

Chapitre I: Cibles biologiques & mimes RGD

1.1. Matrice extracellulaire et récepteurs membranaires

Les tissus du corps sont constitués de cellules et d'un réseau complexe de glycoprotéines et autres carbohydrates¹. Ce réseau, appelé matrice extracellulaire, permet le maintien des tissus ainsi que le déplacement des cellules au travers de ce treillis. La matrice remplit les espaces intercellulaires. Sa constitution est assez variable, selon la situation dans l'organisme. Les principaux constituants en sont les collagènes, les protéoglycans, l'élastine, l'acide hyaluronique ainsi que des protéines adhésives.

Chacune des cellules présentes reconnaît le milieu où elle se trouve grâce à ses récepteurs membranaires. Par cette faculté, les processus physiologiques normaux prennent place (développement, régénération tissulaire) mais aussi certains phénomènes pathologiques (progression tumorale par exemple)². Dès lors, les récepteurs membranaires jouent un rôle capital dans le devenir d'une cellule. Lors des premiers instants de la mise en contact d'une cellule avec un support, 4 grandes familles de macromolécules d'adhésion entrent en jeu: les sélectines, les cadhérines, les immunoglobulines et les intégrines. En général, celles-ci permettent d'établir une liaison entre deux cellules de même type (homotypique) ou de types différents (hétérotypique). Chacune de ces familles intervient à des stades différents et se caractérise par une cascade de réponses cellulaires différentes. Cependant leur caractéristique essentielle est la capacité de transmettre, à partir du milieu extérieur à la cellule, des signaux qui peuvent engendrer une modification du comportement cellulaire. Mais avant de poursuivre plus en profondeur notre description des intégrines, quelques notions concernant les autres familles ne nous semblent pas superflues.

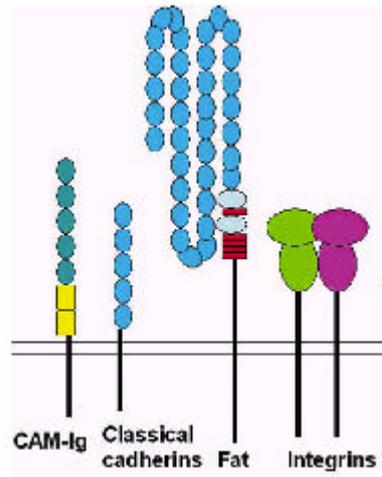


Figure1.1 Principaux récepteurs cellulaires

Sélectines : Elles interviennent dans la première étape de l’adhésion, ou plus communément, ce que l’on nomme le roulement lent (*rolling*). Bien que le phénomène mette en jeu des forces relativement faibles, il s’agit d’une étape transitoire indispensable à la mise en place d’une adhésion “forte”. Cette dernière sera assurée par le biais des intégrines. Trois sélectines distinctes ont été découvertes à ce jour: la sélectine *E* (située à l’endothélium), la sélectine *P* (localisée dans les plaquettes) et la sélectine *L* (constitutive de la surface des lymphocytes).

Cadhérines³: Ces molécules d’adhésion interviennent de manière prépondérante dans les jonctions cellulaires. Elles sont capitales dans la cascade complexe d’évènements permettant la cohésion tissulaire. Comme elles sont “calcium dépendantes”, l’utilisation de chélateurs spécifiques conduit à la dissociation cellulaire. A ce jour, 4 sous-familles ont été élucidées: cadhérine *E* (épithélium), cadhérine *N* (neurones), cadhérine *P* (placenta) et cadhérine *V* (vasculaire).

Immunoglobulines : Cette importante famille est impliquée dans trois types d’interactions. Elles sont responsables d’interactions entre mêmes cellules (plaquettes par exemple). Une autre association est celle entre deux éléments différents d’une même famille (différentes macromolécules portées par une même cellule). Une interaction hétérotypique est également constatée lors d’associations avec une autre famille de protéines telles que les intégrines.

Intégrines : Impliqués dans presque tous les aspects de l'adhésion cellulaire, ces récepteurs établissent le lien entre les cellules et certaines protéines de la matrice extracellulaire, comme le collagène, la fibronectine et la laminine. Les intégrines jouent aussi un rôle important dans les phénomènes d'adhésion intercellulaire.⁴

1.2. Intégrines

Voici près de 20 ans, on a découvert que de nombreuses protéines adhésives présentaient un même motif peptidique. Cette séquence est le tripeptide RGD (Arg-Gly-Asp). Peu de temps après cette découverte, une famille de récepteurs cellulaires a été identifiée. Baptisés intégrines, ces derniers reconnaissent spécifiquement la séquence peptidique RGD. Leur nom provient de cette faculté d'intégrer les informations apportées par le milieu extérieur en vue de gérer le comportement cellulaire. Les intégrines sont des récepteurs membranaires hétérodimériques. Deux sous-unités (α et β) sont liées de manière non-covalente et établissent la jonction entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. La richesse de tels récepteurs réside dans le nombre de combinaisons possibles α et β . En effet, c'est cette diversité qui autorise les différentes spécificités pour les ligands extracellulaires. Les intégrines présentent un large domaine extracellulaire (700-900 aa par sous-unité), une hélice transmembranaire et un petit domaine intracellulaire (20-60 aa). Le site de liaison se situe dans les groupes de tête (Figure 1.2).

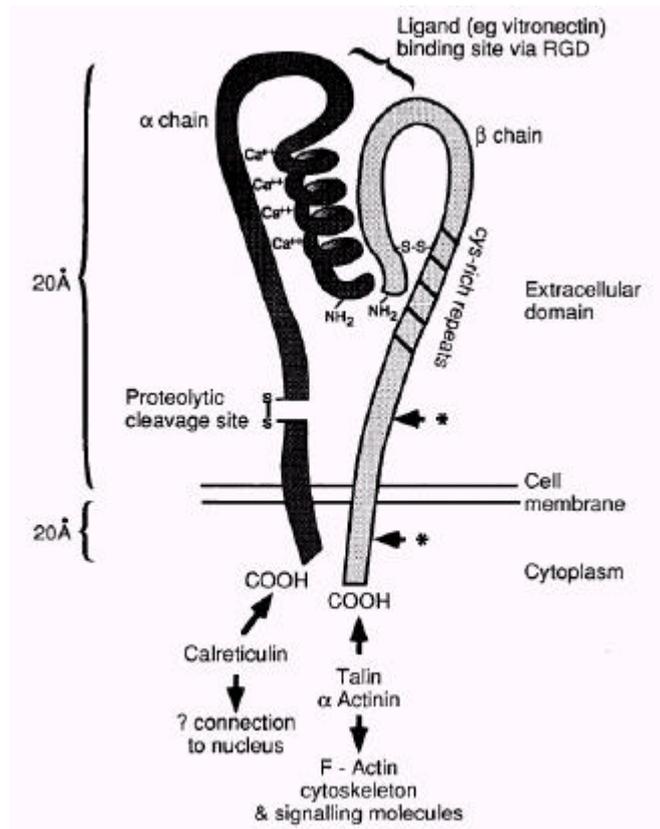


Figure 1.2 Structure schématique d'une intégrine

Actuellement, on dénombre 17 sous-unités α et 8 sous-unités β . Malgré le grand nombre de combinaisons possibles, seules 24 intégrines ont été découvertes à ce jour. Un des points communs entre beaucoup d'intégrines est la reconnaissance d'un motif tripeptidique bien spécifique: la séquence Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD)(schéma 1.1).

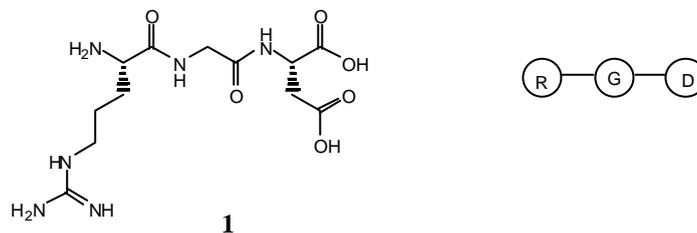


Schéma 1.1 Séquence Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD)

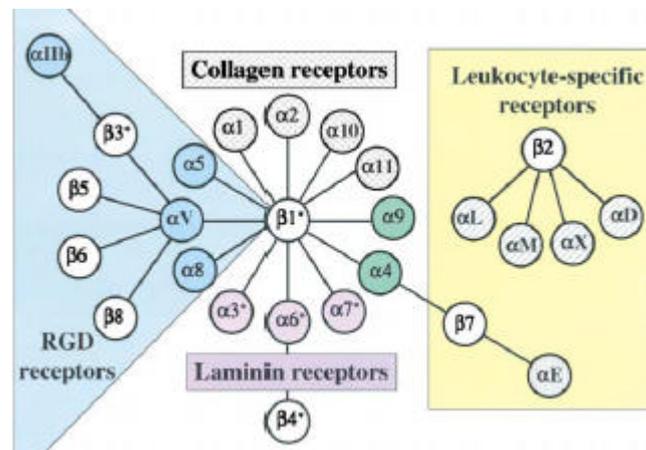
La présence de ces récepteurs est établie dans de nombreuses cellules (cellules endothéliales, épithéliales, nerveuses, osseuses, musculaires, plaquettes...); ils sont considérés comme responsables des phénomènes d'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire (*via* les protéines adhésives) et d'adhésion cellule-cellule.

Une caractéristique importante de ces récepteurs est leur constante de dissociation relativement faible qui autorise avec facilité l'association-dissociation des contacts spécifiques avec la matrice extracellulaire.

Les intégrines sont classées en 3 groupes selon leur sous-unité β :

Tableau 1.1: Classement selon la sous-unité β		
β_1	β_2	β_3
Organisation tissulaire Liaisons aux ligands de la matrice extracellulaire	Uniquement sur leucocytes Critique pour la migration vers les sites d'inflammation	Plaquettes et cellules Activation et adhésion-prolifération

Les intégrines sont des cibles de choix en chimie médicinale car ces récepteurs sont impliqués dans de nombreuses pathologies. La recherche d'antagonistes des intégrines est actuellement en pleine expansion pour la découverte de nouvelles molécules actives (traitement de thromboses, cancers, inflammations,...).



1.3. Ligands de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Le récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ des plaquettes sanguines est la première intégrine mammalienne à avoir été isolée et purifiée. Son rôle est essentiel dans l'agrégation plaquettaire. Le ligand naturel, le fibrinogène (protéine plasmatique), présente plusieurs séquences RGD ; ce ligand peut donc servir de "lien" entre les plaquettes.

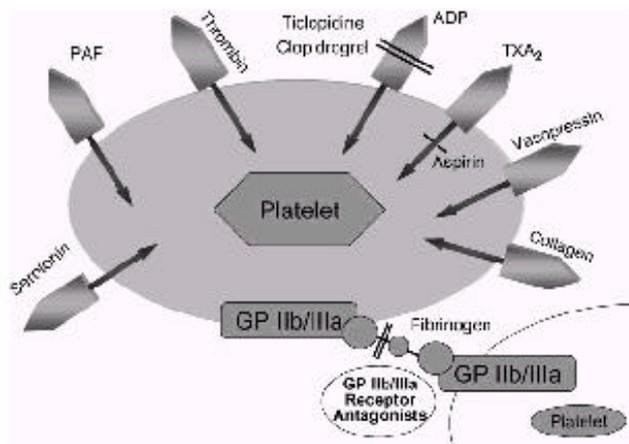
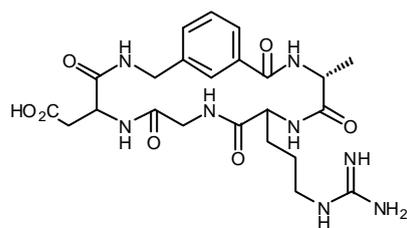


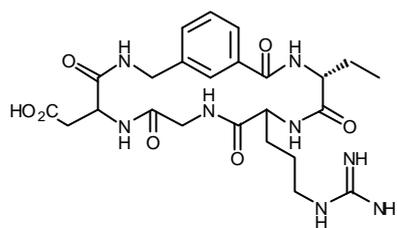
Figure 1.3: Implication de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans la coagulation

Dès la découverte de la "séquence magique RGD", de nombreux groupes académiques et pharmaceutiques se sont intéressés au potentiel thérapeutique de peptides et peptidomimétiques RGD comme agents anti-thrombotiques⁵. Les premiers travaux ont vu le développement de peptides cycliques montrant une certaine efficacité dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. Un pas important a été franchi avec l'élaboration de peptidomimétiques de la séquence RGD. Sur plus de 15 ans, de nombreuses structures furent proposées, synthétisées et évaluées. Parallèlement, une évolution dans la compréhension des événements à l'échelle moléculaire a permis de faire progresser le design dans ce secteur.

Plusieurs composés cycliques présentant le tripeptide RGD dans une conformation figée sont les références actuellement utilisées dans les évaluations biologiques *in vitro* contre l'agrégation plaquettaire (schéma 1.2).



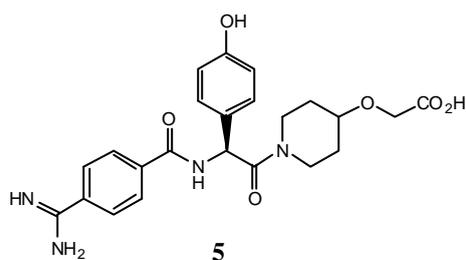
XJ 735, Dupont Merck



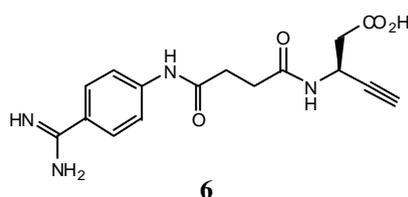
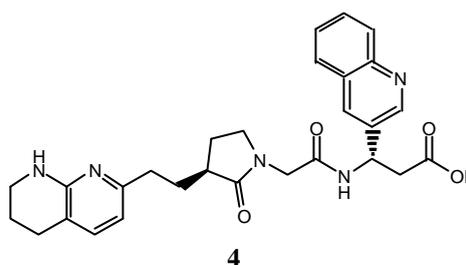
DMP728, Dupont Merck

Schéma 1.2 Cyclopeptides antagonistes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

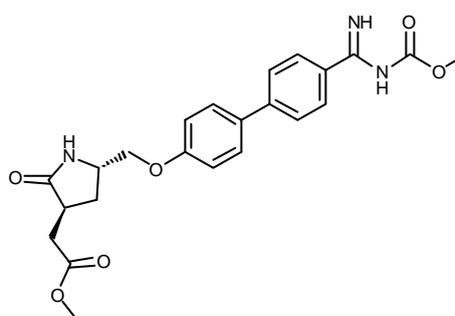
Cependant, un des problèmes majeurs des peptides est leur susceptibilité à subir *in vivo* une dégradation par le milieu physiologique. L'utilisation de peptidomimétiques (mimes de peptides) permet de contourner ce problème. Ci-dessous, nous reprenons plusieurs composés récemment développés comme peptidomimétiques RGD (schéma 1.3). Ceux-ci ont une très bonne affinité pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.



RO 44-9883, Lamifiban, Hoffmann-La Roche



SC 54701A, Xemilofiban, Searle



Bibu-104, Lefradafiban, RO 48-3567
Boehringer Ingelheim

Schéma 1.3 Peptidomimétiques antagonistes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Ces composés se caractérisent par des structures assez diverses. La plupart ont comme site basique (mime Arg) une benzamidine. Le site acide (mime Asp) est assuré par un acide carboxylique (ou un ester hydrolysable= prodrogue).

Un composé que nous voulons mettre en évidence est le Tirofiban **9** (Agrastat)

(schéma 1.4) car il fera partie de la discussion de nos résultats. Développé par Merck, ce composé est basé sur un gabarit tyrosine et présente une fonction sulfonamide⁶. Le mime basique est une pipéridine et l'acide carboxylique le mime acide. Ce composé a été le premier sur le marché à présenter une fonction sulfonamide. De structure relativement flexible, il fait partie des 3 composés commerciaux les plus actifs utilisés en clinique⁷. Les deux autres sont d'une part un anticorps, l'abciximab (~45000 Da) qui se lie de manière irréversible et d'autre part, l'eptifibatide **8** (832 Da) (schéma 1.4), un polypeptide cyclique synthétique, conçu sur base de la famille des désintégrines (antagonistes de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ présents dans le venin de vipère).

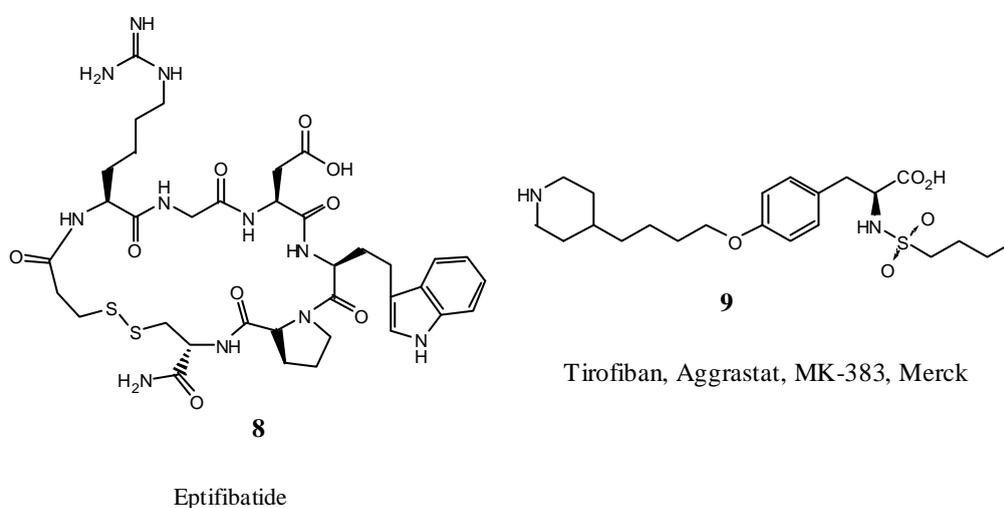


Schéma 1.4

1.4. Ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Après l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, c'est ensuite l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui excita l'intérêt de la chimie médicinale. Cette intégrine, maintenant isolée et purifiée, a été identifiée tout d'abord sur les cellules endothéliales. On sait actuellement qu'elle est présente également, comme récepteur membranaire d'adhésion, sur d'autres types cellulaires. Son ligand naturel est la vitronectine, une protéine de la matrice extracellulaire, caractérisée par la présence de la séquence active RGD. Il a été établi que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est impliquée dans de nombreux processus naturels et/ou pathologiques. L'adhésion des cellules endothéliales via l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ fait partie du processus normal d'angiogénèse. Comme le développement de vaisseaux sanguins est primordial pour la progression tumorale, un antagoniste bloquant le récepteur $\alpha_v\beta_3$ conduit à la régression des cancers. Toutes les pathologies où une néovascularisation est

requis sont des champs d'application pour la recherche pharmaceutique. Un autre domaine important est le traitement de l'ostéoporose. Si l'équilibre dynamique formation-dégradation des tissus osseux (ostéoblastes *vs* ostéoclastes) est perturbé, on assiste à une fragilisation osseuse. Or les ostéoclastes présentent un taux élevé d'intégrines $\alpha_v\beta_3$. Bloquer ces récepteurs, afin de rétablir l'équilibre, est une approche explorée actuellement.

Comme mentionné antérieurement, les ligands naturels des intégrines (protéines) sont assez divers et chacun présente la séquence RGD dans une conformation spécifique, ce qui contribue à la sélectivité de reconnaissance. La recherche des conformations actives, à partir de petites molécules de synthèse, est devenue une démarche importante en chimie médicinale.

Dans les années "90", alors que les travaux concernant la séquence RGD en relation avec les phénomènes liés à l'agrégation plaquettaire étaient à un stade de développement bien avancé, Kessler et al. ont entrepris d'établir la conformation RGD liée à la reconnaissance de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, vu le potentiel thérapeutique très important d'antagonistes synthétiques dirigés vers ce récepteur⁸.

L'approche classique est établie en plusieurs points : d'abord, synthétiser des séquences peptidiques linéaires contenant RGD. Par la suite, induire une contrainte rigidifiant la séquence en l'incorporant dans un cycle. Et finalement, établir les meilleurs "voisins" induisant la conformation la plus efficace et aussi la plus sélective. De nombreux composés acycliques et cycliques (5-6 aa) ont été investigués⁹ ; cette démarche a permis d'établir la structure de reconnaissance la plus affine et la plus sélective envers l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. En cyclisant le pentapeptide RGDfV **10** (schéma 1.5), la conformation la plus sélective a été mise en évidence. L'évaluation biologique conduit à un IC_{50} de 2 nM vis-à-vis de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (schéma 1.5)^a.

^a IC_{50} : Concentration équivalente à 50% du seuil maximum⁹ inhibition.

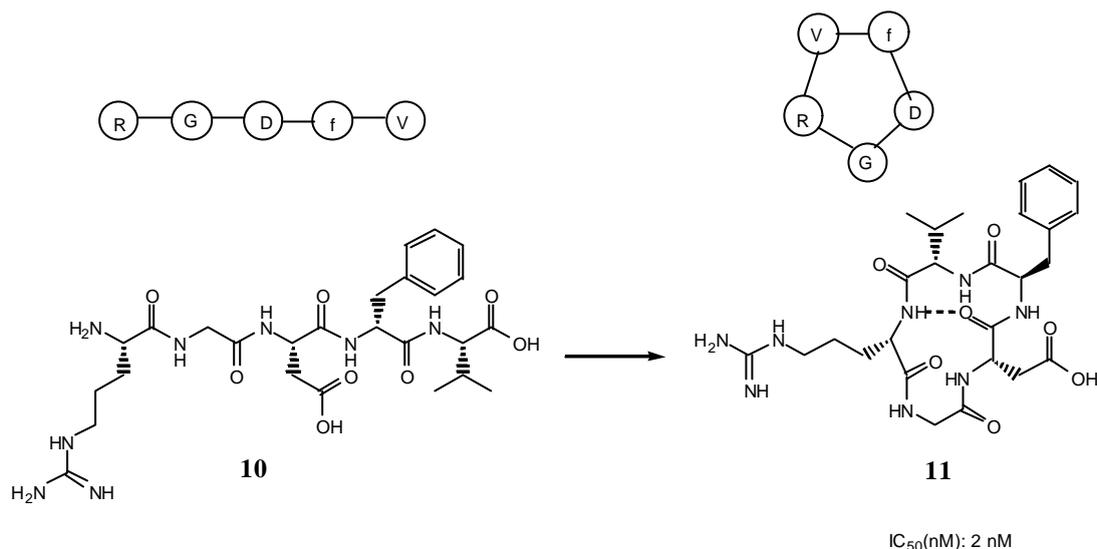


Schéma 1.5

La N-méthylation de la (D)-phénylalanine a conduit finalement à la structure la plus active avec un IC_{50} de 0.6 nM^{10} (schéma 1.6). Ce composé présente donc une excellente affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ mais aussi une grande sélectivité par rapport à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Plusieurs éléments clef sont à mettre en évidence: une distance entre les C_β des acides aminés Asp et Arg inférieure à 7 angströms, distance critique pour conserver une sélectivité antagoniste $\alpha_v\beta_3$ (schéma 1.6); la présence de ponts hydrogène qui assurent une certaine rigidité de la structure.

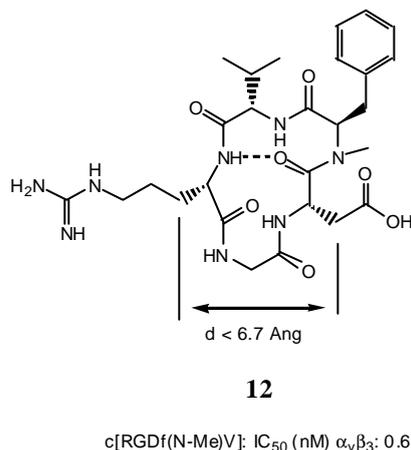


Schéma 1.6

Actuellement, nous pouvons dire que la molécule de Kessler reste toujours la référence dans le design de peptidomimétiques RGD dirigés vers l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le cyclopentapeptide appelé Cilengitide **11** (schéma 1.7) est en phase clinique II dans l'optique d'un traitement anticancéreux¹¹. A notre connaissance, seul un₁₀peptidomimétique développé par Glaxo-

SmithKline **13** (SB 273005) (schéma 1.7) poursuit son chemin en phase clinique dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde, ainsi qu'un anticorps monoclonal LM 609 (Vitaxin) pour la thérapie anti-angiogénique¹².

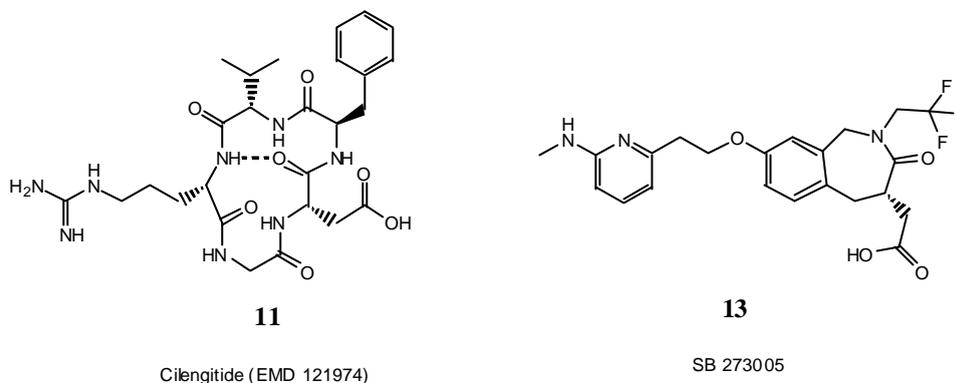


Schéma 1.7

L'explication de ce faible taux de réussite des peptidomimétiques serait un pauvre profil pharmacocinétique et une disponibilité orale faible. Pour contourner ces problèmes, certains groupes développent des prodrogues, composés présentant un profil pharmacologique plus efficace et une meilleure pénétration membranaire.

1.5. Résultats récents en chimie médicinale

Nous présentons un aperçu des travaux récents développés par différents groupes pharmaceutiques dans la recherche d'antagonistes $\alpha_v\beta_3$. Ceci nous permet de faire un bilan des approches et apports de ces nombreuses études.

Le Tirofiban est un des composés utilisés dans le traitement de désordres liés à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Partant de sa structure, les chercheurs de Merck sont actuellement en train de développer une nouvelle famille de peptidomimétiques¹³. Celle-ci se base sur la formation d'un second cycle lié à la tyrosine (schéma 1.8). En augmentant la rigidité du template central, on espère induire une meilleure reconnaissance pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. A ce jour, aucun résultat biologique lié à cette famille n'a été publié.

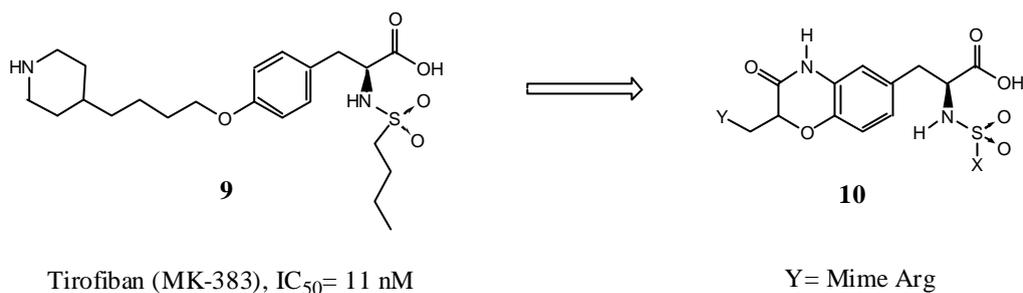


Schéma 1.8

Le groupe Merck a également développé une série de composés actifs où le mime arginine est la tétrahydronaphtyridine¹⁴. Tout en augmentant la sélectivité envers l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, ce résidu basique accroît la lipophilie des composés (schéma 1.9).

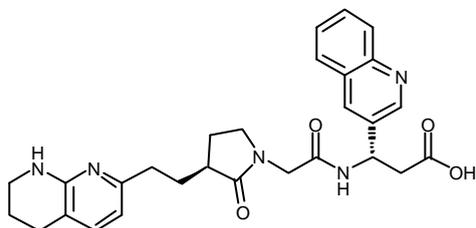


Schéma 1.9

Parallèlement aux études sur le noyau benzazépinone, le groupe GSK propose une nouvelle famille conçue sur le noyau phénylbutyrate¹⁵ (schéma 1.10). Dans cette approche, l'implication d'un résidu lipophile proche du mime acide a été étudiée.

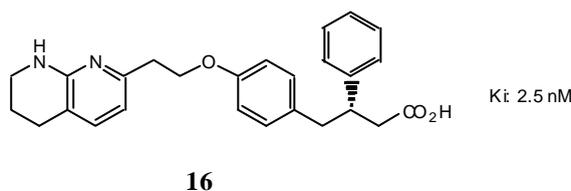


Schéma 1.10

Sur base d'un composé en développement dans leur laboratoire, des chercheurs de BASF ont considéré le noyau dibenzazépinone¹⁶ (schéma 1.11). Ce travail a mis en évidence l'importance du lien entre la dibenzazépinone et le résidu basique. Il constitue une première dans le sens où l'étude d'un centre stéréogénique a été abordée.

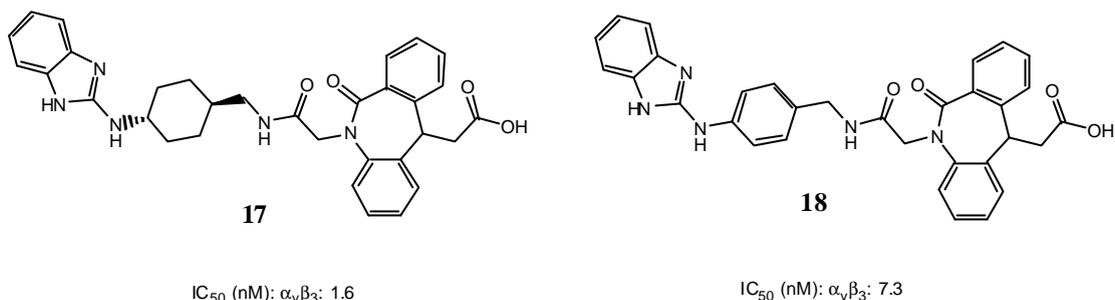


Schéma 1.11

Dans la famille des benzazepinones, le composé ci-dessous a été proposé après l'obtention des résultats sur les dibenzazepinones¹⁷ (schéma 1.12).

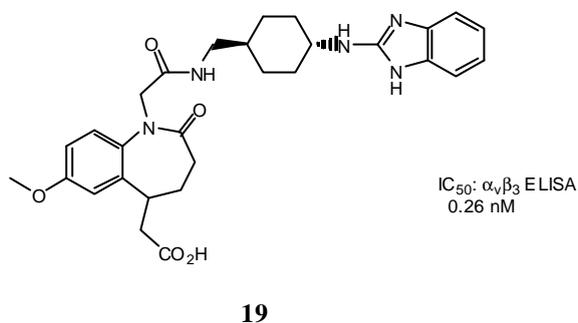


Schéma 1.12

Dans le groupe de recherche Bayer, plusieurs composés potentiellement actifs ont été découverts. Ceux-ci sont conçus sur un noyau rigide biphenyle¹⁸ (schéma 1.13).

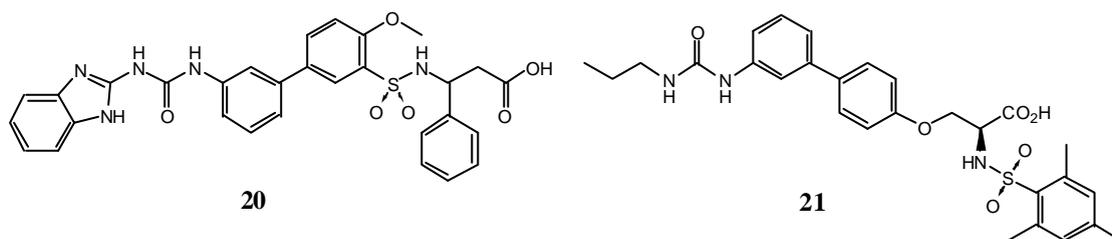
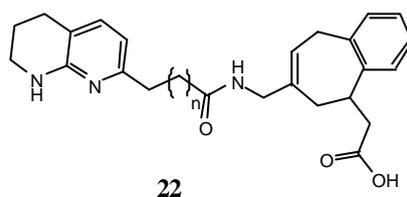


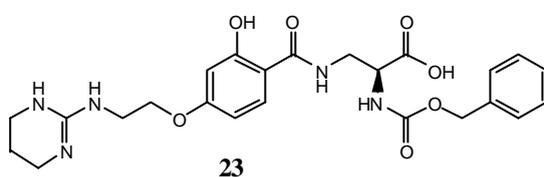
Schéma 1.13

Le groupe Servier a récemment lancé un programme de recherche visant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ¹⁹. A l'inverse des autres groupes, les composés proposés présentent une flexibilité élevée située sur le centre de la molécule et une rigidité (benzocyclohéptène) au niveau des pharmacophores acide et basique (schéma 1.14).



Schema 1.14

La synthèse parallèle en phase solide (Wyeth-Ayerst Research)²⁰ a trouvé une application dans la recherche d'inhibiteurs du récepteur de la vitronectine dérivés de l'acide 2,3-diaminopropionique. Les variations structurales abordées sont les substituants de l'amine en α (urées, carbamates, amides) ainsi que les mimes de l'arginine (schéma 1.15). La présence de guanidines cycliques a conduit à des composés efficaces (travaux publiés durant cette thèse).



IC₅₀~10⁻⁶M

Schéma 1.15

Le noyau isoxazole a servi de template rigide pour le développement d'antagonistes $\alpha_{IIb}\beta_3$ ²¹ par la firme Dupont. Une étude appropriée dérivant de leur noyau lead²² a conduit à un nouveau gabarit basé sur l'indazole (schéma 1.16), pour le développement d'antagonistes $\alpha_v\beta_3$.

L'apport de ce travail est la nécessité d'un groupement lipophile en position α du groupe carboxylate. La présence d'un exosite dans le récepteur est donc supposée, ce qui semble critique pour la liaison avec les antagonistes $\alpha_v\beta_3$. Ce composé a fait l'objet d'une étude sur cellules tumorales où une inhibition de la croissance tumorale a été mise en évidence²³.

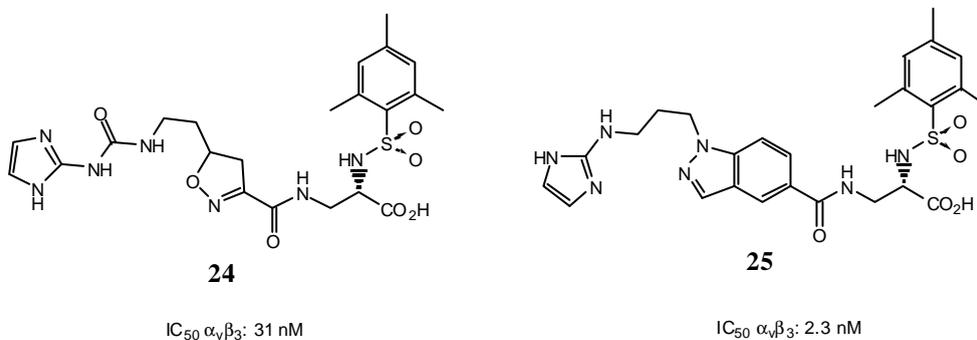


Schéma 1.16

Les composés produits par la firme Smith-Kline Beecham sont caractérisés par un noyau benzodiazépine²⁴. Suite aux modifications de substituants, 2 composés se sont avérés efficaces et des plus intéressants. En effet, l'activité ne semble plus liée à la présence d'un motif sulfonamide.

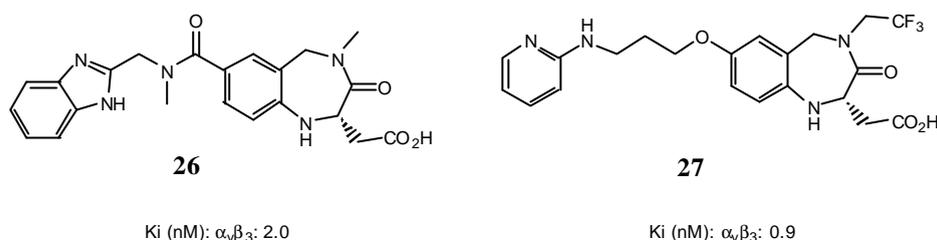


Schéma 1.17

Pour le groupe Shire Biochem, la présence d'un motif sulfonamide augmente le potentiel actif des composés mais parallèlement diminuerait la sélectivité (schéma 1.18).

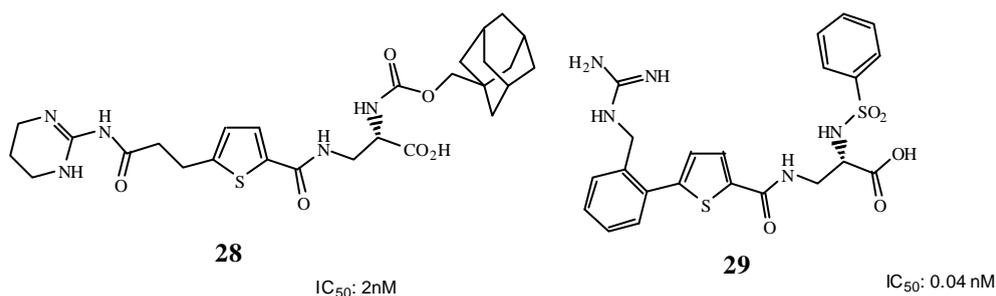
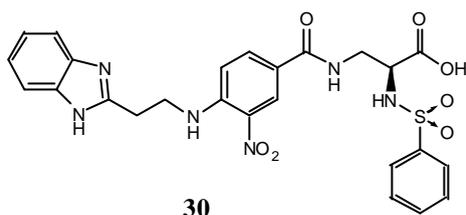


Schéma 1.18

Nicolaou *et al.* se sont également penchés sur le développement d'antagonistes d'intégrines²⁵. En collaboration avec Merck, ils ont profité de leurs expertises antérieures pour établir une série de composés dérivés du template p-aminobenzoï que dont le plus efficace est repris ci-dessous. On peut souligner l'importance de la fonction benzimidazole (lipophile et basique) et de la fonction sulfonamide aromatique (schéma 1.19). Malgré des résultats *in vitro* intéressants, nous émettons quelques doutes quant au futur de ce composé étant donné la présence d'une fonction nitro qui satisfait rarement aux conditions d'acceptation pharmacologique.



IC₅₀: 0.8 nM

Schéma 1.19

Cette revue est loin d'être exhaustive : d'autres groupes académiques et pharmaceutiques se sont penchés sur la synthèse de peptidomimétiques RGD. Les structures utilisées sont relativement variées, ainsi que les templates considérés : azapeptides²⁶, carbohydrates²⁷,...

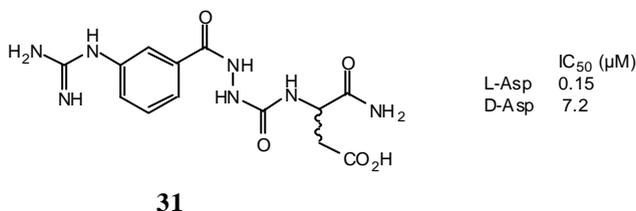


Schéma 1.20

Au cours de cette thèse, 3 revues sont parues couvrant les peptidomimétiques développés comme antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ²⁸. Toutes les structures discutées reprennent les 3 éléments clefs du pharmacophore : mime acide, mime basique et résidu lipophile. Malgré ces informations et le composé de référence c[RGDf(NMe)V], établir le design du peptidomimétique idéal envers cette intégrine n'est pas encore envisageable.

1.6. Etude structurale de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Tout récemment, la partie extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a pu être cristallisée et sa structure tridimensionnelle établie par diffraction des rayons-X. Les complexes avec des ions métalliques et le composé de référence c[RGDf(NMe)V] ont apporté des informations quant au mode de reconnaissance ligand-récepteur²⁹ (Figure 1.4).

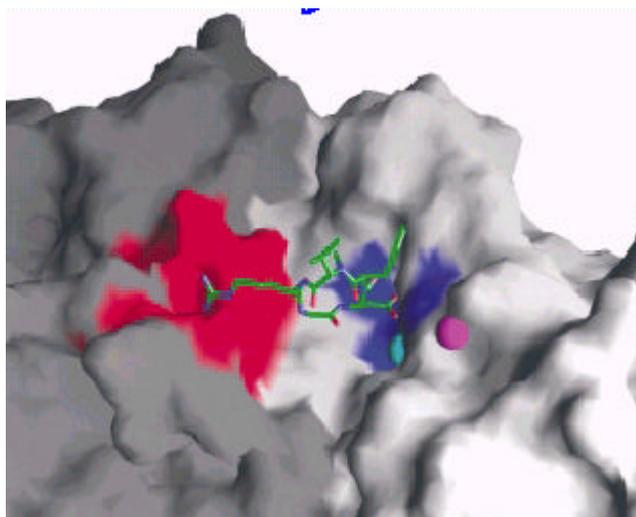


Figure 1.4 : Site de liaison de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le ligand cyclique c[RGDf(NMe)V]

On observe que le résidu aspartique du ligand RGD se lie à un ion métallique dans la région MIDAS^b de la sous-unité β_3 (en bleu). La seule portion du ligand RGD en contact avec la sous-unité α (en rouge) est l'arginine, se liant à une région de charge négative dans α_v . Une caractéristique assez inhabituelle est l'observation d'interactions non-hydrophobes uniquement.

^b MIDAS : Metal Ion Dependent Adhesion Site

D'autres interactions de type lien hydrogène apparaissent entre le NH de la liaison amide Gly-Asp et l'atome d'oxygène (β)-R 216 ainsi que la chaîne secondaire de l'acide aspartique et le NH du groupement (β)-N 215.

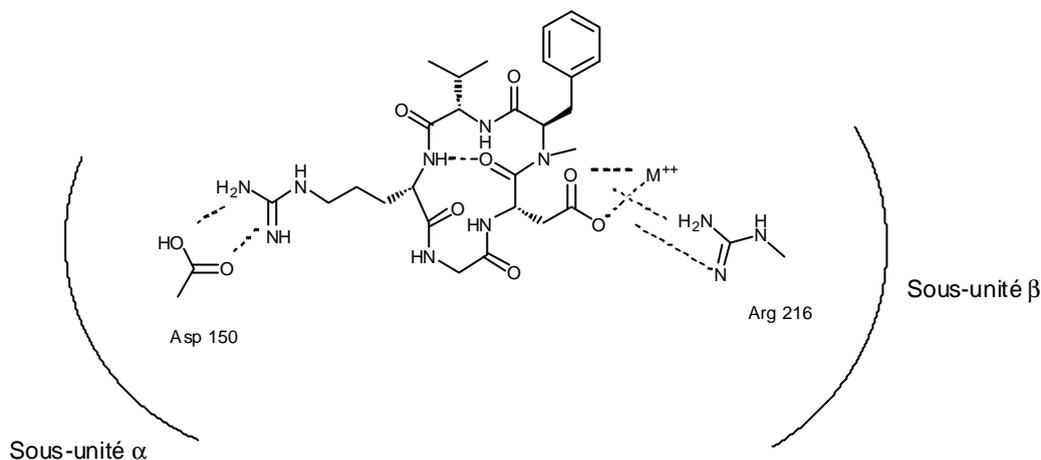


Schéma 1.21 Eléments clefs de reconnaissance entre le c[RGDf(NMe)V] et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Les résidus Asp et Arg du ligand agissent donc comme une pince électrostatique et se lient aux régions chargées de la protéine. Or les ligands ont habituellement tendance à se placer dans des poches hydrophobes disposant de larges interfaces par des interactions de type van der Waals.

Si de manière strictement géométrique, nous nous reportons à la structure RGD, la distance entre l'arginine et l'aspartique dans le cyclopentapeptide est de l'ordre de 13 Å. Or la distance entre le Ca^{++} dans le région MIDAS et l'hélice β de la sous-unité se situe à 17Å. Ainsi la distance entre les carbones en position alpha sur l'arginine et l'aspartique est cruciale.

1.7. Transduction du signal

Un des grands points de discussion est la transmission des informations *via* les intégrines. En effet, ces dernières se présentent dans des états bien distincts (actifs-non actifs). Ce qui gouverne leur état latent n'est à ce jour pas encore élucidé.

Prenons le cas de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, impliquée dans les phénomènes d'agrégation plaquettaire ; cette intégrine est normalement dans un état inactif. Une activation inappropriée conduirait au désastre lié à une thrombose par exemple. En opposition, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ se trouve normalement dans un état actif pour ¹⁸assurer la constitution de l'endothélium.

Pour expliquer ces différents états, il est proposé que le domaine extra-cellulaire des intégrines soit dans un état de faible affinité. Ceci se caractériserait par une conformation pliée où la poche de liaison N-terminale est proche de la membrane³⁰ (Figure 1.5). En plus de cette conformation extra-cellulaire, il faut tenir compte de l'interaction entre les sous-unités dans la portion cytoplasmique. La constante de dissociation ($K_d \sim 7-50 \mu M$) autorise un équilibre rapide entre ces deux parties. Ainsi des constituants du cytoplasme peuvent entrer en compétition dans la liaison entre ces sous-unités. Et parallèlement, la présence de ligands en solution a une influence qui se manifesterait par une modification conformationnelle vers l'extension³¹. Plusieurs questions subsistent. Si un petit ligand est "autorisé" à s'inclure dans le site de reconnaissance, qu'en est-il du ligand naturel, beaucoup plus "massif" à l'échelle des acides aminés³² ? Si l'information extérieure à la cellule induit une réponse vers l'intérieur (outside-in effect) par différents stimuli (ligands, anticorps, cations métalliques,..), comment se produit l'opposé (inside-out effect)?

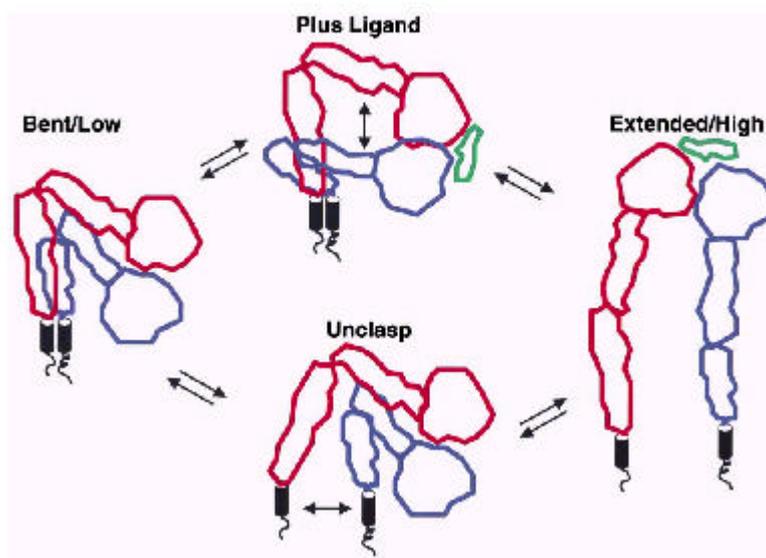


Figure 1.5 Activation de l'intégrine : modèles proposés

Un domaine aussi palpitant que la compréhension du comportement des intégrines se situe à un stade où les réponses déjà apportées engendrent encore plus de questions. Dès qu'une structure cristalline d'une intégrine complète associée à son ligand sera disponible, il sera (peut-être) possible d'établir un modèle de reconnaissance complet et de cibler de nouveaux composés capables de figer une intégrine dans une conformation particulière. A ce moment là, de nouvelles réponses seront envisageables.

1.8. Ligand naturel : la vitronectine

Un des ligands naturels de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est la vitronectine, appelée ainsi à cause de sa faculté à se lier au verre³³. Découverte comme un facteur d'étalement du sérum, la vitronectine est parfois nommée Epiboline ou Protéine S. Composée de 459 acides aminés dans sa portion de reconnaissance, sa séquence RGD est située du 45 au 47^{ème} acide aminé (Figure 1.6).

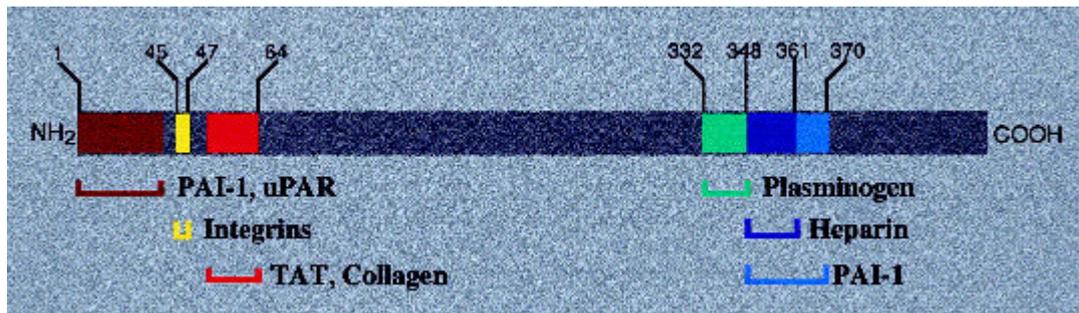


Figure 1.6 site de reconnaissance de la Vitronectine

Ses fonctions biologiques se situent au niveau de la promotion de l'adhésion cellulaire et de la protéolyse physiologique. L'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans l'angiogénèse n'est plus à démontrer ; le rôle important de la vitronectine dans la cicatrisation et la progression tumorale a aussi été établi.

Dès qu'il y a contact entre la vitronectine et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, celle-ci régule la réorganisation du cytosquelette de la cellule, le transport d'ions intracellulaire, le métabolisme lipidique et l'expression de gènes.

Dans le cadre de notre thèse, nous avons considéré la vitronectine comme composé naturel de référence pour les évaluations biologiques.

1.9. Bibliographie

1. "Complex carbohydrates of the extracellular matrix: structures, interactions and biological roles." Aplin, J. D.; Hughes, R. C. *Biochimica et Biophysica Acta* **1982**, 694, 375-418.
2. "Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions." Moiseeva, E. P. *Cardiovascular Research* **2001**, 52, 372-386 ; "Les molécules d'adhésion en cancérologie." Pierres, A. ; Benoliel, A.M. ; Bongrand, P. *Rev. Méd. Interne* **1999**, 20, 1099-1113.
3. "Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization." Nagar, B.; Overduin, M.; Ikura, M.; Rini, J. M. *Science* **1995**, 267, 386-389.; "Zipping together a cell adhesion interface." Patel, D. J.; Gumbiner, B. M. **1995**, 374, 306-307; "Solution structure of the Epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion." Overduin, M.; Harvey, T. S.; Bagby, S.; Yau, P.; Takeichi, M.; Ikura, M. *Nature* **1996**, 380, 360-364.
4. "Get a ligand, get a life: integrins, signalling and cell survival." Stupack, D. G.; Cheresch, D. A. *Journal of cell science* **2002**, 115, 3729-3738.
5. "Platelet GPIIb-IIIa blockers." Topol, E. J.; Byzova, T. V.; Plow, E. F. *The Lancet* **1999**, 353, 227-231.
6. "Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 2. Optimization of a Tyrosine template as a mimic for Arg-Gly-Asp." Egbertson, M. S.; Chang, C. T.-C.; Duggan, M. E.; Gould, R. J.; Halczenko, W. & al. *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2537-2551.
7. "Anti-integrin therapy." Hamm, C. W. *Annu. Rev. Med.* **2003**, 54, 425-435 ; "Les anti-GPIIb-IIIa." Nurden, P. *Transfus. Clin. Biol.* **2001**, 8, 114-122; "Antithrombotic agents: from RGD to Peptide mimetics." Ojima, I.; Chakravarty, S.; Dong, Q. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 337-360.
8. "Structural and functional aspects of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists. " Haubner, R.; Gratias, R; Diefenbach, B.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7461-7472.
9. "Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ integrin for a new cancer therapy." Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1374-1389.

10. “N-methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonists.” Dechantstreiter, M.A.; Planker, E.; Mathä, B.; Lohof, E.; Hölzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S.L.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-3040.

12. “Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin $\alpha_v\beta_3$.” Gutheil, J. C.; Campbell, T. N.; Pierce, P. R.; Watkins, J. D.; Huse, W. D.; Bodkin, D. J.; Cheresch, D. A. *Clinical Cancer Research* **2000**, *6*, 3056-3061.

13. Bender, H.-M.; Ulrich, L.; Wiesner, M.; Friedlander, M. Brevet WO 2003 068253.

14. “Nonpeptide $\alpha_v\beta_3$ antagonists. Part 3: identification of potent RGD mimetics incorporating novel β -amino acids as aspartic acid replacements.” Coleman, P. J.; Brashear, K. M.; Hunt, C. A.; Hoffman, W. F.; Hutchinson, J. H.; Duggan, M. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 31-34.

15. “Phenylbutyrates as potent, orally bioavailable Vitronectin receptor (Integrin $\alpha_v\beta_3$) antagonists.” Miller, W.H.; Manley, P.J.; Cousins, R.D.; Erhard, K.F.; Heerding, D.A.; Kwon, C.; Ross, S.T.; Samanen, J.M.; Takata, D.T.; Uzinskas, I.N.; Yuan, C.C.K.; Curtis Haltiwanger, R.; Gress, C.J.; Lark, M.W.; Hwang, S.-M.; James, I.E.; Rieman, D.J.; Willette, R.N.; Yue, T.-L.; Azzarano, L.M.; Salyers, K.L.; Smith, B.R.; Ward, K.W.; Johanson, K.O.; Huffman, W.F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1483-1486.

16. “Synthesis and SAR of N-substituted Dibenzazepinone Derivatives as Novel Potent and Selective $\alpha_v\beta_3$ Antagonists.” Kling, A.; Backfisch, G.; Delzer, J.; Geneste, H.; Graef, C.; Holzenkamp, U.; Hornberger, W.; Lange, U.; Lauterbach, A.; Mack, H.; Seitz, W.; Subkowski, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 441-446.

17. “Design and synthesis of 1,5- and 2,5-substituted tetrahydrobenzazepinones as novel potent and selective integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists.” Kling A.; Backfisch, G.; Delzer, J.; Geneste, H.; Graef, C.; Hornberger, W.; Lange, U.E.W.; Lauterbach, A.; Seitz, W.; Subkowski, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1319-1341.

18. “Biphenyls as Potent vitronectin receptor antagonists” Urbahns, K.; Härter, M.; Albers, M.; Schmidt, D.; Stelte-Ludwig, B.; Brüggmeier, U.; Vaupel, A.; Gerdes, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 205-208. “Biphenyls as Potent vitronectin receptor antagonists. Part 2:

Biphenylalanine Ureas.” Urbahns, K. ; Härter, M. ; Vaupel, A.; Albers, M. ; Schmidt, D. ; Brüggemeier, U.; Stelte-Ludwig, B. ; Gerdes, C.; Tsujishita, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1071-1074.

19. “Substituted Benzocycloheptenes as potent and selective α_v integrin antagonists.” Perron-Sierra, F. ; Saint Dizier, D. ; Bertrand, M.; Genton, A.; Tucker, G.C.; Casara, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3291-3296.

20. “Parallel solid-phase synthesis of vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$) inhibitors.” Gopalsamy, A. ; Yang, H. ; Ellingboe, J.W.; Kees, K.L.; Yoon, J.; Murrills, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1715-1718.

21. “Disubstituted indazoles as potent antagonists of the integrin $\alpha_v\beta_3$.” Batt, D. G.; Petraitis, J. J. ; Houghton, G. C.; Modi, D. P.; Jadhav, P. K. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 41-58.

22. “Isoxazolines as potent antagonists of the integrin $\alpha_v\beta_3$.” Pitts, W. J.; Wityak, J.; Smallheer, J. M.; Tobin, A. E.; Jetter, J. W.; Jadhav, P. K. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 27-40.

23. “Effects of the novel α_v integrin antagonist SM256 and cis-platinum on growth of murine squamous cell carcinoma PAM LY8.” Van Maes, C.; Enamorado-Ayala, I.; Hecht, D.; Sulica, L.; Chen, Z.; Batt, D. G.; Mousa, S. *Internat. J. Oncology* **2000**, *16*, 1189-1195.

24. “Discovery of potent nonpeptide vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$) antagonists.” Keenan, R. M.; Miller, W. H.; Kwon, C.; Ali, F. E.; Callahan, J. F.; Calvo, R. R.; Huffman, W. F. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2289-2292.

“Discovery of orally active nonpeptide vitronectin receptor antagonists based on a benzazepine Gly-Asp mimetic.” Miller, W. H.; Alberts, D. P.; Bhatnagar, P. K.; Bondinell, W. E.; Callahan, J. F.; Huffman, W. F. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 22-26.

25. “Design, synthesis and biological evaluation of nonpeptide integrin antagonists.” Nicolaou, K.C.; Trujillo, J. I.; Jandeleit, B.; Chibale, K.; Rosenfeld, M.; Diefenbach, B.; Cheresch, D. A.; Goodman, S.L. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1185-1208.

26. “Nonpeptidic $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonist libraries: on-bead screening and mass spectrometric identification without tagging.” Gibson, C.; Sulyok, G. A. G.; Hahn, D.; Goodman, S. L.; Hölzemann, G.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 165-169.

27. “Design, synthesis and preliminary biological evaluation of a focused combinatorial library of stereodiverse carbohydrate-scaffold-based peptidomimetics.” Moitessier, N. ;

Dufour, S. ; Chrétien, F. ; Thiery, J.-P. ; Maigret, B. ; Chapleur, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 511-523.

28. "Identification and in vitro efficacy of small-molecule antagonists of integrin $\alpha_v\beta_3$ (the vitronectin receptor)." Miller, W.H. ; Keenan, R.M. ; Willette R.N. ; Lark, M.W. *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 397-408.

"Ligands to the integrin receptor $\alpha_v\beta_3$." Duggan, M.E. ; Hutchinson, J.H. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2000**, *10*, 1367-1383.

"The α_v integrin antagonists as novel anticancer agents: an update." Kerr, J. S.; Slee, A.M.; Mousa, S. A. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2002**, *11*, 1765-1774.

29. "Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$." Xiong, J.-P.; Stehle, T. ; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D. L.; Joachimiak, A.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. *Science* **2001**, *294*, 339-345.

30. "Will the real integrin please stand up?" Liddington, R. C. *Structure* **2002**, *10*, 605-607.

31. "Integrin activation and structural rearrangement." Takagi, J.; Springer, T. A. *Immunol. Rev.* **2002**, *186*, 141-163.

32. "New light on the integrin switch." Leahy, D. J. *Structure* **2002**, *10*, 1152-1154.

33. "Vitronectin." Schwartz, I.; Seger, D.; Shaltiel, S. *Int. J. Biochem Cell Biol.* **1999**, *31*, 539-544. "An unraveling tale of how integrins are activated from within." Travis, M. A.; Humphries, J. D. ; Humphries, M. J. *Trends in Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 192-197.