

Unité UMR 176 CNRS / Institut Curie
Equipe Pharmacochimie, Chimie Bioorganique, Vectorisation (Paris)

Chef d'équipe : Jean-Claude FLORENT

Chercheurs permanents : 6
Etudiants et post-doctorants : 8
Techniciens et administratifs : 3,5

L'équipe de "Chimie Bioorganique, Vectorisation" a comme activité principale la synthèse et la pharmacomodulation de petites molécules pour l'étude du vivant. Les molécules que nous synthétisons, trouvent de multiples applications en tant que sondes pour la protéomique/génomique et/ou en tant qu'agents à visée thérapeutique. Nous poursuivons nos axes de recherche sur la vectorisation et le ciblage antitumoral, en particulier par l'utilisation de conjugués drogue-toxine de Shiga, ou peptide-Shiga (pour des applications en immunologie antitumorale). Notre laboratoire est également impliqué dans le domaine de la thérapie ciblée. Nous développons ainsi, en particulier, des composés flavonoïdes inhibiteurs d'aminopeptidases potentiellement anti-angiogéniques et anti-métastatiques. Nous synthétisons des ligands de la tubuline à activité antivasculaire, analogues de la combrétastatine A4, ainsi que des composés inhibiteurs des sérine thréonine kinases CK2 et PIM1.

Nous nous efforçons en permanence d'ajouter de petites molécules à la chimiothèque Curie-CNRS, qui regroupe les produits synthétisés à l'UMR 176. Certains des « hits » trouvés par nos partenaires biologistes sont en cours d'optimisation : inhibiteurs d'interactions protéine-protéine impliquées dans la migration cellulaire et les métastases (Syndécan 1-lamiline). Nous développons un hit inhibiteur de la sérine-thréonine phosphatase I (PP1).

Par ailleurs, au sein d'un réseau PIC, et en liaison avec une équipe de biologistes de l'Institut Curie, nous synthétisons des sondes chimiques pour l'étude moléculaire de la biologie et des mécanismes relatifs à la voie rétrograde empruntée par la toxine de Shiga pour atteindre l'appareil de Golgi. Les outils chimiques synthétisés sont destinés à réaliser des études d'imagerie en spectroscopie ionique et à obtenir une analyse protéomique de surface de la voie rétrograde.

I. Inhibition de l'angiogénèse tumorale : Synthèse de composés antivasculaires.

(R. Pontikis, J.-C. Florent). Participants : N. Ty, M. Arthuis (étudiants en thèse).

(Collaboration : G. Chabot, INSERM U 640, UMR 8151 CNRS/Université Paris Descartes)

Ce projet s'inscrit dans la poursuite d'un programme PIC (Programme Incitatif Curie) et fait l'objet d'un contrat INCa (Institut National du Cancer) en 2009

L'angiogénèse (c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux qui sont préexistants) est fondamentale dans un grand nombre de processus, dont la progression tumorale. C'est pourquoi cet événement constitue une cible prometteuse en chimiothérapie anticancéreuse. Nous nous intéressons à des thérapies qui vont spécifiquement détruire la vascularisation des tumeurs.

Certains inhibiteurs de polymérisation de la tubuline ont la propriété d'induire, à des doses inférieures aux doses maximales tolérées, un changement morphologique des cellules endothéliales des nouveaux vaisseaux sanguins tumoraux. Il en résulte un arrêt du flux sanguin et la mort des cellules tumorales par nécrose hémorragique. Les données cliniques de la CA4-P (prodrogue phosphate de la combrétastatine A4) ont confirmé cette activité antivasculaire chez l'homme. Rechercher, au sein de cette famille, de nouveaux inhibiteurs de tubuline plus efficaces,

plus stables et moins toxiques tout en essayant de mieux comprendre leur mécanisme d'action, telle est la finalité de nos travaux.

La CA4 est un dérivé naturel de type stilbène. La double liaison de configuration *cis* qui définit l'orientation des deux noyaux aromatiques est essentielle pour l'activité biologique. Une étude de structure-activité portant sur des vinylogues de la CA4 nous a permis de sélectionner un dérivé possédant le motif *cis-trans* butadiène et un simple noyau phényle. Il présente un effet inhibiteur de la polymérisation de la tubuline supérieur à celui de la CA4 tout en étant moins cytotoxique, ce qui pourrait être un avantage pour un anti-vasculaire. De par sa structure originale il peut être considéré comme une nouvelle tête de série (J. Kaffy *et al.* *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2657).

Parallèlement, nous avons montré que la stabilisation de ces structures diéniques, par le remplacement de la double liaison *cis* par un *cis*-cyclopropane, permet de conserver l'activité antitubuline (N. Ty *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, sous presse). Une synthèse énantiosélective de nouveaux dérivés cyclopropaniques chiraux est en cours d'étude.

D'autre part, dans le but de réduire la liberté conformationnelle du pont de liaison (oléfinique ou diénique), de nouveaux analogues, rigidifiés par adjonction d'un cycle à 5 ou 6 atomes et présentant une double liaison *cis* exocyclique, ont été synthétisés (analogues contraints). L'étape-clé, une réaction tandem Heck-Suzuki-Miyaura, permet de créer de façon stéréosélective et convergente les structures envisagées (M. Arthuis *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 6397; M. Arthuis *et al.*, *J. Org. Chem.* **2009**, sous presse). La conception de ces molécules est guidée par des études de « docking » dans le site actif de la tubuline ; coll L. Morin Allory, ICOA, UMR CNRS 6005, Orléans.

Les composés synthétisés sont évalués pour leur capacité à inhiber la polymérisation de la tubuline et réduire la prolifération cellulaire tumorale, mais également pour leurs effets sur la morphologie des cellules endothéliales humaines (test *in vitro* prédictif d'une activité antivasculaire) ; coll. G. Chabot, U640 et UMR 8151, Univ. Paris 5, Paris.

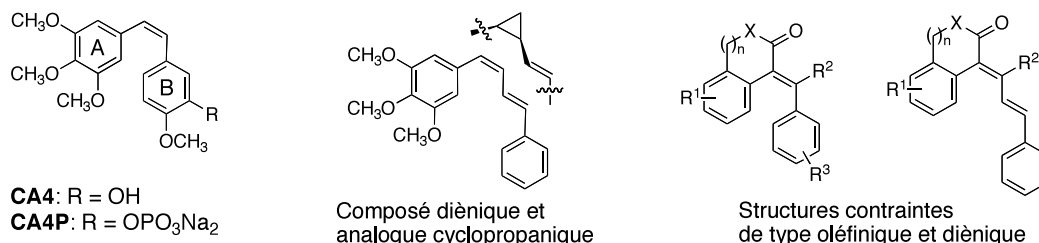


Figure 1 : Nouveaux analogues contraints de la CA4, agents anti-vasculaires potentiels

II. Vectorisation et activation de prodrogues antitumorales par la sous-unité B de la toxine de Shiga

(F. Schmidt). Participants : G. Fillon, C. Smet-Gilardi (CDD Curie) (Collaboration : L. Johannes, UMR 144 CNRS/Institut Curie)

Dans le contexte de notre expérience dans le domaine de la vectorisation, nous avons été amenés à établir une collaboration avec l'équipe de biologie dirigée par Ludger Johannes au sein de l'UMR 144 (Institut Curie) pour utiliser la sous-unité B de la toxine de Shiga comme vecteur.

La toxine de Shiga est l'agent étiologique de la shigellose, une forme de dysenterie. Cette protéine bactérienne est constituée de deux sous-unités : la sous-unité A, qui exerce une activité toxique une fois parvenue dans le cytoplasme, inhibant la synthèse protéique. La sous-unité B, pentamérique, qui joue le rôle de "pilote", interagit avec les récepteurs à la surface de la cellule, et assure le transport intracellulaire de la sous-unité A vers l'appareil de Golgi. Son récepteur cellulaire est un glycosphingolipide, le globotriosyl céramide ou Gb3 qui est surexprimé pour la majorité des cancers.

L'agent cytotoxique est ciblé sous forme de prodrogue, inactive par elle-même, mais susceptible de libérer le composé actif par activation intracellulaire. Cette prodrogue est constituée de 3 parties, l'élément de ciblage (sous-unité B de la Toxine de Shiga), un espaceur et l'agent cytotoxique. L'avantage de ce type de stratégie est dû à la fois à la reconnaissance des cellules tumorales et à l'internalisation qui suit l'étape de reconnaissance.

1. Conjugué Shiga-Sn38

Un des systèmes de libération sur lequel nous avons travaillé est la coupure des disulfures par un réducteur comme le glutathion intracellulaire pour libérer le SN-38, un dérivé de la camptothécine particulièrement actif sur les cancers colorectaux. Les conjugués sont stables et libèrent bien le composé actif à l'intérieur des cellules.

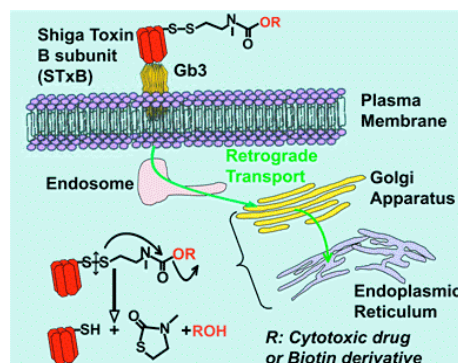


Figure 2 : Mécanisme d'action du conjugué.

Des mesures de cytotoxicité sur le conjugué ont été conduites sur des cellules HT29 (cancer colorectal). On a ainsi pu mesurer une CI_{50} meilleure que le médicament de référence, l'irinotecan, et surtout une très bonne sélectivité pour les cellules qui expriment le récepteur par rapport à celle qui ne l'expriment pas (A. El Alaoui *Angewandte Chemie* 2007). Des tests sur souris ont permis de montrer un très bon effet thérapeutique avec régression des tumeurs.

2. Conjugué Shiga-pro-Benzodiazépine

Depuis ces dernières années, les ligands des récepteurs périphériques de benzodiazépines (RPB) sont apparus comme des agents thérapeutiques potentiels des cancers humains.

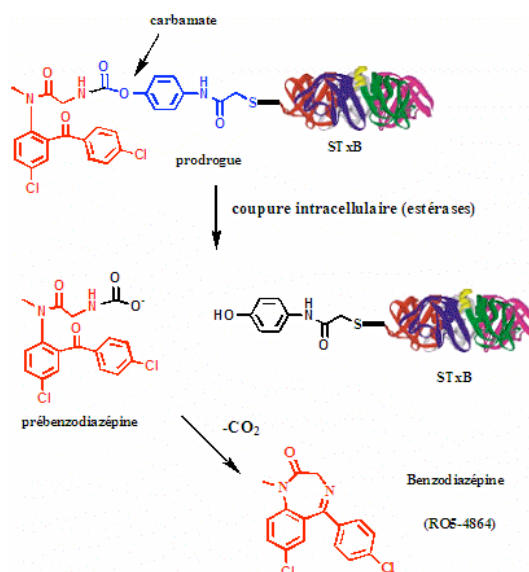


Figure 3 : Mécanisme de libération.

Le RO5-4864 constitue un très bon ligand des RPB, mais il n'existe pas de forme galénique de la molécule, c'est-à-dire de forme injectable chez l'homme, et ceci en raison du caractère très insoluble du produit. Il nous a donc paru intéressant d'explorer une approche de ciblage d'une forme "prodrogue de benzodiazépine". Pour cela, nous avons utilisé, comme élément de ciblage de tumeurs, l'unité B de la toxine de Shiga. Cette vectorisation pourrait, d'une part augmenter la solubilité de la molécule et, d'autre part, accroître la sélectivité du produit vis-à-vis des cellules tumorales.

Notre approche consiste à synthétiser des pro-benzodiazépines acycliques liées à la toxine de Shiga par un espaceur clivable intracellulairement. Dans un premier temps, la prodrogue a été obtenue par un schéma de synthèse nécessitant 11 étapes, avec un rendement global de 4,7%. Un deuxième schéma, plus convergent, a permis de réduire ce nombre d'étapes à 7 avec un rendement global de 15%. Les conditions de couplage avec la fonction thiol de la sous-unité B de la toxine de Shiga modifiée ont été optimisées (pH = 7,5).

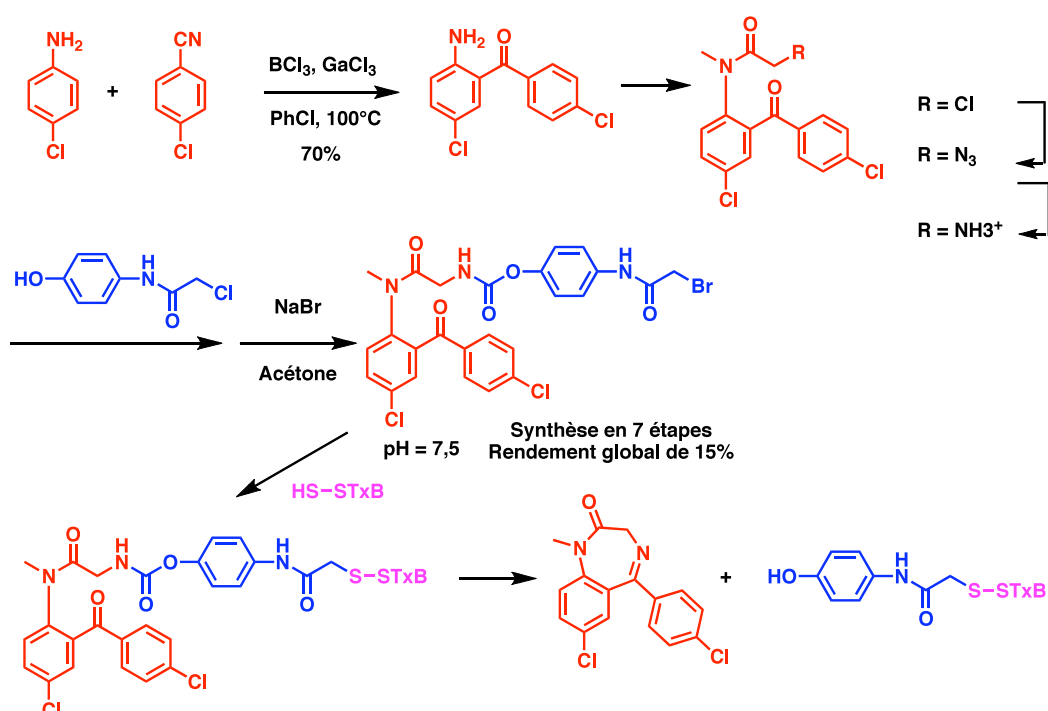


Figure 4 : Schéma de synthèse

La prodrogue s'est avérée beaucoup plus soluble que R05-4864, stable et apte à libérer la benzodiazépine active. Le conjugué est de plus sélectif des cellules cancéreuses qui surexpriment le récepteur de la Toxine de Shiga. (A El Alaoui, *Chem Med Chem* 2008).

En ce qui concerne les développements actuels du projet, notre but consiste à améliorer l'efficacité *in vivo* sans augmenter la toxicité, en clair à augmenter le rapport agent cytotoxique/sous-unité B de la toxine de Shiga. Dans cette optique, des répartiteurs permettant de lier simultanément plusieurs drogues à une unité toxine de Shiga sont en cours de synthèse.

III. Synthèse d'agents de contraste ciblés par la Toxine de Shiga

(F. Schmidt). Participants: N. Bogliotti (post-doctorant, contrat P-G. de Gennes)
(Collaborations : V. Semetey, UMR 168 CNRS/Institut Curie ; M. Tantet, LOA CNRS, UMR 7587, ESPCI ; C. Boccara, UPR A005, ESPCI)

Ce projet est réalisé dans le cadre d'une collaboration entre notre laboratoire, un laboratoire de biologie de l'Institut Curie UMR 144 (équipe L. JOHANNES), un laboratoire de physico-chimie de surface et des matériaux de l'Institut Curie UMR 168 (équipe V. SEMETEY) et deux laboratoires de physiciens de l'ESPCI (équipes M. TANTER, C. BOCCARA). Ce projet a reçu le soutien financier de la Fondation Pierre-Gilles de Gennes pour la Recherche. (Réseau Thématique de Recherche Avancée).

Il est possible de détruire des tumeurs par l'utilisation d'ultrasons suffisamment puissants pour provoquer un échauffement fatal pour les cellules. Le problème qui se pose est la focalisation du faisceau pour ne toucher que les zones ciblées. En effet, l'inhomogénéité des tissus environnants traversés par le faisceau ne permet pas une bonne définition de la zone à irradier. Pour pallier à ce défaut, une technique appelée retournement temporel ultrasonore consiste à récupérer un signal ultrasonore émis par la tumeur, analyser le signal et le renvoyer avec une intensité destructrice pour la zone ciblée en tenant compte de la signature du signal ultrasonore.

L'ensemble constituerait donc un protocole en plusieurs étapes. Tout d'abord, l'injection d'un agent de contraste ciblé par la Toxine de Shiga (STxB) qui reconnaît les zones tumorales et une irradiation laser permettrait l'obtention d'une image ultrasonore tenant compte des distorsions dues à l'environnement de la tumeur. Vient ensuite une phase de récupération et d'analyse du signal permettant de créer une émission ultrasonore adaptée à la zone ciblée. Cette émission sera suffisamment énergétique pour réaliser la destruction de la zone tumorale par échauffement.

Comme agent de contraste, nous avons choisi des particules d'or de type bâtonnets (nanorods) qui donnent lieu à un effet photoacoustique compatible avec une utilisation *in vivo*.

IV. Vers une nouvelle méthode de protéomique fonctionnelle, pour l'identification des protéines impliquées dans la voie du transport rétrograde

(J.-C. Florent, M. Azoulay). Participant : R. Christiano (étudiant en thèse, ARC)
(Collaboration : L. Johannes, UMR 144 CNRS, Institut Curie)

Dans ce projet, nous développons une approche de protéomique fonctionnelle visant à identifier les protéines qui utilisent la voie du transport rétrograde. De découverte récente, cette voie permet aux molécules d'éviter recyclage et dégradation pour atteindre d'autres compartiments de la cellule. Les protéines et lipides l'empruntant passent directement de l'endosome précoce au réseau trans-golgien (TGN), en court-circuitant les endosomes tardifs. La voie du transport rétrograde est clairement nécessaire pour l'entrée cellulaire de produits pathogènes comme les toxines (STxB, CTxB, ...) ou les virus (VIH, Herpes, ...) et la liste des protéines cellulaires empruntant cette voie croît régulièrement. De récentes études suggèrent un rôle prépondérant du transport rétrograde dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la présentation d'antigènes, le transport du glucose et du cuivre et le transport de certains récepteurs du signal (IFN, EGFR, ...). L'élucidation des mécanismes mis en jeu, mais aussi l'identification de nouvelles protéines de cette voie, présentent donc un intérêt majeur, tant dans le domaine des connaissances fondamentales qu'en thérapeutique.

Dans une première étape, nous modifions l'ensemble des protéines de surface à l'aide d'un peptide signal de sulfatation lié à une biotine. Parmi les protéines ainsi modifiées, celles qui vont se

diriger vers les compartiments accepteurs de la voie rétrograde (Golgi, ...) sont alors sulfatées sur le peptide tag par une enzyme sulfotransférase, du Golgi/TGN. Les protéines biotinylées isolées avec des billes de streptavidine, puis caractérisées par gels d'électrophorèse et qui s'avèrent sulfatées, seront caractérisables comme celles qui suivent la voie rétrograde, et seront identifiées en spectrométrie de masse MALDI-TOF.

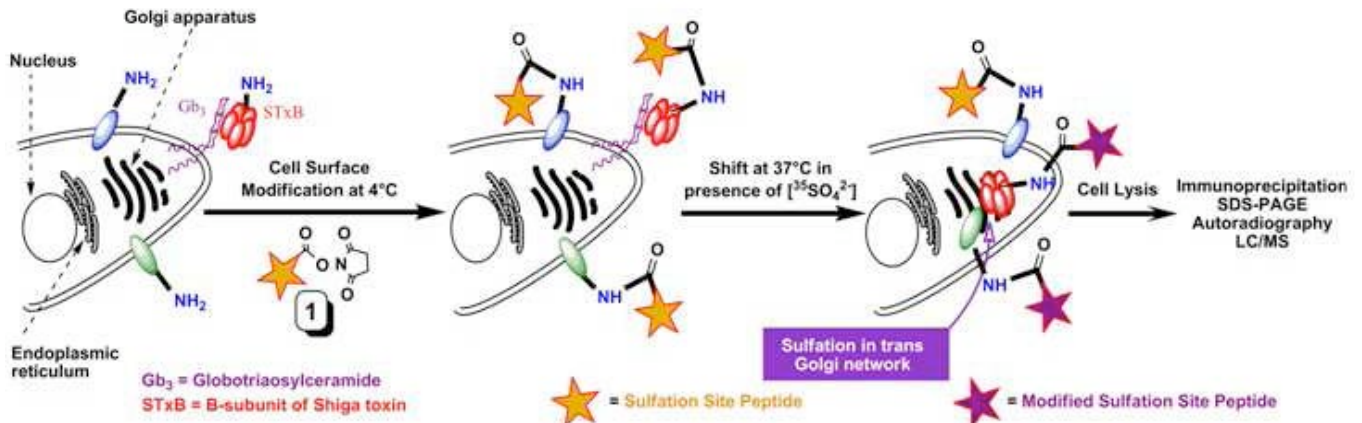


Figure 5 : Principe de la méthode de protéomique

Cette démarche a donc été réalisée sur une protéine modèle en se servant de la sous-unité B de la toxine de Shiga (STxB), ancrée en surface à son récepteur, le glycolipide Gb3 présent sur les cellules Hela.

Par comparaison avec une Shiga génétiquement taguée par fusion génétique prise comme référence, nous avons pu évaluer l'efficacité de la méthode. Nous avons ainsi montré que la méthode, bien que fonctionnelle, n'est pas pour l'instant suffisamment efficace, et nous travaillons à son optimisation (cf schéma ci-après).

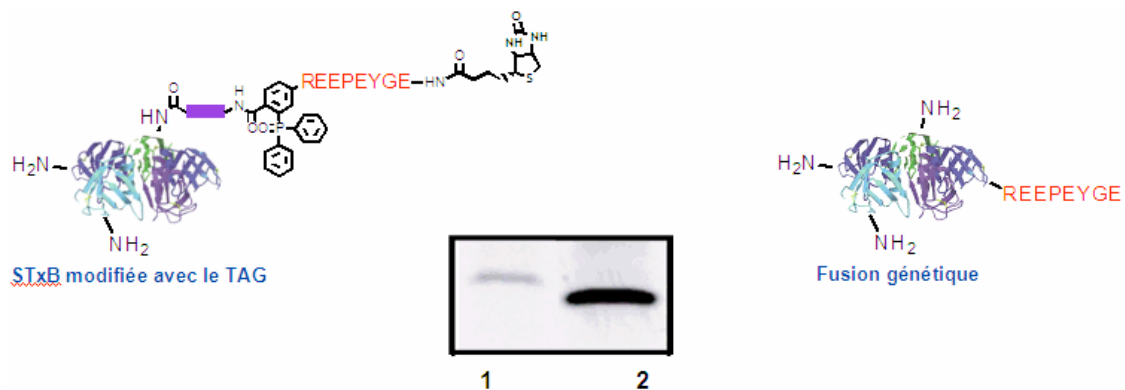


Figure 6 : Comparaison des signaux obtenus par mesure de la radioactivité sur gel après ligation du tag peptidique sur la protéine Shiga déjà ancrée (Ligne 1), ou avec la Shiga porteuse du même Tag mais pré-introduit par génie génétique (ligne 2).

V. Utilisation de réactions bioorthogonales comme outils de ligation en biologie

(J.-C. Florent, M. Azoulay). Collaborations : L. Johannes UMR 144 CNRS/Institut-Curie.

Les cellules dendritiques dites « présentatrices d'antigènes » dérivées de la moëlle osseuse sont présentes dans tous les tissus. Elles jouent un rôle essentiel dans le déclenchement de la réponse immunitaire. Elles captent les antigènes étrangers et stimulent les lymphocytes T cytotoxiques qui sont spécialisés dans la reconnaissance et la destruction des cellules porteuses des antigènes présentés. De plus, les cellules dendritiques expriment le récepteur Gb3, récepteur de la STxB permettant l'entrée de cette protéine dans la cellule. Comme le principe de la vaccination antitumorale consiste à utiliser un vecteur pour acheminer les antigènes tumoraux vers ces cellules dendritiques, nous avons choisi d'utiliser la STxB comme vecteur alternatif aux vecteurs viraux actuellement étudiés.

Des études préliminaires ont montré que le couplage de la protéine immunogène E7 avec la STxB modifiée utilisant de façon classique le réactif bi-spécifique SMPB (4 [4-maléimidophényl] butyric acide N-hydroxysuccinimide) induisait une forte précipitation de la protéine E7. Ce manque de spécificité entraîne des difficultés de couplage avec la STxB et une non-reproductibilité de la qualité des protéines couplées obtenues.

Pour contourner les problèmes souvent rencontrés en utilisant les techniques classiques de ligation protéine-protéine ou protéine-RNA/ouDNA, nous avons utilisé la réaction de « click chemistry » utilisant la réaction de Huisgen. Nous avons testé une méthode convergente de couplage de protéines en deux temps : le premier, par la fonctionnalisation de la STxB avec une fonction alcyne et celle de la protéine d'intérêt avec un azoture, le second temps par couplage des protéines fonctionnalisées *via* la cycloaddition [3+2] de Huisgen. Nous avons montré, par immunofluorescence, que cette méthode convergente de ligation n'altère ni l'intégrité des deux protéines ni la capacité de reconnaissance et de transport de la STxB par le Gb3. Par la suite, d'autres protéines, comme la Bovine Serum Albumine (BSA) ou la protéine Her2/neu ont été couplées à la STxB suivant cette même méthode, ce qui a conduit au dépôt d'un brevet européen.

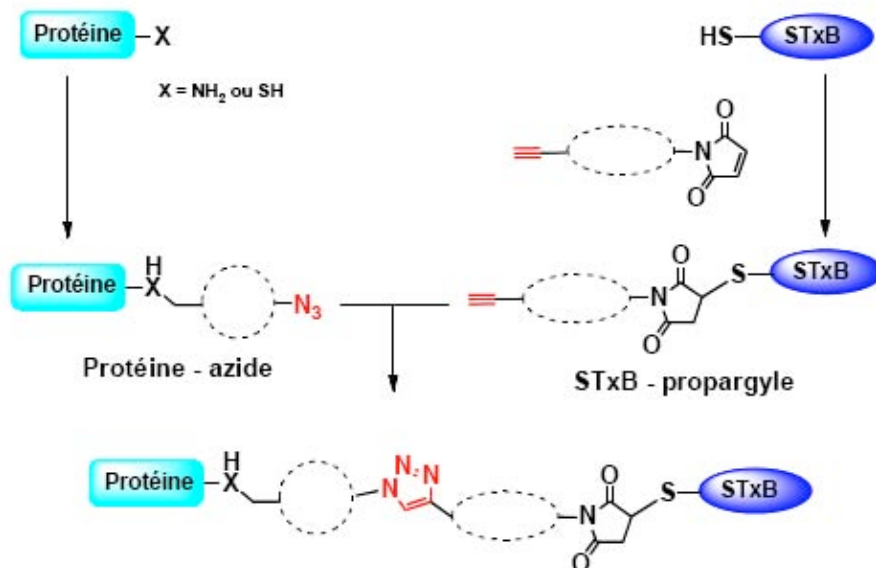


Figure 7 : Ligation de la Shiga à une protéine par réaction de Huisgen

VI Sondes chimiques pour l'étude de la biologie cellulaire de la voie rétrograde

(J.-C. Florent) Participant : R. Christiano (étudiant thèse, soutien ARC) (Collaborations : L. Johannes, UMR 144 CNRS/Institut Curie ; P. Bassereau, UMR 168 CNRS/Institut Curie)

Nous avons développé une voie d'accès au trisaccharide Globotriose Gb3 récepteur de la toxine de Shiga. La synthèse de glycosphingolipides pour étudier comment la membrane cellulaire capture les agents pathogènes liés à sa surface a été achevée avec succès (W. Römer *et al.*, *Nature*, **450**, 670-675, 2007).

A l'aide des glycolipides que nous avons synthétisés, W. Römer (équipe P. Bassereau, UMR 168 CNRS/Institut Curie) a reproduit le mécanisme de l'endocytose, par liaison de l'unité B de reconnaissance de la Shiga lorsqu'elle est mise en contact de vésicules géantes incorporant le glycosphingolipide Gb3, mimant ainsi une bi-couche lipidique. La formation de spots intenses a été observée en imagerie à la surface de ces GUV « Giant Unilamellar Vesicles », à partir desquelles des tubulures se forment. En utilisant des variantes du récepteur Gb3 de longueurs variables, que nous avons synthétisées, il a été montré que le récepteur lui-même était impliqué dans le processus d'invagination, c'est-à-dire la création de micro-domaines, induite par la toxine, et suivie d'une dépression de la membrane aboutissant finalement à la formation de microtubules. Le mécanisme a donc été démontré comme étant purement physique.

Dans la poursuite de cette étude, nous construisons un globosphingolipide porteur d'un Tag fluorescent. Notre objectif sera de ne pas perturber la reconnaissance Gb3-Shiga.

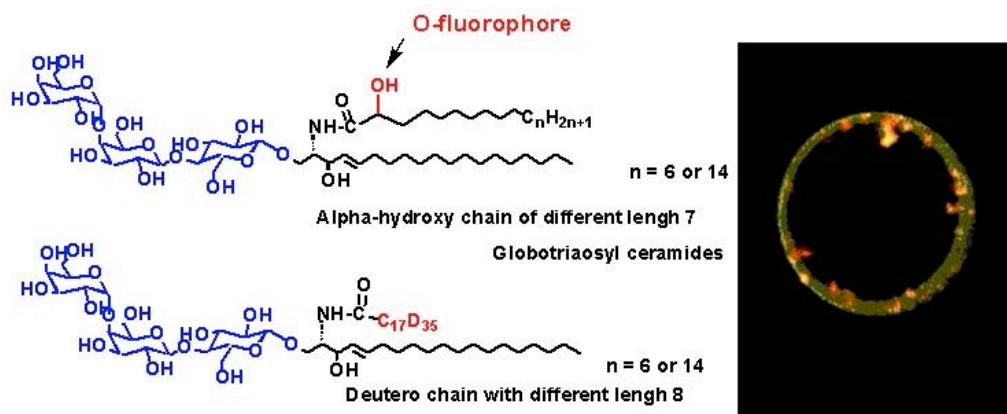


Figure 8 : Sondes glycolipides préparées et visualisation des invaginations provoquées par liaison de la Shiga sur du Gb3 ancré sur un modèle de membrane (GUV).

VII. Synthèse et évaluation biologique de flavonoïdes à visée antitumorale

1. Identification de métabolites actifs de l'acide flavone-8-acétique (FAA), un composé à visée antivasculaire tumorale

(D. Dauzonne) (Collaboration : G. Chabot, INSERM U640, UMR8151 CNRS/Université Paris Descartes).

Les flavonoïdes exercent un spectre très large d'activités biologiques et pharmacologiques comprenant des activités antitumorales. Parmi les flavonoïdes antitumoraux, l'acide flavone-8-acétique (FAA) s'est montrée particulièrement actif sur les tumeurs murines et humaines transplantées chez la souris. Cependant, le FAA n'a montré aucun effet anticancéreux chez l'homme. Etant donné que le métabolisme du FAA pourrait jouer un rôle dans la différence

d'activité anticancéreuse observée entre la souris et l'homme, le but de ce travail a été de comparer les voies métaboliques du FAA chez les deux espèces.

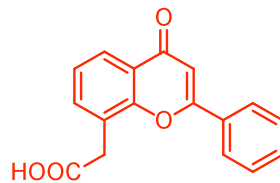


Figure 9 : Acide flavone-8-acétique (FAA)

Nous avons montré que le FAA peut être métabolisé par des microsomes murins en formant 6 nouveaux métabolites que nous avons identifiés : le 3',4'-dihydrodiol-FAA, le 5,6-époxy-FAA, le 4'-OH-FAA, le 3'-OH-FAA, le 3',4'-époxy-FAA et le 6-OH-FAA. Par comparaison avec des préparations microsomales humaines, nous avons constaté que le FAA est beaucoup mieux métabolisé par des microsomes murins. Nous avons également identifié les cytochromes P450 et l'époxyde hydrolase impliqués dans le métabolisme du FAA *in vitro* par des microsomes murins. Chez la souris, après l'administration *in vivo*, plusieurs métabolites du FAA ont été identifiés dans l'urine et le plasma.

Afin d'évaluer la cytotoxicité des métabolites du FAA, nous avons testé l'extrait de l'incubation de ce composé en présence de microsomes murins. Nous avons aussi testé séparément ses dérivés monohydroxylés sur des cellules murines de mélanome B16. Le FAA s'est avéré plus cytotoxique en présence de microsomes murins. Nous avons également observé que l'un des métabolites murin, le 4'-OH-FAA, peut changer la morphologie des cellules endothéliales *in vitro* à faibles concentrations. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que le métabolisme du FAA pourrait être impliqué dans son activité anticancéreuse *in vivo* chez la souris (M. H. Pham *et al. Drug. Metab. Dispos.* **2007**. 35, 2023-34). La synthèse univoque, à l'échelle du gramme, de certains métabolites murins (6-OH-FAA, 4'-OH-FAA) est actuellement en cours afin d'évaluer leurs activités *in vivo*. Ce travail fait partie d'un projet INCA qui a été retenu.

2. Conception et synthèse d'inhibiteurs flavoniques de l'aminopeptidase N/CD13 de cellules leucémiques et évaluation biologique dans la prolifération et la migration associées à l'angiogénèse

(D. Dauzonne). (Collaboration : B. Bauvois, Centre de Recherches Biomédicales des Cordeliers UMR-S872, Paris).

La métalloprotéase de surface aminopeptidase N (APN/CD13) est surexprimée dans certaines tumeurs solides et hématologiques (cancer du rein, de la prostate, mélanome, leucémies myéloïdes aiguës et chroniques) et à la surface des cellules endothéliales jouxtant les tumeurs solides. Des observations *in vitro* et *in vivo* indiquent que l'APN des cellules tumorales et endothéliales pourrait contribuer au processus tumoral et à l'angiogénèse associée à la progression de la tumeur en augmentant le taux de prolifération de ces cellules et/ou favorisant leur motilité et leur capacité invasive.

Des inhibiteurs commerciaux d'APN existent (bestatine, actinonine, acide bétulinique, amastatine...), ils se révèlent cependant cytotoxiques et/ou peu spécifiques. De plus, il n'existe pas d'information sur la structure d'APN empêchant ainsi le développement d'inhibiteurs d'APN modélisés. Nous avons récemment synthétisé et identifié une molécule non cytotoxique, l'acide 2',3-dinitroflavone-8-acétique, qui inhibe spécifiquement l'activité enzymatique de l'APN des

cellules leucémiques myéloïdes. Cet inhibiteur est maintenant commercialisé par EMD Biosciences Inc. (San Diego, CA)(revendeur Calbiochem n°164602).

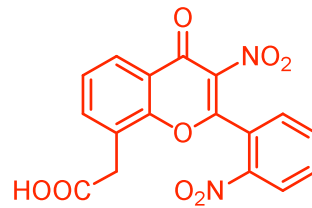


Figure 10 : 2',3-Dinitroflavone-8-acétique

Dans ce contexte, nous avons entrepris la synthèse de nouveaux dérivés flavoniques conçus dans le but de sélectionner, à partir du modèle de l'acide 2',3-dinitroflavone-8-acétique, de nouvelles molécules non cytotoxiques qui soient des inhibiteurs hautement affins de l'APN des cellules tumorales et/ou endothéliales et qui soient capables de bloquer la progression tumorale. Les tests sont effectués sur des lignées humaines leucémiques myéloïdes (NB4, HL-60, U937, THP1) et endothéliale (HBMEC), ainsi que sur des cellules primaires sanguines provenant de patients atteints de leucémie (Service d'Hématologie de l'Hôtel-Dieu, Paris). Nos expériences en cours indiquent que la présence d'APN confère i) une capacité proliférative, et ii) une motilité aux lignées myéloïdes (chimiocinèse et invasion à travers une couche de Matrigel en transwell) qui sont dépendantes du niveau d'expression de l'APN.

L'identification et l'utilisation de nouvelles molécules non-cytotoxiques capables d'inhiber efficacement l'activité enzymatique et l'action d'APN sur les cellules tumorales devrait permettre d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques à court terme chez l'animal (modèles tumoraux de souris xénogreffées) et, à moyen terme, en médecine oncologique.

VIII. Inhibiteurs de DNA méthyltransférases (DNMT)

(D. Dauzonne). Participant R. Ait Sarkouh (stagiaire M2) (*Collaboration : P. A. Arimondo, USM 0503 MNHN, UMR 5153 CNRS, U 565 INSERM, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris*).

La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique qui participe à la régulation de l'expression des gènes. Elle possède plusieurs rôles essentiels dans le fonctionnement d'une cellule (stabilité chromosomique, différenciation cellulaire, empreinte parentale). Les enzymes responsables de cette méthylation chez l'homme sont des DNA méthyltransférases (DNMT) qui catalysent le transfert d'un méthyl en position 5 de certaines 2'-désoxycytidines pour donner la 5-méthyl-2'-désoxycytidine. Ces enzymes reconnaissent les séquences CpG très représentées dans les promoteurs des gènes et la méthylation de ces séquences provoque une répression de la transcription.

Des perturbations de la méthylation sont associées à certains cancers avec souvent une hyperméthylation locale de promoteurs de gènes suppresseurs de tumeurs, conduisant à une instabilité génomique. C'est pourquoi, la recherche d'inhibiteurs des DNMT constitue une voie prometteuse dans le cadre de la recherche de nouvelles thérapies anticancéreuses. Différentes molécules inhibitrices de cette classe d'enzymes ont été récemment caractérisées dans la chimiothèque de l'Institut Curie par une équipe du Muséum National d'Histoire Naturelle (USM 0503 MNHN, UMR 5153 CNRS, U 565 INSERM). Ces composés actifs appartiennent à la classe des flavonoïdes et répondent à la formule générale représentée ci-après :

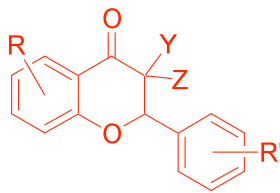


Figure 11 : Inhibiteurs de DNMT

Plusieurs molécules originales appartenant à cette série sont en cours de synthèse et une demande de brevet sur ce sujet est, à l'heure actuelle, en cours d'évaluation.

IX. Recherche de molécules actives sur certaines maladies mitochondriales.

(D. Dauzonne). (Collaboration : M. Blondel, CNRS, Université de Brest, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, UMR-S613, Brest, France).

Ce projet concerne la recherche de molécules thérapeutiques visant à traiter certaines maladies mitochondriales (maladies de type myopathies, encéphalopathies...). L'équipe dirigée par le Professeur Marc Blondel a mis au point un test de criblage simple et rapide qui utilise un modèle de maladie mitochondriale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Dans ce contexte, l'examen de la chimiothèque de l'Institut Curie a permis de mettre en évidence le fait que certains composés, appartenant à la classe des flavonoïdes, se révèlent efficaces dans le test d'activité étudié (restauration de la croissance respiratoire des levures mutantes, ce qui indique une correction de l'activité mitochondriale).

Sur la base des données acquises, des études plus poussées sont en cours et des re-synthèses de composés actifs, aussi bien que des synthèses de nouveaux dérivés, sont en cours.

X. Comprendre et combattre le processus métastatique : Inhibition de l'adhérence syndécan-1 dépendante

(E. Bertounesque). *Participants* : A. Carrère (Doctorante, BDI Institut Curie-CNRS) et un chercheur (contrat post-doctoral ANR). *Collaboration* : P. Rousselle, Institut de Biologie et Chimie des Protéines (UMR 5086), Lyon, I. García-Sáez, Institut de Biologie Structurale (UMR 5075), Grenoble.

Ce projet de recherche est financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) et coordonné par Patricia Rousselle (IBCP, UMR 5086).

Les métastases, ou tumeurs secondaires dues à la dissémination de cellules cancéreuses dans divers tissus, font la gravité de ces cancers. L'acquisition de la capacité à migrer vers d'autres tissus est un événement indispensable à l'acquisition de la malignité. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la transformation maligne d'une tumeur sont encore peu connus et nécessitent l'exploration de nouvelles voies de recherche. L'état des connaissances actuelles fait apparaître que les molécules d'adhérence, et les cascades de signalisation associées, jouent un rôle majeur dans la progression tumorale et représentent des cibles thérapeutiques incontestables. On pense que les récepteurs de surface cellulaire EGFR (epidermal growth factor receptor), syndécans (e.g. syndécan-1) et intégrines ($\alpha6\beta4$) jouent des rôles clés dans la régulation de la croissance tumorale, le processus métastatique et l'angiogénèse tumorale, notamment via l'activation de PI3K et RAC1

(Fig. 9). P. Rousselle et collaborateurs ont identifié la protéine d'adhérence majeure des cellules épithéliales : la laminine 332 (communément appelée laminine 5). Des anomalies de l'expression de la laminine 332 et des récepteurs correspondants sont décrites dans les carcinomes, reflétant le caractère invasif et métastatique des cellules de carcinomes.

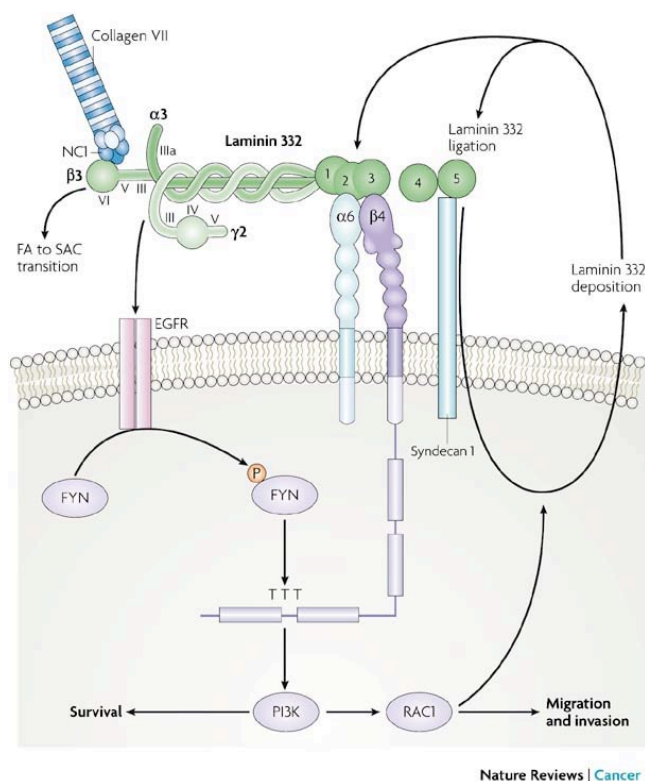


Figure 12. Extraite de "Laminin 332 in squamous-cell carcinoma, M. Peter Marinkovich, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 370-380".

P. Rousselle et collaborateurs ont démontré l'existence d'une interaction entre un récepteur cellulaire (le syndécan-1) et un domaine précis de la laminine 332 spécifiquement impliquée dans la migration cellulaire (le domaine LG4/5). En effet, ils ont montré que l'adhérence cellulaire à LG4/5 par le biais du syndécan-1 induit une réorganisation du cytosquelette de la cellule conduisant à la formation de filopodes et de microspicules, prolongements cytoplasmiques protrusifs caractéristiques de la migration cellulaire. Nos projets actuels visent à élucider le rôle de l'interaction LG4/5-syndécan-1 dans l'invasion tumorale et à tenter de bloquer cette interaction.

P. Rousselle et son groupe ont développé un test d'adhérence cellulaire au fragment LG4/5 dépendant du syndécan-1 et l'ont adapté à un criblage haut débit de petites molécules effectué à la Plateforme de Criblage de Molécules Bio-Actives, CEA, Grenoble (Laurence Lafanechère). Ainsi, un nombre important de hits a été trouvé, à partir de la chimiothèque CNRS UMR 176-Institut Curie, capable de produire une inhibition de l'adhérence, comprise entre 50 et 100%, au fragment LG4/5 mais pas au reste de la molécule de laminine 332. Parmi les classes structurales identifiées, les séries benzofurane (**1**) et 7-déazapurine (**2**) (Figure 10), qui ont été sélectionnées pour le programme de recherche collaboratif CHEMISPIKE.

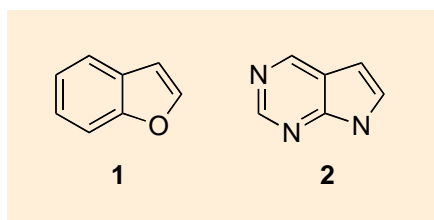


Figure 13. Recherche en chimie thérapeutique pour la génération de leads et leur optimisation à partir des hits basés sur les squelettes benzofurane ou 7-déazapurine.

En particulier, les objectifs du projet CHEMISPIKE visent à (1) disséquer les mécanismes moléculaires extra- et intracellulaires à la base de l'interaction LG4/5-syndécan-1, (2) identifier, parmi les molécules hits identifiées lors du criblage, les inhibiteurs spécifiques et à déterminer leur cible moléculaire, (3) une recherche en chimie thérapeutique à travers des études Hit-to-Lead et génération de Leads, avec la conception et synthèse de candidats-médicaments, (4) tester leur effet anti-tumoral potentiel dans un modèle pré-clinique de cancer du colon (5) résoudre la structure tridimensionnelle du fragment LG4/5 en présence de l'inhibiteur le plus pertinent pour une conception rationnelle de candidats-médicaments.

En conclusion, nous nous concentrons sur l'étude de la biologie fondamentale de l'adhérence syndécan-1 dépendante et sur le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique en oncologie en étroite collaboration avec un partenaire pharmaceutique, pour le traitement des carcinomes. En chimie, l'accent est mis sur le développement de stratégies et de méthodes qui permettent la préparation de composés originaux basée sur la diversité moléculaire.

XI. Inhibiteurs de la Protéine Kinase CK₂ (caséine kinase)

(F. Schmidt). Participant : M. López Ramos (étudiante thèse), G. Calvet (post-doc CNRS) (Collaboration: C. Cochet, L. Lafanechère, U 366 INSERM, CEA, Grenoble; L. Mouawad, INSERM U 759, Institut Curie, Orsay; J.-B. Reiser, ISB, Grenoble).

Les sérine/thréonine kinases CK2 et PIM-1 qui sont des suppresseurs d'apoptose, sont surexprimées dans les cellules tumorales, en particulier dans le cancer de la prostate. CK2 a été validée pour le traitement du cancer par l'utilisation d'ARN antisens. Des résultats récents montrent que la famille de kinases PIM joue un rôle dans le développement et la progression du cancer de la prostate. A ce jour, plusieurs types d'inhibiteurs de CK2 ont été décrits, mais il existe relativement peu d'inhibiteurs connus de PIM-1.

La Chimiothèque de l'Institut Curie a été criblée par les équipes de Claude Cochet (U244 INSERM) et Laurence Lafanéchère (U366 INSERM) au CEA à Grenoble. Parmi les milliers de composés testés, plusieurs molécules sont apparues comme inhibant la kinase CK2. Certains de ces composés ont aussi montré une inhibition de PIM-1. La sélectivité par rapport à un panel d'autres kinases est très bonne. Les structures obtenues sont originales par rapport à celles qui sont décrites, ce qui nous permet d'espérer développer une nouvelle famille d'inhibiteurs de ces kinases.

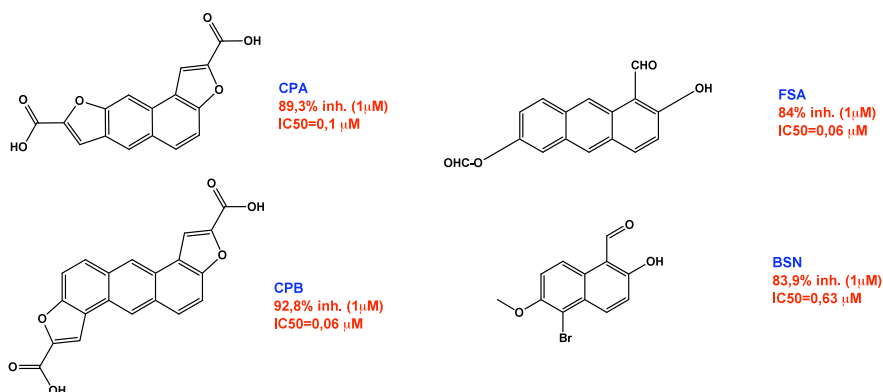


Figure 14 : Activité résiduelle de CK2 en % à 1mM et IC₅₀

Des analogues ont été synthétisés permettant de déterminer les éléments indispensables pour avoir un composé actif.

Parallèlement à la synthèse chimique pour établir les relations structures activités, des études de modélisation (docking), en collaboration avec Liliane Mouawad de l'Institut Curie d'Orsay (Unité INSERM 759), ont permis de déterminer le mode de fixation de nos composés les plus actifs dans le site ATP de CK2.

Les molécules comportent trois éléments de reconnaissance, une partie polaire interagissant dans le fond du site actif avec en particulier les résidus Lys68 et Asp175, une partie hydrophobe relativement plane ainsi qu'un groupement polaire qui pourra se placer à l'entrée de la cavité. La validité de ces calculs de docking a été confirmée par des résultats de rayons X d'un de nos inhibiteurs cocrystallisé avec CK2 (équipe de J.-B. Reiser, IBS, Grenoble).

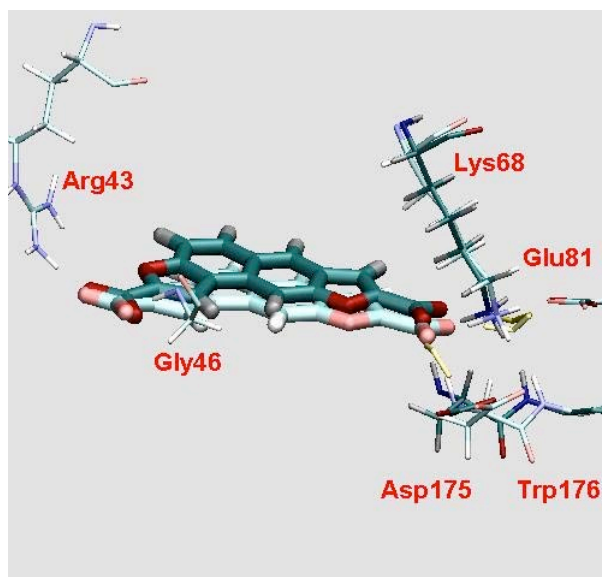


Figure 15 : Comparaison entre la structure radiocristallographique et le docking.

L'objectif principal du projet est thérapeutique. Il consiste à trouver le meilleur candidat possédant des propriétés antitumorales par induction de l'apoptose pour un développement ultérieur (R. Prudent; M. Lopez Ramos *Mol. Cell Biochem*, 2008 ; R. Prudent; M. López Ramos *BBA*, 2008).

XII. Chimiothèque de l'UMR 176 CNRS/Institut Curie

(Gestionnaire : F. Mahuteau-Betzer). Participants : M. Bombled, L. Charles, S. Dubruille-Thirot

1. Origines et objectif

Les principales motivations et occupations du Laboratoire de Pharmacochimie de l'Institut Curie, durant les cinquante dernières années, ont été la découverte de molécules à visée anticancéreuse. Une conséquence directe de cette activité est l'existence (souvent en quantités non négligeables) d'échantillons d'un grand nombre de composés qui y ont été préparés.

D'autre part, les progrès de la protéomique et de la génomique ont permis la découverte d'un nombre croissant de nouvelles cibles protéiques d'intérêt thérapeutique potentiel.

Par criblage de petites molécules, soit individuellement soit, de préférence, de collections dites "librairies de petites molécules" (chimiothèques), de nombreuses possibilités seront offertes pour découvrir ou identifier des molécules biologiquement actives, qui représentent des outils en « Chemical Biology » ou des médicaments de demain.

La découverte de molécules d'intérêt thérapeutique « drug discovery » implique une collaboration étroite entre chimistes, biologistes et, quand c'est possible, structuralistes-modélisateurs. Il est communément admis que pour 10.000 molécules synthétisées, une molécule entrera en phase clinique. En absolu, ceci peut être considéré comme un énorme gâchis en molécules. Or, en règle générale, l'application qu'une molécule a en biologie n'est souvent pas celle pour laquelle elle a été synthétisée à l'origine. De ce fait, la probabilité est non-négligeable que le potentiel thérapeutique des 9999 autres molécules sera découvert par criblage continu contre de nouvelles cibles.

Cette réalisation est à l'origine de la création de la Chimiothèque de Curie-CNRS en juin 2001 : elle comprenait alors 6720 composés formatés en microplaques 96 puits.

En 2004, notre chimiothèque a été mise à jour pour atteindre 7440 composés. En juillet 2006, une dernière mise à jour a été réalisée et 8560 composés sont disponibles sous forme de microplaques.

2. Contenu

Historiquement, l'activité du laboratoire concernant le développement d'agents anti-cancéreux visait plus particulièrement la synthèse de molécules interagissant avec l'ADN. Dans ce cadre, 6 molécules étant des cytotoxiques sont entrées en essais de phase clinique.

Dans la chimiothèque d'origine, il y a donc un grand nombre de composés polyhétérocycliques (de mono- à pentacycle) appartenant à une grande variété de familles (polycycles fusionnés, linéaires ou branchés).

Pendant ces 4 dernières années, la chimiothèque s'est agrandie régulièrement ; elle compte, à l'heure actuelle, 8560 substances. Ces composés sont des analogues de synthèse obtenus lors de programmes d'optimisation contre différentes cibles thérapeutiques (programme anti-VIH, inhibiteurs de kinases,...). Des chimiothèques ciblées ont aussi été construites à partir de "scaffolds" ayant des propriétés drug-like, par exemple les purines.

3. Valeur de la chimiothèque Curie-CNRS

Une question importante concernant la chimiothèque est la valeur des produits qui la composent.

Tout d'abord, les résultats de criblage réalisés sur la chimiothèque ont montré que notre collection est suffisamment diversifiée pour permettre de trouver des molécules actives contre diverses cibles thérapeutiques.

Dans la mesure où la chimiothèque contient des molécules qui avaient été conçues pour interagir avec le vivant, elle est en grande partie constituée de composés hétérocycliques. De tels composés sont connus pour leurs propriétés "drug-like".

Un assez grand nombre de molécules présentes dans la chimiothèque possède des propriétés cytotoxiques plus ou moins (souvent moins) importantes. En effet, la planéité et les propriétés intercalantes d'un composé ne sont pas suffisantes pour qu'il soit cytotoxique, il faut aussi qu'il interagisse/inhibe une enzyme (topoisomérase, ...). De toute façon, les propriétés cytotoxiques ne doivent pas être perçues comme rédhibitoires. En effet, dans la phase initiale de découverte de drogue, le criblage est souvent réalisé *in vitro* en absence d'acides nucléiques (ADN et ARN). Leurs propriétés cytotoxiques n'ont donc aucune incidence sur l'objectif de ces criblages primaires. Les touches identifiées sont donc de vrais hits et, de ce fait, le point de départ d'un nouveau programme de recherche. Pour quantifier la cytotoxicité des composés présents dans notre

collection, un criblage de cytotoxicité sera bientôt effectué (Collaboration Thierry Cresteil, ICSN, Gif/Yvette).

La chimiothèque a été constituée en collectant (presque) toutes les molécules de synthèse préparées au laboratoire. Avec beaucoup de recul, nous avons recensé un certain nombre de produits de type « frequent hitter » ou de nature trop réactifs et donc peu pertinents pour le criblage.

Parmi eux, nous avons notamment des molécules contenant des nitrofuranes, des aldéhydes ou des énones... Ces sous-structures sont *a priori* à éviter, car trop réactives. Il a donc été envisagé de les enlever de la collection. Cependant, il existe un nombre non négligeable de drogues ou de composés en phase de développement qui contiennent ces motifs. On peut notamment citer le composé CI1033 (inhibiteur irréversible d'EGF ; phase III ; Pfizer) qui contient dans sa structure un motif acrylamide. De la même façon, si certains nitrofuranes sont mutagènes, le nitrofuroxide, un désinfectant intestinal, est un médicament commercialisé. Enfin, si les aldéhydes sont très réactifs, le benzaldéhyde est présent dans certains aliments.

Ainsi, si ces fragments ou sous-structures sont *a priori* à éviter, il existe toujours des exceptions. C'est pourquoi, nous n'avons toujours pas tranché sur ce qu'il fallait conserver ou éliminer de notre chimiothèque. Si on considère que le criblage primaire nous permet d'identifier une touche qui est le point de départ d'un processus d'optimisation vers une molécule plus « drug like », alors il paraît raisonnable de conserver de telles molécules.

De manière à évaluer les qualités du contenu de notre chimiothèque, nous avons établi une collaboration avec Luc Morin-Allory (Orléans). Son équipe a analysé le contenu de notre chimiothèque et les premiers résultats indiquent que 6234 molécules sur 7680 seraient « drug-like » (soit 80%) en utilisant le score CFMS et 4950 composés seraient « lead-like » (soit 65%).

En conclusion, l'analyse informatique suggère que la chimiothèque contient une très grande majorité de composés de grand intérêt pour la recherche en « drug discovery ».

3. Collaborations

Notre chimiothèque a été criblée sur une quarantaine de tests biologiques à travers 23 collaborations.

Les collaborations pour lesquelles il y a eu le plus d'avancées ces quatre dernières années sont :

- Aurora kinase A (cancer) – A. Molla (Grenoble)
- Malaria – Ph. Grellier (Muséum National d'Histoire Naturelle)
- Stabilisant tubuline (cancer) –L. Lafanechère (Plateforme CEA, Grenoble)
- CK2 – C. Cochet (CEA, Grenoble)
- Amphiréguline (cancer du poumon) – Favrot (*via* Plateforme CEA)
- Marqueur de l'ADN BENA435 – A. Popov (Grenoble)
- Stabilisant tubuline via MAPs (cancer) – A. Popov (Grenoble)
- Interaction protéine-protéine P66-PVNA (cancer) – G. Baldacci (Institut Curie)
- Epissage alternatif et NMD (VIH et maladie de Duchenne) –J. Tazi (Montpellier)
- Maladie de la Dengue, West-Nile, Hépatite C – B. Canard (Marseille)
- Inhibition de métastases : inhibiteurs d'interactions lamine5 / protéoglycane syndécan. P. Rousselle (IBCP, Lyon)
- Bilharziose ; cible NAD⁺ glycohydrolase. F. Schuber (UMR 7175, Strasbourg)
- Tuberculose. UMP kinase de *M. tuberculosis*, et antiviraux - H. Munier-Lehman (CNRS URA 2128, Institut Pasteur, Paris)
- Neuropathies, tests levure – M.Blondel (Université de Brest)

Les résultats de ces criblages sont nombreux ! En effet, suite à ces criblages primaires, un grand nombre de hits ont été identifiés appartenant à différentes familles chimiques. La question qui se

pose alors est comment organiser notre recherche pour répondre à l'attente des biologistes qui voudraient que soit mis en place un programme d'optimisation pour les hits les plus importants. Du point de vue de la chimie, la question est comment déployer nos forces pour travailler sur chacun de ces projets.

4. Développements issus des "screens" biologiques de la chimiothèque

L'Institut Curie a construit un laboratoire de synthèse rapide robotisée au sein de l'UMR 176, sur le site d'Orsay, dont F. Mahuteau-Betzer est responsable. Cette plate-forme est destinée à optimiser certains "hits" quand nous le jugeons utile. Nous avons aussi "clusterisé" nos activités pour rationaliser nos efforts. Les résultats issus de ces screens ont conduit à de nouvelles thématiques de recherche, surtout centrées sur CK2, au laboratoire de Paris (F. Schmidt, Equipe Paris), inhibiteurs de métastases (E. Bertounesques, cf. chapitre VII) et un second cluster organisé sur une famille de molécules comportant un système polyhétérocyclique non fusionné pour ces applications diverses (Marqueur ADN, Epissage alternatif – NMD, PCNA-p66)(F. Mahuteau-Betzer, Equipe Orsay,), et le virus de la Dengue (Equipe Orsay). Cette organisation permet d'harmoniser nos efforts par rapport à nos objectifs.

PUBLICATIONS CLES

2009

M. ARTHUIS, R. PONTIKIS, J.-C. FLORENT M. ARTHUIS, R. PONTIKIS, J.-C. FLORENT. Stereoselective Synthesis of Novel Highly Substituted Isochromanone and Isoquinolinone-Containing Exocyclic Tetrasubstituted. Alkenes. *J. Org. Chem.*, sous presse.

2008

A. EL ALAOUI, F. SCHMIDT, M. SARR, D. DECAUDIN, J.-C. FLORENT, L. JOHANNES (2008). Synthesis and properties of a mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor conjugate. *ChemMedChem*. 3, 1687-1695.

R. PRUDENT, M. LOPEZ-RAMOS, V. MOUCADEL, C. BARETTE, D. GRIERSON, L. MOUAWAD, J.-C. FLORENT, L. LAFANECHERE, F. SCHMIDT, C. COCHET (2008). Salicylaldehyde Derivatives as New Protein Kinase CK2 Inhibitors. *Biochim. Biophys Acta* 1780, 1412-1420.

M. DORBEC, J.-C. FLORENT, C. MONNERET, M.-N. RAGER, C. FOSSE, E. BERTOUNESQUE. Synthesis of novel angular heterocyclic lignans by InCl₃-catalyzed Friedel-Crafts type cyclization. *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 1723-1731.

C. COURME, S. GILLON, N. GRESH, M. VIDAL, C. GARBAY, J.-C. FLORENT, E. BERTOUNESQUE. Terminal alkyne-functionalized triazine by Sonogashira coupling : synthesis of a potential cell signalling inhibitor via click chemistry *Tetrahedron Lett.* 2008, 49, 4542-4545.

R. PRUDENT, V. MOUCADEL, M. LOPEZ RAMOS, S. ACI, B. LAUDET, L. MOUAWAD, C. BARETTE, J. EINHORN, C. EINHORN, J.-N. DENIS, G. BISSON, F. SCHMIDT, S. ROY, L. LAFANECHERE, J.-C. FLORENT, C. COCHET Expanding the chemical diversity of CK2 inhibitors. *Mol Cell Biochem* 2008, 316, 71-85.

R. PRUDENT, M. LOPEZ-RAMOS, V. MOUCADEL, C. BARETTE, D. GRIERSON, L. MOUAWAD, J.-C. FLORENT, L. LAFANECHERE, F. SCHMIDT, C. COCHET. Salicylaldehyde Derivatives as New Protein Kinase CK2 Inhibitors. *Biochim. Biophys Acta* 2008, 1780, 1412-1420.

2007

W. RÖMER, L. BERLAND, V. CHAMBON, K. GAUS, B. WINDSHIEG, D. TENZA, M.R.E. ALY, V. FRAISIER, J.-C. FLORENT, D. PERRAIS, C. LAMAZE, G. RAPOSO, C. STEINEM, P. SENS, P. BASSEREAU, L. JOHANNES (2007). Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature*, 450, 670-675.

A. EL ALAOU, F. SCHMIDT, M. AMESSOU, M. SARR, D. DECAUDIN, J.-C. FLORENT, L. JOHANNES (2007). Shiga toxin-mediated retrograde delivery of a topoisomerase I inhibitor prodrug. *Angewandte Chemie* 119, 6469-6472.

M. H. PHAM, N. AUZEIL, A. REGAZZETTI, D. DAUZONNE, A. DUGAY, M.-C. MENET, D. SCHERMAN, G. G. CHABOT. Identification of new flavone-8-acetic acid metabolites using mouse microsomes and comparison with human microsomes. *Drug. Metab. Dispos.* 2007. 35, 2023-34.)

M. H. PHAM, M.-C. MENET, A. DUGAY, A. REGAZZETTI, D. DAUZONNE, N. AUZEIL, A. DUGAY, G. G. CHABOT. Characterization of monohydroxylated derivatives of the anticancer agent flavone-8-acetic acid by liquid chromatography with on-line UV and mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21, 3373-86

2006

J. KAFFY, R. PONTIKIS, D. CARREZ, A. CROISY, C. MONNERET, J.-C. FLORENT. Isoxazole-type derivatives related to combretastatin A-4, synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 4067-4077.

M. DUCA, D. GUIANVARC'H, K. OUSSEDIK, L. HALBY, A. GARBESI, D. DAUZONNE, C. MONNERET, N. OSHEROFF, C. GIOVANNANGELI, P.B. ARIMONDO. Molecular basis of the targeting of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by VP16 derivatives conjugated to triplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, 1900-1911.

A. EL ALAOU, N. SAHA, F. SCHMIDT, C. MONNERET, J.-C. FLORENT. New Taxol[®] (paclitaxel) prodrugs designed for ADEPT and MPT strategies in Cancer. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, 14, 5012-5019.

C.D. THOMAS, C. WALCZAK, J. KAFFY, R. PONTIKIS, J. JOUANNEAU, A. VOLK. Early effects of combretastatin-A-4 Phosphate assessed by anatomical and carbogen-based functional Magnetic Resonance Imaging on rat bladder tumors implanted in nude mice. *Neoplasia* 2006, 587-595.

M. R. E. ALY, P. ROCHAIX, M. AMESSOU, L. JOHANNES, J.-C.FLORENT. Synthesis of globo- and isoglobotriosides bearing a chalcone tag as novel electrophilic thiol-specific carbohydrate reagents. *Carbohydrate Research* 2006, 341, 2026-2036.

M. LICHTENBERGER, D. DAUZONNE, V. ZOOTE, C. GERHAUSER, R.V. BENSASSON. Quantitative structure activity relationships of 3-nitroflavones, acting as potential inhibitors of angiogenesis, target of cancer inhibition. *Chemico-Biological Interactions* 2006, 161, 217-217.

2005

M. DUCA, P.B. ARIMONDO, S. LÉONCE, A. PIERRÉ, B. PFEIFFER, C. MONNERET, D. DAUZONNE. Novel carbamate derivatives of 4-b-amino-4'-O-demethyl-4-deoxypodophyllotoxin as inhibitors of topoisomerase II: synthesis and biological evaluation. *Org. Biomol. Chem.* 2005, 3, 1074-1080.

M. DUCA, D. GUIANVARC'H, P. MERESSE, E. BERTOUNESQUE, D. DAUZONNE, L.KRAUS-BERTHIER, S. THIROT, S. LEONCE, A PIERRE, B. PFEIFFER, P RENARD, P. B. ARIMONDO, C. MONNERET. Synthesis and biological study of a new series of 4'-Demethylepipodophyllotoxin Derivatives. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 593-683.

M. DUCA, K. OUSSEDIK, A. CECCALDI, L. HALBY, D. GUIANVARC'H, D. DAUZONNE, C. MONNERET, J.-S. SUN, P.B ARIMONDO. Triple Helix-forming oligonucleotides conjugated to new inhibitors of Topoisomerase II: Synthesis and binding properties. *Bioconj. Chem.* 2005, 16, 873-884.