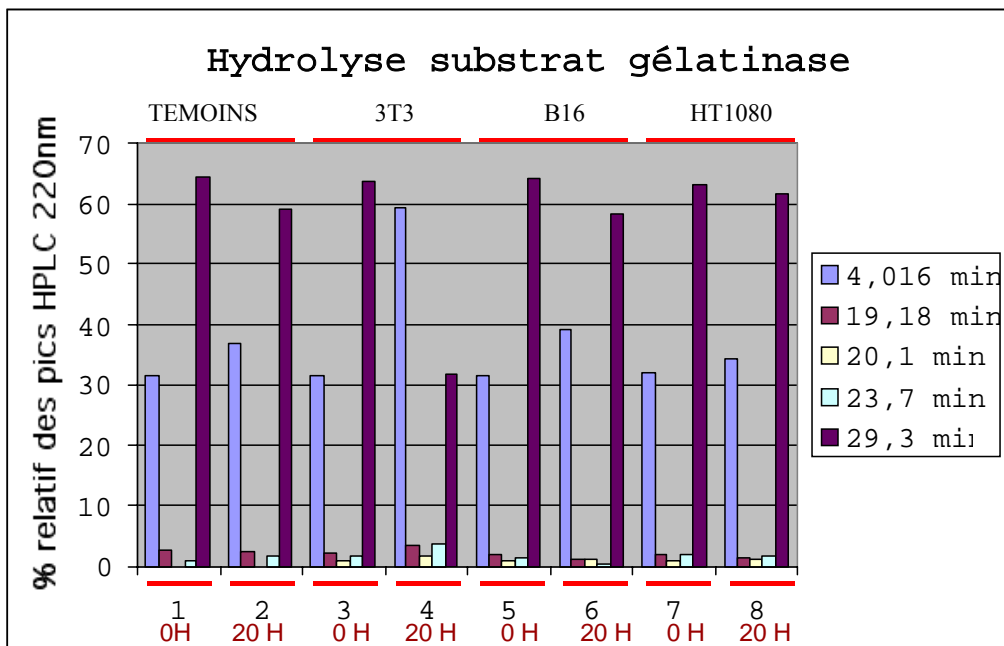


Fig. 39 Analyses HPLC de l'hydrolyse de substrat synthétique de gélatinases par les surnageants cellulaires, avec et sans sérum

3.3.3 Evaluation physico-chimique des vecteurs contenant du PEI

Plusieurs molécules dérivées du PEI, ont été testées pour leur capacité à transférer dans différents types de cellules, l'ADN du gène de la luciférase.

Outre le PEI témoin, ces molécules sont des « vecteurs » substrats potentiels de gélatinases. Mais comme nous l'avons décrit, plusieurs types de substrats ont été synthétisés. Des substrats peptidiques insérés entre le mPEG et le PEI, dont les séquences sont de sens opposés : **8** et les deux molécules en sens inverse **16** et **21**, un « vecteur poly-substrat » **12c** possédant plusieurs fois la même séquence peptidique, des vecteur-témoins » comportant un substrat théoriquement non clivable par les gélatinases, **23**, **27**, **30**, des vecteurs-témoins sans substrat peptidique soit avec du L-PEI **31**, soit avec du B-PEI **31b**, **31c**, **31d**. Enfin des dérivés du L-PEI, qui sont théoriquement des produits de la réaction enzymatique des gélatinases, provenant d'une séquence peptidique dans un sens **33** ou dans le sens inverse **34b** :

VECTEURS-SUBSTRATS

[mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala]_n-PEI : **8**

[(mPEG-NH-succ-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala)₄-(Lys-Lys-Lys)₂]_n-PEI **12c**

[mPEG-NH-Ala-Trp-Leu-Gly-Leu-Pro-(Ala)₃-succ]_n-PEI **16**

L-PEI-[succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys(NH₂)-S-S-CH₂-CH₂-CO-NH-PEGm]_n
21

TEMOINS

[mPEG-NH-succ-(Gly)₉]_n-L-PEI **23**

[mPEG-NH-succ-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n-PEI **27**

[mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-(D)Leu-Trp-Ala]_n-PEI **30**

[mPEG-succinyl]_n-PEI **31**

PRODUITS DE LA REACTION (possibles) provenant de la molécule **8**

H-Leu-Trp-Ala-PEI-Ala-Trp-Leu-H **33**

L-PEI-[succinyl-Pro-Leu-Gly-OH]_n **34b**

Les transfections nécessitent d'abord, un compactage correct de l'ADN du gène choisi, avec le vecteur utilisé. Ces compactages forment des particules appelées polyplexes dont la taille et la « charge globale externe » (traduite par le potentiel ζ), varient et peuvent moduler le taux de transfection.

Dans notre cas, plusieurs facteurs peuvent diminuer le taux de transfection. Le mPEG utilisé pour la conception de ces vecteurs, a pour fonction, comme cela a été précédemment décrit, de bloquer la transfection du PEI, auquel il est lié par l'intermédiaire d'un bras peptidique. Ainsi, la valeur des rapports « PEG / PEI » des molécules utilisées, a un rôle dans l'absence de transfection. Ce rapport molaire est obtenu par calcul à partir du rapport des protons de ces polymères en RMN du proton (voir méthodes expérimentales).

La transfection devrait être absente dans un « vecteur-substrat, à partir d'un rapport molaire de 2, dans la mesure où les deux amines primaires du L-PEI sont substituées par du mPEG-X-peptide-OH.

Mais, le mPEG semble avoir une influence négative dans le compactage de l'ADN dans certains lots de molécules. Il faut que le mPEG inhibe la transfection lorsque le substrat-peptide est intact, mais il ne faut pas qu'il empêche le compactage de l'ADN, sinon le vecteur-substrat devient inutilisable. L'inhibition du compactage sur le PEI, pourrait être due à une « alkylation » de ses amines secondaires au cours des synthèses, éventuellement par les groupes mPEG-X-peptide-OH. Le tableau ci-joint, montre l'absence ou la présence de compactage dans différents lots de molécules de différents rapports « PEG / PEG » :

| Mol | lot | Nom | Compact ADN | PEG/ PEI | taille (nm.) | Potent. ζ | %PEI |
|------------|-----------|--|-------------|----------|--------------|-----------------|------|
| | | X = NH-succ | | moles/ | | | |
| | | b = thiopropionyl | | mole | | | |
| <u>2</u> | | L-PEI | oui | | 1080 | 10 | 100 |
| <u>8</u> | YL069 | (mPEG-X-(A) ₃ -PLGLWA) ₂ -L-PEI | oui | 2,3 | 1334 | 8 | 65 |
| <u>8</u> | YL136 | (mPEG-X-(A) ₃ -PLGLWA) ₂ -L-PEI | | 7,8 | 244 | | 36 |
| <u>8</u> | YL143 | (mPEG-X-(A) ₃ -PLGWA) ₂ -L-PEI | oui | 4,6 | 1573 | | 49 |
| <u>8</u> | YL186 | (mPEG-X-(A) ₃ -PLGWA) ₂ -L-PEI | oui | 4,4 | 1414 | 3 | 50 |
| <u>12c</u> | polysubs | ((mPEG-X-(A) ₃ -PLGLWA) ₄ -(Lys) ₃) ₂ -L-PEI | non | 6,6 | | | 36 |
| <u>16</u> | sub. inv. | (mPEG-NH-AWLGLP-(A) ₃ -succ) ₂ -L-PEI | non | | 128 | 2,8 | 4 |
| <u>21</u> | sub.inv. | (mPEG-NH-b-CAWLGLP-(A) ₃ -succ) ₂ -L-PEI | oui | 5,7 | 1056 | | 42 |
| <u>23</u> | témoin | (mPEG-X-GGGGGGGGG) ₂ -PEI | oui | 75,9 | | -8,4 | 5 |
| <u>27</u> | témoin | (mPEG-X-AAA-GGGG-S) ₂ -PEI | non | 2,6 | | 4 | 60 |
| <u>30</u> | témoin | (mPEG-X-(A) ₃ -PLG-(D)L-WA) ₂ -L-PEI | oui | 2 | | | 70 |
| <u>31</u> | témoin | (mPEG-X) ₂ -L-PEI | oui | 4,2 | 1270 | | 51 |
| <u>31b</u> | | (mPEG-X) ₂ -B-PEI | oui | 0,18 | 1409 | | 96 |
| <u>31c</u> | | (mPEG-X) ₂ -B-PEI | oui | 0,29 | 1202 | | 95 |
| <u>31d</u> | | (mPEG-X) ₂ -B-PEI | oui | 0,3 | 591 | | 94 |
| <u>33</u> | prod. | H-(LWA) _n -L-PEI | oui | | 1788 | 5 | |
| <u>34b</u> | prod. | L-PEI-(succ-(A) ₃ PLG-OH) ₂ | non | | 750 | | |

Tab.2 Propriétés physico-chimiques des dérivés des PEI.

Plusieurs lots du vecteur-substrat **8** (YL069 et YL186), lorsqu'ils sont compactés avec l'ADN, forment des polyplexes, de tailles allant de 1300 nm à 1500 nm, pour un rapport N / P allant de 5 à 15. Par contre, un autre lot (YL136) donne un rapport PEG / PEI de 7,8 avec parallèlement, des tailles de polyplexes, allant de 200 à 400 nm pour ces mêmes rapports N / P. La substitution de dérivés PEG sur le PEI, fait diminuer le potentiel ζ avec l'augmentation du rapport PEG / PEI mais, cela n'est pas nécessairement corrélé avec la baisse de la taille des polyplexes.

En effet, un autre lot de la molécule **8**, YL143, avec un rapport PEG / PEI de 4,67, donne, au contraire, un potentiel ζ aussi élevé que ceux du L-PEI, une taille élevée (1300 à 1500 nm) et une transfection équivalente à celle du PEI, traduisant probablement, la présence de PEI libre. Ainsi, le potentiel ζ est un élément de « contrôle-qualité » et permet d'éliminer les produits non attendus.

Les taux de transfections sont en général corrélés avec un bon potentiel ζ et ils peuvent diminuer lorsque la taille des polyplexes diminue, comme cela est parfois le cas en présence de glucose.

Dans le cas des (B-PEI **31b**, **31c**, **31d**), qui sont très faiblement Pegylés, l'on observe que la taille des polyplexes diminue avec le taux de Pegylation, aussi faible soit-il. Les faibles « Pegylations » des PEI ramifiés, peuvent améliorer leur capacité de transfection [113].

Le polysubstrat **12c**, le vecteur-substrat inverse **16**, le témoin **27** et le produit **34b**, ne compactent pas l'ADN, donc n'ont pu être évalués en transfection. Pour les deux premières molécules, cela peut être expliqué par des rapports respectifs PEG / PEI élevés (6,6 et 128). Pour la molécule **34b**, cela peut être expliqué par une succinylation probable des amines secondaires du L-PEI.

3.3.4 Transfection du gène de la luciférase par les polyplexes « vecteurs-substrat »

La transfection du gène de la luciférase est effectuée dans ces expériences, grâce à un vecteur transporteur d'ADN, le PEI, qui permet au gène transporté, la traversée de la membrane cellulaire et celle de la membrane nucléaire. Mais comme ce polymère se trouve en quantité variable dans les « vecteurs-substrats » synthétisés, leur concentration, lors de la comparaison des taux de transfection d'ADN, est ajustée à quantités de PEI égales. Le % de PEI contenu dans un « vecteur-substrat » est calculé en fonction du rapport molaire du PEG et du PEI.

3.3.4.1 Transfection du PEI et effet de l'actinonine sur la transfection

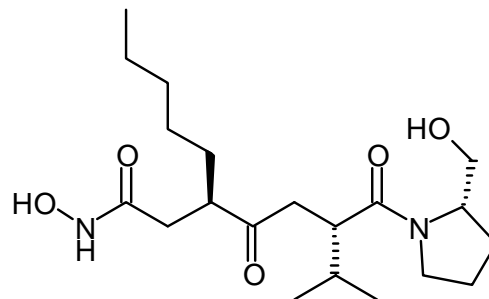


Fig. 40 Structure de l'actinonine

Connaissant l'activité inhibitrice de l'actinonine des MMP (Faucher et *al.*,) [54], et sa capacité d'« antagoniser » l'activité inhibitrice de l'endostatine (antiangiogénique) sur la gélatinase A (MMP2) [52], nous avons utilisé de l'actinonine dans les milieux de transfection des cellules HT1080, censées libérer cette enzyme [115][116]. La molécule **8** (mPEGsucc-NH-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala)₂-PEI utilisée comme « vecteur-substrat » est comparée au L-PEI seul, en présence de différentes concentrations d'actinonine. Normalement, un inhibiteur de gélatinase devrait diminuer la restauration de la transfection, qui est ici de 40%, pour le dérivé PEI, comparativement au L-PEI seul (Fig.41).

Or, nous observons deux phénomènes : l'actinonine inhibe, en elle-même, la transfection de l'ADN de la luciférase, transporté par le PEI.

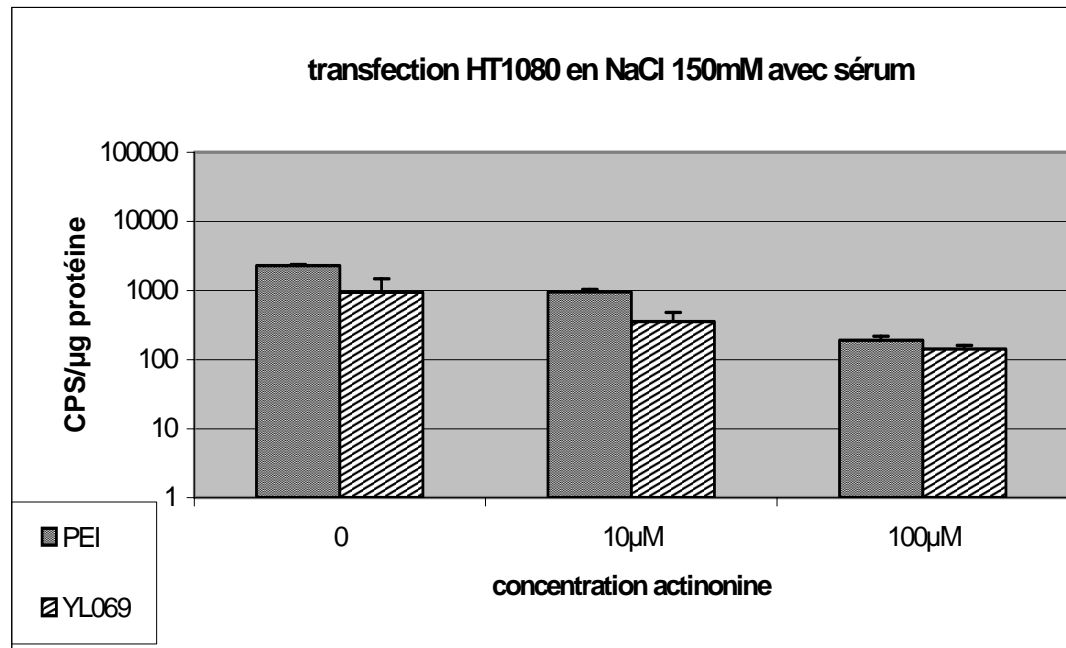


Fig.41 Influence de l'actinonine sur la transfection de la molécule 8 (lot YL 069), comparativement au L-PEI 2, en présence de sérum.

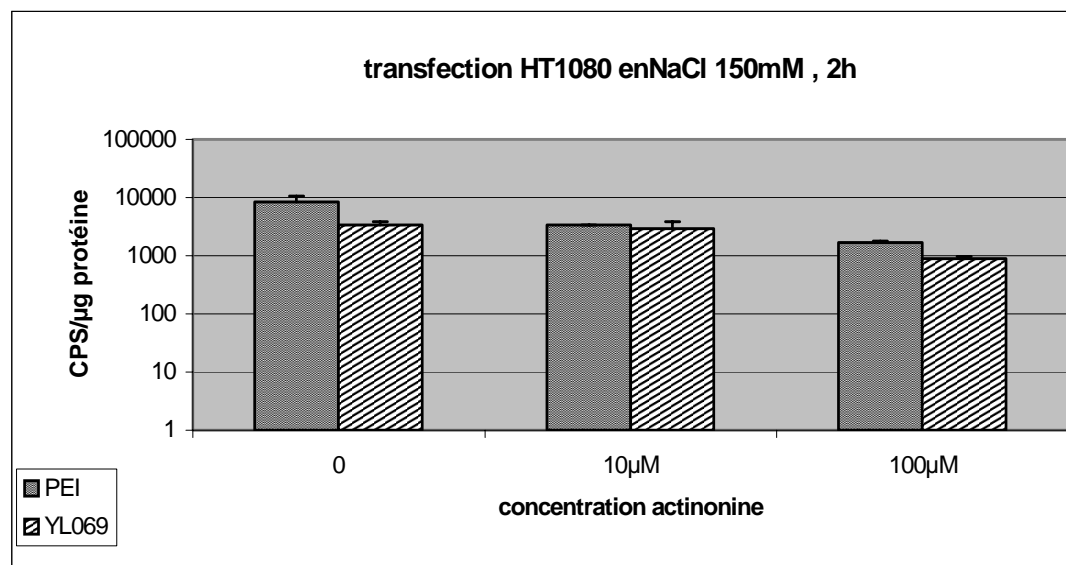


Fig. 42 Influence de l'actinonine sur la transfection de la molécule 8 (Lot YL 069), comparativement au L-PEI 2, sans sérum.

Ce n'est peut-être pas étonnant, dans la mesure où la transfection d'un gène, plus particulièrement, le passage à travers les pores du noyau cellulaire, serait gouverné dans un processus extrêmement complexe, entre autre, par des nucléoporines à doigt de zinc. Une d'entre elles Nup358 se situe à l'entrée du pore, coté cytoplasme.

Une autre, Nup153, se trouve dans le « panier » nucléaire, à la sortie du pore, côté nucléoplasme [118]. L'actinonine, pourvu de son extrémité hydroxamate chélateur de zinc, pourrait intervenir à ces niveaux. Toute « molécule-vecteur » ayant des propriétés chélatantes, risque donc d'empêcher la transfection d'ADN.

L'actinonine ne fait pas diminuer le taux de restauration de transfection du PEI de la molécule **8**, qu'elle aurait dû provoquer, en inhibant les gélatinases et en empêchant la dégradation du vecteur substrat **8**. L'actinonine, aurait dû maintenir le rôle inhibiteur du PEG sur la transfection par le PEI, lorsque le substrat-vecteur reste intact. Or ce n'est pas le cas.

Les expériences citées dans la littérature, concernant l'inhibition de l'actinonine, ont été effectuées *in vitro*, sans culture de cellules, aussi bien pour l'« antagonisation » de l'effet du TIMP [54] que pour celle de l'effet de l'endostatine [52]. Or, nous savons que les inhibiteurs dérivés hydroxamate se sont montrés plutôt inefficaces dans l'inhibition de la prolifération de cellules tumorales provoquées par les cellules cancéreuses libérant des activités gélatinases.

Une explication pourrait être, que ces inhibiteurs synthétiques inhibent la formation du complexe, « enzyme / inhibiteur » ici « gélatinase / TIMP : nous savons que l'actinonine ne déplace pas le complexe « TIMP / gélatinase » déjà formé (Faucher)[54], mais empêche sa formation, ce qui peut être le cas dans un processus de cultures cellulaires. Ce « déplacement » pourrait rendre l'effet « inhibiteur global » nul. Aucune variation ne serait alors observée.

Mais l'effet inefficace de certains inhibiteurs synthétiques, tel l'actinonine, a été mis en évidence par Toth et *al.* [137]. Ces auteurs ont montré qu'un inhibiteur puissant des MMP (IC50 au niveau nanoMolaire), le Marimastat[®], pouvait agir d'une manière synergique avec le TIMP2, pour stimuler l'activation de la pro-MMP2 en MMP-2 (gélatinase A) par la métalloprotéase membranaire MT1-MMP (dont il inhiberait l'autolyse) de cellules HT1080. L'effet obtenu serait donc inverse de l'effet attendu.

3.3.4.2. Effet du rapport N/P sur la transfection du PEI dans les cellules HT1080, de la molécule « substrat-vecteur » **8** (lot YL069) et du produit de la réaction enzymatique, molécule **33**

Nous observons que la transfection augmente avec le rapport N / P (Fig.43), c'est à dire lorsqu'un nombre plus important de charges positives du PEI est démasqué. Ceci favorise probablement l'endocytose cellulaire du PEI ou du « vecteur-substrat », dans la mesure où les charges des cellules cancéreuses sont négatives à leur surface (par les glycoprotéines glucuronoconjuguées ou sulfatées). La restauration de la transfection par la molécule **8** dans les cellules HT1080, théoriquement productrices de gélatinases, suit cette augmentation du rapport N / P. Ces valeurs sont inférieures aux valeurs obtenues avec la molécule (Leu-Trp-Ala)₂-PEI, **33**, qui est le produit théorique d'hydrolyse de la molécule **8** par les gélatinases. Mais elles suivent le même profil. Dans cette expérience, les taux de transfusions sont sensiblement identiques avec et sans sérum.

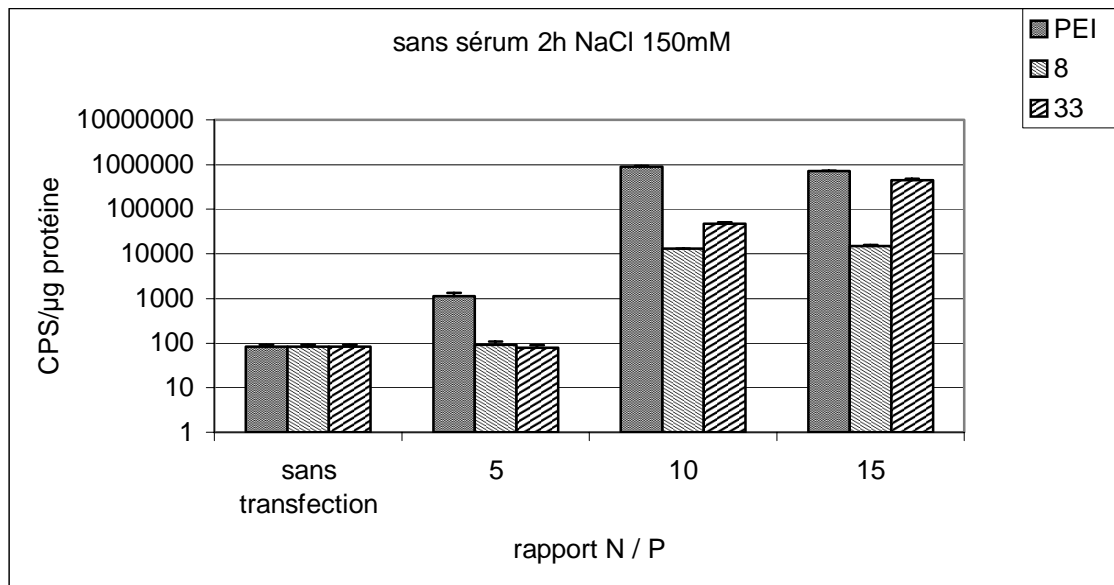
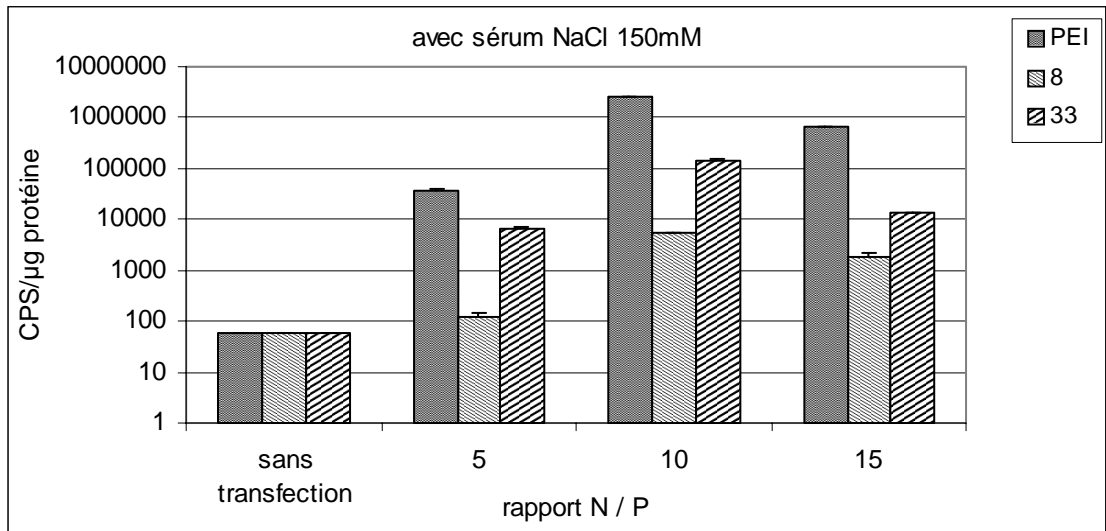
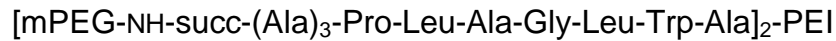


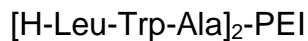
Fig.43 Effet du rapport N/P sur les transfections avec et sans sérum du L-PEI 2, du « vecteur-substrat » 8 et du produit 33

3.3.4.3 Comparaison des transfections, en NaCl 0.15M, dans 2 types de cellules des deux lots (YL069, YL186) du même « vecteurs substrat » 8

Dans une même expérience, deux lots la molécule 8 :



« substrat-vecteur » potentiel de gélatinase, YL069 et YL186, ont été comparés avec le produit théorique de la réaction enzymatique : molécule 33 :



l'hydrolyse par la gélatinase devant s'effectuer sur la liaison amide entre les résidus Gly et Leu.

Alors que pour un rapport N / P = 10, la transfection du gène de la luciférase, exprimée en activité spécifique de cette enzyme (cps/ μg de protéine exprimée), est au niveau de 1000 pour les surnageants de cellules B16 (Fig.44), elle est 10 fois plus importante pour le surnageant de cellules HT1080 dont une activité gélatinase sur le substrat synthétique DNP-Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His-Ala-(D)Arg-NH₂ avec sérum a été mis en évidence (fig.40), signifiant une possible corrélation.

Cette transfection, en milieu sérum, est aussi importante dans les surnageants de cellules HT1080, que celle fournie par le produit théorique de la réaction gélatinase [H-Leu-Trp-Ala]₂-PEI (molécule 33, lot YL176). La transfection dépend plus du rapport N / P, pour cette molécule, dans les surnageants de cellules B16 que dans les surnageants de cellules HT1080.

La différence entre les deux types de cellules est moins nette au rapport N / P = 15, surtout pour le lot YL186 de la molécule 8.

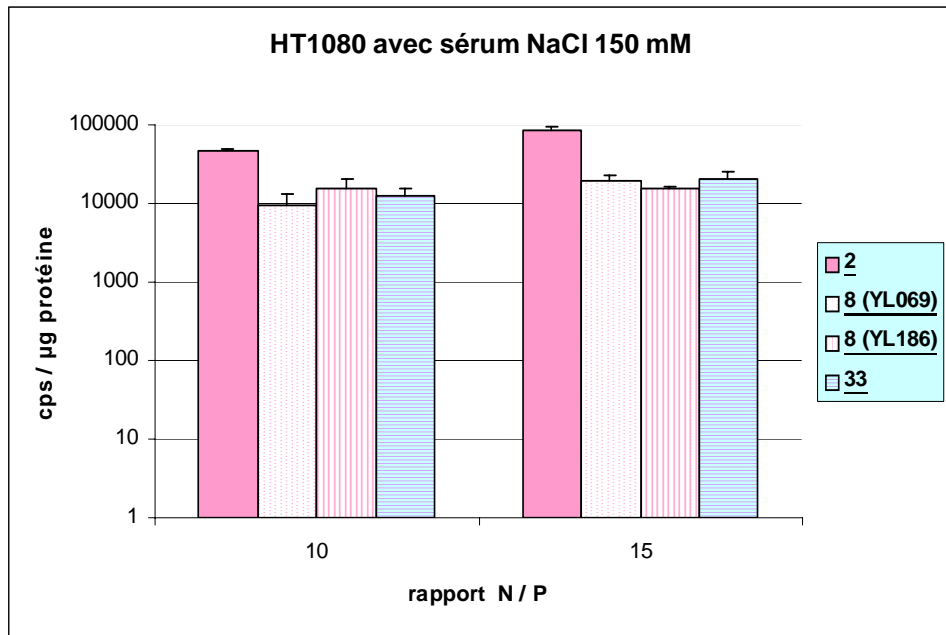
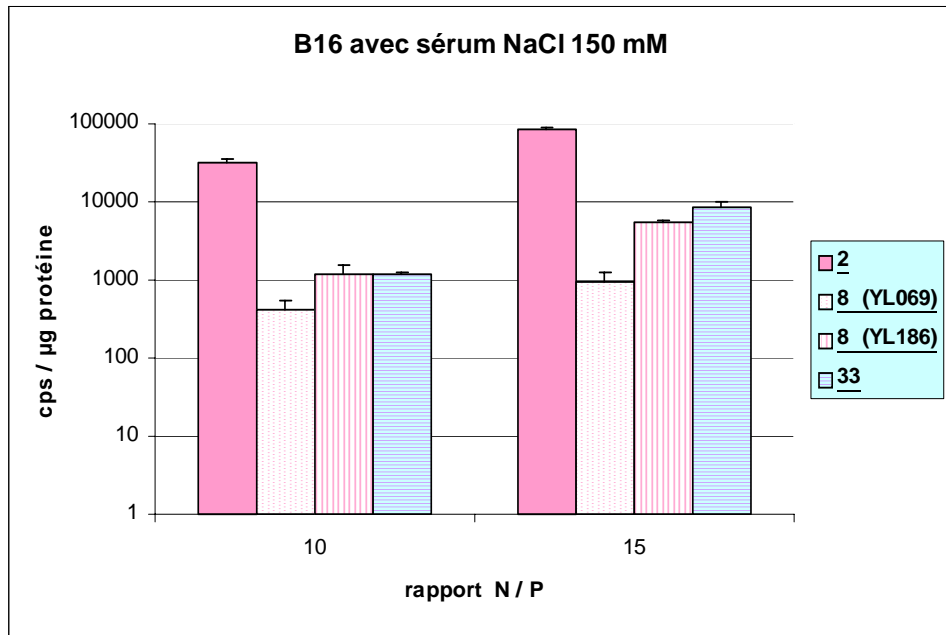


Fig.44 Transfections du gène de la luciférase par 8 (lots YL069 et YL186) et 33 (lot YL176), dans les cellules B16 et HT1080.

3.3.4.4 Comparaison des transfections, en NaCl 0.15M et sérum glucosé, dans 2 types de cellules (3T3 et HT 1080) avec deux lots (YL069 et YL186) du même « vecteurs substrat » 8

La même expérience que précédemment a été effectuée, mais cette fois, en milieu sérum glucosé et avec comme témoin, non pas des cellules B16, mais des cellules 3T3 (Fig.45).

Les cellules HT1080 permettent une transfection très supérieure à celle obtenue avec les cellules 3T3 surtout avec le lot YL069. Cependant le lot YL186 permet d'obtenir une transfection supérieure à celle de [H-Leu-Trp-Ala]₂-PEI **33** (lot YL176)

Comme dans l'essai avec sérum seul, la transfection dans les surnageants de cellules est, semble-t-il, moins inhibée au rapport N / P = 15 qu'au rapport N / P = 10.

Un rapport N / P plus élevé, signifie qu'il y a moins d'ADN sur le « vecteur-substrat », et que par conséquent, il y a plus de charges positives du PEI démasquées. Par conséquent, l'effet masquage du PEG est moins fort. Son inhibition de la transfection s'en trouverait ainsi diminuée.

Dans les cellules HT1080, les transfections se retrouvent au même niveau de celle du PEI libre, lorsque le rapport N / P = 15. En effet, d'une part il y a plus de charges positives du PEI démasquées, d'autre part, le clivage du substrat par les gélatinases libère totalement le PEI qui était encore masqué par le PEG.

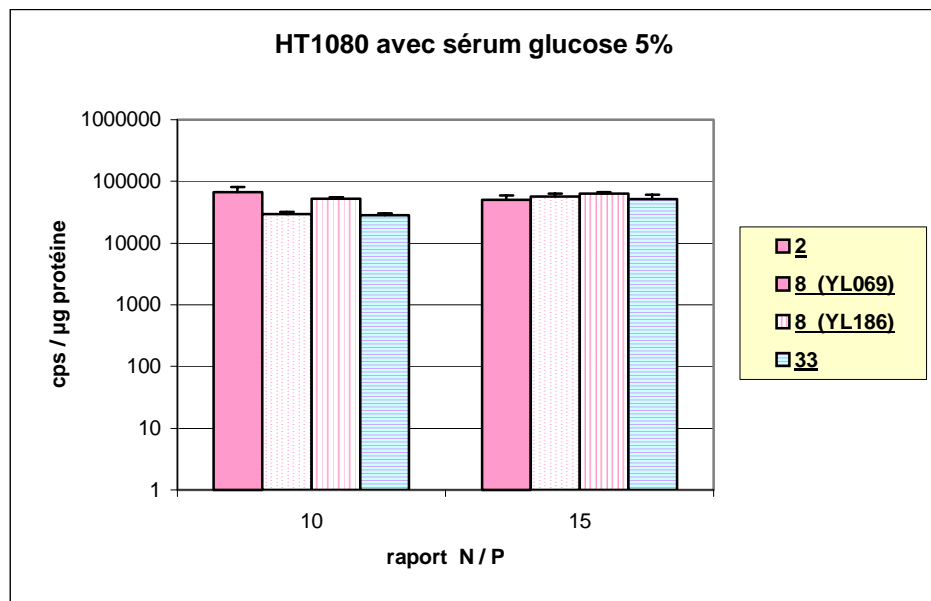
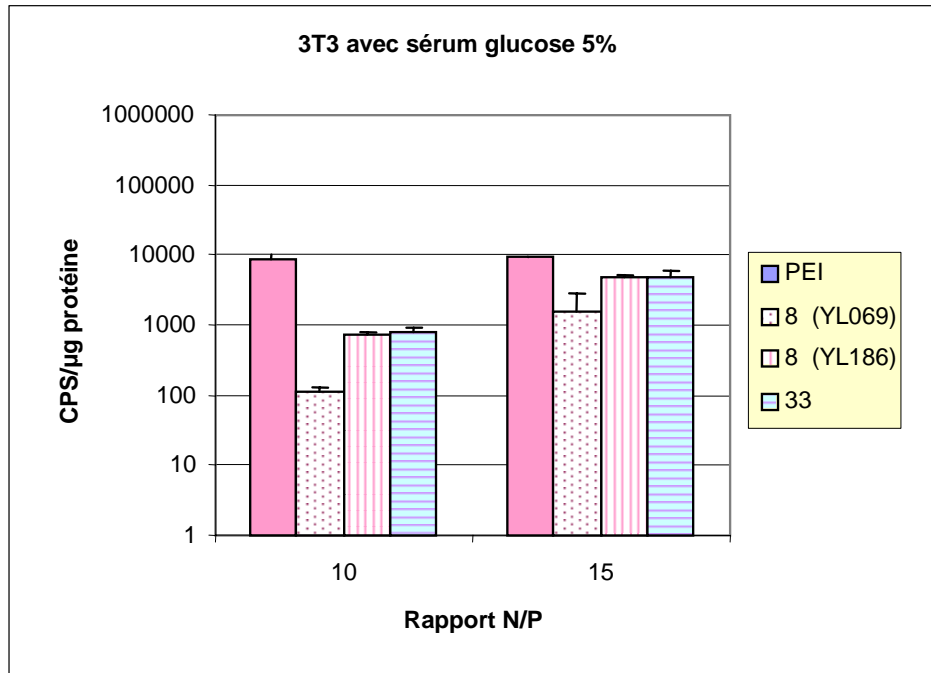


Fig.45 Transfections du gène de luciférase par 8 (lots YL069 et YL186) et 33 (lot YL176), dans les cellules 3T3 et HT1080

3.3.4.5 Pourcentage de restauration de la transfection par deux lots YL069 et lot YL186 du même « vecteurs substrat » **8** dans 3 types de cellules 3T3, B16, HT1080.

Les deux lots identiques le la molécule **8**, le lot YL069 et le lot YL186 :



sont comparés, cette fois, en % de restauration de transfection sur trois types de cellules, les cellules témoins 3T3 et B16 puis les cellules HT 1080.

Ces résultats sont corrélés avec les activités d'hydrolyse du substrat de gélatinase B (MMP9) : Dnp-Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His-Ala-(D)Arg-NH₂ avec sérum et sans sérum (Fig.39). En effet, en présence de sérum, les surnageants de cellules HT1080 hydrolysent ce substrat et restaurent, en partie, la transfection d'ADN porté par les deux lots du même vecteur-substrat. L'on peut présumer que cette transfection est due à la libération, par une activité gélatinase dans le surnageant de ces cellules HT 1080, d'un fragment du peptide portant toujours le PEI (avec l'ADN) et pouvant transférer le gène de la luciférase, car débarrassée du PEG. Ce % de restauration est plus élevé lorsque les cellules transfectées sont incubées en présence de sérum glucosé.

Les cellules 3T3 restaurent plus que les cellules B16, la transfection de ces deux lots. Est-ce du à l'activité protéolytique, mise en évidence sur le substrat synthétique de gélatinase, observée dans les conditions sans sérum (Fig. 39) ?

De cette étude du % de la restauration de transfection, ressort un profil reproductible de la transfection par les surnageants cellulaires des deux lots de fabrication identique de la molécule **8** : YL069 et YL186 accréditant la validité de résultats obtenus. Des profils également identiques ont été obtenus aux rapports N / P = 15.

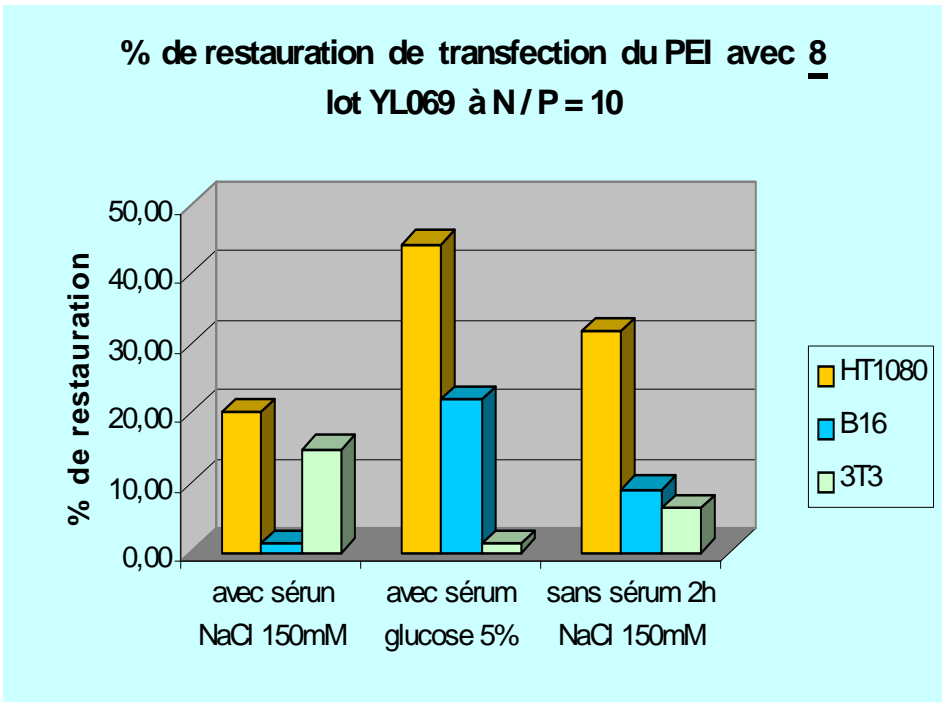
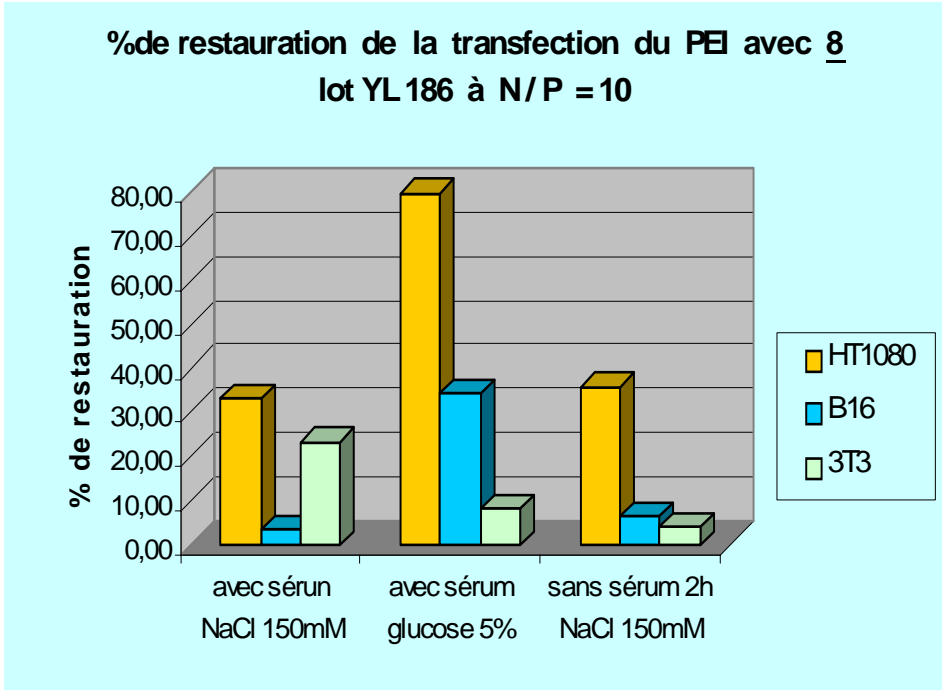


Fig.46 % de restauration de transfactions, obtenues avec 8 (lotsYL186 et YL069) sur 3 types de cellules (3T3, B16, HT1080)

3.3.4.6 Comparaison des transfections avec différents témoins et vecteurs-substrats

Différentes molécules (Fig.47), ont été comparées pour leur capacité à transférer deux types de cellules : a) les cellules transformées HT1080, b) les cellules B16 qui peuvent être considérées comme témoins, car ne fournissant pas ou peu d'activité gélatinase.

Parmi les seules molécules qui compactent l'ADN, deux types de « vecteurs-substrat) ont été utilisés, dans la même expérience. Ce sont les molécules :

8 lot YL069 : [mPEG-NH-succ-(A)₃-P-L-A-G-L-W-A]₂-PEI

21 lot YL252 : [mPEG-NH-CO-CH₂-CH₂-S-S-C-A-W-L-G-L-P-(A)₃]_n-succ-PEI
(molécule inverse)

Puis, a été testé un produit théorique de la réaction enzymatique gélatinase sur le vecteur-substrat **8** :

33 lot YL176 : [H-L-W-A]₂-PEI

Enfin, ont été testées, les témoins théoriquement non hydrolysés par les gélatinases :

23 lot YL107A : [mPEG-NH-succ-(Gly)₉]_n-PEI

30 lot YL240 : [mPEG-NH-succ-(A)₃-P-L-A-G-(D)L-W-A]₂-PEI (forme D)

Dans les cellules cultivées avec sérum :

Le « vecteur substrat », **8**, dont le produit d'hydrolyse enzymatique devrait être [H-Leu-Trp-Ala]₂-PEI (**33**), transfère beaucoup mieux dans les cellules HT1080 que dans les cellules B16. Cela pourrait corrélérer avec le taux d'activité gélatinase contenu dans les surnageants de ces deux types de cellules (fig.39). Si l'on analyse les résultats en taux de restauration de transfection (fig. 48), celui-ci est à

peine visible avec les cellules B16 alors qu'il est de 16% avec les cellules HT1080, dans cette expérience.

La molécule **21**, le vecteur substrat inverse, dont le produit d'hydrolyse devrait être [OH-Gly-Leu-Pro-(Ala)₃]_n-succ-PEI, transfecte presque environ 30 fois plus dans les cellules HT1080 que dans les cellules B16. Son % de restauration de transfection est en effet de 31% dans les cellules HT1080 alors qu'il n'est que de 1.2% dans les cellules B16.

Autre fait marquant, le % de restauration de la transfection (Fig.48) est deux fois plus important pour le vecteur-substrat inverse **21**, que pour le vecteur-substrat **8**. Dans l'hypothèse où ces deux molécules ne contiennent pas de L-PEI libre, plusieurs explications sont possibles. Le substrat inverse **21**, est peut-être plus accessible aux protéases de type gélatinases que la molécule **8**.

Son k_{cat} / K_m , (rapport qui permet de comparer les substrats) est peut-être meilleur. En effet, les analyses des hydrolysats in vitro, sur colonne Pharmacia Superdex 75 (3.2 x 30 cm) en CPG montrent un R_t plus élevé, à 280 nm (Tab.3) pour la molécule **21**, comparativement à celui de la molécule **8**, indiquant une dégradation plus « importante ». Enfin, un autre paramètre peut intervenir, à savoir une meilleure pénétration de la membrane cellulaire du produit de la réaction d'hydrolyse « [OH-Gly-Leu-Pro-(Ala)₃]_n-succ-PEI⁺ / ADN⁻ » que celle du produit « H-Leu-Trp-Ala₂-PEI⁺ / ADN⁻ » formé à partir de la molécule **8**.

Le produit de la réaction **33**, provenant théoriquement de l'hydrolyse enzymatique : [H-Leu-Trp-Ala]₂-PEI, permet la transfection d'ADN dans les deux types de cellules, cependant beaucoup moins dans les cellules B16 que dans les cellules HT1080. Ce serait une preuve que c'est la réaction de la gélatinase sur le vecteur-substrat **8**, qui, en faisant apparaître ce produit, serait responsable de la restauration de la transfection.

Le témoin, théoriquement non hydrolysable par les gélatinases, car ne possédant pas de séquence Gly-Leu clivable, [mPEG-NH-succ-(Gly)₉]_n-PEI **23**, ne permet qu'une transfection extrêmement faible dans les deux types de cellules.

L'autre témoin, [mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Ala-Gly-(D)Leu-Trp-Ala]₂-PEI (forme D), **30**, théoriquement, aussi non hydrolysable, car non clivable au niveau de la liaison « Gly-(D)Leu », donne un taux de restauration de transfection, de 10 à 15 fois plus faible que celui des « vecteurs-substrats » normaux, dans les cellules HT1080.

Le témoin [mPEG-NH-succ]₂-PEI **31** transfecte presque autant que le L-PEI (résultats non montrés). Cela laisserait entendre qu'un bras suffisamment long entre le mPEG et le L-PEI soit nécessaire pour que le PEG puisse « bloquer » la transfection du PEI.

Globalement, ces résultats renforcent l'hypothèse que ce pourrait bien être les gélatinases qui soient impliquées dans la restauration de la transfection avec les « vecteurs-substrats » dans les cellules HT1080. Ces « vecteurs-substrats » seraient bien des substrats de gélatinases.

La même expérience, sans sérum, a fourni, cette fois des taux de transfusions plus importants que celles avec sérum. Cependant le profil obtenu, de restauration des transfusions, est identique. L'effet non reproductible des effets du sérum, pourrait être dû à l'état des cellules qui n'est pas forcément identique d'une expérience à l'autre. L'on sait que c'est dans leur état de multiplication que leur transfection est la meilleure. Elles ne sont donc pas forcément toujours à un stade identique.

- 8** : [mPEG-NH-succ-(A)₃-P-L-G-L-W-A]₂-PEI (lot YL069) | substrats
21 : [mPEG-NH-CO-CH₂-CH₂-S-S-C-A-W-L-G-L-P-(A)₃-succ]_n-PEI |
 (molécule inverse) |
33 : [H-L-W-A]₂-PEI | produit
23 : [mPEG-NH-succ-(Gly)₉]_n-PEI |
30 : [mPEG-NH-succ-(A)₃-P-L-G-(D)L-W-A]₂-PEI (forme D) | témoins
 ↑ : site de clivage théorique par les gélatinases

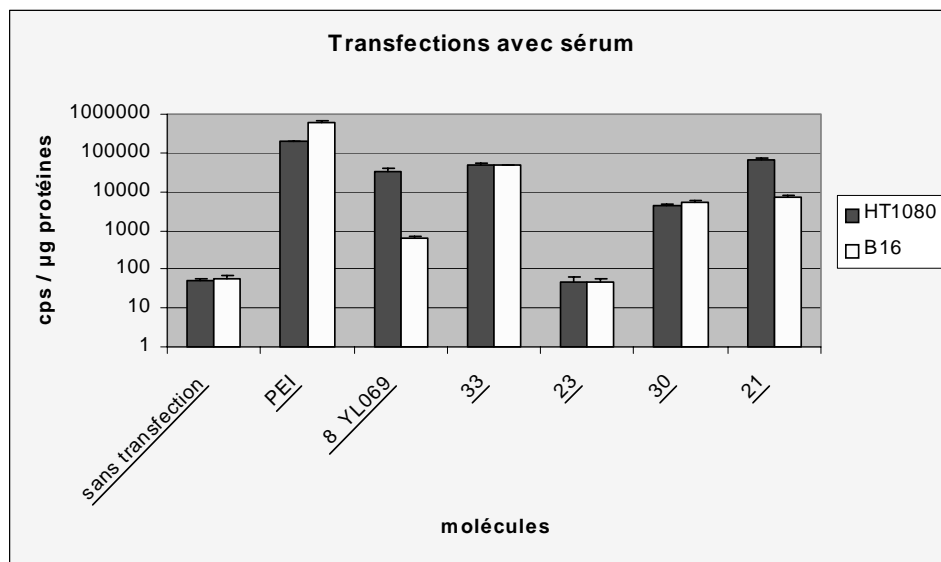


Fig.47 Comparaison des transfections de différentes molécules avec les cellules HT1080 et avec les cellules B16.

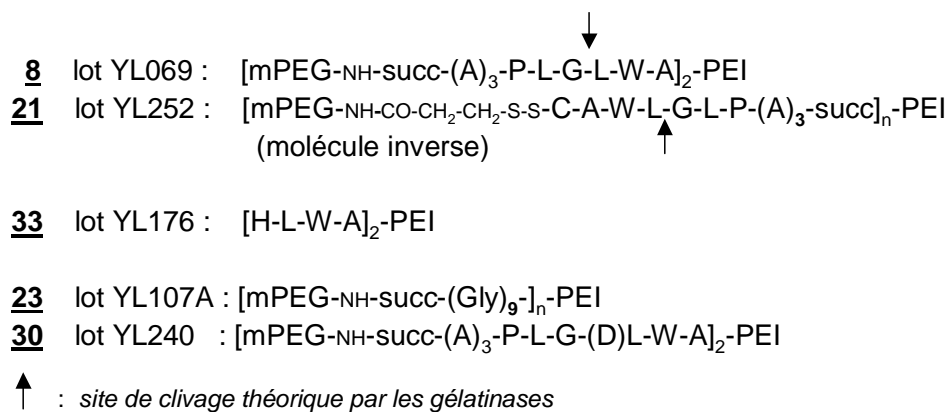
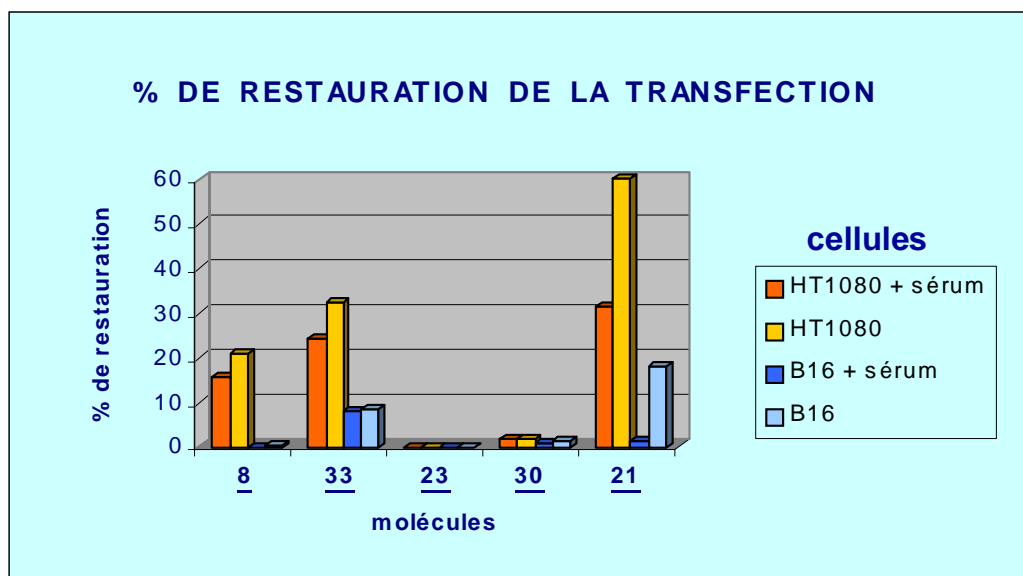


Fig.48 % de restauration de transfection avec différentes molécules dérivées PEI

Pour prouver l'origine protéolytique du processus de restauration de transfection, quelques unes de ces molécules substrats ou témoins, ont été analysées en CPG sur un ensemble HPLC, doté d'une colonne Pharmacia Superdex 75 3,2 / 30, avant et après leur incubation avec le surnageant de cellules HT1080 pendant 20H à 37°C. Plusieurs paramètres ont été considérés 1) le déplacement du pic du substrats vers les plus bas poids moléculaires, 2) l'augmentation éventuelle de la D.O. à 220 nm et 280 nm.

Les résultats suivants ont été obtenus avec des temps de rétention (Rt) de pics exprimés en minutes :

| Molécule | Rt à 220 nm Δ D.O. | | | Rt à 280 nm Δ D.O. | | |
|----------------------------|--------------------|-------|----|--------------------|--------|----|
| | 0 H. | 20H. | | 0H. | 20H. | |
| 8 substrat | 13,69 | 14,08 | - | 14,21 | 14,53 | - |
| 30 TS forme D | 12,2 | 12,20 | - | 12,25 | 12,237 | - |
| 12c Polysubstrat | 12,12 | 12,02 | - | 12,18 | 12,12 | + |
| 21 substrat inverse | 11,43 | 11,39 | | 16,75 | 17,04 | |
| | 14,84 | 14,06 | ++ | 20,42 | 20,80 | ++ |

Tab. 3 Temps de rétention, en CPG sur colonne Superdex 75, des « vecteur-substrats » soumis à une hydrolyse de 20H. à 37°C avec les surnageants de cellules HT1080

Le substrat **8** présente un léger déplacement du pic vers les plus bas poids moléculaires, sans modification de la D.O. Le substrat inverse **21c**, présente initialement, une petite hétérogénéité en sommet de pic (Fig.49). Si cette molécule n'a pas de déplacement, il y a légère augmentation de D.O après incubation, en particulier à 280nm, comme s'il y avait démasquage du tryptophane.

Au contraire, le témoin substrat (TS) de forme D, **30**, et le polysubstrat **12** n'ont rigoureusement pas de déplacement de pics. Il y a seulement une légère augmentation d'hydrolyse pour le polysubstrat **12c** à 280 nm.

Ces résultats sont sujets à caution, dans la mesure où les variations des valeurs sont très faibles. Mais elles corréleraient avec les résultats de transfections pour **8**, **30** et **21** précédentes. (**12c** n'a pas été testé en transfection, car ce polysubstrat ne compacte pas l'ADN). Une activité gélatinolytique du surnageant des cellules HT1080, pourrait expliquer les variations obtenues, parallèlement aux restaurations de transfection.

Les vecteurs-substrats, en tant que tels, ne sont pas adaptés pour les analyses d'hydrolyse par les enzymes protéolytiques. Une dérivation par la molécule Cy5.5 (sur le mPEG ?) permettrait un dosage, beaucoup plus sensible, en fluorescence dans le proche infra-rouge (NIRF).

Un ADN intercalé avec un agent fluorescent comme le picogreen ou le bromure d'éthidium (BET) pourrait éventuellement permettre de suivre avec plus de sensibilité l'hydrolyse du « substrat-vecteur PEI » portant l'ADN.

La molécule **21** : [mPEG-NH-CO-CH₂-CH₂-S-S-C-A-W-L-G-L-P-(A)₃]_n-succ-PEI, (substrat inverse), semblerait la plus active quant à la restauration de la transfection (Fig.48) et quant à la modification de son profil HPLC sur Superdex 75, après incubation avec le surnageant de cellules HT1080 (Fig.49).

La présence d'un pont di-sulfure dans sa structure pourrait-elle expliquer ces propriétés ? Si le clivage de ce pont disulfure se produisait, outre celui de la liaison Gly-Leu par les gélatinases (Fig.50), cela pourrait produire un démasquage du résidu tryptophane et l'augmentation de son absorption à 280 nm.

Cette hypothèse n'est pas impossible dans la mesure, où les amines secondaires basiques du L-PEI (donc non salifiées par HCl), pourraient fort bien être à l'origine du clivage de ces ponts di-sulfure au bout de 20H d'incubation : celles-ci sont en effet très sensibles aux bases et aux milieux basiques. En outre le milieu intracellulaire est réducteur.

Mais, si le sérum avait eu un effet réducteur des ponts di-sulfure de cette molécule, les restaurations de transfections auraient été plus fortes en sa présence. Or c'est le contraire qui s'est produit. Peut-être le sérum, protège-t-il ces ponts de l'effet basique des PEI. En définitive, la présence d'un pont di-sulfure dans les vecteur-substrats n'est peut-être pas souhaitable, vu son instabilité et sa capacité à s'échanger avec des thiols des milieux biologiques. De plus, leur présence en synthèse chimique est sujette à la formation de composés secondaires. Les ponts di-sulfure apportés avec le réactif SPDP pourraient avantageusement être remplacés par des liaisons S-C en utilisant du mPEG-N-méthylmaléimide devant être couplé au thiol de la cystéine du peptide.

Peut-être, la structure de ce « vecteur-substrat » **21**, présente-t-elle, aussi, une plus grande accessibilité aux gélatinases, que la molécule **8**. Et, la molécule [OH-G-L-P-(A)₃]_n-succ-PEI **34b**, produite par la molécule **21**, sous l'action des gélatinases, transfecte peut-être mieux que la molécule [H-L-W-A]₂-PEI **33**, produite à partir de la molécule **8**. Cette éventualité était à l'origine de l'alternative de construction des vecteur-substrats d'ADN, posée au début de nos travaux, à savoir, quelle était l'influence du sens de leurs liaisons peptidiques entre les deux polymères, le PEG et le PEI transporteur d'ADN.

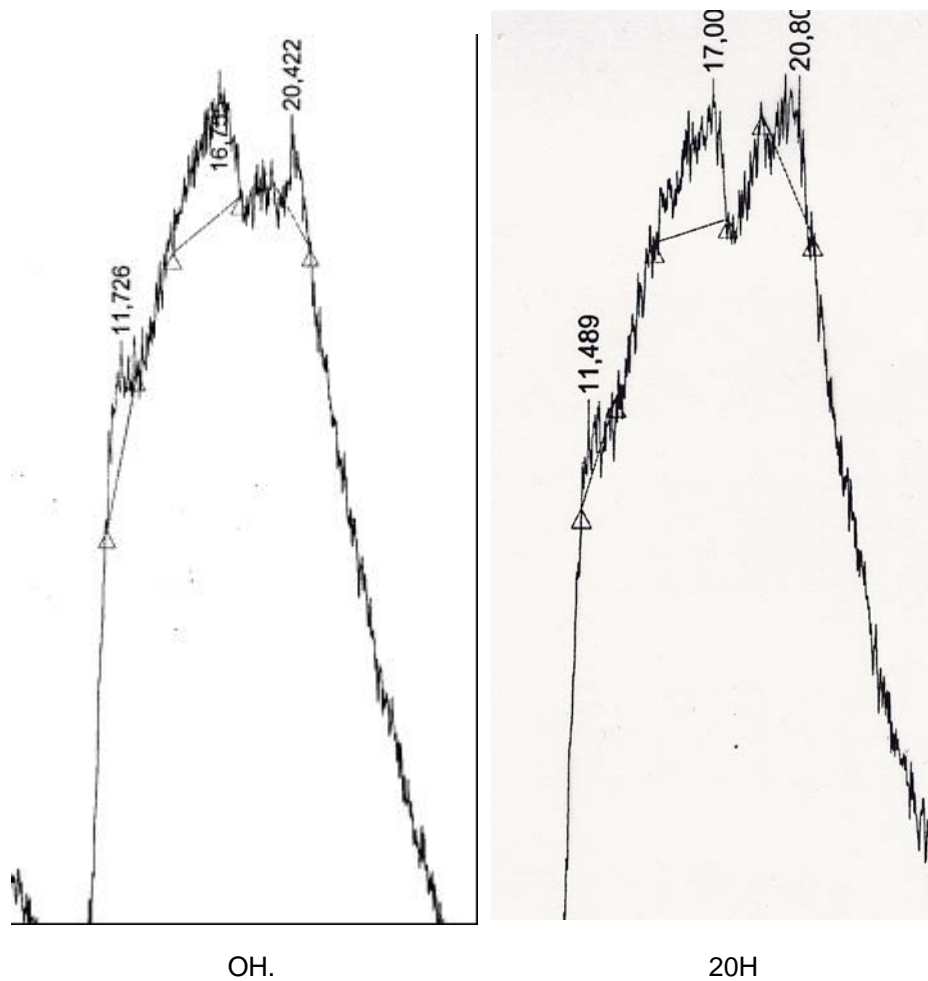


Fig.49 Profil d'hydrolyse du « vecteur-substrat » 21 par le surnageant des cellules HT1080, mise en évidence sur colonne Superdex 75®

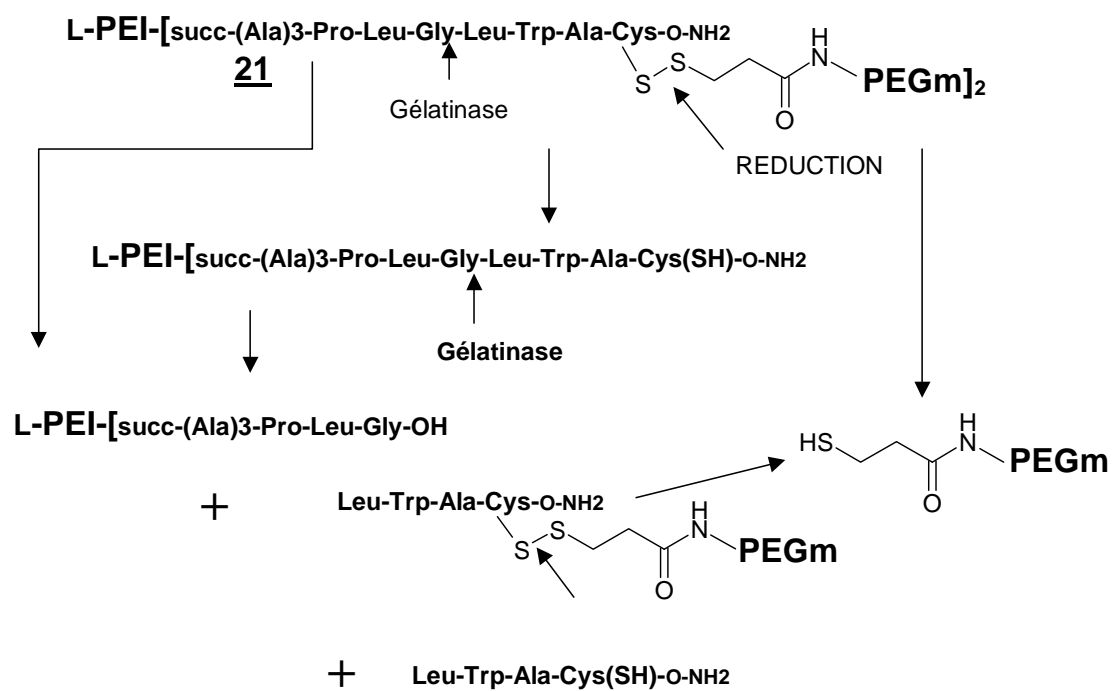


Fig.50 Hydrolyses possibles du « vecteur-substrat » **21** par le surnageant des cellules HT1080

Chapitre 4 : CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Conclusions :

- L'incorporation d'un substrat de gélatinase entre du mPEG et du L-PEI permet de transfecter spécifiquement le gène de la luciférase dans des cellules sur-exprimant de la gélatinase (cellules transformées HT1080), comparativement à celles qui en produisent peu (B16) ou pas (fibroblastes 3T3). Cette transfection différentielle est en effet, corrélée avec les activités gélatinases mises en évidence dans leur surnageants cellulaires respectifs (Fig.39).

Les résultats obtenus avec les cellules semblent meilleurs que ceux qu'auraient laissé supposer ceux obtenus dans l'hydrolyse de vecteurs-substrat comme **8**, sous l'action de gélatinase commerciale. Dans ce cas, les vecteurs substrats ne portaient pas d'ADN alors que dans les tests de transfections cellulaires, les vecteurs-substrats étaient chargés d'ADN pouvant neutraliser partiellement les charges positives du L-PEI qui inhibe partiellement l'activité gélatinase.

- Nos résultats corroborent ceux obtenus par Peng et *al.*[57][58] où un substrat peptidique de gélatinase de même séquence, était incorporé dans un plasmide capable d'exprimer une protéine chimérique contenant à la fois ce type de substrat et le gène de la luciférase, transporté avec un vecteur rétroviral. Notre approche est aussi identique à celle de D.J.Mincher et *al.* de l'Université Napier [119], qui couplèrent une molécule anticancéreuse intercalante de l'ADN, l'antraquinone, à un substrat de

gélatinase A (MMP2) de séquence Pro-Ala-Gly-Ala-Ala-Ala-, grâce un bras N, N'diaminopropyle. Ces auteurs montrèrent que lorsque ce substrat était mis en présence de cellules MAC15A d'adénocarcinome de colon, le IC50 sur la relaxation de l'ADN pBR322, catalysé par la topoisomérase I, diminuait de plus de 50 fois en 96 heures, traduisant la vectorisation et l'incorporation d'antraquinone. Mais notre travail serait original par rapport à ces travaux dans la mesure où c'est la première fois qu'un vecteur synthétique, lié à un substrat de gélatinase permet la transfection spécifique d'un gène dans une cellule cancéreuse.

- Dans notre système, la présence de mPEG, muni d'un bras peptidique, non clivé ou non clivable, empêche ou diminue la transfection de l'ADN par le L-PEI, en particulier dans des cellules n'exprimant pas d'activité gélatinase. Cette propriété-clef permet le ciblage du vecteur-substrat portant le gène d'intérêt sur les cellules cancéreuses sur-sécrétant cette enzyme. Nous bénéficions ici, en outre, des propriétés connues du PEG, empêchant les interactions non spécifiques du PEI dont le caractère toxique est connu[29][31][32].
- Une seule chaîne peptidique dans un vecteur-substrat suffit pour obtenir la transfection d'un gène. Nous avons montré qu'un polysubstrat, **12c**, transfecte peu ou pas les cellules HT1080. Cela peut être la conséquence de la forte quantité de PEG contenue dans cette molécule.
- Les vecteur-substrats « inverses » tel que **21** fournissant sous l'action de gélatinases le produit de la réaction L-PEI-[succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-OH]_n,

transfecteraient mieux que ceux tels **8**, fournissant le produit L-PEI-[Leu-Trp-Ala-OH]. L'éloignement du L-PEI du site de clivage Gly-Leu, plus important dans le premier cas, peut expliquer ce résultat, puisque les gélatinases sont inhibées par ce polymère (Fig. 15).

Perspectives :

Les résultats obtenus nécessitent que des travaux supplémentaires les confirment.

- Ainsi, il conviendrait d'éliminer des préparations le L-PEI libre résiduel, donc non couplé, qui apporte du « bruit de fond » dans les mesures obtenues. Pour cela, il faudrait optimiser les conditions de couplage à ce polymère devrait être améliorée, ainsi que la purification du « vecteur-substrat » synthétisé. Une autre solution pourrait être de synthétiser le « vecteur-substrat » sur support solide portant du mPEG, ce procédé permettant aisément des lavages. Cependant, le couplage final du polymère L-PEI pourrait être rendu difficile par un problème d'accessibilité.

Le fragile pont di-sulfure du meilleur « vecteur-substrat » **21** pourrait être remplacé par une liaison thio-éther non clivable, grâce à l'utilisation de mPEG-N-méthyl-maléimide à la place du dérivé dithiopyridine du mPEG formé à partir du mPEG-NH₂ et du SPDP. L'utilisation d'une autre molécule « inverse » serait également envisageable, comme **16** où le groupement succinyl n'est pas lié au groupement aminé du mPEG, mais aux groupements aminés du L-PEI. Dans ce cas, il faudrait, non pas succinyler

le PEI lors de sa synthèse, mais le groupement amino-terminal de la molécule H-peptide-X-PEGm.

- L'opportunité de la présence du tripeptide tri-Ala dans le peptide du « vecteur-substrat » se pose étant donné sa capacité d'être clivée par de l'élastase. Cette propriété peut être intéressante dans la mesure où les tumeurs constituent une zone inflammatoire accumulant des macrophages qui peuvent libérer cette enzyme par dégranulation ainsi que de l'héparinase et des gélatinases. Mais comme les zones inflammatoires accompagnent de nombreux processus, cette stratégie se heurte à un manque de spécificité dans le ciblage du gène. Il conviendrait alors de remplacer le tripeptide tri-Ala par une chaîne aliphatique dont la longueur devrait être optimisée. En effet, si nous avons observé que la molécule [mPEG-NH-succinyl]_n-L-PEI **31** permettait une aussi bonne transfection du gène de la luciférase que le L-PEI, nous ne savons pas quel est l'optimum de longueur nécessaire entre le mPEG et le L-PEI pour que le mPEG puisse empêcher la transfection du vecteur substrat contenant le L-PEI. Cette étude systématique reste donc à effectuer.
- Des vérifications biologiques de la spécificité d'action des vecteurs substrats dérivés du L-PEI devraient être mises en œuvre. En effet, l'implication des gélatinases devrait être corroborée en vérifiant si la transfection du gène d'intérêt dans les cellules HT1080 est inhibée par des inhibiteurs naturels de gélatinases comme les TIMP. L'utilisation d'inhibiteurs synthétiques de gélatinases devrait être évitée étant donné

leur capacité à empêcher la formation des complexes « TIMP / gélatinases » [53][54] et à faire produire de la gélatinase[137].

L'implication des gélatinases pourrait aussi être mise en évidence par le « knock-out » de leur gène ou par l'utilisation d'anti-sens ou de Si-RNA spécifiques.

- La détermination précise du site de clivage du peptide incorporé dans le « vecteur-substrat » apporterait la preuve de l'implication des gélatinases A ou B. En effet, le site attendu du clivage par ces enzymes se situe entre la glycine et la leucine. L'analyse de la composition en acides aminés des produits d'hydrolyse de la réaction enzymatique apporterait la connaissance de ce site. Il faut toutefois noter que si l'analyse des acides aminés en spectrométrie de masse est réalisable avec une bonne sensibilité, il est plus difficile de séparer les produits d'hydrolyse enzymatique du « vecteur-substrat » initial qu'elle nécessite. En effet, la présence de deux polymères avec profil de courbe gaussienne rend, semble-t-il, très difficile une séparation des composants formés par hydrolyse.
- Il serait également opportun de montrer, *in vitro*, la capacité d'hydrolyse du « vecteur-substrat » cette fois lié à l'ADN du gène transporté, par les surnageants de cellules HT1080. Il se peut, en effet, que l'ADN masque une partie des charges positives du L-PEI et donc en atténue l'inhibition sur les gélatinases. Mais l'ADN peut aussi provoquer un encombrement qui gênerait l'accessibilité de l'enzyme au « vecteur-substrat ».

- Toutes ces expériences nécessitent que soit mise en oeuvre la synthèse d'une quantité plus importante de vecteur-substrat. Cela s'avère encore plus impératif par la nécessité de tester ces vecteur-substrats sur des tumeurs, induites, par exemple, par des cellules HT1080, pour valider les résultats obtenus.

D'autres types de tumeurs, dont les cellules transformées et celles activées à leur contact sur-sécrétant des gélatinases pourraient être soumises à des essais de transferts de gènes dont on aurait préalablement identifié la carence dans leur génome.

- La cible « gélatinases » peut apparaître d'une spécificité relative, ces enzymes étant associées à d'autres processus comme, par exemple, la cicatrisation [120][121][131][132] ou l'inflammation liée à la réponse immunitaire [134]... A cet égard, un certain nombre de précautions serait à prendre dans le cas d'un traitement thérapeutique ciblé. Les travaux de Nagase et *al.* [122] montrèrent également une spécificité assez relative des peptides substrats des « matrix metalloprotéases » MMP2 (gélatinase A) et MMP9 (gélatinase B), comparativement aux autres substrats d'autres MMP. La spécificité n'est donc jamais absolue. Mais, ce caractère relatif n'empêche d'envisager pas un certain ciblage potentiel de drogues ou de gènes, marquant un certain progrès thérapeutique : les travaux de Bremer et *al.* [64], montrant le ciblage du marqueur fluorescent FITC sur les tumeurs grâce au même type de substrat de gélatinases, laissent penser que cette approche sera transposable au transfert ciblé de drogues, de gènes sous-exprimés et d'oligonucléotides anti-sens pour les gènes sur-exprimés.

- Notre type de « vecteur-substrat », mPEG-X-peptide-X-L-PEI, pourrait être utilisé dans le traitement par thérapie génique de pathologies autres que les cancers, en choisissant comme cibles d'autres MMP spécifiques de ces pathologies, telles celles citées par Bremer et *al.* [64] dans le domaine cardiovasculaire [139], dermatologique [140], ophtamologique (dégénération maculaire) [141], infectieux [142], immunologique[143], neurodégératif[144], en utilisant la séquence peptidique la plus spécifique pour chaque type de MMP impliqué.
- Enfin, notre modèle pourrait être appliqué à d'autres protéases. Ainsi la cathepsine D, semble-t-il sur-exprimée dans cellules cancéreuses du cancer du sein [61], serait également une cible d'intérêt. Un substrat peptidique de cette enzyme, de séquence Pro-Ile-Cys(Et)-Phe-Phe-Arg-Leu, fût utilisé par Tung et *al.* [123], pour visualiser, *in vitro*, l'activité de la cathepsine D de tumeurs sur-exprimant cette enzyme. Dans cette étude, le peptide-substrat est inclus entre du mPEG et un ligand fluorescent dans le proche Infra-rouge, le Cy5.5. Le clivage par la protéase libère, in situ, l'agent fluorescent qui peut être détecté par une sonde NIRF. Ainsi, ce ligand fluorescent pourrait avantageusement être remplacé par du PEI pour vectoriser spécifiquement, in situ, un gène thérapeutique dans une cellule cancéreuse, qu'elle soit disséminée ou constitutive des tumeurs.

Chapitre 5 : METHODES EXPERIMENTALES

5.1. Méthodes Biochimiques

Activation des progélatinases en gélatinases : 5 µg de pro-gélatinase B (MMP9, Calbiochem ref.444232, lot B37665) dissous extemporanément dans 45 µl de tampon Tris/HCl 0,1M pH 7,5, à 4°C, sont additionnés de 0,1 µmole de 4-amino-phénylmercuric acétate (APMA, Sigma réf. A9563), soient 5 µl d'APMA 20 mM dans NaOH 0,1N ajustés à pH 11. Après agitation, le mélange est maintenu 3H à 37°C, puis maintenu dans la glace jusqu'à utilisation ou jusqu'à conditionnement. Concentration de la gélatinase activée : 110 µg/ml

Conditionnement et conservation éventuels de la gélatinase activée (technique de J.L.Seltzer et al.[65]) : 35 µl de solution de gélatinase activée, sont additionnées de 185 µl de tampon Tris/HCl 0,05M pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, glycérol 20% (v/v), 1-10 O-phénantroline 1 mM. Après mélange et distribution en tubes de 40µl, la préparation est congelée sur carboglace et conservée à – 20°C. Concentration de la gélatinase activée congelée : 17,6 µg/ml.

La gélatinase activée congelée est réutilisée par décongélation lente des tubes sur de la glace. L'orthophénantroline et le glycérol sont éliminés par dessalage à 4°C de 40 µl d'échantillon décongelé sur 0,3 ml de Sephadex G25 préalablement équilibré avec du Tampon Tris/HCl 0,05M pH 7,5 CaCl₂ 10 mM. Après élution par 0,1 ml de tampon, la première fraction éluée de 140 µl contient la gélatinase activée. Concentration de la gélatinase récupérée : 30 µg /ml.

Hydrolyses enzymatiques des substrats

Hydrolyse de substrat peptidique commercial, suivi d'une analyse CLHP en phase reverse : Plusieurs substrats peptidiques commerciaux de gélatinases sont utilisés : Dnp-Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His-Ala-(D)Arg-NH₂ (Bachem M1905), Dnp-Pro-Leu-Gly-LeuTrp-Ala-(D)Arg-NH₂ (Bachem M1885). Ils sont d'abord dissous dans du DMSO (5 mg / 10 µl) et additionnées de tampon de dosage (Tris/HCl 0,05M, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1µM, pH 7,5) pour obtenir la Molarité adéquate (0,027M).

20 µl du substrat (540 nmoles), sont ajoutés à la gélatinase activée ou à 45 µl de surnageant cellulaire (dilué au 1/2 dans le tampon) et complétés à 110 µl par le tampon de dosage. Les incubations son effectuées en tubes Eppendorf de 0,5 ml à 37°C à différents temps. Après centrifugation rapide du tube pour récupérer l'eau évaporée, la réaction enzymatique est bloquée par addition de 3 µl de TFA 0,5% et mélangé par agitation. Ce mélange est congelé à – 20°C ou analysé directement en CLHP : 20 µl du surnageant de ce mélange, centrifugés 10 min. à 5000 RPM, sont injectés sur une colonne C18 (Vydac cat.218TP54, longueur 25 cm, granulométrie 5µ, porosité 300 Å), équilibrée avec du TFA 0,05%. Les produits d'hydrolyse sont séparés avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 60% dans du TFA 0,05% de 0 à 33 min. avec un débit de 2 ml / min. Les pics sont détectés à 220 et 280 nm sur un détecteur à barrette de diodes.

Effet de dérivés PEG et PEI sur l'activité gélatinase : Une quantité croissante de ces dérivés (3, 22, et 628 pmoles dans 5 µl) sont mis à incuber 18H. avec 0,5 pmole (45µl) de gélatinase B activée selon les conditions décrites, (pour obtenir des rapports molaires de 5,6, 44 et 1240 avec la gélatinase) avec 62 nmoles (20µl) de substrat Dnp-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-(D)Arg-NH₂, les composants de ce dosage étant tous dissous dans du tampon Tris/HCl 0,05M, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1µM, pH 7,5. Puis, 20 µl du surnageant de ce mélange, centrifugés 10 min. à 5000 RPM, sont injectés sur une colonne CLHP C18 (Vydac cat.218TP54, longueur 25 cm, granulométrie 5µ, porosité 300 Å), équilibrée avec du TFA 0,05%. Les produits d'hydrolyse sont séparés avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 60% dans du TFA 0,05% de 0 à 33 min. avec un débit de 2 ml / min. Les pics sont détectés à 220 et 280 nm sur un détecteur à barette de diodes.

Cinétique d'hydrolyse de « substrat-vecteur » avec mesure des groupements aminés apparus à la fluorescamine : 24 nmoles du substrat-vecteur, par exemple [mPEG-succ-(A)₃-PLGLWA]_n, dissous dans 1,6 ml de tampon MOPS 0,05M, CaCl₂ 5 mM, Cl₂Zn 0,5 mM, Brij[®] 0,01% pH 7,4, sont ajoutées à 12,5 pmoles de Gélatinase B (MMP9, Calbiochem ref. 4444232, lot B37665) - activée et préparée selon le protocole ci-dessus – à 42 pmoles/ml dans le même tampon, ou, à un volume déterminé de surnageant cellulaire. Après complément à 2 ml de mélange total réactionnel avec ce tampon, des prélèvements de 60 µl sont effectués à différentes heures, ajoutés à 940 µl de tampon phosphate 0,1M pH 8. Puis, 0,5 ml de fluorescamine à 0,3 mg / ml dans l'acétone sont ajoutés avec agitation immédiate. Au bout de 7 min. les lectures sont effectuées au Spectrofluorimètre Hitachi F 2000 (exc. 390 nm, ém. 475 nm.) réglé avec une fente de 10 nm.

Hydrolyse de substrat vecteur avec les surnageants cellulaires et analyse en chromatographie de perméation sur gel (CPG).

Technique A : 37 nmoles de substrat vecteur **8** [mPEG-NH-succ-(A)₃-PLGLWA]_n dissoutes dans 45 µl de tampon Tris/HCl 0,05M pH 7,4, sont additionnées à 0,056 nmole de gélatinase B (4 µg / 40 µl) dissoute dans du tampon Tris / HCl 0,05M CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1µM, Brij[®] 0,01%, pH 7,5 et éventuellement activée à l'APMA 2 mM, comme décrit précédemment. Dans le cas de l'élastase, 1,94 nmole (48µg / 5 µl) d'élastase pancréatique de porc ((Sigma ref.E-1250, lot 12K6780) est utilisée à la place de la gélatinase, le volume du mélange réactionnel étant complété à 140 µl avec le tampon Tris / HCl 0,05M pH 7,4. L'incubation est effectuée en tubes Eppendorf pendant 43 H à 37°C. Les mélanges réactionnels, aux temps 0 et 43H, sont ensuite déposés après courte centrifugation et agitation, sur une colonne de Sephadex G50[®] medium (Pharmacia), de longueur 16,5 cm et diamètre 1,6 cm, équilibrée avec du NaCl 0,05M. Le débit utilisé est de 1 ml /min. Les fractions de 1 ml sont ensuite lues à 220 nm sur un spectrophotomètre Cary 100 Varian.

Technique B: 11,7 μ moles (45 μ l) de « substrat- vecteur » dissous dans du tampon Tris/HCl 0,05M, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1 μ M, pH 7,5 et additionnés à 45 μ l de surnageant cellulaire. Les incubations sont effectuées en tubes Eppendorf de 0,5 ml à 37°C pendant 20H. Après agitation et centrifugation rapide pour récupérer l'eau évaporée, la réaction est bloquée à 0 et 20H par congélation du tube dans l'azote liquide, puis conservation éventuelle à - 20°C.

L'analyse CPG est effectuée par injection de 10 μ l d'échantillon sur une colonne Pharmacia Superdex 75 3.2/30 (Ref. 17-0771-01, Amersham Pharmacia Biotech), en système isocratique, avec comme éluant du tampon Tris 0,05M pH7,4, NaCl 0,15M, acétonitrile 30%, à 0,05 ml / min. Les pics sont détectés à 220 et 280 nm sur un détecteur à barrette de diodes.

5.2. Méthodes Biologiques

Mesure de compactage de l'ADN sur les vecteurs synthétiques, par fluorescence

La quantité d'ADN « compactable » au vecteur portant du PEI est mesurée en comparaison avec la même quantité de PEI seul, par une gamme, en duplicate, de ces deux composés ajoutés à une quantité constante d'ADN. Cette gamme correspond à des rapports croissants N/P de 5 à 15, soient à 3 à 6 nanomoles de PEI ou équivalents, pour une quantité constante d'ADN (50 ng). Ce mélange aqueux est alors additionné de Picogreen[®] à 0,5% dans du TBE 1X pour un volume total de 200 µl. La lecture est effectuée sur un lecteur en fluorescence pour microplaques Victor2 (Wallac) (λ_{em} . 485 nm, λ_{exc} .535 nm).

Mesure du potentiel ζ

Le potentiel ζ est mesuré en mV sur un appareil Delsa 440SX Coulter. Les échantillons à différents rapports N/P, dilués dans 2ml de NaCl 20 mM, sont mesurés en duplicate.

Transfection *in vitro*

Cellules mises en culture : cellules témoins fibroblastes 3T3 (NIH 3T3 CRL-1658), cellules de mélanome B16 (B16-FO CRL-6322), cellules de fibrosarcomes humains HT1080 (CCL-121).

Conditions de culture : les cellules sont cultivées, en milieu DMEM avec ou sans SVF (FCS) 10%, en plaques de 24 puits, pendant 24 H, à 37°C en incubateurs saturés à 5% de dioxyde de carbone. Un jour avant la transfection, les cellules sont transférées dans des plaques de 24 puits avec un nombre déterminé de cellules pour chaque type de cellules. Ces dilutions représentent approximativement 50 à 60% de confluence pour 24H.

transfection : les cellules sont additionnées de 50 µl de complexes « ADN / vecteur-substrat » (polyplexes) contenant le même % de PEI et préparé au moins 30 min. à l'avance. Ceux-ci, éventuellement à différents rapports N / P, contiennent 0.5 µg du plasmide « luciférase » (ADN PLX3031-pcorLUC). Après deux heures à 37°C, les plaques sans sérum, sont complétées avec du SVF (FCS) 10% (v/v) dans le même milieu. Toutes les plaques sont ensuite placées 24H à 37°C en enceinte sous CO₂ à 5%.

Lyse : les cellules transfectées sont lavées deux fois avec 500 µl de PBS (tampon phosphate) puis lysées avec 200 µl de réactif (Promega Cell culture lyse reagent).

Mesure de l'activité luciférase : 10 µl du milieu de lyse sont centrifugés à 12000 RPM pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est additionné dans un puits de microplaque, à une solution contenant le substrat luciférine, de l'ATP et du coenzyme A. La lumière émise est mesurée pendant 10 sec. Dans le Luminomètre Victor 2 (Wallac 1420 multilabel Counter). L'activité luciférase est rapportée à 2000 cellules traitées et est exprimée en unités de lumière relative (RLU), puis normalisée par rapport à la concentration de protéines de l'échantillon, mesurée par dosage à l'acide bicinchoninique (Kit Pierce[®] BCA, [125]).

5.3. Méthodes analytiques et préparatives :

Dosage des groupements aminés au TNBS [138] :

Une gamme d'échantillon de 1 ml de 0 à 40 $\mu\text{eq/l}$ de groupements aminés libres dans du tampon tétraborate de Na 0,1 M pH 9,4, est utilisée à partir d'une solution d'échantillon à 0,5 mM. Chaque dilution est additionnée de 25 μl d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS, picrylsulfonic acid solution, Fluka ref.92824) à 1% dans le DMF. Les échantillons sont lus au bout de 30 minutes à 420 nm.

Détection des groupements aminés en synthèse peptidique en phase solide [127] :

Quelques billes de résines conjuguées à des résidus portant des groupements aminés, sont additionnées d'une goutte de réactif TNBS et d'une goutte de DIPEA à 20% dans le DMF ; La coloration rouge orange apparaissant au bout de 5 min. indique la présence de groupements aminés.

Détermination quantitative du premier résidu « fmoc-amino-acide » couplé à une résine, en synthèse peptidique en phase solide : Une quantité de résine déterminée (portant environ 1 μmole de résidu couplé) est additionnée de 3 ml de pipéridine 20% dans le DMF et laissée en contact pendant 30 min. avec agitations intermittentes. La D.O. est mesurée à 290 nm sur le surnageant de résine traitée, contre une solution de pipéridine identique en témoin. La quantité de Fmoc chargée sur la résine, en mmole /g de résine, est égale à : $\Delta \text{D.O.} / (1,65 \times (\text{mg}) \text{ de résine})$

Dosage des groupements aminés à la Fluorescamine [128] :

Une gamme d'échantillon de 1 ml de 0 à 400 nEq/l de groupements aminés libres, dans du tampon phosphate 0,1 M pH 8, est additionnée sous agitation de 0,5 ml de fluorescamine (Sigma ref.F-9015) dissoute extemporanément à 0,3 mg/ml dans de l'acétone redistillé. A bout de 7 minutes, la fluorescence émise à 475 nm de l'échantillon soumis à une excitation de 390 nm, est mesurée.

Dosage du Polyéthylèneglycol [129] :

Une gamme de 0,8 ml de mPEG (P.M.5000) de 0 à 2 μM dans l'eau, est ajoutée à 0,2 ml de Cl_2Ba 5% dans HCl 0,1N et 0,2 ml de I_2 0,05% dans IK 2%. Après agitation et attente de 15 min. à température ambiante. La densité optique est lue à 550 nm.

Détection PEG en CCM : vapeurs d'iode, puis fixation à un mélange v/v de I_2/IK 2% et Cl_2Ba 5%. Coloration marron.

Détection du mPEG-NH₂ en CCM à la ninhydrine (Prolabo ref.30960-226) 0,5% dans le n-butanol et chauffage. Coloration bleue.

Détection des groupements acides organiques en CCM avec un mélange de 9 vol. de (vert de bromocrésol 0,075%, bleu de bromophénol 0,025% dans le méthanol) et de 1 vol. de (MnO_4K 0,25% , CO_3Na_2 0,5% dans l'eau), puis chauffage. Coloration bleue.

Détection qualitative des amines secondaires du L-PEI et dérivés : réactif de Dragendorff (Fluka ref.44578) (Nitrate basique de bismuth dans l'AcOH et l'EtOAc) et chauffage : coloration orange

Chromatographies couche mince (C.C.M.) du mPEG et dérivés : couche mince : Gel de silice 60 F₂₅₄[®] sur feuille plastique Merck (ref.1.05735). Phase mobile : DCM / MeOH 5 / 1 (v/v).

Élimination des petites molécules sur Sephadex G25[®] ou sur Sephadex LH20[®]

Les gels sont mis à gonfler 2H avant utilisation avec soit l'eau ou le tampon adéquat (Sephadex G25[®]) ou le solvant adéquat (Sephadex LH20[®]). Les gels sont déposés par décantation dans des corps de seringue en polypropylène sur bouchon de coton hydrophile ou dans des colonnes munies à leur base de verre fritté ou de téflon fritté.. La hauteur du gel est telle que la hauteur de l'échantillon déposé est inférieure à son 1/10^e. L'échantillon est déposé à la surface du gel, puis après sa pénétration, élué avec la solution de gonflement du gel. Des fractions de volume adéquat sont recueillies. 2 µl de chaque fraction sont alors déposés sur bandes C.C.M. Leur contenu est identifié par les méthodes de détection spécifiques décrites et les fractions sont rassemblées en conséquence, lyophilisées ou évaporées à sec.

Chromatographies de perméation sur gel (Sephadex G50[®]). Elles sont effectuées sur une colonne en verre de 1,6 cm de diamètre, remplie de Sephadex G50[®] (préablement gonflé dans le tampon d'éluion), sur une longueur de 30 cm entre deux adaptateurs (LKB). L'échantillon est déposé par l'adaptateur supérieur à l'aide d'une pompe péristaltique Ismatec MS-CA2/860C et élué avec du NaCl 0,05M, ou de l'eau, à un débit de 0,8 ml /min. Les fractions sont collectées dans des tubes de 10 ml sur un collecteurs Gilson FC203B. Lorsque le résidu Tryptophane est contenu dans l'échantillon à séparer, l'éluat est détecté en continu à 280 nm sur un détecteur Gilson Spectrochrom M à longueur d'onde variable, la densité optique (D.O.) étant mesurée sur un enregistreur. Sinon les fractions sont analysées sur un spectrophotomètre, particulièrement pour les courtes longueurs d'onde (220 nm), ou, analysées par détecteurs colorimétriques.

Spectres Ultra-Violet (U.V.) des échantillons. Ils sont effectués à concentration adéquate, sur un spectrophotomètre U.V./ visible à double faisceau CARY 100 Scan, en densité optique (D.O.), entre 500 et 200 nm, contre le tampon ou le solvant de solubilisation.

Chromatographie liquide à haute pression (C.L.H.P.) en phase inverse : elles sont effectuées sur un chromatographe WATERS 4000, muni d'un logiciel de pilotage et d'exploitation Millennium, d'un passeur d'échantillon « WATERS 717 plus » et d'un détecteur à barrette de diodes WATERS 996. Les éluants TFA 0,05% et Acétonitrile / TFA 0,05% sont dégazés par un bullage à l'hélium. Le débit généralement choisi est de 0,8 ml /min. La composition du gradient d'acétonitrile et le choix des colonnes en phase inverse, sont déterminés en fonction des séparations. Les pics sont mesurés à 220 nm et 280 nm (si le produit à analyser contient du tryptophane) et leurs spectres sont analysés directement grâce au détecteur à barrette de diodes.

Analyses Infra-Rouge (I.R.) des échantillons. Elles sont effectuées sur un Spectromètre I.R. Nicolet 210 à transformée de Fourier, dont le logiciel d'exploitation permet une accumulation des données et une soustraction des spectres. Les échantillons solubles dans DCM sont analysés dans ce solvant à environ 9 mg/ml, leur réponse étant soustraite de la réponse du solvant seul. Les échantillons insolubles dans le DCM (et solubles dans l'eau) sont mélangés en poudre anhydre à du KBr (1mg / 120mg) au mortier et compressés sur une presse à 900 Bars pour obtenir une pastille translucide.. Les pics sont affectés d'une valeur de nombres d'onde (cm⁻¹) et mesurés en % de Transmission.

Analyses par Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) des échantillons. Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre R.M.N. Bruker Avance DRX à la fréquence de 300,13 MHz pour le proton et de 75,47 MHz pour le carbone. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme référence interne. Les produits solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants organiques sont analysés en D₂O. Les produits plus hydrophobes sont analysés en CDCl₃.

Synthèse peptidique automatisée en support solide. L'appareillage utilisé est un synthétiseur Applied Biosystem, modèle 431 A. Les synthèses sont effectuées en « chimie fmoc », avec couplage au DCC et HOBt dans du DCM, en présence de DMAP sur support solide (résine substituée). Les déprotections des groupements Fmoc sont effectuées avec de la pipéridine. Les lavages sont effectués avec du DCM et de la NMP.

Quantification de Fmoc-amino-acides substitués sur une résine. 1 à 2 mg de résine substituée, pesée dans une cuve de spectrophotomètre en quartz (QU ou QS), est additionnée de 3 ml de pipéridine / DMF 20 /80 (v/v). Au bout de 30 min, une lecture est effectuée à 290 nm contre un témoin pipéridine / DMF 20 /80 (v/v). Une moyenne est effectuée sur des pesées différentes. La quantité de Fmoc-amino-acides couplés est égale au quotient : $D.O._{290nm} / (1,65 \times n \text{ mg})$ et est exprimé en mmoles / g de résine.

Spectrométrie de masse

Deux techniques ont été utilisées en fonction des disponibilités du matériel :

1) *Spectrométrie de masse seule.* 5 µl d'échantillon à 10 ppm dissous dans l'éluant MeOH / H₂O ,70/30 (v/v), sont injectés en FIA (Flow Injection Analysis) dans un spectromètre de Masse Applied Biosystem API3000 en ESI (électrospray ionisation) à 200°C. Les résultats sont exprimés en m/z, en ions positifs (MS+) et négatifs (MS-). (Service de Spectrométrie de masse ENSCP)

2) *Technique LC / MS.* Un maximum de 20 µl d'échantillon, contenant au minimum 10 nanomoles de produit à analyser, dissous dans MeOH, sont injectés sur une colonne CLHP C8 montée sur un ensemble Shimadzu LCMS-2010. L'élution est effectuée à 1 ml/min. par un gradient d'acétonitrile 30 à 70 % en 15 min. dans de l'acide formique 0,1%. Les détections sont effectuées en ligne, en UV sur un détecteur à barette de diodes SPD-MD10, un détecteur à diffusion de la lumière ELSD et un détecteur « électrospray » (ESI), mesurant la masse de 70 à 2000 en poids moléculaire (MS+ et MS-).

Analyse des acides aminés contenus dans les « vecteurs-substrats ».

1 mg d'une molécule est dissous dans 1 ml de HCl 6N en flacon à fond conique de 3 ml (Pierce ref.13222), puis hydrolysée pendant 1 nuit à 110°C dans un bloc chauffant Reactitherm Pierce ref.18790. Au bout de ce temps, le contenu des tubes est centrifugé 10 min. à 10000 RPM en tubes Eppendorf. Le surnageant est ensuite filtré sur membrane de « cut-off » 10000, en poids moléculaire, par centrifugation pendant 15 min. à 10000 RPM. 20 µl de surnageant sont injectés dans l'appareil LC/MS dans les conditions décrites, mais avec un réglage de lecture, de M/Z de 70 à 250, en Electrospray (ESI).

Détermination du rapport molaire PEG / PEI d'une molécule substrat et calcul du % de PEI Ce calcul est basé sur le rapport des protons en 1-H RMN mesuré par intégration.

Les quantités théoriques de protons dans une mole de L-PEI de P.M. 22000, est de **2048**, le L-PEI possédant 512 unités de CH₂-CH₂-N de P.M.43 de 4 protons. Pour le B-PEI (PEI branché), le poids Moléculaire étant de 25000, on dénombre 2324 protons par mole. Le mPEG, de Poids Moléculaire d'environ 5000, possède **452** protons par mole, étant composé de 113 unités de CH₂-CH₂-O de P.M. 44 et de 4 protons.

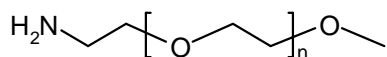
Le rapport molaire PEG/ PEI est alors ainsi évalué quand, par exemple, l'on a une intégration de 0,5 en protons pour le PEG et de 1 pour le PEI en RMN. Ainsi, pour 2048 protons de PEI on a 1024 protons de mPEG, ce qui correspond à 1024 / 4, ou, 256 moles d'unités « CH₂-CH₂-O ».

Comme le PEG utilisé, de P.M. de 5000, a des sous-unités CH₂-CH₂-O de masse 44, cela correspond à 256 X 44 = 11264 g de m PEG, soient « 11264 / 5000 » moles de mPEG ou **2,25** moles de mPEG. Dans ce cas, le rapport molaire est de **2,25** moles de PEG pour 1 mole de L-PEI.

Dans ce rapport de protons obtenu pour une molécule qui possède par exemple, en théorie, une mole de L-PEI (P.M. 22000), deux moles de PEG (P.M.5000) et une mole de peptide (P.M. env.1000), le % en PEI, par rapport à la masse totale du produit, est donc égal à (22000 / (22000 + 11264 + 1000)) x 100, soit environ 62,8% (w/w).

5.4. Méthodes de Synthèse

m-PEG₅₀₀₀-NH₂ ou α methoxy-ω amino-poly (éthylène glycol 5000) 1 :



méthode 1 : Le mPEG₅₀₀₀-NH₂ a été purifié à partir d'un mélange fourni par le laboratoire et ainsi synthétisé : le méthoxyPEG₅₀₀₀-OH (7,8 mmoles) préalablement séché sous argon à 80°C est solubilisé dans DCM et additionné de Et₃N (50 ml) et de p-toluene sulfonyl chlorure (19,3 mmoles), pour réagir pendant 48 H. Le mélange est concentré deux fois, puis précipité avec Et₂O.

Le mPEG-O-tosyl synthétisé, solubilisé dans du DMF, est mis à réagir à 70°C pendant une nuit avec de l'azide de sodium (20 mmoles). Le mélange est évaporé à sec, repris par DCM, filtré et précipité avec Et₂O pendant une nuit. 18 g de précipité contenant du mPEG₅₀₀₀-N=N⁺=N sont obtenus.

Le mPEG₅₀₀₀-N=N⁺=N obtenu est réduit à 40°C pendant 30 minutes avec 19,8 mmoles de triphénylphosphine en THF. Le produit repris à l'eau est isolé, évaporé à sec, repris par DCM / EtOH, puis reprécipité avec Et₂O.

Le mPEG₅₀₀₀-NH₂ synthétisé est purifié à partir d'une fraction des 17 g obtenus de mélange « mPEG₅₀₀₀-NH₂ + mPEG₅₀₀₀-OH » (env.50/50, w/w), sur résine échangeuse de cations Amberlyst[®] 15 (H⁺) à 1,75 meq H⁺/ml. La fixation du mPEG₅₀₀₀-NH₂ s'effectue à partir de 1,8 g du mélange à une concentration de 5 mg/ml à un débit de 3,6 ml/min sur un lit de résine de 140 ml. La majeure partie de mPEG₅₀₀₀-OH restant est décrochée avec NaCl 0,035M. Le mPEG₅₀₀₀-NH₂ est décroché par du NaCl 0,85 M, puis concentré à 75 ml, ajusté à pH 11 avec NaOH 50% pour le transformer en forme base, et enfin extrait par 2 x 75 ml de DCM. L'extrait obtenu est concentré sous vide et séché sur P₂O₅. Analyse **CCM** : DCM / CH₃OH (5/1, v/v). Détection : 1) I₂ et mélange IK 2%+ Cl₂Ba 5%, : mPEG₅₀₀₀-NH₂, Rf 0,42, env 95% ; mPEG₅₀₀₀-OH, Rf 0,62, env.5 %.

2) ninhydrine. : mPEG₅₀₀₀-NH₂, Rf 0,42. **1-H RMN** (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm 2,82 (4H, CH₂-CH₂-N-), 3,38 (3H CH₃-O-), **3,65** (nH, CH₂-CH₂-O-). 5,3 (nH, NH₂-).

IR (BrK) ν (cm⁻¹) : 840, 953, 1116, 1224, 1301,1342, 1357, 1413, 1465, 1557, 1614,1967, **2893** (C-H : -CH₂-O-, CH₃-O-), **2457**(N-H, -NH₂).

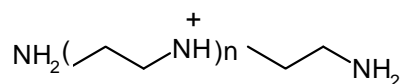
méthode 2 : synthèse et purification de mPEG₅₀₀₀-NH₂ :

Synthèse de mPEG₅₀₀₀-N=N⁺=N : 5 mmoles de mPEG₅₀₀₀-OH dissoutes dans 80 ml de DMF, sont additionnées de 20 mmoles de triphénylphosphine. Le mélange soluble est refroidi à 10°C puis additionné de 20 mmoles de N-bromosuccinimide. Le mélange est alors ajusté à 60°C et la réaction de formation du dérivé bromé du mPEG₅₀₀₀, s'effectue pendant 3H. Après refroidissement du mélange à température ambiante, l'on ajoute 2 ml de CH₃OH, puis 50 mmoles d'azide de sodium. Le mélange réactionnel est maintenu une nuit à 70°C sous agitation. Le mélange réactionnel est filtré sur papier. Le contenu du filtrat est précipité avec

Et₂O. Le précipité obtenu est solubilisé dans du DCM puis reprécipité avec Et₂O et séché sous vide. Analyse **CCM** : (DCM / MeOH (5/1, v/v), détection : I₂ et mélange IK 2%+ Cl₂Ba 5% : mPEG₅₀₀₀-N=N⁺=N, Rf 0,78. **1-H RMN** (CDCl₃ 300 MHz) δ ppm : 1,93 (4H, -CH₂-CH₂-N₃), 3,4 (3H, -OCH₃), **3,66** (nH, -CH₂-CH₂-O). **IR** (KBr) ν (cm⁻¹) : 842, 962, 1060, 1109, 1147, 1241, 1280, 1342, 1359, 1466, 1721, 1964, 2099 (C-N=N⁺=N), 2884 (C-H : CH₂, CH₃)

Synthèse de mPEG₅₀₀₀-NH₂ . 2 mmoles de mPEG₅₀₀₀-N=N⁺=N sont solubilisées dans 80 ml de THF à 40°C puis additionnées de 15 ml de DCM. Une suspension opalescente est obtenue. 10 mmoles de triphénylphosphine sont alors ajoutées sous agitation, la réaction étant maintenue 1H à 40°C. Au bout de ce temps, 2ml de H₂O sont ajoutés et la réaction est maintenue une nuit sous agitation à 40°C. Le mélange réactionnel est évaporé à sec puis resolubilisé dans un mélange DCM / EtOH 1/1 (v/v) dont le contenu est précipité avec Et₂O. Le produit est repurifié par solubilisation dans 250 ml de H₂O et extrait avec 2 fois 250 ml de DCM. L'extrait évaporé à sec est repris par 40 ml d'EtOH et son contenu est précipité avec Et₂O. Analyse **CCM** : (DCM / MeOH (5/1, v/v). Détection : 1) I₂ et mélange IK 2%+ Cl₂Ba 5%, 2) ninhydrine : mPEG₅₀₀₀-NH₂, Rf : 0.36. **1-H RMN** (CDCl₃, 300 MHz) δ ppm 2,93 (4H, CH₂-CH₂-N-), 3,39 (3H CH₃-O-), **3,65** (nH, CH₂-CH₂-O-). 5,3 (nH, NH₂-). **IR** (KBr) ν (cm⁻¹) : 850, 963, 1060, 1111, 1147, 1239, 1275, 1342, 1357, 1475, 1639, 1803, 1967, 2167, 2243, 2356, **2878** (C-H : CH₂-O-, CH₃-O-), **3436** (N-H, NH₂).

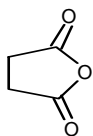
H- L-PEI-H (poly(éthylèneimine linéaire)) : 2



1 mmole de polyethoxazoline (PEOX) est ajoutée doucement à 300 ml d'eau distillée dans un ballon tricol, puis agitée jusqu'à dissolution complète (2H.). 75 ml de HCl 12 N (900 meq) sont alors ajoutés. L'hydrolyse est effectuée sous agitation, à 100°C et à reflux pendant 24 H. L'acide propionique libéré est distillé jusqu'à l'obtention de 250 ml de distillat. Le polymère L-PEI restant est additionné de 250 ml de NaOH 12,5 N. Le polymère devient visqueux et colle aux parois. La soude est ainsi éliminée par décantation, puis un lavage est effectué avec 500 ml d'eau distillée. Une nouvelle décantation est mise en oeuvre, puis 900 ml d'eau distillée sont rajoutés. Le produit est alors chauffé à 95-100°C, sous agitation, jusqu'à dissolution. La solution de polymère est versée dans un béccher et laissée à refroidir. Les cristaux apparus sont vigoureusement lavés par 250 ml d'eau distillée froide. La masse gélatineuse est alors filtrée sous vide puis redissoute dans 1300 ml d'eau distillée à 90°C. Le produit est de nouveau recristallisé par refroidissement. Après filtration, le polymère PEI est séché à 85°C sous vide pendant 72 H. **IR** ν (cm⁻¹), DCM, 3260, 2940, 2893, 2828, 1635, 1456, 1273, 1123). **1-H RMN** 300MHz (D₂O) δ **2,7** ppm (CH₂-CH₂-N) ; traces : 3,4 ppm (CH₂-CH₂-N terminaux), 2,37 ppm (CH₂ propionate), 1,64 ppm (CH₂ propionyl), 1,1 ppm (CH₃ propionyl, propionate).

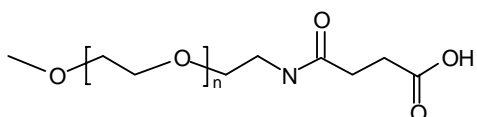
13-C RMN 300 MHz (CDCl₃) δ **48.6** ppm (CH₂-CH₂-N) ; traces : 26,4 ppm (CH₂ propionyl), 9,57 ppm (CH₃ propionyl).

Anhydride succinique : 3



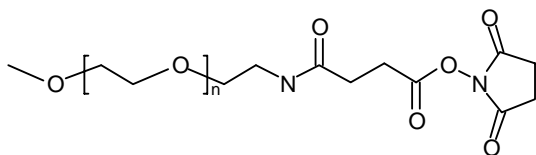
purification : 11g d'anhydride succinique commercial sont dissous dans 100 ml de DCM anhydre. On y ajoute 100 ml de CO₃HNa 10% (w/v). Le mélange est agité 30 min. puis décanté. La phase inférieure est recueillie puis déshydratée sur SO₄Mg₂. La solution est filtrée et évaporée à sec. Poids obtenu 4,83 g. (rdt : 44%). **1-H RMN** (D₂O, 300MHz) δ 2,49 ppm.

m-PEG₅₀₀₀-NH-CO-CH₂-CH₂-COOH : 4



A 0,060 mmoles de mPEG₅₀₀₀-NH₂ **1**, dissoutes dans 45 ml d'eau, sont additionnées pendant 2H, sous agitation, de petites quantités d'anhydride succinique purifié (1,2 mmole totale), tout en maintenant à chaque fois le pH à 9 avec NaOH 1N. Le mPEG-NH₂ non succinylé est ensuite retenu sur 12,5 ml de résine Amberlyst[®] 15 (H⁺) à 1,75 mEq H⁺ / ml ou résine Dowex (H⁺). La fraction non retenue est lyophilisée et dosée en groupements aminés libres restants, au TNBS. Le taux de succinylation est déterminé à partir de solutions, avant et après succinylation à 0,5 mM. (Taux de succinylation : 1) avant Amberlyst[®] (H⁺) : 93%, 2) après Amberlyst[®] : 100%). L'acide succinique libre est retenu par filtration sur gel sur Biogel P6[®] ou Sephadex G25[®]. Les fractions sont analysées sur gel de silice de plaques **CCM** par coloration du dérivé PEG à l'iode, suivi du mélange IK 2%, Cl₂Ba₂ 5%. L'absence d'acide succinique libre est vérifiée par coloration au réactif des acides organiques (bleu). Les fractions rassemblées sont lyophilisées. Analyses : **1-H RMN** (CDCl₃, 300 MHz), δ : 2,54 ppm (2H, α CH₂), 2,63 ppm (2H, β CH₂), 3,38 ppm (3H, O-CH₃), **3,645** ppm (nCH₂, PEG), 5,29 ppm (1H, NH). **1-H RMN** (D₂O, 300 MHz) δ 2,53 ppm (4H, CH₂-CH₂), 3,25 ppm (3H, O-CH₃), **3,55** ppm (nCH₂, PEG), 5,6 ppm (1H, NH). **I.R.**(KBr) : ν (cm⁻¹) 1337 (C-N, CO-NH), 1470 (CH₂, PEG), 1654 (CO-NH), 1710 (COOH). **Dosage TNBS** : absence de groupements aminés libres.

mPEG-NH-succinylsuccinimide **5** [126]



A 0,016 mmole de mPEG-NH-succinyl **4** dissoute à 50°C dans l'EtOAc, sont additionnées sous agitation, de 0,162 mmole de NHS, puis de 0,081 mmole de DCC. Agitation 17 H à 37°C. Au bout de ce temps le DCU formé est centrifugé 10 min à 5000 RPM. Le surnageant est traité au charbon activé. Au bout de 2 min d'agitation, le mélange est centrifugé 10 min. à 5000 RPM. Le surnageant est amené à 0°C. Le précipité alors formé est centrifugé, débarrassé de son surnageant et repris par l'EtOAc. Le produit est reprécipité dans ce solvant à 0°C. Cette opération est répétée 3 fois. Le précipité final est relavé à l'EtOAc froid puis avec Et₂O. Rendement final : 33 %. **1-H RMN** (CDCl₃) δ 2,55 ppm (4H CH₂-CH₂ succ), 2,63 (4H CH₂-CH₂ succinimide), 3,39 (3H, -O-CH₃), **3,65** (nH, CH₂-CH₂-O PEG).

mPEG-NH-succinyl-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-OH : **6**

Synthèse directe : 0,0156 mmole de mPEG-NH-CO-CH₂-CH₂-COOH **4** est dissoute par addition de 1 ml de DMF puis de 0,5 ml de H₂O. 1,156 mmole de NHS dans le DMF est ajoutée, puis goutte à goutte : 0,078 mmole d'EDC sous forme de 130 µl d'un mélange avec DMF/eau 1/1 (v/v). Au bout de 24 H d'agitation à T.A., le mélange est rapidement débarrassé des réactifs de petits poids moléculaires par passage sur Séphadex LH20[®], avec comme éluant le mélange DMF/H₂O 1/1 (v/v). Le contenu des fractions obtenues est visualisé par le réactif du mPEG : I₂ / IK / CO₃Ba par dépôt de prélèvements de 2µl sur bande CCM. Les fractions contenant la molécule supposée mPEG-NH-succinylsuccinimide, sont rassemblées et aussitôt additionnées, goutte à goutte, de 0,0156 mmole du peptide H-(A)₃-PLGLWA-OH dissoutes dans 0,5 ml de tampon phosphate 0,05M pH 8, sous glace. Le mélange est agité sous azote pendant 20 H, en laissant revenir à température ambiante. Le mélange réactionnel est alors déposé sur une colonne de Sephadex G25 pour éliminer la partie de peptide non couplée. Le mPEG-NH-succinyl-(A)₃PLGLWA-OH sort dans le 1^{er} pic détecté au réactif à l'iode. Rendement global 43%. Spectre **UV** : épaulement à 280 nm (Trp). **1-H RMN** (D₂O, 300 MHz) δ 1,1ppm (nH, CH₃ Leu, Ala), 1,76 ppm (nH, βCH₂ Leu, γCH₂ Pro), 2,31 ppm (?), 2,43 ppm – 2,49 ppm (nH CH₂-CH₂ succ.), 2,84 ppm (2H CH₂-NH), 3,24 ppm (3H, -OCH₃), **3,56** ppm (pic majeur nH, CH₂-CH₂-O PEG).

*Synthèse à partir de mPEG-NH-succinylsuccinimide **5** isolé* : 0,0372 mmole de cette molécule dissoute dans 1 ml de DMF est additionnée goutte à goutte de 0,0248 mmole de H-(A)₃-PLGLWA-OH préalablement dissoute dans 1 ml de tampon phosphate 0,05M pH 8. Agitation sous azote pendant 20 H à T.A. Au bout de ce temps, le dérivé mPEG est précipité par addition de 150 ml de Et₂O

à 0°C. Le surnageant est décanté et éliminé. Le précipité, séché par évaporation de Et₂O restant, est dissous dans 2 ml d'un mélange éthanol/eau 1/1 (v/v), qui est ajusté à pH 2 avec 25 µl de HCl 0,1N. Le peptide non couplé est éliminé par passage de ce mélange sur Amberlyst (H+) préalablement équilibré à l'eau. Le dérivé PEG non accroché et collecté, est rassemblé après identification avec le mélange I₂ / IK / CO₃Na₂. La fraction évaporée à sec est reprise par 0,7 ml de H₂O et éliminée de ses petites molécules par CPG sur Séphadex G25[®]. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics visibles : δ ppm 1 (nH CH₃ Leu, Ala), 2,65 (4H CH₂-CH₂ succ), 3,3 (3H, -O-CH₃), **3,65** (nH -CH₂-CH₂-O, PEG). **1-H RMN** (400 MHz) δ ppm nH 7,11, 7,33, 7,52, CH Trp).

L-PEI Chlorhydrate : 7

0,022 mmole de L-PEI base **2**, est solubilisée par addition de 2,7 meq de HCl (27 ml HCl 0,1N), puis chauffage à 50°C pendant le temps nécessaire à sa dissolution (1H). Le produit soluble obtenu est à pH 8.

Le sel partiellement formé est passé sur colonne de Séphadex G25[®] (220 ml de gel (colonne Long.18 cm, diam. 3,5 cm), collecté, identifié au réactif de Dragendorff, rassemblé, lyophilisé ou concentré à sec à l'évaporateur rotatif.

Alternativement, la solution salifiée est directement passée à l'évaporateur rotatif, puis lyophilisée, sans passage par le Sephadex G25[®].

Le produit évaporé à sec ou lyophilisé, doit être repris d'abord avec de l'eau à 50°C pour solubilisation, puis additionné ensuite de DMF pour obtenir à chaud un mélange soluble dans le DMF/eau, aux concentrations adéquates pour les couplages.

[mPEG-NH-succinyl-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala]₂-PEI : 8 (substrat)

0,007 mmole de mPEG-NH-succinyl-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-OH **6** obtenue par synthèse directe, dissoute dans 1 ml de DMF/eau 50/50 (v/v), est additionnée de 0,0007 mmole de HOBt dans 39µl de DMF. Au bout de 15 min. d'agitation sous azote, sont ajoutés 0,007 mmole de EDC dans 92 µl de DMF et 0,007 mmole de Et₃N, puis, goutte à goutte, 0,007 mmole de L-PEI-HCl **7** dissoute dans 1,5 ml de DMF/H₂O 50/50 (v/v). Agitation 72 H sous azote sur bain de sable à 50°C. La molécule synthétisée est séparée du dérivé PEG **6** non couplé, par CPG sur Sephadex G50 avec comme éluant du NaCl 0,05M. La 1^{ère} fraction contenant le PEI-(X-PEGm)₂, donc contenant seulement, à la fois, du dérivé PEI identifiée au réactif de Dragendorff et du dérivé mPEG identifié au réactif à l'Iode, est rassemblée, évaporée à sec et reprise par 4 ml d'un mélange EtOH / eau 1/1 (v/v) puis partiellement dessalée sur Sephadex G25[®]. La fraction PEI-(X-PEGm)₂ collectée, et de nouveau identifiée, est rassemblée, évaporée à sec et reprise par de l'éthanol. L'insoluble NaCl restant est centrifugé 10 min. à 5000 RPM. Le précipité NaCl est lavé à l'éthanol et recentrifugé.

Le produit attendu, contenu dans les surnageants éthanoliques, est débarrassé de l'éthanol par évaporation. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm 0,92 0,93 1,01 1,03 (nH CH₃ Ala, Leu), 2,31 -2,33 (4H CH₂-CH₂ succ), **2,84** (nCH₂-CH₂N PEI), 3,22 (3H CH₃-O), **3,54** (nCH₂-CH₂-O PEG), 7,94 (nH Trp). Acide

aminés détectés en LC / MS après hydrolyse HCl 6N : Pro, Leu, traces de Ala et Gly, Trp non détecté.

Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Cys(acm)-OH 9

1,8 mmole de Fmoc-Lys(Boc)-OH (Novabiochem ref. 04.12.1026) dans 5 ml de DMF anhydre sont rajoutés à 1 g de résine substituée H-Cys(acm)-2-Cl-trityl-résine, contenant 0,3 mmole de cystéine (Novabiochem 04.12.2822). Après nappage d'azote, une agitation lente rotative est effectuée pendant 15 min. 1,8 mmole de PyBOP dans 2 ml de DMF, puis 2,4 mmoles de DiPEA (0,42 ml) sont ensuite rajoutés. Après nappage d'azote, une agitation lente de 4H est mise en oeuvre. Au bout de ce temps, la résine est filtrée sous pression d'azote et lavée 3 fois avec 5 ml de DMF.

Les groupements aminés non substitués de la cystéine, sont ensuite "capés" avec 5,2 mmoles d'(AcO)₂O contenue dans 5 ml de DMF. Après addition de 0,28 mmole de DiPEA, la résine est agitée sous azote pendant 30 min. Au bout de ce temps, la résine est filtrée et lavée 3 fois avec 5 ml de DMF. L'absence de groupements aminés libres est vérifiée au réactif au TNBS.

La Fmoc-Lys(Boc)-Cys(Acm)-2-Cl-résine, est déprotégée du groupement Fmoc, par addition de 1 ml de pipéridine à 20% (v/v) dans le DMF et agitation rotative, sous azote, pendant 30 min. La déprotection est vérifiée au réactif au TNBS (coloration rouge).

Le cycle de couplage du Fmoc-Lys(Boc)-OH est répété 1 fois. Le dernier couplage est effectué dans les mêmes conditions avec 1,8 mmole de Boc-Lys(Boc)-OH (Novabiochem ref. 04 12 0063) suivi uniquement d'un « capage » à l'(AcO)₂O. La résine substituée est lavée 3 fois avec 10 ml de DCM, puis avec 3 fois 10 ml de MeOH.

Clivage de la résine : la résine substituée : Boc-(Lys(Boc))₃-Cys(acm)-resine est clivée par addition de 10 ml de AcOH / TFE / DCM 2/2/6 (v/v) et agitation rotative sous azote pendant 2H à T.A. Au bout de ce temps, le filtrat est recueilli, évaporé à l'évaporateur rotatif. Il est ensuite additionné de cyclohexane puis réévaporé pour éliminer l'AcOH. Cette opération est effectuée deux fois. Rdt 34%.

Après analyse CLHP sur colonne C8 (équilibrée en TFA 0,05%, élution : gradient d'acétonitrile de 2 à 95 % dans le TFA 0,05%), le produit présente deux pics à ce stade : Rt 13,7 min et 31,55 min.

Le produit est alors purifié sur cartouche C8 équilibrée avec 20 ml de TFA 0,05%. 3 fractions sont obtenues après élution d'acétonitrile de 40% puis 90% d'acétonitrile dans le TFA 0,05 %. La dernière fraction contient le produit pur en CLHP : Rt 31,7 min. **M/z** (ES) : 999,8 [M+Na]. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 1,44 (CH₃ Boc), 1,98-2,04 (CH₂ Lys), 3,1 (CH α Lys).

H-Lys-Lys-Lys-Cys-NH₂ 10

Synthèse sur synthétiseur automatique Applied Biosystem model 431A : Après un cycle de déprotection du groupement Fmoc, des 0,3g de résine Fmoc-Rink-amide MBHA (0,192 mmole) avec de la pipéridine à 20% dans le DMF, le peptide immobilisé "H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-O-Rink-amide" est synthétisé par des couplages automatiques successifs avec le DCC et le HOBt des acide aminés suivants protégés, ajoutés par 0,96 mmole : Fmoc-Cys(Trt)-OH (Novabiochem 04.12.108) et 3 fois Fmoc-Lys(Boc)-OH (Novabiochem 04.12.1026). Les

déprotections successives des groupements Fmoc, à la pipéridine, sont suivis au fluorimètre.

Clivage de la résine : Le peptide-amide est libéré de la résine greffée, par addition de 3 ml du mélange TFA / EDT / TIS / H₂O 94,5 / 2,5 / 1 / 2,5 (v/v), sous azote, puis contact, sous agitation rotative lente, pendant 3H. Le filtrat est alors recueilli sous azote. La résine est lavée par 2 fois 3 ml de mélange de clivage, sous azote.

Purification : Les filtrats rassemblés, sont additionnés, sous agitation, à 500 ml de Et₂O, sous glace. Après contact pendant 3H, la majeure partie de la phase supérieure est éliminée. La phase inférieure est additionnée de nouveau par 50 ml de Et₂O et ré-extraite par agitation. Après décantation, la phase aqueuse est recueillie et ré-extraite avec 2 fois 100 ml de Et₂O. Réciproquement, les phases étherées sont rassemblées et extraites avec 2 fois 50 ml de H₂O. Les fractions aqueuses rassemblées sont débarrassées de leur éther résiduel à l'évaporateur rotatif, puis lyophilisées.

La molécule ne s'accrochant pas sur phase reverse C18, l'extrait est purifié par passage sur cartouche C18 (Tube SPE Discovery Supelco ref. DSC18LT de 500 mg / 3ml) équilibrée avec du TFA 0,05%. L'éluat initial (breakthrough) est dessalé sur Sephadex G10, avec H₂O comme éluant. L'échantillon détecté à la ninhydrine est rassemblé et lyophilisé.

Le produit encore impur en analyse CLHP, est repris par de l'eau et ré-extrait avec deux fois 50 ml d'EtOAc. Il est ensuite évaporé à sec, repris par 1 ml de MeOH, additionné à 200 ml de Et₂O sous glace, laissé précipiter pendant 16H. Le précipité est recueilli sur verre fritté de porosité N°4. Le précipité est repris par 2 fois 5 ml de MeOH, puis évaporé à sec. 140 mg sont obtenus. **M/z** (ES) : 505.7 [M+H]⁺ (et impureté d'environ 30% : 561.7 [M+H]⁺). **CLHP C18** (gradient de 0-60% en 33 min. TFA 0,05%, débit 2 ml / min Rt 2.1 min. (molécule non retenue sur colonne C18).

Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH 11

a) 0,36 mmole de "H-Lys(Boc)-2-Cl-trityl-résine" (Novabiochem ref. 04-12-2802) sont mis en suspension dans 5 ml de DMF anhydre contenant 0,9 mmole de Fmoc-Lys(Boc)-OH (Novabiochem ref.04-12-1026). Après agitation de 15 min. à T.A., 0,9 mole de HBTU, 0,9 mmole de HOBt (ref.15276,0) et 1,8 mmole de DiPEA (Aldrich 12580-6) contenus dans 5 ml de DMF anhydre, sont ajoutés. La résine et le milieu réactionnel sont agités par rotation pendant 1H à T.A. Au bout de ce temps, la résine est filtrée et lavée avec 2 fois 5 ml de DMF. L'absence de groupements aminés libres est vérifiée au TNBS.

b) La résine substituée est déprotégée du groupement Fmoc, par addition de pipéridine à 20 % dans le DMF. Après agitation pendant 5 min, la résine est filtrée et lavée par 3 fois 5 ml de DMF. Les groupements aminés apparus sont mis en évidence au TNBS.

c) 0,36 mmole de "H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-2-Cl-trityl-résine" (Novabiochem ref.04-12-2802) sont mis en suspension dans 5 ml de DMF anhydre contenant 0,9 mmole de Fmoc-Lys(Boc)-OH (Novabiochem ref.04-12-1026). Après agitation de 15 min. à T.A., 0,9 mole de HBTU (Sigma ref.B2728), 0,9 mmole de HOBt (ref.15276,0) et 1,8 mmole de DiPEA (Aldrich 12580-6) contenus dans 5 ml de DMF anhydre, sont ajoutés. La résine et le milieu réactionnel sont agités par rotation pendant 1H à

T.A. Au bout de ce temps, la résine est filtrée et lavée avec 2 fois 5 ml de DMF. L'absence de groupements aminés libres est vérifiée au TNBS.

d) La résine substituée est déprotégée du groupement Fmoc, par addition de pipéridine à 20 % dans le DMF. Après agitation pendant 5 min, la résine est filtrée et lavée par 3 fois 5 ml de DMF. Les groupements aminés apparus sont mis en évidence au TNBS.

e) 0,36 mmole de résine substituée "H-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-2-Cl-trityl-résine" dans 5 ml de MeOH, est re-substituée par un groupement Boc par addition 0,41 mmole de di-t-butyldicarbonate (di-BDC) solide, puis 1,26 mmole (0,18 ml) de Et₃N. Après agitation à T.A. pendant 1H30, la résine substituée est filtrée et lavée par 3 fois 5 ml de MeOH.

f) *Clivage de la résine* : 0,336 mmole de résine substituée "Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-2-Cl-trityl-résine", est clivée par 5 ml du mélange "TFE / ac.acétique / DCM" 1/1/2 (v/v), sous agitation, sur glace et sous azote, pendant 3H. Le filtrat est recueilli et additionné des lavages : 2 fois 5 ml du mélange de clivage, puis 5 ml d'heptane.

g) *Purification* : l'ensemble est évaporé à sec, puis re-dissous dans 100 ml d'EtOAc. Cette solution est extraite par 2 fois 100 ml de H₂O et les solutions aqueuses sont extraites avec 200 ml de EtOAc. Les fractions "EtOAc", débarrassées d'eau résiduelle par filtration sur papier séparateur de phase Whatman 1PS, sont ensuite évaporées à sec : 208 mg.

Une purification par "flash chromatography" est ensuite effectuée par passage sur gel de silice équilibré à l'heptane. Un gradient discontinu d'EtOAc, par pas de 10% (de 0 à 100%) dans l'heptane, permet d'éluer le produit dans les dernières fractions. **M/z** en LC/MS : 825 [M-H]⁺, **CLHP** LC/MS : Rt 21 min.

[Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)]₂-PEI 12a

0,008 mmole de Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH **11** contenue dans 0,5 ml de DMF, est additionnée de 0,008 mmole de HOBt contenue dans 0,1 ml de DMF puis agitée pendant 10 min. sous azote. 0,016 mmole de EDC dans 0,4 ml de DMF et 0,017 mmole de DiPEA puis, goutte à goutte, 0,004 mmole de L-PEI / HCl (**7**) contenue dans un mélange DMF / H₂O, 1 / 1 (v / v), sont ensuite ajoutées. Le trouble apparu disparaît par addition de 20 µl de H₂O. La réaction est mise en œuvre à 45°C, sous azote, sous agitation, pendant 40H. Au bout de ce temps, le milieu réactionnel refroidi, est ajouté à 10 vol. de Et₂O, sur glace. Le précipité, filtré sur fritté N°3, lavé à l'éther et resolubilisé par H₂O, puis lyophilisé : 30 mg. **1-H RMN** (300 MHz), D₂O, δ (ppm), 0,92, 1,08, 1,27 (CH₃, Boc), 1,92 (CH₂ Lys ?), **2,83** (nH -CH₂-CH₂-N **PEI**), 3,37 (?), 3,98-3,95 (CH_α Lys ?).

H-Lys-Lys-Lys-PEI-Lys-Lys-Lys-H 12b

1,27 µmole de [Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)]₂-PEI **12a**, est additionnée de 3 ml d'un mélange TFA / EDT / Thioanisole / H₂O, 94,5 / 2,5 / 1 / 2,5 (v / v), et mis sous agitation pendant 3H, sous azote, à T.A. Au bout de ce temps, le milieu réactionnel est additionné à 250 ml de Et₂O, sur glace pendant une nuit. Le précipité formé est filtré sur fritté N°3 et lavé à l'éther puis séché. Le produit, resolubilisé dans l'eau, est débarrassé des petites molécules sur Sephadex G25, avec élution à l'eau. Les fractions, détectées au réactif de Dragendorff, sont

rassemblées et lyophilisées : 29 mg. La molécule, sous forme de sel de TFA, est transformée en forme chlorhydrate, par addition de 2 meq. de HCl, (soit 3 "excès" d'équivalents par rapport aux équivalents d'amines secondaires protonées), sur glace, contact de 15 min., sous agitation. Au bout de ce temps, le milieu réactionnel est additionné de 250 ml de Et₂O froid, sous agitation. Le milieu réactionnel est lavé à l'éther, repris par de l'eau et lyophilisé. **1-H RMN** (300 MHz), D₂O, δ (ppm), 0,92, 1,05, 1,53, 1,88, 2,13, 2,3; 2,83 (nH -CH₂-CH₂-N PEI natif), **3,19**(nH -CH₂-CH₂-N PEI déplacement), 3,60 (?), 3,83, 3,98-3,95 (CH α Lys ?); 5,3 (H- NH₂).

[(mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-)-]_n-Lys-Lys-Lys-]_n- PEI / HCl **12c Polysubstrat**

3,7 μmoles de mPEG-NH-(Ala)₃-succ-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-OH, dissoutes dans 1 ml de DMF / H₂O, sont additionnées de 0,44 μmoles de HOBt et agitées sous azote pendant 10 min. Puis, 4,4 μmoles de EDC, 4,4 μmoles de DiPEA, puis, goutte à goutte, 0,37 μmole du dérivé "PEI-polylysine" **11c** dissoute dans 1 ml de DMF / eau, sont successivement ajoutées. La réaction de couplage est mise en oeuvre pendant 80h à T.A. Au bout de ce temps, le milieu réactionnel est purifié sur une colonne de Sephadex G50 (Long. 55 cm, diam. 1,6 cm), avec NaCl 0,15M comme éluant, avec un débit de 1 ml / min. Deux pics sont obtenus à 220 nm. Les fractions du premier pic, détectées comme contenant à la fois du PEG (au réactif I₂ / IK / CO₃Na₂) et du PEI (au réactif de Dragendorff) sont rassemblées et lyophilisées. Le lyophilisat, repris par 1 ml de H₂O, est dessalé sur Sephadex G25. La fraction contenant le produit attendu, est détectée d'une manière identique, puis lyophilisée : 16 mg. Spectre **U.V.**, pic détecté à 280 nm. **1-H RMN** (300 MHz), D₂O, δ (ppm), 0,92, 1,17, 1,38, 1,73, 2,28, 2,54, **3,53** (nH -CH₂-CH₂-O PEG), **3,73** (nH -CH₂-CH₂-N PEI déplacement), 4,69 (H₂O ?), 4,86 (?). Acide aminés détectés en LC / MS après hydrolyse HCl 6N : Pro, Leu, traces de Ala et Gly, Trp non détecté.

Fmoc-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-OH 13

0,023 mmole de H-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-OH dissoute dans du tampon Borate (Acide borique/NaOH) 0,5 M pH 7,8, est additionnée 0,04385 mmole de Fmoc-chloroformiate dissoute dans 3 ml d'acétone, puis immédiatement agitée pendant 45 sec. à l'agitateur Vortex. L'excès de réactif est ensuite éliminé par 2 extractions successives de 6 ml du mélange heptane / EtOAc (80/20) v/v. Les phases supérieures rassemblées sont re-extraites par un mélange tampon borate/acétone 3/3 (v/v). Les phases inférieures rassemblées sont débarrassées de l'acétone par évaporation sur évaporateur rotatif. La concentrat obtenu est débarrassé des sels de borate par passage sur cartouche C18 High load (5g Altech cat.N°255450) équilibré avec TFA 0,05% (v/v). Après lavage de la colonne avec 10 ml de TFA 0,05%, le Fmoc-peptide retenu sur C18, est décroché par de l'acétonitrile 65% dans TFA 0,05%. Les fractions de 5 ml collectées sont analysées à 280 nm pour détecter le tryptophane du dérivé peptidique. Les fractions rassemblées sont débarrassées de TFA par évaporation sous vide. Le

concentrat aqueux est lyophilisé et analysé en CLHP où un seul pic est obtenu (10µl injectés (0,05 mg), Rt : 25,29 min. sur colonne C18, gradient acétonitrile 35 à 97,5% en TFA 0,05%, débit 0,8 ml/min. Rdt couplage ≤100 %.

1-H RMN (300 MHz) CDCl₃. Pics identifiables : δ ppm 1,10-1,28 (nH CH₃, Ala, Leu), 1,87-2,04-2,11 (CH₂ Leu, Pro), 2,88-3,15-3,30 nCH₂ (Gly, Pro, Trp), 7,3-7,6-7,98-8,03 (nH CH aromatiques Fmoc, Trp)

mPEG-NH-Ala-Trp-Leu-Gly-Leu-Pro-(Ala)₃-H 14

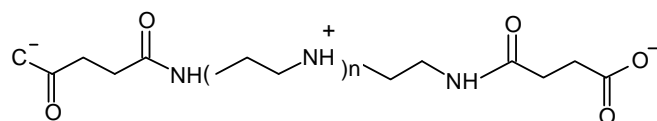
0,012 mmole de mPEG-NH₂ **1** additionnée de 0,1 ml de H₂O, est dissoute dans 0,3 ml de DMF puis de 0,0027 mmole de Fmoc-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala dans 0,2ml de DMF/H₂O 3/1 (v/v). 10 µl de CO₃Na₂ 10% sont additionnés pour ajuster le pH à 8, puis, sont ajoutées sous agitation de 0,00016 mmole de HOBt dans 15 µl de DMF et au bout de 15 min. de 0,0024 mmole de EDC dans 30 µl de DMF. Me milieu réactionnel est agité 18 H à température ambiante sous azote. (Taux de couplage ≤ 20%, dosage TNBS).

Le mPEG-NH₂ non couplé est éliminé par échange de cations sur résine Amberlyst[®] 15 (H⁺). Les réactifs sont éliminés de l'éluat par dessalage sur Sephadex G25[®]. Le dérivé PEG collecté est identifié par détection I₂ / IK / Cl₂Ba, rassemblé et lyophilisé.

Le groupement Fmoc du produit obtenu : Fmoc -(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-NH-PEG_m (0,00673 mmole), est éliminé par addition de 3 ml d'un mélange morpholine / DMF 2/8 (v/v), et agitation magnétique pendant 1 H. Le Fmoc-OH et les réactifs sont éliminés par dessalage sur Sephadex G25[®].

Le produit final collecté est identifié par détection I₂ / IK / Cl₂Ba, rassemblé et lyophilisé. **1-H RMN** (300 MHz) CDCl₃. Pics identifiables : δ ppm 0,88-1,26 (nH CH₃, Ala, Leu), 1,87-2,04-2,11 (CH₂ Leu, Pro), 2,88-3,15-3,30 nCH₂ (Gly, Pro, Trp), **3,60** n(CH₂-CH₂) (**PEG**), 7,3-7,6-7,98-8,03 (nH CH aromatiques Fmoc, Trp)

OH-succ-L-PEI-succ-OH 15



1) *en milieu anhydre* : 500 mg de L-PEI **2** (P.M.22000) soit 22,5 µmoles (45 µeq NH₂ libres) sont dissous dans 25 ml de DCM anhydre et additionnées de 225 µmoles de DMAP dans 4 ml de DCM puis de 225 µmoles d'anhydride succinique dans 10 ml de DCM. 200 ml de DCM sont ensuite ajoutés. Le mélange est mis à 40°C sous reflux pendant 19H. La solution trouble obtenue est extraite à l'eau distillée. Le mélange réactionnel est extrait par 250 ml d'eau. La phase aqueuse est concentrée 3 fois et extraite avec 1 volume de DCM. Les phases DCM rassemblées sont évaporées à sec. Rdt 12 %. (perte dans la phase aqueuse). Taux de succinylation au TNBS :99%.

2) *en milieu aqueux* : 750 mg de L-PEI **2**, (soit 0,034 mmole) sont additionnés de 15 ml de HCl 0,1N puis de 3 ml de HCl N et totalement solubilisés par chauffage 1 min. à 60°C. Le L-PEI / HCl formé est ajusté à pH 8,5 avec NaOH N. La succinylation est effectuée par 0,68 mmole totale d'anhydride succinique purifié,

additionné pendant 2H, par petites quantités avec maintien permanent du pH à 8,5 avec NaOH N. A ce stade le taux de succinylation est de 45%, par mesure des groupements aminés au TNBS. L'opération de succinylation est renouvelée une fois dans les mêmes conditions. La molécule est débarrassée de l'acide succinique et des sels par dessalage sur Sephadex G25[®] ou Biogel P6[®]. Le taux de succinylation final, dosé par les groupements aminés libres au TNBS est de 96%.

1-H RMN (300 MHz), D₂O, δ 2,32, 2,50 (8H -CH₂-CH₂- succ, amines I aire), **2,87** (nH -CH₂-CH₂-N PEI), 3,49 (nH -CH₂-CH₂- succ. amines II aires).

PEI-[succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-NH-PEGm]_n 16 (substrat inverse)

2.4 μmoles de (OH-succinyl)_n-PEI/HCl **7** sont dissoutes sous agitation dans 0,45 ml d'eau. Sont ajoutées, 0,4 ml de DMF, 0,25 μmole de HOBt dissoute dans 15 μl de DMF. Au bout de 15 minutes, sont alors ajoutées 2,5 μmoles d'EDC, dissoutes dans 20 μl de DMF, 2,5 μmoles de Et₃N dissoutes dans 15 μl de DMF puis, par petites quantités, 5 μmoles de H-(A)₃-PLGLWA-PEGm **14**. La réaction s'effectue sous azote pendant une nuit à température ambiante. Le trouble provoqué par l'insolubilisation du PEI disparaît par addition de HCl 0,01N en ajustant le pH à 8. La molécule synthétisée est purifiée par CPG sur Biogel P30 avec élution à l'eau et détection du tryptophane à 280 nm. La première fraction (de plus haut poids moléculaire), débarrassée de H-(A)₃-PLGLWA-PEGm non couplée, est recueillie, lyophilisée, reprise par un volume minimum de NaCl 0,05M et re-chromatographiée sur gel de Sephadex G50[®] avec élution en NaCl 0,05M. Le premier pic obtenu contient à la fois du PEG, identifié par le réactif à I₂ / IK / CO₃Ba et du PEI, identifié par le réactif de Dragendorff. L'échantillon re-lyophilisé est dessalé par passage sur Sephadex G25[®]. Le produit est re-lyophilisé. Rendement global : 36%. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 1,01 1,04 1,06 (nH CH₃ Ala, Leu), 1,775 (?), 2,31 -2,51 (4H CH₂-CH₂ succ), **2,79** (nCH₂-CH₂N PEI), 3,25 (3H CH₃-O), **3,57** (nCH₂-CH₂-O PEG), 7,97 (nH Trp). Rapport des surfaces en protons mPEG / PEI : 26,4

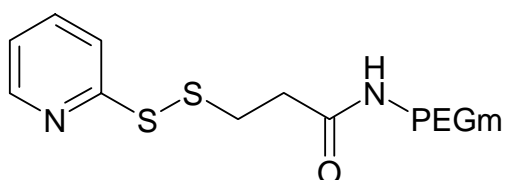
H-Ala-Ala-Ala-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys- NH₂ 17

Synthèse sur synthétiseur automatique Applied Biosystem model 431A : Après un cycle de déprotection des groupements Fmoc, des 0,3g de résine Fmoc-Rink-amide (0,192 mmole) avec de la pipéridine, le peptide immobilisé "H-Ala-Ala-Ala-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp(Boc)-Ala-Cys(Trt)-O-Rink-amide" est synthétisé par des couplages automatiques successifs avec le DCC et le HOBt des acides aminés suivants protégés, ajoutés par 0,96 mmole: Fmoc-Cys(Trt)-OH (Novabiochem 04.12.108), Fmoc-Ala-OH (Novabiochem 04.12.006), Fmoc-Trp(Boc)-OH (Novabiochem 04.12.1103), Fmoc-Leu-OH (Novabiochem 04.12.1025), Fmoc-Gly-OH (Novabiochem 04.12.1001), Fmoc-Leu-OH (Novabiochem 04.12.1025), Fmoc-Pro-OH (Novabiochem 04.12.1031), Fmoc-Ala-OH (Neosystem 04.12.006), Fmoc-Ala-OH (Neosystem 04.12.006), Fmoc-Ala-OH (Neosystem 04.12.006). Les déprotections successives des groupements Fmoc à la pipéridine sont suivies au fluorimètre.

Clivage de la résine : Le peptide-amide est libéré de la résine greffée par addition de 3 ml du mélange TFA / EDT / TIS / H₂O 94,5 / 2,5 / 1 / 2,5 (v/v), sous azote, avec mise en contact, sous agitation rotative lente, pendant 3H. Le filtrat est alors recueilli sous azote. La résine est lavée par 2 fois 3 ml de mélange de clivage, sous azote.

Purification : Les filtrats rassemblés (9 ml) sont additionnés, sous agitation, à 500 ml de EtO₂, sous glace. Le précipité est recueilli sur verre fritté N°4. Le filtrat est repris par un minimum d'eau et dessalé sur une colonne de Sephadex G10. Les fractions détectées à la ninhydrine sont rassemblées et lyophilisées; **HPLC C18** (gradient de 0-60% en 33 min. TFA 0,05%, débit 2 ml / min Rt. 20 min. **U.V.** pic à 280,9 nm. **M/z** (ES) 971,8[M+H]⁺, 993,8[M+Na]⁺. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 1,13 -1,23 -1,39 (CH₃ Ala, Leu), 1,84, 2,08, 2,73, 3,10, 3,16, 3,46, 3,65, 4,19, (CH₂ et CH α) ; 7,03, 7,13, 7,34, 7,51 (protons aromatiques Trp).

N-(2-pyridyldithiopropionyl)-amino-PEGm 18



0,023 mmole de mPEG-NH₂ dissoute dans MeOH est additionnée, sous agitation, de 0,051 mmole de Et₃N (7 μ l), puis de 0,064 mmole de SPDP sous forme solide. La dissolution et l'agitation sont effectuées sous azote pendant une nuit à T.A. Au bout de ce temps, 10 vol. de Et₂O sont ajoutés et laissés en contact sous glace pendant 3H. Le précipité est retenu par filtration sur verre fritté N°3 et repris par 5 ml de H₂O. Le produit est lyophilisé : 108 mg (Rdt 74% en poids, 81 % par dosage des groupements NH₂ au TNBS.). le mPEG-NH₂ restant est éliminé sur résine Amberlyst 15 (H+) équilibré avec de l'eau. L'éluat est recueilli et lyophilisé : 29 mg. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 1,11, 2,48(4H, CH₂-CH₂), 3,22 (3H, -O-CH₃), **3,54** (nH CH₂-CH₂-O, **PEG**), 7,18, 7,70, 8,20 (nH, pyridyl).

H-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys(O-NH₂)-S-S-CH₂-CH₂-CO-NH-PEGm 19

0,003 mmole de **18** dissoute dans 1 ml de tampon phosphate 0,05M, NaCl 0,15M est additionnée sous azote et sous agitation à 0,006 mmole du peptide H-Ala-Ala-Ala-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys-NH₂ **17** dissoute dans 1ml du même tampon. La réaction est effectuée pendant 2H30 à T.A. Le milieu réactionnel est alors déposé sur une colonne de Sephadex G25 superfine (52 cm X 1,6 cm.) avec comme

éluant NaCl 0,15M et un débit de 1 ml/min. Des fractions de 4 ml sont collectées. Leur D.O. est lue à 280 et 220 nm. Le premier pic détecté à 220 nm est rassemblé. Le spectre U.V. de cette fraction présente un pic à 220 et 280 nm (Trp). Cette fraction est lyophilisée puis reprise dans H₂O dessalée sur Sephadex G50, puis re-lyophilisée. 5 mg. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 0,98, 1,01, 1,05 (nH, CH₃ Leu, Ala), 2,55(4H, CH₂-CH₂), 2,8, 3,19, 3,22 (3H, -O-CH₃), 3,32, **3,54** (nH CH₂-CH₂-O, **PEG**),.

OH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys(NH₂)-S-S-CH₂-CH₂-CO-NH-PEGm 20

0,8 μ mole de **19** est dissoute dans 1 ml de H₂O et additionnée sous agitation de 82 μ moles d'anhydride succinique, par petites quantités, sous forme solide, tout en maintenant le pH entre 8 et 9 avec une électrode de pH mètre, pendant 2H à T.A. Le milieu réactionnel est dessalé sur Sephadex G25 avec l'eau comme éluant. Le dérivé PEG des fractions est détecté par le test I₂ / IK /CO₃Na₂, rassemblé et lyophilisé. 7 mg. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 0,98, 1,01, 1,05 (nH, CH₃ Leu, Ala ?), 2,27(CH₂ ?) 3,02(CH₂ ?), 3,32, 3,46 ? 3,58 (nH CH₂-CH₂-O, **PEG**). **U.V.** pic-épaulement à 280 nm.

L-PEI-[succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys(NH₂)-S-S-CH₂-CH₂-CO-NH-PEGm]_n 21 (substrat inverse)

1,13 μ mole de **20** est dissoute dans 0,5 ml de H₂O puis additionnée de 0,5 ml de DMF. 0.135 μ mole de HOBt est ajoutée sous agitation et sous azote. Au bout de 15 min., 1,35 μ mole de EDC est ajoutée. Le pH est vérifié à 8,5 (sans addition de Et₃N qui pourrait provoquer le clivage du pont di-sulfure). Puis 0,56 μ mole de L-PEI / HCl **2**, dissoute dans le DMF / H₂O, est ajoutée, goutte à goutte, pendant 15 min. La réaction est mise en oeuvre pendant 100 H à T.A., puis déposée sur une colonne de Sephadex G50 avec comme éluant NaCl 0,15M et un débit de 1 ml / min. La molécule est purifiée dans le premier pic après détection au réactif de Dragendorff et au test I₂ / IK /CO₃Na₂. Cette fraction est lyophilisée, reprise par 1 ml de H₂O et dessalée sur Sephadex G25 avec comme éluant H₂O. La fraction dessalée est lyophilisée : 6 mg. Spectre **UV** : pic à 220 et 240 nm. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 0,98, 1,01, 1,05 (nH, CH₃ Leu, Ala ?), 2,27(CH₂ ?) 2,81 (nH CH₂-CH₂-N, **PEI**), 3,54 (nH CH₂-CH₂-O, **PEG**), 3,69, 4,84, 4,91.

mPEG-NH-CO-CH₂-CH₂-CO-Gly-Gly-Gly-OEt 22a

0,013 mmole de H-(Gly)₃-OEt et 0,020 mmole de mPEG-succ-OH **4**, sont dissoutes dans 1 ml d'un mélange tampon phosphate 0,05 M pH 8 / DMF (v / v). 0,0013 mmole de HOBt est ensuite ajoutée puis, au bout de 15 min., 0,013 mmole d'EDC. La réaction est effectuée pendant 4 jours à T.A. Le mPEG-succ-OH non couplé est éliminé par passage du mélange réactionnel sur Dowex (H+). La partie non accrochée, déterminée par le test I₂ / IK /CO₃Na₂, est lyophilisée : 84 mg. Rdt 100 % **I.R.** cm⁻¹ 528, 845, 968, 1050, 1142, 1239, 1280, 1347, 1407, 1562, 1644 (amides), (absence de pics des carboxyles à 1710), 1967, 2878, 3441.

mPEG-NH-CO-CH₂-CH₂-CO-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-OH 22b

0,013 mmole de mPEG-NH-CO-CH₂-CH₂-CO-Gly-Gly-Gly-OEt **19a**, est mise en contact avec 1 meq. (0,08 ml de NaOH 12,5N) pendant 2H à température ambiante. Au bout de ce temps, le produit est neutralisé par 1 meq. de HCl 1N. Le mélange obtenu à pH 5 est passé sur un Sephadex G25 pour éliminer les sels et EtOH formé. 74 mg (Rdt 71 %). 13-C **RMN** (300 MHz) δ (ppm) : 70,66 (C du PEG), 72.

0,0094 mole de mPEG-NH-CO-CH₂-CH₂-CO-Gly-Gly-Gly-OH et 0,0094 mmole de H-(Gly)₃-OEt sont dissoutes dans 1 ml d'un mélange tampon phosphate 0,05 M pH 8 / DMF (v/v). 0,4 μ mole de HOBt est ensuite ajoutée puis, au bout de 15 min, 0,0094 mmole d'EDC. Agitation pendant 1 nuit. Les molécules non couplées, sous forme carboxyle, sont éliminées par passage sur résine échangeuse d'anions AGMP1m (Biorad ref 141-1841) mise sous forme acétate. Les fractions, contenant les molécules non accrochées sont collectées et rassemblées après détection par le test I₂ / IK / CO₃Na₂, puis lyophilisées.

Le lyophilisat est repris par 2 meq. de NaOH. Au bout de 2H à température ambiante, le mélange est neutralisé par 2 meq de HCl. Le produit est alors dessalé et débarrassé de EtOH par passage sur Sephadex G25. 31 mg sont obtenus.

1-H **RMN** (300 MHz) CDCl₃, pics identifiables δ ppm : 2,48, 2,54 (CH₂ succ), 3,34 (CH₃-O), 3,36 (CH₂-Gly) **3,61** (nCH₂-CH₂- PEG).

mPEG-NH-CO-CH₂-CH₂-CO-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-OH 22c

0,0056 mmole de mPEG-NH-CH₂-CH₂-CO-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-OH **19b**, et 0,0056 mmole de H-(Gly)₃-OEt sont dissoutes dans 1 ml d'un mélange tampon phosphate 0,05 M pH 8 / DMF (v/v). 0,566 μ mole de HOBt est ensuite ajoutée puis, au bout de 15 min., 0,0056 mmole d'EDC. Agitation pendant 1 nuit. Les molécules non couplées, sous forme carboxyle, sont éliminées par passage sur résine échangeuse d'anions AGMP1m (Biorad ref 141-1841) mise sous forme acétate. Les fractions, contenant les molécules non accrochées sont collectées et rassemblées après détection par le test I₂ / IK / CO₃Na₂, puis lyophilisées.

Le lyophilisat est repris par 2 meq. de NaOH. Au bout de 2H à température ambiante, le mélange est neutralisé par 2 meq de HCl. Le produit est dessalé et débarrassé de EtOH par passage sur Sephadex G25. Lot YL104 : 23 mg Rdt. 72 %. 1-H **RMN** (300 MHz) CDCl₃, pics identifiables δ ppm : 2,6, 2,97, 3,37 (CH₃-O ?), 3,39 (CH₂-Gly ?), 3,51, **3,63** (nCH₂-CH₂- PEG), 3,84, 3,86.

[mPEG-NH-CO-CH₂-CH₂-CO-(Gly)₉]_n-L-PEI 23

0,004 mmole de **22c** est dissoute dans 1,8 ml de DMF / eau, 50 / 50 (v/v). 0,4 μ mole de HOBt dans le DMF, sont ensuite ajoutés et laissés en contact 15 min. sous agitation. 0,004 mmole de EDC, puis 0,004 mmole de Et₃N sont ensuite ajoutées. Enfin 0,004 mmole de L-PEI / HCl dissous dans 1,7 ml de DMF / H₂O 50 / 50 (v/v), sont ajoutés, goutte à goutte pendant 15 min. La réaction s'effectue pendant 24H sur bain de sable à 47°C. Le milieu réactionnel est débarrassé des

composés non couplés, par CPG sur Sephadex G50, avec comme éluant H₂O à 1 ml / min. Les premières fractions contenant à la fois du PEG (test I₂ / IK / CO₃Na₂) et du PEI sont rassemblées et lyophilisées. 16 mg. 1-H RMN (300 MHz) , D₂O, pics identifiables δ ppm : 1,74, 2,28, 2,54, 2,54 (4H, CH₂-CH₂- succ), 2,73 (nCH₂-CH₂- N L-PEI) 3,2 (CH₃-O ?), 3,29 (CH₂, Gly ?), 3,51, **3,53** (nCH₂-CH₂-, **PEG**), 3,68, 3,76.

H-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(OtBu)-OH 24

Synthèse de Fmoc-Ser(OtBu)-2-Cl-trityl-résine : 2,7 mmoles de Fmoc-Ser(OtBu)-OH et 13,6 mmoles de DiPEA sont dissoutes dans 8 ml de DCM anhydre. Le mélange est versé sur 0,55 mmole de 2 Cl-trityl-résine et agité pendant 14 H. à T.A, puis filtré. La résine substituée est lavée par 3 x 10 ml de DCM / MeOH / DiPEA 17 / 2 / 1 (v/v), puis par 3 X 10 ml de DCM, 2 et X 10 ml de DMF et 2 X 10 ml de DCM. Taux de couplage par le test à la pipéridine à 290 nm : 25%. (0,244 mole par mole de résine).

Synthèse de H-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(OtBu)-2-Cl-trityl-résine : 4 X 1,6 mmoles Fmoc-Gly-OH, puis 3 X 1,6 mmoles de Fmoc-Ala-OH sont pesées dans 7 cartouches successives pour être mises en contact avec 0,133 mmole de résine substituée : Fmoc-Ser(OtBu)-2-chlorotrityl-résine. La synthèse s'effectue avec du DCC, HOBt en présence de DMAP dans le synthétiseur automatique.

Clivage de la résine : Le peptide substitué sur la résine 2-Cl-trityl-résine, est clivé de la résine par TFE / Ac. Acétique / DCM 1 / 1 / 2 (v/v) pendant 3H. à T.A, puis filtré sur fritté N°4. La résine est lavée avec 5ml d'heptane et 5 ml d'hexane. Les filtrats rassemblés sont évaporés sous vide à 45°C. Le résidu est repris par 40 ml de Et₂O et agité. L'insoluble blanc est retenu sur fritté N°4 et lavé avec 40 ml de Et₂O. L'insoluble blanc lavé est solubilisé par 10 ml d'eau et le fritté est lavé par 5 ml d'eau. Les fractions aqueuses rassemblées sont ré-extraites par 2 fois 15 ml de Et₂O. La fraction aqueuse est débarrassée de Et₂O résiduel à l'évaporateur rotatif. Le peptide obtenu en solution aqueuse est repurifié par 3 extractions supplémentaires de 20 ml d'EtOAc. La fraction aqueuse est débarrassée des solvants résiduels à l'évaporateur rotatif, puis lyophilisée. Une purification finale est effectuée par chromatographie sur Séphadex G10 avec comme éluant l'eau et détection du pic à 220 nm. Pic CLHP C18 (grad. CH₃CN 0-60% dans TFA 0,05 %), Rt 2 min : produit non retenu. **M/z** (ES) : 625,8 [M+Na]⁺

mPEG-NH-succ-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(OtBu)-OH 25

0,19 mmole de mPEG-NH-succ-OH **4** est dissoute dans 1 ml de DMF et additionnée de 0,5 ml de H₂O. Sont ensuite ajoutés, sous, agitation 0,19 mmole de NHS dans 0,15 ml de DMF, puis, goutte à goutte, 0,095 mmole de EDC dissoute dans 0,15 ml de DMF/eau 1/1 (v/v). Le mélange est agité sous azote pendant 24 H. Le mPEG-NH-succinyl-succinimide formé est purifié par passage sur Sephadex LH20 avec le DMF / H₂O. Les fractions réagissant au test à l'iode (I₂ / IK / CO₃Ba) sont rassemblées et additionnées de 0,019 mmole du peptide H-(Ala)₃-(Gly)₄-Ser(OtBu)-OH préalablement dissoute dans 0,5 ml de tampon phosphate 0,05M pH 8, et mises en agitation pendant 20H sous azote. Au bout de ce temps, le

mélange réactionnel est dessalé sur Sephadex G25. Les fractions identifiées au test à l'iode sont rassemblées et lyophilisées. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 1,06 (CH₃ Ala, OtBu), 2,39-2,37 (4CH₂ succ), 3,32 (3H, CH₃-O), 3,57 (nCH₂-CH₂-O, **PEG**).

[mPEG-NH-succ-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(OtBu)]₂ – PEI 26

0,022 mmole de mPEG-NH-succ-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(OtBu)-OH dissoute dans 1 ml de DMF / H₂O (1/1, v/v), est additionnée de 0,22 micromole de HOBt. Après agitation pendant 15 min., sont additionnées 0,0022 mmole de EDC dans le DMF, puis 0,002 mmole de Et₃N dans le DMF. Sont ajoutées ensuite, goutte à goutte, 0,0022 mmole de L-PEI / HCl dissoute dans 1 ml de DMF / eau 1/1 (v/v). Agitation 60 H sous azote à T.A.

Au bout de ce temps, la molécule est purifiée sur gel Sephadex G50, avec éluant NaCl 0,05M, pour éliminer le "PEG - peptide" éventuellement non couplé. La première fraction contenant à la fois du PEG (test à l'iode / IK / CO₃Ba) et du PEI (test au réactif de Dragendorff) est rassemblée et lyophilisée. La molécule, reprise dans 1 ml de H₂O, est dessalée sur Sephadex G25, collectée identifiée et lyophilisée. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 0,097-1,05 (CH₃, isobutyl, alanine), 2,4 (CH₂ succ), **2,89** (nCH₂-CH₂-N, **PEI**), 3,14(?) 3,22 (CH₂ Gly ?), **3,58** (nH CH₂-CH₂-O **PEG**).

[mPEG-NH-succ-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]₂ - PEI 27.

3,4 μ moles de [mPEG-NH-succ-Ala-Ala-Ala-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(OtBu)]₂ – PEI **26**, sont additionnées sous azote et sur glace, de 38,6 mmoles de TFA (3 ml à 95%). Le mélange est agité sous azote pendant 3H, puis, au bout de ce temps, additionné de 150 ml de Et₂O froid. Après mélange, le produit est laissé à décanter. Le précipité, est filtré sur fritté N°4 et lavé avec 100 ml d'éther. Le précipité est repris par 6 meq. de HCl (3ml de HCl 2N), sur glace et laissé en contact 1H. Le produit est ensuite dessalé sur Sephadex G25 avec comme éluant H₂O. Les fractions obtenues sont détectées au papier pH, au réactif de Dragendorff pour le PEI et avec le mélange I₂ / IK / CO₃Na₂ pour le PEG. Les fractions rassemblées sont lyophilisées : 20 mg sont obtenus. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 0,097-1,05 (CH₃, alanine), 2,36-2,33 (CH₂ succ), **2,93** (nCH₂-CH₂-N, **PEI**), 3,23 (CH₂ Gly), **3,59** (nH CH₂-CH₂-O- **PEG**), 3,83 ?).

H-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-(D)Leu-Trp-Ala-OH 28

Synthèse sur synthétiseur automatique Applied Biosystem model 431A : A partir de 0,133g de résine "H-Ala-2-Cl-trityl-résine" (0,085 mmole), le peptide immobilisé "H-Ala-Ala-Ala-Pro-Leu-Gly-(D)Leu-Trp-Ala-2-Cl-trityl-résine" est synthétisé par des couplages automatiques successifs avec le DCC et le HOBt des acide aminés suivants protégés, ajoutés par 1,33 mmole : Fmoc-Trp(Boc)-OH (Novabiochem 04,12,1103), Fmoc-(D)Leu-OH (Novabiochem 04.13.1025), Fmoc-Gly-OH (Novabiochem 04.12.1001), Fmoc-Leu-OH (Novabiochem 04.12.1025), Fmoc-Pro-OH (Novabiochem 04.12.1031), Fmoc-Ala-OH (Novabiochem 04.12.006), Fmoc-

Ala-OH (Neosystem 04.12.006), Fmoc-Ala-OH (Novabiochem 04.12.006). Les déprotections successives des groupements Fmoc, à la pipéridine, sont suivis au fluorimètre.

Clivage du peptide de la résine : Le D-peptide est libéré de la résine greffée par addition de 3 ml du mélange TFA / EDT / TIS / H₂O 94,5 / 2,5 / 1 / 2,5 (v/v), sous azote, puis contact, sous agitation rotative lente, pendant 3H. Le filtrat est alors recueilli sous azote. La résine est lavée par 2 fois 3 ml de mélange de clivage, sous azote.

Purification : le filtrat est additionné sous agitation 500 ml de Et₂O sur glace. Le peptide est laissé à précipiter pendant une nuit. Le précipité blanchâtre est filtré sur verre fritté N°4 et re-solubilisé par MeOH. Le produit évaporé à sec est re-solubilisé par 100 ml d'eau, puis est extrait par 3 fois 100 ml de EtOAc. La fraction aqueuse retenue par papier séparateur de phase Whatman 1PS est lyophilisée (40 mg). Le peptide est repurifié en CPG sur Sephadex G10 avec l'eau comme éluant. Les fractions collectées réagissant à la ninhydrine sont rassemblées et lyophilisées. **M/z** (ES, LC-MS) 869 [M+H]⁺. **UV** : pic à 280 nm (Trp). **CLHP C18** (gradient de 0-60% en 33 min. TFA 0,05%, débit 2 ml / min Rt 27 min.

mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-(D)Leu-Trp-Ala-OH 29

0,0155 mmole de mPEG-NH-succ-OH **4** est dissoute dans 1 ml de DMF et additionnée de 0,5 ml de H₂O. Sont ensuite ajoutées, sous, agitation 0,154 mmole de NHS dans 0,15 ml de DMF, puis, goutte à goutte, 0,077 mmole de EDC dissoute dans 0,13 ml de DMF/eau 1/1 (v/v). Le mélange est agité sous azote pendant 24 H.

Au bout de ce temps, le mPEG-NH-succinyl-succinimide formé est purifié par passage sur Sephadex LH20 avec le DMF / H₂O. Les fractions réagissant au test à l'iode (I₂ / IK / CO₃Ba) sont rassemblées et additionnées de 0,015 mmole du peptide H-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-(D)Leu-Trp-Ala-OH préalablement dissoute dans 0,5 ml de tampon phosphate 0,05M pH 8, et mises en agitation pendant 20H sous azote. Au bout de ce temps, le mélange réactionnel est dessalé sur Séphadex G25. Les fractions identifiées au test à l'iode sont rassemblées et lyophilisées. **UV** : pic à 280 nm(Trp). **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 1,01-1,03-1,06 (CH₃ Ala, Leu), 1,76 (CH₂ : γ CH₂ Pro ?, β CH₂ Leu ?), 2,28-2,37-2,42 (CH₂ succ) 2,65 ?, 3,24, 3,32 (CH₃-O), **3,56** (CH₂-CH₂-O PEG), 7,12-7,34-7,36-7,54 (protons aromatiques Trp)

(mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-(D)Leu-Trp-Ala-)_n -PEI 30

4 μmoles de mPEG-NH-succ-Ala-Ala-Ala-Pro-Leu-Gly-(D)Leu-Trp-Ala-OH dissoutes dans 1 ml de DMF / H₂O 1/1 (v/v), sont additionnées de 0,4 micromole de HOBt dans le DMF. Après agitation pendant 15 min, sous azote, sont additionnées 0,004 mmole de EDC dans le DMF, puis 0,004 mmole de Et₃N dans le DMF. Sont ajoutées ensuite, goutte à goutte, 0,002 mmole de L-PEI / HCl

dissoute dans 1 ml de DMF / eau 1/1 (v/v). Agitation 24 H sous azote à 50°C (pour éviter la précipitation du PEI).

Au bout de ce temps, la molécule est purifiée sur gel Sephadex G50, avec éluant NaCl 0,05M, pour éliminer le "PEG –peptide" éventuellement non couplé. La première fraction contenant à la fois du PEG (test à l'Iode / IK / CO₃Ba)) et du PEI (test au réactif de Dragendorff) est rassemblée et lyophilisée. La molécule, reprise dans 1 ml de H₂O, est dessalée sur Sephadex G25, collectée identifiée et lyophilisée. **U.V.** : Epaulement à 280 nm (Trp). **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 0,097-1,05 (CH₃, isobutyl, alanine), 2,4 (CH₂ succ), 2,8 (nCH₂-CH₂-N, **PEI**), 3,48-3,59 (nCH₂-CH₂-O, **PEG**), 3,79 ?

13-C RMN (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 46,17 (nCH₂-CH₂-N, **PEI**) 69,75 (nCH₂-CH₂-O, **PEG**).

(mPEG-NH-succinyl)₂-L-PEI **31**

14 μ moles de mPEG-NH-succ-OH **4** dissoutes dans 1,2 ml de DMF/H₂O (v/v) sont additionnées sous agitation de 1,4 μ mole de HOBt dissoute dans 80 μ l de DMF et laissées en contact pendant 20 minutes. 14 μ moles de EDC, dissoutes dans 185 μ l de DMF, sont ensuite ajoutées, puis 14 μ moles de triéthanolamine dans 85 μ l de DMF. 14 μ moles de L-PEI / HCl **7** dissoutes dans 2 ml de DMF / H₂O 1/1 (v/v) sont ensuite ajoutées goutte à goutte pendant 1 min. La réaction est maintenue sous agitation à 50°C, sous azote, pendant 40 H.

Au bout de ce temps, le mélange réactionnel est déposé sur une colonne de Sephadex G50[®] préalablement équilibrée avec du NaCl 0,05M. La macromolécule est isolée dans le premier pic détecté positif à la fois au test à l'Iode / IK / CO₃Ba (pour le PEG) et au papier pH pour le PEI (le mPEG non couplé est retenu dans un second pic). Ce 1er pic rassemblée, lyophilisé, re-dissous dans un minimum d'eau est dessalé sur colonne de Sephadex G25[®] élué à l'eau, re-détecté et re-lyophilisé. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : 1,775 (?), 2,33 –2,52 (4H CH₂-CH₂ succ), **2,84** (nCH₂-CH₂-N **PEI**), 3,39(3H CH₃-O), **3,56** (nCH₂-CH₂-O **PEG**). Rapport des surfaces en protons mPEG / PEI : 1/1.

(mPEG-NH-succinyl)₂-B-PEI **31b**, **31c**, **31d**

0,2 μ mole, pour **31b**, ou, 0,8 μ mole pour **31c**, ou, 3 μ mole, pour **31d**, de mPEG-NH-succ-OH **4**, dissoute dans 1,2 ml de DMF / H₂O (v/v), est additionnée de 0,4 μ mole de HOBt et laissée en contact, sous agitation, pendant 15 min. Puis, 4 μ moles de EDC et 4 μ moles de Et₃N sont ajoutées. Enfin, sont ajoutées, goutte à goutte, 4 μ moles de B-PEI (pH 6,8 Aldrich 40,872-7). La réaction est mise en œuvre pendant 65H à 50°C. Le mPEG-NH-succ-OH non couplé et les réactifs, sont éliminés par CPG sur Sephadex G50 avec NaCl 0,15M comme éluant à 1 ml / min. La première fraction contenant du PEG (détectée au réactif I₂ / IK / CO₃Na₂) et du PEI (détecté au réactif de Dragendorff), est rassemblée et lyophilisée. Le lyophilisat, repris dans un minimum de H₂O est dessalé par CPG sur Sephadex G25. La première fraction contenant à la fois du PEG et du PEI, est rassemblée et lyophilisée.

31b : 60 mg. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : massif important à 4 pics : **2,52, 2,70, 2,84, 2,94** (nCH₂-CH₂-N **PEI**), **3,55** (nCH₂-CH₂-O **PEG**). Rapport des surfaces en protons mPEG / PEI : 1 / 27,3. Rapport moles PEG / mole PEI : 0,18

31b : 105 mg. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : massif important à 3 pics : **2,62, 2,74, 2,99** (nCH₂-CH₂-N **PEI**), **3,9** (nCH₂-CH₂-O **PEG**). Rapport des surfaces en protons mPEG / PEI : 1 / 17,5. Rapport moles PEG / mole PEI : 0,29

31c : 153 mg. **1-H RMN** (300 MHz) D₂O, pics identifiables δ ppm : massif important à 3 pics : **2,63, 2,79, 3,02** (nCH₂-CH₂-N **PEI**), **3,56** (nCH₂-CH₂-O **PEG**). Rapport des surfaces en protons mPEG / PEI : 1 / 16,7. Rapport moles PEG / mole PEI : 0,30

Boc-Leu-Trp(Boc)-Ala-OH 32

Synthèse en phase hétérogène. Les étapes suivantes sont effectuées :

8 mmoles de Fmoc-Trp(Boc), dissoute dans 5 ml de DMF anhydre sont additionnées à 1 g de résine greffée « H-Ala-2-Cl-trityl » (0,9 mmole) dans un réacteur muni d'un verre fritté et d'un robinet de vidange. Après nappage d'azote, le réacteur clos est mis en rotation lente pendant 15 min. On rajoute alors 1,8 mmole de PyBOP dissoute dans 2 ml de DMF anhydre, puis 2,4 mmoles de DiPEA. Après nappage d'azote, l'agitation par rotation est reprise pendant 17 H à T.A. Le filtrat est éliminé sous pression d'azote. La résine greffée est lavée 3 fois avec 5 ml de DMF.

Les groupements aminés non couplés de l'alanine greffée sont bloqués par acétylation (capage) : 5,2 mmoles d'(AcO)₂O, dissoutes dans 5ml de DMF anhydre, sont ajoutées à la résine greffée et 0,284 mmole de DiPEA dans 0,05 ml de DMF La résine est agitée par rotation lente sous azote à T.A. pendant 30 min, temps au bout duquel une filtration est effectuée, suivie de 3 lavages avec 5 ml de DMF.

Le groupement NH₂ terminal du tryptophane est démasqué par élimination du groupement Fmoc, par addition à la résine de 10 mmoles de pipéridine (5 ml à 20% dans le DMF) pendant 30 minutes à T.A., sous azote et sous agitation rotative. La fraction soluble du réacteur est filtrée sous pression d'azote et la résine est lavée trois fois au DMF. La présence des groupements aminés démasqués est mise en évidence qualitativement par apparition d'une coloration rouge après addition du réactif au TNBS.

1,8 mmole de Boc-Leu-OH dissoute dans 5 ml de DMF est ensuite ajoutée à la résine greffée obtenue. Après agitation rotative sous azote à T.A. pendant 15 min, 1,8 mmole de PyBOP dans 2 ml de DMFanhydre est ajoutée, puis 2,4 mmoles de DiPEA dans 0,415 ml de DMF. Le couplage est effectué sous agitation rotative, sous azote à T.A. pendant 17H. La fraction soluble est alors filtrée sous pression d'azote et la résine greffée est lavée 3 fois au DMF

Les groupements aminés non couplés du Tryptophane de la résine greffée sont bloqués par acétylation (« capage ») : 5,2 mmoles d'(AcO)₂O, dissoutes dans 5ml de DMF anhydre sont ajoutées à la résine greffée et 0,284 mmole de DiPEA dans 0,05 ml de DMF. La résine est agitée par rotation lente sous azote à T.A. pendant

30 min, temps au bout duquel une filtration est effectuée, suivie de 3 lavages avec 5 ml de DMF.

L'absence de réaction colorée au TNBS sur la résine indique l'absence de groupements aminés libres à la fin des couplages.

Clivage du peptide Boc-Leu-Trp(Boc)-Ala-OH (et impuretés acétylées) de la résine : la résine greffée est additionnée, sous azote, d'un mélange de 5 ml de TFE (14 mmoles) / AcOH (17 mmoles) / DCM, 2/2/6 (v/v), puis agitée pendant 2H à T.A. sous azote, par rotation lente. L'éluat contenant le peptide protégé par des substituants Boc, est recueilli par filtration sous pression d'azote. 2 lavages sont effectués avec 5 ml du mélange de clivage, suivis de 1 lavage avec 5 ml de DCM et de 3 lavages avec 5 ml d'heptane.

Purification : les filtrats rassemblés sont re-filtrés sur papier en fibre de verre GF/A. Le nouveau filtrat est évaporé à sec et repris par 120 ml d'EtOAc. Cette solution est extraite 5 fois par 100 ml de H₂O. La fraction EtOAc obtenue est alors évaporée à sec : poids obtenu : 0,39 g.

Le peptide protégé attendu est alors purifié par « Flash chromatography » sur gel de silice (70 g préalablement mis en suspension dans un mélange DCM / MeOH 20/2 (v/v)). L'échantillon à purifier est repris dans 1 ml de ce solvant, déposé sur une colonne du gel (25 cm. x 2,5 cm.), élué par 150 ml du mélange de solvant. Les fractions de 5 ml collectées, sont analysées à l'Iode et par le colorant des acides carboxyliques. Trois fractions sont rassemblées. Après analyse en CCM sur gel de silice avec éluant : DCM/ MeOH 5 / 1 (v/v), et analyse avec les mêmes colorations, la première fraction contient des impuretés (R_f : 0,85 et 0,59). Les deux autres fractions contiennent le même produit (R_f : 0,45), qui absorbe en UV (365 nm), et qui donne un seul pic (R_t = 25.9 min, pureté > 95%) en CLHP analytique sur colonne C8 (Vydac 208TP54, éluant : TFA 0,05 % - gradient acétonitrile 0-95%, débit 1 ml / min.)

M / z (ES) = 587,7 (M-H)⁻, **1-H RMN** (300 MHz) CDCl₃, pics δ ppm : 0,86 (nH CH₃ Ala, Phe), 1,22 (?), 1,35 et 1,62 (2 X 9H CH₃ tBut), 3,17 (nH αCH Ala, βCH₂ Trp), 3,45 (?), 3,69 et 3,71 (αCH Leu, Trp), 4,11, 4,45, 4,87, 5,04, 5,30 (?), groupe : 7,18 7,21 - 7,23 - 7,31 - 7,46 - 7,52 - 7,55 (nH cycle indole Trp).

H-Leu-Trp-Ala-PEI-Ala-Trp-Leu-H 33

8 μmoles de Boc-Leu-Trp(Boc)-Ala-OH **32** dissoutes dans 0,5 ml de DMF anhydre, sont additionnées de 8 μmoles de HOBt préalablement dissoutes dans 0,5 ml de DMF et laissés en contact 10 min. Sont ajoutées ensuite 16 μmoles de EDC, dissoutes dans 4 μl de DMF, puis 17 μmoles de DiPEA (3μl), puis, goutte à goutte, 4 μmoles de L-PEI / HCl **7** dissoutes dans 1 ml de DMF/eau (1 / 0,2 v/v). 20 μl de H₂O sont ajoutés pour empêcher l'insolubilisation du PEI. Le milieu réactionnel est incubé à 50°C sous agitation, sous azote, pendant 28H.

Au, bout de ce temps, le mélange réactionnel est additionné sous agitation à 500 ml de Et₂O refroidi sur glace et laissé en contact pendant 1H. Le précipité blanc est retenu sur filtre GF/A. L'insoluble est repris dans 2,4 ml d'un mélange éthanol / eau 1/1 (v/v) à 45°C et 40 mg sont obtenus après évaporation à sec.

Le produit obtenu est déprotégé du Boc, en lui additionnant 1 ml de « reagent K », constitué du mélange « TFA, H₂O, Phénol, Thioanisole, EDT » 82,5 / 5 / 5 / 5 / 2,5 (v/v), sous agitation, sous azote, à T.A. pendant 3H. Au bout

de ce temps, le milieu réactionnel est additionné à 150 ml de Et₂O refroidis sur glace et laissé en contact pendant 1H. Le précipité blanc est décanté, puis, repris par 2 ml de HCl 2N, sur glace pour reformer le chlorhydrate du PEI. Après dissolution, le produit est de nouveau reversé sur 150 ml de Et₂O sur glace, laissé à précipiter pendant 3H, puis filtré sur fritté N°3. Le précipité blanc obtenu est repris par 2 ml de EtOH / H₂O 1 / 1 (v/v). Après dissolution à 40-50°C, le produit est dessalé sur Sephadex G25 (colonne, 37 cm. X 2,3 cm), avec l'eau comme éluant. Les fractions collectées, sont identifiées au papier pH et au réactif de Dragendorff, rassemblées et lyophilisées. 1-H RMN (300 MHz), D₂O, pics δ ppm : 0,93, 0,95, 1,07 (nCH₃, Ala, Leu), 2,34, **2,82** (n CH₂-CH₂-N L-**PEI**), 3,37 (protons d'amines secondaires du L-PEI ?), 3,53, 3,56, 3,76 et 7,83, 7,92, 7,95 (nH protons aromatiques de Trp).

L-PEI-[succinyl-Pro-Leu-Gly-OEt]_n **34a**

4 μmoles de (OH-succinyl)_n-PEI **15** dissoutes dans 0,8 ml de DMF / tampon borate 0,5M pH 8, 50/50 (v/v), sont additionnées sous agitation sous azote de 0,8 μmole de HOBt dissoute dans 8 μl de DMF. Au bout de 15 minutes d'agitation sous azote, sont ajoutées 8,3 μmoles de EDC, dissoutes dans 0,15 ml de DMF, qui, une fois dissoutes, sont additionnées, goutte à goutte, de 8,3 μmoles de H-Pro-Leu-Gly-OEt (Bachem, ref.SP022166, lot CF02080) dissoutes dans 0,8 ml du mélange DMF / tampon borate. La réaction est laissée s'effectuer pendant 44H, sous agitation, sous azote.

Au bout de ce temps, le léger insoluble est centrifugé 5 min. à 4000RPM. Le surnageant est déposé sur colonne de Sephadex G25[®] (15 cm X 2.5 cm), pour rétention et élimination des petites molécules, dont le « peptide ethyl ester » éventuellement non couplé (P.M.526). Le dérivé PEI est détecté dans les fractions collectées au réactif de Dragendorff, rassemblé et lyophilisé. Rdt : 70%

1-H RMN (300 MHz) CDCl₃, pics δ ppm : 0,95, 1,12 (CH₃ ethyl ester), 1,26, 1,36 (H CH₃), 2,33, 2,52 (8H -CH₂-CH₂- succ, amines I aire), 2,72 (14H ?), **2,875** (66H ?, nCH₂-CH₂N **PEI**), 3,51 (10H ? -CH₂-CH₂- succ amines II aires), 3,76 (?)

L-PEI-[succinyl-Pro-Leu-Gly-OH] **34b**

3 μmoles de L-PEI-[succinyl-Pro-Leu-Gly-OEt]_n **34a** dissoutes dans 0,8 ml de H₂O sont additionnées de 1,9 meq. de NaOH (0,15 ml NaOH 12,5N) pour obtenir une Normalité finale de 2N. Le milieu réactionnel est agité pendant 21H sous azote, sur glace puis à 0-4°C. Une CPG sur Biogel P6, avec comme éluant H₂O, est ensuite mise en oeuvre sur le mélange, afin d'éliminer NaOH. Les éluats sont collectés et analysés au papier pH (vérification de l'absence de soude), puis au réactif de Dragendorff (détection du PEI). Le pic de Et₂O (1,12 ppm) est devenu absent : **1-H RMN** (300 MHz) CDCl₃, pics δ ppm : 0,92, 0,96, 2,29, 2,32, 2,5 (8H -CH₂-CH₂- succ, amines I aire), 2,72 (14H ?), **2,67** (50H, nCH₂-CH₂N **PEI**), 3,38 (15H-CH₂-CH₂- succ amines II aires), 3,76 (?)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Donsante, C. Vogler, Muzycska, N., Crawford, J.M., Barker, J., Flotte, Campbell-Thompson, M., Daly, T., Sand. M.S., Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Therapy* (2001), 8, 1343-1346.
- [2] McCormick, F. Cancer gene Therapy : fringe or cutting edge ? *Nature Reviews, Cancer* (2001), 1, 130-140.
- [3] Wadhwa, P.D., Zielske, S.P., Roth, J.C., Ballas, C.B., Bowman, J.E., Gerson, S.L., *Cancer Gene Therapy : scientific basis. Annual Review of Medicine* (2002), 53, 437-452.
- [4] Seth, P., Li, Z., Kim, M., Craig, C., Wersto, R., Shanmugan, M., Ohri, E., Rakkar, A., Kodolop, P., Mudaashar, B.S., Cowan, K.H. A recombinant adenovirus expressing wild type p53 induces apoptosis in drug resistant human breast cancer cells : a gene therapy approach for drug-resistant cancers. *Cancer Gene Therapy* (1997), 4, 383-390.
- [5] Sumimoto, K., Shimizu, R., Shinohara, A., Yokota, J., Sone, J., Activation of RB tumor suppressor protein and growth suppression of small cell lung carcinoma cells by reintroduction of p16^{INK4A} gene. *International Journal of Oncology* (1999), 14, 1075-1080.
- [6] Demers, G.W., Harris, M.P., Wen, S.F., Engler, H., Nielsen, L., Manevaj, D.C. A recombinant adenoviral vector expressing full-length human retinoblastoma susceptibility gene inhibits human tumor cell growth. *Cancer Gene Therapy* (1998), 5, 207-214.
- [7] Cheney, I.W., Johnson, D.E., Vailancourt, M.T., Arjanzini, A., Morimoto, A., Demers, G.W., Wills, K.N., Shabran, P.W., Bolen, S.P., Tavtigian, S.V. Bookstein, R. Suppression of tumorigenicity of glioblastoma cells by adenoviruses mediated MMAC1 / PTEN gene transfer. *Cancer Research* (1998), 58, 2331-2334.
- [8] Slack, A., Bovenzi, V., Bigey, P., Ivanov, M.A., Ramchandani, S., Bhattacharya, S., tenOever, B., Lamrihi, B., Scherman D., Szyf, M. Antisense MDB2 gene therapy inhibits tumorigenesis. *The journal of Gene Medicine* (2002), 4, 381-389.
- [9] Jia, S-F., Worth, L.L., Densmore, C.L., Xu, B., Zhou, Z., Kleinerman E.S. Eradication of osteosarcoma lung metastases following intranasal interleukin-12 gene therapy using a nonviral polyethyleneimine vector. *Cancer Gene Therapy* (2002), 9, 260-266.
- [10] Aghi, M., Hochberg, F., Breakefield, X.O. Prodrug activation enzymes in cancer Gene Therapy. *The Journal of Gene Medicine* (2000), 2, 148-164.
- [11] Chen, Q.R., Kumar, D., Strass, S.A., Mixson, A.J. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Research* (1999), 59, 3308-3312.

- [12] Rigg, A.S., Lemoine, N.R., Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect *in vivo*. *Cancer Gene Therapy* (2001), 8, 869-878.
- [13] Brand, K., Paker, A.H., Perez-Canto, A., Possling, A., Sacharjat, M., Geheeb, M., Arnold, W. Treatment of colorectal liver metastases by adenoviral transfer of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 into the liver tissue. *Cancer Research* (2000), 60, 5723-5730.
- [14] Tran, P.L., Vigneron, J.P., Pericat, D., Dubois, S., Cazals, D., Hervy, M., Dec, Y.A., Degott, C., Auclair, C. Gene therapy for hepatocellular carcinoma using non-viral vectors composed of bis guanidinium-trecholesterol and plasmids encoding the tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-2 and TIMP-3. *Cancer Gene Therapy* (2003), 10 N°6, 435-444.
- [15] Hood, J.D., Bednarski, M., Frausto, R., Guccione, S., Reisfeld, R.A., Xiang, R., Cheresch, D.A. Tumor regression by targeted gene delivery to neovasculature. *Science* (2002), 296, 2404-2407.
- [16] Bouvet, M., Ellis M., Nishizaki., Fujiwara, T. Liu, W., Bucana, C.D., Fang, J., Lee, J., Roth, J.A. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon. *Cancer Reseach* (1998), 58, 2288-2292.
- [17] Sa, I., Gomez-Manzano, C., J.Fueyo, J., Liu, T., Ke, L., Kim, J., Lee H., Steck, P., Kirystis, A., Yung, W. Antiangiogenesis treatment for gliomas : transfer of antisens - vascular endothelial growth factor inhibit tumor growth *in vivo*. *Cancer Research* (1999), 59, 895-900.
- [18] Philport, G.W., Shearer, W.T., Bower, R.W. Parker, C.W. Selective cytotoxicity of hapten substituted cells with an antibody-enzyme conjugate. *J.Immunol.* (1973), 111, N°3, 921-929.
- [19] Weyel, D., Sedlacek, H-H., Muller,R., Brüsselback. Secreted human β glucuronidase : a novel tool for gene-directed enzyme prodrug therapy. *Gene Therapy* (2000), 7, 224-231.
- [20] Ichikawa T, Tamiya T, Adachi Y, Ono Y, Matsumoto K, Furuta T, Yoshida Y, Hamada H, Ohmoto T. *In vivo* efficacy and toxicity of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapy for malignant gliomas mediated by adenovirus. *Cancer Gene Therapy* (2000), 7, 74-82.
- [21] Crystal, R.G., Hirschowitz, E. Lieberman, M., Daly, J., Kazam, E., Henschke, C., Yankelevitz, D., Kemeny, N., Silverstein, R., Ohwada, A., Russi, T., Mastrangeli, A., Sanders, A., Cooke, J., Harvey, B.G. Phase 1 study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the *E.Coli* cytosine deaminase gene to metastatic colon carcinoma of the liver in association with the oral administration of the prodrug 5-fluorocytosine. *Human Gene Therapy* (1997), 8, 985-1001.

- [22] Cavallaro, G., Pitaressi, G., Licciardi, M., Giammona, G. Polymeric prodrug for release of an antitumoral agent by specific enzymes. *Bioconjugate Chemistry* (2001), 12, 143-151.
- [23] Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethyleneimine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1995), 92, 7297-7301.
- [24] Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G. Poly(ethyleneimine) and its role in gene delivery. *J. of Controlled Release* (1999), 60 N°2-3, 149-160.
- [25] W.T.Godbey, M.A.Barry, P.Saggau, K.K.Wu, A.G.Mikos. Poly(ethyleneimine)-mediated transfection : a new paradigm for gene delivery. *J. of Biomedical Research* (2000), 51 N°3, 321-328.
- [26] Behr, J.P., The proton sponge, a means to enter cells viruses never thought of. *MS-Med. Sci.* (1996), 12, 56-58.
- [27] Moret, I., Peris, J.E., Guillem, V.M., Benet, M., Revert, M., Dasi, F., Crespo, A., Alino, S.F. Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes : effect of alkaline pH, heparin and serum. *J. of Controlled Release* (2001), 76, 169-181.
- [28] Bahnson, A. B., Dunigan, J. T., Baysal, B. E., Mohny, T., Atchison, R. W., Nimgaonkar, M. T., Ball, E. D. & Barranger, J. A. Centrifugal enhancement of retroviral mediated gene transfer. *J. Virology Method* (1995), 54, 131-143.
- [29] Ogris, M Brunner,S., Schüller, S., Kircheis, R., Wagner, E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes : reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delifery. *Gene Therapy* (1999), 6, 595-605.
- [30] Kircheis, R., Wightman, L. Schreiber, A., Robitza, B., Rössler, V., Kurs, M, Wagner, E. Polyethyleneimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Therapy* (2001), 8, 28-40.
- [31] Erbacher, P., Bettinger, T., Belguise-Valladier, P., Zou, S., Coll, J-L., Behr, J.P., Remy, J-S. Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethyleneglycol), and antibody-derivatized polyethyleneimines (PEI). *The J. of Gene Medicine* (1999), 1, 210-222.
- [32] Lee, H., Jeong, J.H., Park, T.G., A new gene delivery formulation of polyethyleneimine/DNA complexes coated with PEG conjugated fusogenic peptide. *J. of Controlled Release* (2001), 76, 183-192.
- [33] Sagara, K., Kim, S.W. A new synthesis of galactose-poly(ethylene glycol)-polyethyleneimine for gene delivery to hepatocytes. *J. of Controlled Release* (2002), 79, 271-281.

- [34] Nomura, H., Sato, H., Seiki, M., Mai, M., Okada, Y. Expression of membrane- type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas. *Cancer Research* (1995), 55, 3263-3266.
- [35] Himelstein, B.P., Canete-Soler, R., Bernhard, E.J., Dilks, D.W., Muschel, R.J. Metalloproteinases in tumor progression : the contribution of MMP9. *Invasion Metastasis* (1994), 14, 246-258.
- [36] Iwata, H., Kobayashi, S., Iwase, H., Masaoka, A., Fujimoto, N., Okada, Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn J. of Cancer Research* (1996), 87, 602-611.
- [37] Sawaya, R., Go, Y., Kyristisis, A.P., Uhm, J., Venkaiah, B., Mohanam, S., Gosaslan, Z.L., Rao, J.S. Elevated levels of Mw 92,000 type collagenase during tumor growth *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1998), 251 N°2, 632-636.
- [38] Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., Selki, M. A matrix metalloprotease expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* (1994), 370, 61-65.
- [39] Will, H. Atkinson, S.J., Butler, G.S., Smith, B., Murphy, G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloprotease cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. *The Journal of Biological Chemistry* (1996), 271 N°29, 17119-17123.
- [40] Emonard, H.P., Remacle, A.G., Noël, A.C. Grimaud, J.A., Stetler-Stevenson, W.G., Foidart, J.M. Tumor cell surface associated binding site for the MW 72,000 type IV collagenase. *Cancer Research* (1992), 52 N°20, 5845-5848.
- [41] Stettler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., Kleiner., D. Extracellular matrix 6 : role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *The FASEB Journal* (1993), 7, 1434-1441.
- [42] Ara, T., Kusafuka, T., Inoue, M., Kuroda, S., Fukuzawa, M., Okada, A. Determination of imbalance between MMP-2 and TIMP-2 in human neuroblastoma by reverse transcription polymerase chain reaction and its correlation with tumor progression. *J. Pediatr. Surg.* (2000), 35 N°3, 432-437.
- [43] Furuya, M. Analysis of matrix metalloproteinases and related tissue inhibitors in cystic fluids of ovarian tumors. *Hokkaido Igaku Zasshi* (1999) 74 N°2, 145-155.
- [44] Arnold, S.M., Young, A.B., Kmun, R., Patchell, R.A., Nanayakkara, N., Markesbery, W.R. Expression of p53, bcl-2, E-cadherin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloprotease-1 in paired tumors and brain metastasis. *Clinical Cancer Research* (1999), 5 N°12, 4028-4033.

- [45] Heppner, K.J., M.Matrisian, L., Jensen, R.A., .Rodgers, W.H. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor-induced host response. *American Journal of Pathology* (1996), 149 N°1, 273-282.
- [46] Keski-Oja, J., Lohi, J., Tuutila A., Tryggvason, K., Vartio, T., Proteolytic processing of the 72,000Da Type IV collagenase by urokinase plaminogen activator. *Exp. Cell Research* (1992), 202, 471-476.
- [47] Lohi, J., Kehti, K., Westermarck, J., Kahari, V.M., Keski-Oja, J. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression by growth factors and phorbol 12-myristate 13-acetate. *European J. of Biochemistry* (1996), 239, 239-247.
- [48] Huang, L.W., Garrett A.P., Bell, D.A., Welch, W.R., Berkowitz, R.S., Mok., S.C. Differential expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein and mRNA in epithelial ovarian tumors. *Gynecologic Oncology* (2000), 77 N°3, 369-376.
- [49] Kachra, Z., Beaulieu, E., Delbecchi, L., Mousseau, N., Berhelet, F., Moudjian, R., Del Maestro, R., Béliveau, R. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human brain tumors. *Clinical Experimental Metastasis* (1999), 17 N°7, 555-556.
- [50] Foda, H.D., Zucker, S. Matrix metalloproteinases in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discovery Today* (2001), 6, 478-482.
- [51] Kahari, V.M., Saarialho-Kere, U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion. *Ann. Med.* (1999), 31 34-45.
- [52] Lee, S.J. Jang, J.W., Kim, Y.M., Lee, H.I., Jen, J.Y., Kwon, Y-G., Lee, S-T. Endostatin binds the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2. *FEBS Letters* (2002), 519, 147-152.
- [53] Lelièvre, Y., Bouboutou, R., Boiziau, J., Cartwright, T. Inhibition de la collagénase synoviale par l'actinonine. Etude de relations structure/activité. *Pathologie Biologie* (1989), 37 N°1, 43-46.
- [54] Faucher, D.C., Lelièvre, Y., Cartwright, T. An inhibitor of mammalian collagenase active at micromolar concentrations from an actinomycete culture broth..*The J. of Antibiotics* (1987), XL N°12, 1757-1761.
- [55] Boger, D.L., Goldberg, J., Silletti, S., Kessler, T., Cheresch, D.A. Identification of a novel class of small-molecule antiangiogenic agents through the screening of combinatorial which function by inhibiting the binding and localization of metalloproteinase MMP2 to integrin $\alpha v \beta 3$. *J of the American Chemical Society* (2004), 123 N°7, 1280-1288.

- [56] Zucker, S., Lysik, R.M., Zarrabi, M.H., Stetler-Stevenson, W., Liotta, L.A., Birkedal-Hansen, H., Mann, W., Furie, M; Type IV collagenase/gelatinase (MMP-2) is not increased in plasma of patients with cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (1992), 1, 475-479.
- [57] Peng, K.W., Vile, R.G., Cosset, F.L., Russell, S.J.. Selective transduction of protease-rich tumors by matrix-metalloproteinase-targeted retroviral vector. *Gene Therapy* (1999), 6, 1552-1557.
- [58] Peng, K.W., Morling, F.J., Cosset, F.L., Murphy, G., Russell, S.J. A gene delivery system activatable by disease-associated matrix metalloproteinases. *Human gene therapy* (1997), 8, 729-738.
- [59] Koivunen, E., Arap, W., Valtanen, H., Rainisalo, A., Medina, O.P., Heikkilä, P., Kantor, C., Gahmberg, C.G., Salo, T., Kontinen, Y.T., Sorsa, T., Ruoslahti, E., Pasqualini, R. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nature Biotechnology* (1999), 17, 768-774.
- [60] Suzawa T., Nagamura S., Saito H., Ohta S., Hanai N., Kanazawa J., Okabe M., Yamasaki M. Enhanced tumor cell selectivity of adriamycin-monoconal antibody conjugate via poly(ethylene glycol)-based cleavable linker. *J of Controlled Release* (2002), 79 N°1-3, 229-242.
- [61] Garcia, M., Platet, N., Liaudet, E., Laurent, V., Derocq, D., Brouillet, J.P., Rochefort, H., Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis. *Stem Cells* (1996), 14 N°6, 642-650.
- [62] Tung, C-H, Bredow, S., Mahmood, U., Weissleder, R. Preparation of a cathepsin D sensitive near-infrared fluorescence probe for imaging. *Bioconjugate Chemistry* (1999), 10 N° 5, 892-896.
- [63] Zucker, S., Cao, J. Imaging metalloproteinase activity *in vivo*. *Nature Medicine* (2001), 7 N°6, 655-666.
- [64] Bremer C., Tung C-H., Weissleder R. In vivo molecular target assesment of matrix metalloproteinase inhibition. *Nature Medicine* (2001), 7 N°6, 743-748.
- [65] Seltzer, J.L., Weingarten, H., Akers, K.T., Eschbach, M.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z. Cleavage specificity of type IV collagenase (gelatinase) from human skin. *The J. of Biol. Chem.* (1989), 264 N°33, 19583-19586.
- [66] Schechter, I., Berger, A. On the size of the active site in proteases. I papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1967), 27, 157-162.
- [67] Netzel-Arnett, S., Mallya, S.K., Nagase, H., Birkedal-Hansen, H., Van Wart, H.E. Continously recording fluorescent assays optimised for five human matrix metalloproteases. *Analytical Biochemistry* (1991), 195, 86-92.

- [68] Stack, %S., Gray, R.D. Comparaision of vertebrate collagenase and gelatinase using a new fluorogenic substrate peptide. The J. of Biol. Chemistry (1989) 264 N°8, 4277-4281.
- [69] Berman, J., Green, M., Sugg, E., Anderegg, R., Milligton, D.S., Norwood, D.L., Mc Geehan, J., Wiseman, J. Rapid optimisation of enzyme substrates using defined substrate mixtures. The J. of Biol. Chemistry (1992), 267 N°3, 1434-1437.
- [70] Borowski, P., Resch, K., Schmitz, H., Heiland, M. A synthetic peptide derived from non-structural protein 3 of hepatitis C virus serves as a specific substrate for PKC. Biol Chem. (2000), 381, 19-27.
- [71] Toomik, R., Ek, P. A potent and highly selective peptide substrate for protein kinase C assay. Biochemical Journal (1997), 322 Pt 2, 455-460.
- [72] Feldherr, C., Akin, D. Stimulation of nuclear import by simian virus 40-transformed cell extracts is dependent on protein kinase activity. Mol. Cell. Biol. (1995), 15 N°12, 7043-7049.
- [73] Schäfer, P., Aitken, S.J., Bachmann, M., Agutter, P.S., Muller, W.E., Prochnow, D.. Immunological evidence for the localization of a 110 kDa poly(A) binding protein from rat liver in nuclear envelopes and its phosphorylation by protein kinase C. Cell. Mol. Biol. (Noisy le Grand) (1993), 39 N°7, 703-714.
- [74] Carpino, L.A., Han, G.Y. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. J.Org. Chem. (1972), 37, 3404-3409.
- [75] Merrifield R.B. Solid phase synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc. (1963), 85, 2149-2153.
- [76] Fordyce, Hibbert, J.Am.Chem. Soc. (1905), 61-
- [77] Zalipsky S.. Functionalized poly(ethyleneglycol) for preparation of biologically relevant conjugates. Bioconjugate chemistry (1995), 6,150-165.
- [78] Morpurgo, M., Veronese, F.M., Kachensky, D., Milton Harris, J.. Preparation and characterization of poly(ethylene glycol) vinyl sulfone. Bioconjugate Chemistry (1996), 7, 363-368.
- [79] Abuchowski, A., Van Est, J., Palczuck, N. C., Davis F.F. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylenglycol. The J. of Biological Chemistry (1977), 252 N°11, 3578-3581.
- [80] Zalipsky, S., Brandeis, E., Newman, M.S., Woodle M.C. Long circulating, cationic liposomes containing amino-PEG-phosphatidylethanolamine. FEBS Letters (1994), 353, 71-74.

- [81] Dreborg, S., Akerblom, E.B. Immunotherapy with monomethoxy-polyethylene glycol modified allergens. *Crit.Rev.Ther. Drug Carrier Syst* (1990), 6, 315-365.
- [82] Davis, F.F, Van Es, T., Palzuck, N.C. Non immunogenic polypeptides (1979) U.S.Patent 4,179,337.
- [83] Abuchowski, A., McCoy, J.B., Palczuck, N.C., Van Est, J., David, F.F. Effect of attachment of polyethleneglycol on immunogenicity and circulating live of bovine liver catalase. *J. of Biological Chemistry* (1997), 252 N° 11, 3582-3586a.
- [84] Nakajima, N., Ikada, Y., Fusogenic activity of various water-soluble polymers. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* (1994), 6 N°8, 751-759.
- [85] Yamazaki, M., Ito, T.. Deformation and instability in membrane structure of phospholipid vesicles caused by osmophobic association : mechanical stress model for the mechanism of poy(ethylene glycol)-induced membrane fusion. *Biochemistry* (1990), 29, 1309-1314.
- [86] Herold, D.A., Keil, K.,Bruns, D.Z.E. Oxydation of polyethleneglycol by alcohol deshydrogenase. *Biochemical Pharmacology* (1991), 38 N°1, 73-76.
- [87] Harris J.M. : Poly(ethylene glycol) chemistry . *Biotechnical and Biomedical Applications ; Plenum Press* (1992) 347-370.
- [88] Staudinger, H., Meyer J.. *Helvetica Chimica Acta* (1919), 2, 635-
- [89] Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G.. Review. Poly(ethyleneimine) and its role in gene delivery. *J. of Controlled Release* (1999), 60 N°2-3, 149-160.
- [90] Mark, H.F., Bikales, N.M., Overberger, C.G., Menges, G.. Alkeyleneimines polymers. *Encyclopedia of Polymeric Science and Engineering* (Ed. Kroschwitz, Wiley New York) (1985), 1, 689-696.
- [91] Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Nieman, A., Elasser, H.P. Intracellular route and transcriptionnal competence of polyethyleneimine-DNA complexes. *J. of Controled Release* (2002), 82, N°2-3, 441-454.
- [92] Ferrari, S., Moro, E., Pettenazzo, A., Behr, J.P., Zachello, F., Scarpa, M.. ExGen500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells *in vitro et in vivo*. *Gene Therapy* (1997), 4, 1100-1106. Abstract.
- [93] Goula, D., Benoist, C., Mantero, S., Merlo, G., Levi, G., Demeneix, B.A.. Polyethyleimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung. *Gene Therapy* (1998), 5, 1291-1295.
- [94] Kunak, K., Merdan, T., Hegener, O., Häberlein, H., Kissel, T. Integrin targeting using RGD-PEI conjuguates for in vitro gene transfer. *J of Gene Medicine* (2003), 5 N° 7, 588-599.

- [95] Diebold, S.S., Kursa, M., Wagner, E., Cotton, M., Zenke, M. Mannose polyethyleneimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells. *The J. of Biological Chemistry* (1999), 274 N°27, 19087-19094.
- [96] Bettinger, T., Remy, J-S., Erbacher, P. Size reduction of galactosylated PEI / DNA complexes improves lectin-mediated gene transfer into hepatocytes. *Bioconjugate Chemistry* (1999), 10, 558-561.
- [97] Chollet, P., Favrot, M.C., Hurbin, A., Coll, J.L. Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes. *The J. of Gene Medicine* (2002), 4, 84-91.
- [98] Planck, C., Metchler, K., Szoka, F.C.Jr, Wagner E.. Activation of the complement system by synthetic DNA complexes : a potential barrier for intravenous gene delivery. *Human gene Therapy* (1996), 7, 1437-1446 Abstract.
- [99] Forrest, M.L., Koerber, J.T., Pack, D.W. A degradable polyethylenimine derivative with low toxicity for highly efficient gene delivery. *Bioconjugate Chemistry* (2003), 14 N°5, 934-940.
- [100] Tomalia, D.A., Killat, G.R. *Encyclopedia of Polymeric Science and Engineering* (Ed. Kroschwitz, Wiley New York) (1985) 1, 680-739.
- [101] Tanaka, R., Ueoka, I., Takaki, Y., Kataoka, K., Saito, S.. High molecular poly(ethyleneimine) and poly(methyleneimine). *Macromolecules* (1983), 16, N°6, 849-853.
- [102] J.M. Warakowski, B.P.Thill. J. Evidence for long chain branching in polyethyloxazoline. *J of Polymer Science : part A : Polymer Chemistry* (1990), 283551-3563.
- [103] Jeong, J.H., Song, S.H., Lim, D.W., Lee, H., Park, T.G.. DNA transfection using linear poly(ethyleneimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline). *J of Controlled Release* (2001), 73 N°2-3, 391-399.
- [104] Sheenan, J.C., Hess, G.P.. A new method for forming peptide bonds. *J. of the American Chemical Society* (1955), 77, 1067-1068.
- [105] Khorana, H.G. The use of dicyclohexylcarbodiimide in the synthesis of peptides. *Chem Ind. (London)* (1955) 1087-1088.
- [106] Sheenan, J.C., Cruckshank, P.A., Boshart, G.L. A convenient synthesis of water-soluble carbodiimide. *The J. of Organic Chemistry* (1961), 26, 2525 – 2528.
- [107] Köning, W., Geiger, R. Eine neue methode zur synthese von peptide : aktivierung der carboxylgruppe mit dicyclohexylcarbodiimide unter zusatz von &-hydroxy-benzotriazolen. *Chemische Beritche* (1970), 103, 788-798.

- [108] Anderson, G.W., Zimmerman, J.E., Callahan, F.M. The use of esters of N-hydroxysuccinimide in peptide synthesis. *The J. of American Chemical Society* (1964), 86 N°9, 1839-1842.
- [109] Castro, B., Dormoy, J.R., Dourtoglou, B., Evin, G., Selve, C. Réactifs de couplage peptidique IV. L'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-Noxytris(diméthylamino)phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Letters* (1975), 14, 1219-1222.
- [110] Castro, B., Dormoy, J.R., Dourtoglou, B., Evin, G., Selve, C., Ziegler, J-C.. Peptide coupling reagent IV. A novel cheaper preparation of benzotriazolyl-oxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophate (BOP reagent). *Synthesis* (1976), 11, 751-752.
- [111] Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Letters* (1989), 30 N°15, 1927-1930
- [112] Carlsson, J., Drevin, H., Axen R. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate, a new heterobifunctional reagent. *The Biochemical Journal* (1978), 173, 723-737.
- [113] Tang, C.P., Zeng, J.M., Gao, Z.J., Ma, Y.W., Shi, L., Li, H., Too, H.P., Wang. Polyethylene glycol modified polyethyleneimine for improved CNS gene transfer : effects of PEGylation extent. *Biomaterials* (2003), 24 N°13, 2351-2362.
- [114] Mordelet-Dambrine, M., Lafuma, C., Stanislas-Leguern, G., Robert, L., Chretien, J., Hornebeck W. Elastase activity of bronchoalveolar cells in advanced pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* (1998), 1, 748-745.
- [115] Okada, Y., Gonoji, Y., Naka, J., Yomita, K., Nakanishi, I., Iwata, K., Yamashita, K., Hayakawa T. Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT1080 human fibrosarcoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* (1992), 267 N°30, 21712 -21719.
- [116] Morodomi, T., Ogata Y., Sasaguri Y., Morimatsu, M., Nagase H.. Purification of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukemia and HT1080 fibrosarcoma cells. *The Biochemical Journal* (1992), 285, 603-611.
- [117] Guh, J.H., Cheuh, S.C., Hwang, T.L., Che, J., Teng C.M. Cell proliferation in human prostatic smooth muscle cells involves the modulation in protein kinase C isoenzymes. *European J. of Pharmacology* (1998), 359, N° 2-3, 281-284.
- [118] Vasu, S.K., Forbes, D.J. Nuclear pores and nuclear assembly. *Current Opinion in Cell Biology* (2001), 13, 363-375.

- [119] Mincher, D.J., Turnbull, A., Bibby, M.C., Loadman, P.M.. Napier University, BTG international Ltd, Cancer Research Ventures Ltd. Tumor targeting prodrugs activates by metallo matrixproteinases, Patent : WO02072620 (Priority data 09/03/2001, Filing date 08/03/2002, Publication date : 19/09/05), cité dans : Protease-activated drug delivery. Expert Opinion in Therapeutic Patents (2003), 13 N°1, 125-127.
- [120] Ye, H.Q., Azar D.T. Expression of gelatinase A et B and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. Invest. Ophtamol. Vis. Sci. (1998), 39 N°6, 913-921.
- [121] Parikka, M. Detection of gelatinolytic activity in the migrating epithelial cells of the wound edge 5.7.2 / Cutaneous wound healing of transgenic mice carrying human TIMP-1 under MMP-9 promoter (5.7) / Collagen XVII an TIMP-1 in epithelial cell migration. Ed. University of Oulu, (Finlande). ISBN 951-427198-X. URN : ISBN : 951427198X.
- [122] Nagase, H., Fields, G.B. Human matrix metalloproteinase specificity studies using collagen sequence-based synthetic peptides. Biopolymers (1966), 40, 399-416.
- [123] Tung, C-H., Bredow, S., Mahmood, U., Weissleder, R. Preparation of a cathepsin D sensitive near infrared fluorescence probe for imaging. Bioconjugate Chemistry (1999), 10, 892-896.
- [124] Selvey, S., M.Haupt, L., Thompson, E.W., Matthaei, K.I., Irving, M.G., Griffiths, L.R.. Stimulation of MMP-11 (stromelysin-3) expression in mouse fibroblasts by cytokines, collagen and co-culture with human breast cancer cell lines. BMC Cancer (2004), 4, 40.
- [125] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid.. Analytical Biochemistry (1985), 150, 76–85. (and published erratum, 163, 279 (1987)).
- [126] Gaertner, H.F., Offord, R.E.. Site-specific attachment of functionalized poly(ethylene glycol) to the amino terminus of proteins. Bioconjugate Chemistry (1996), 7, 38-44.
- [127] Hancock, W.S., Battersby, J.E. A new micro-test for the detection of incomplete coupling reactions in solid-phase peptide synthesis using 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid. Analytical Biochemistry (1976), 71, 260-264.
- [128] Stocks, S.J., M.Jones, A.L., Ramey, D.E., Brooks C.W. A fluorometric assay of the degree of modification of protein primary amines with polyethylene glycol. Analytical Biochemistry (1986), 154, 232-234.

- [129] Sims, G.E.C., Snape T.J. A method for the estimation of polyethylene glycol in plasma protein fractions. *Analytical Biochemistry* (1980), 107, 60-63.
- [130] Nagase, H., Activation mechanism of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* (1997), 378, 151-160.
- [131] Salo, T., Makela, M., Kymaniemi, M., Autio-Harmanen, H., Larjava, H. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 during early human wound healing. *Lab. Investigation* (1994), 70 N°2, 176-182.
- [132] Agren, M.S., Gelatinase activity during wound healing. *British Journal of Dermatology* (1994), 131, 634-640.
- [133] Yasumitsu, H., Wakabayashi, E., H.Kitakima, Sakakamoto, Y., Miyazaki, K. TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) : their species, functions and effects on tumor metastasis. *Nippon Rinsho* (1995), 53, 1798-1804.
- [134] Goetzl, E.J., Jda, M., Leppert, D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J.of Immunology* (1996), 156, 1-4.
- [135] Zanta, M.A., Belguise-Valadier, P., Behr, J.P. Gene delivery : a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *P.N.A.S. USA* (1999), 96 N°1, 91-96.
- [136] Fibbi G., Caldini, R., Chevanne, M., Pucci, M., Schiavone, N., Morbidelli, L., Parenti, A., Granger, H.J., Del Rosso, M., Ziche, M. Urokinase-dependent angiogenesis in vitro and diacylglycerol production are blocked by antisense oligonucleotides against the urokinase receptor. *Lab. Invest.* (1998), 78 N°9, 1109-1119.
- [137] Toth, M., M.Bernardo, M., Gervasi, D.C., Soloway, P.D., Wang, Z., Bigg, H.F., Overall, C.M., DeClerck, Y.A., Tschache, H., Cher, M.L., Brown, S., Mashery, S., Fridman, R.. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (membrane type-1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *The Journal of Biological Chemistry* (2000), 275, N°52, 41415-41423.
- [138] Snyder S., Sobocinski P.Z. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Analytical Biochemistry* (1975), 64, 284-288.
- [139] Ross R., Atherosclerosis, an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* (1999), 340, 115-126
- [140] Tsukifuji R., Tagawa K., Hatamochi A., Shinkai H. Expression of matrix metalloproteinase-1, -2 and -3 in squamous cell carcinoma and actinic keratosis. *British J. Cancer* 1999, 80, 1087-1091

- [141] Plantner J.J., Jiang C., Smine A. Increase in interphotoreceptor matrix gelatinase A (MMP-2) associated with age-related macular degeneration. *Exp.Eye.Res.* (1998), 67, 637-645
- [142] Holskin B.P., Buktiyarova M.Dunn B.M., Baur P., De Chastonay J., Pennington M.W. A continuous-based assay of human cyto-megalovirus protease using a peptide substrate. *Analytical Biochemistry* (1995), 227, 148-155
- [143] Ishiguro N., Ito T., Miyazaki K., Iwata H. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and glycosaminoglycans in synovial fluid from patient with rheumatoid arthritis. *J.Rhumatol.* (1999), 26, 34-40
- [144] Giraudon P., Buart S., Bernard A., Belin M.F. Cytokines secreted by glial cells infected with HTLV-I modulate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their natural inhibitor (TIMPs): Possible involvement in neurodegenerative processes. *Mol. Psychiatry* (1997), 2, N°184, 107-110

Résumé des figures et des tableaux

| | FIGURES | Page |
|---------------|---|------|
| Fig.1 | Vectorisation de drogues ou de gènes par des enzymes péricellulaires | 16 |
| Fig. 2 | Interaction de l'ADN avec la L-Poly(éthylèneimine) | 19 |
| Fig. 3 | Mécanisme du processus d'angiogenèse liée à la production de gélatinase B | 21 |
| Fig.4 | Mécanisme du processus d'angiogenèse liée à la production de gélatinase A | 22 |
| Fig.5 | Transfection ciblée d'ADN par les gélatinases | 26 |
| Fig.6 | Structure type du « vecteur-substrat », dont un peptide situé entre le PEI et le mPEG est clivable par les gélatinases | 31 |
| Fig.7 | Dérivés PEI différents obtenus par des substrats de sens peptidique inverse | 32 |
| Fig.8 | Principe de synthèse peptidique | 34 |
| Fig.9 | Groupements protecteurs des groupements aminés | 35 |
| Fig.10 | Synthétiseur peptidique | 36 |
| Fig.11 | Schéma-type de synthèse peptidique | 37 |
| Fig.12 | Synthèse du mPEG-NH₂ <u>1</u> | 45 |
| Fig.13 | Synthèse du L-PEI <u>2</u> | 54 |

| | |
|--|----|
| Fig.14 Cinétique d'hydrolyse du substrat synthétique par la gélatinase B | 55 |
| Fig.15 Effets du mPEG-OH et du L-PEI sur l'activité gélatinase | 56 |
| Fig.16 Carbodiimides utilisées pour les couplages | 57 |
| Fig.17 Modes de couplages possibles avec les carbodiimides | 58 |
| Fig.18 Couplage peptidique par les analogues du BOP | 60 |
| Fig.19 Formation d'oxazolidinone lors d'un essai de couplage de la partie C-terminale d'un peptide à une amine. | 61 |
| Fig.20 Synthèse du vecteur-substrat <u>8</u> : [mPEG-NH-succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala]₂-PEI | 65 |
| Fig.21 Purification de <u>8</u> : [mPEG-NH-succ-(A)₃-P-L-G-L-W-A]_n-PEI | 67 |
| Fig.22 Spectre 1-H RMN de <u>8</u> : [mPEG-NH-succ-(A)₃-P-L-G-L-W-A]_n-PEI | 68 |
| Fig.23 Synthèse de N N'(2-pyridyldithiopropionyl) L-poly(éthylèneimine (L-PEI-PDP) | 70 |
| Fig.24 Projet de synthèse de polysutrat avec pont di-sulfure | 70 |
| Fig.25 Synthèse directe de H-Lys-Lys-Lys-Cys-NH₂ sur résine Rinkamide | 71 |
| Fig.26 Synthèse de <u>11</u> : Boc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH | 73 |
| Fig.27 Synthèse du Polysubstrat <u>12</u> : [mPEG-NH-succ-(A)₃PLGLWA)₄-Lys-Lys-Lys]₂-L-PEI | 73 |
| Fig.28 Synthèse de <u>16</u> : [mPEG-NH-Ala-Trp-Leu-Gly-Leu-Pro-(Ala)₃-succ]_n-PEI | 76 |
| Fig.29 Synthèse de <u>17</u> : H-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Cys-(NH₂) | 77 |

| | |
|---|-----|
| Fig.30 Synthèse de <u>21</u> : PEI-[succ-(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala- -Cys(NH₂)-S-S-CH₂-CH₂-CO-NH- PEGm]_n | 78 |
| Fig.31 Synthèse de <u>23</u> : [mPEG-NH-succ-(Gly)₉]_n-PEI | 79 |
| Fig.32 Synthèse de <u>27</u> : [mPEG-NH-succ-(Ala)₃-(Gly)₄-Ser]_n - PEI | 81 |
| Fig.33 Synthèse de <u>31</u> : [mPEG-NH-succ)₂-PEI | 83 |
| Fig.34 Synthèse de <u>33</u> : [Leu-Trp-Ala]₂-PEI | 84 |
| Fig.35 Synthèse de <u>34b</u> : L-PEI-[succ-Pro-Leu-Gly-OH] | 86 |
| Fig.36 Cinétique d'hydrolyse de <u>8</u> : [mPEG-NH-succ(Ala)₃-Pro-Leu-Gly- Leu-Trp-Ala]_n-PEI, par la Gélatinase B | 88 |
| Fig.37 Analyse CPG de l'hydrolysate de <u>8</u> : [mPEG-NH-succ(Ala)₃-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala]_n-PEI (lot YL 186) par la Gélatinase B, obtenue en 43H. à 37°C | 89 |
| Fig.38 Analyse CPG de l'hydrolysate de <u>8</u> : [mPEG-NH-succ(Ala)₃-Pro-Leu-Gly- Leu-Trp-Ala]_n-PEI (lot YL186) par l'élastase, obtenue en 43H. à 37°C | 89 |
| Fig.39 Analyses HPLC de l'hydrolyse de substrat synthétique de gélatinases par les surnageants cellulaires, avec et sans sérum | 92 |
| Fig.40 Structure de l'actinonine | 96 |
| Fig.41 Influence de l'actinonine sur la transfection de la molécule <u>8</u> comparativement au L-PEI <u>2</u>, en présence de sérum. | 97 |
| Fig.42 Influence de l'actinonine sur la transfection de la molécule <u>8</u> comparativement au L-PEI <u>2</u>, sans sérum | 97 |
| Fig.43 Effet du rapport N/P sur les transfusions avec et sans sérum du L- PEI <u>2</u>, du « vecteur-substrat » <u>8</u> et du produit <u>33</u> | 100 |
| Fig.44 Transfections du gène de la luciférase par <u>8</u> (lots YL069 et YL186) et <u>33</u> (lot YL176), dans les cellules B16 et HT1080. | 102 |
| Fig.45 Transfections du gène de luciférase par <u>8</u> (lots YL069 et YL186) et de <u>33</u> (lot YL176), dans les cellules 3T3 et HT1080 | 104 |

| | | |
|---------------|--|-----|
| Fig.46 | % de restauration de transfections, obtenues avec <u>8</u> (lots YL186 et YL069) sur 3 types de cellules (3T3, B16, HT1080) | 106 |
| Fig.47 | Comparaison des transfections de différentes molécules avec les cellules HT1080 et avec les cellules B16. | 107 |
| Fig.48 | % de restauration de transfection avec différentes molécules dérivées PEI | 111 |
| Fig.49 | Profil d'hydrolyse du « vecteur-substrat » <u>21</u> par le surnageant des cellules HT1080, mise en évidence sur colonne Superdex 75® | 115 |
| Fig.50 | Hydrolyses possibles du « vecteur-substrat » <u>21</u> par le surnageant des cellules HT1080 | 116 |

TABLEAUX

| | | |
|--------------|--|-----|
| Tab.1 | Métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP) | 30 |
| Tab.2 | Propriétés physico-chimiques des dérivés des PEI | 94 |
| Tab.3 | Temps de rétention, en CPG sur colonne Superdex 75, des « vecteur-substrats » soumis à une hydrolyse de 20H. à 37°C avec les surnageants de cellules HT1080 | 112 |

ELABORATION OF DNA VECTORS AS SUBSTRATES OF GELATINASES

ABSTRACT

A peptide, a substrate of gelatinase A (MMP2) and B (MMP9), has been incorporated between two polymers : a poly(ethyleneimine), (L-PEI) and a poly(ethyleneglycol)₅₀₀₀, (mPEG), by several methods of synthesis. The conception of the substrates is based on the inhibition of the PEI bound DNA transfection, by mPEG, when no cleavage of the incorporated peptide occurs. A higher level of transfection of the luciferase gene, carried by these substrates, is obtained in the HT1080 cells than in the B16 and 3T3 cells, while no or few tranfection occurs with the control molecules. These results are in accordance with the gelatinase activities produced by the supernatant of these cells, allowing the discarding of the mPEG. It allows us to envisage a targeting of therapeutical genes into cancerous cells by mean of a synthetic vector.

Key-words : PEI, PEG, gelatinase, DNA, transfection

RESUME

Un peptide synthétique, substrat de gélatinases A (MMP2) et B (MMP9) a été introduit par synthèses chimiques diverses entre deux polymères : une poly(éthylèneimine), (L-PEI) et un poly(éthylène glycol)₅₀₀₀, (mPEG₅₀₀₀). La conception des produits est basée sur l'inhibition de la transfection cellulaire d'ADN lié au L-PEI, par le mPEG, lorsque le peptide incorporé n'est pas clivé par ces enzymes. Un taux plus important de transfection du gène de la luciférase, transporté par ces substrats, est obtenu avec les cellules HT1080 qu'avec les cellules B16 et 3T3, alors que pas ou peu de transfection est obtenue avec les molécules-témoins. Ces résultats sont en rapport avec les activités gélatinases des surnageants de ces cellules, permettant l'élimination du mPEG. Ils laissent envisager un ciblage de gènes thérapeutiques de cellules cancéreuses avec un vecteur synthétique.

Mots -clés : PEI, PEG, gélatinases, ADN, transfection.