

Université de Montréal

**CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'UN LIGAND DE L'INTÉGRINE
 $\alpha_v\beta_3$ SUSCEPTIBLE D'ÊTRE GREFFÉ À UN POLYMÈRE, DANS
LE BUT DE CIBLER LES PROCESSUS D'ANGIOGENÈSE DANS
DES TISSUS CANCÉREUX**

Par
Alexander Agudelo

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade
de M.Sc. en sciences pharmaceutiques, option technologie pharmaceutique.

Novembre, 2006

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cet mémoire, intitulé:

**CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'UN LIGAND DE L'INTÉGRINE $\alpha v\beta 3$
SUSCEPTIBLE D'ÊTRE GREFFÉ À UN POLYMÈRE, DANS LE BUT DE CIBLER
LES PROCESSUS D'ANGIOGÈNESE DANS DES TISSUS CANCÉREUX**

Présenté par

Alexander Agudelo

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Marc Servant, président rapporteur

Dr Grégoire Leclair, membre



Résumé

La possibilité d'interférer avec les fonctions des récepteurs intégrines ouvre plusieurs opportunités d'intervention thérapeutique dans des maladies aussi diverses que la thrombose, l'inflammation et le cancer.

Des intégrines spécifiques, telles que la $\alpha_v\beta_3$ et la $\alpha_v\beta_5$, sont impliquées dans la régulation de la fonction des cellules endothéliales; ainsi, les intégrines peuvent contribuer non seulement à l'angiogenèse en favorisant et en commençant le développement des nouveaux vaisseaux sanguins, mais également en participant à la survie de la vascularisation nouvellement formée. Bref, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle important dans l'événement décisif de la formation des nouveaux vaisseaux sanguins pendant l'angiogenèse tumoral

Le travail de recherche réalisé comporte la modification d'un ligand approprié pour se fixer d'une manière stable et spécifique au récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$; le ligand choisi est active comme antagoniste du récepteur. La modification structurelle appliquée au ligand permet son greffage sur un polymère destiné à produire des nanoparticules ciblant activement les processus d'angiogenèse dans des tissus cancéreux.

Des simulations numériques des interactions entre le ligand modifié et le récepteur d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été réalisées au moyen des logiciels qui effectuent le couplage des molécules dans les sites actifs des récepteurs, pour confirmer la puissance et spécificité du ligand modifié sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

La suite du travail envisageait la conception d'une voie de synthèse et la synthèse comme telle du ligand, incluant la modification structurelle proposée et le greffage sur le polymère.

Mots-clés:

Intégrine $\alpha_v\beta_3$, angiogenèse, nanoparticules, PLA

Abstract:

The possibility of interfering with the activity of integrin receptors opens a number of opportunities to treat different disorders such as thrombosis, inflammation and cancer.

Specific integrins, such as $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ are involved in regulating the activity of endothelial cells; accordingly, integrins do contribute not only to angiogenic processes, starting and stimulating the development of new blood vessels, but also stimulating the survival of the formed vascular network. Summarizing, $\alpha_v\beta_3$ integrin has a decisive role in new blood vessels formation by angiogenic processes.

In this study, the modification of a ligand, suitable to specifically bind the integrin $\alpha_v\beta_3$ receptor, producing an antagonistic effect, was performed. This structural modification enables the molecule to be attached to a polymer appropriate for the further production of nanoparticles, targeting angiogenic processes in neoplastic tissues.

Electronic simulations of interactions between the modified ligand and the integrin $\alpha_v\beta_3$ receptor were made using specific software intended to perform the docking process of molecules on the active site of the protein, in order to confirm the strength and specificity of the modified ligand over the integrin $\alpha_v\beta_3$.

Finally, the synthesis route of the ligand has been proposed and then this ligand was produced, including its structural modification and its linkage to the polymer.

Keywords:

Integrin $\alpha_v\beta_3$, angiogenesis, nanoparticles, PLA,

*a Mary, porque a ti
debo tantas enseñanzas,
tanta felicidad... y este logro.
Por siempre... gracias, mi vida.*

Table des matières

Liste des tableaux	1
Liste de figures	1
Liste des abréviations	5
Chapitre 1, Contexte	
Introduction	7
Objectifs de la recherche	9
Contexte biologique	11
Les intégrines et le cancer	13
Les ligands des intégrines	17
Chapitre 2, Approche générale au problème	
Recherche d'un ligand	20
Un ligand spécifique et puissant pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	20
Chapitre 3, Couplage	
Simulations numériques	24
Le couplage avec le logiciel GOLD	29
Préparation des données structurales de la protéine	30
Préparation des données structurales des ligands	30
Détermination du site de liaison sur le récepteur d'intégrine $\alpha_v\beta_3$	31
Évaluation du couplage (docking score)	32
Analyse des résultats	32
Couplage avec le logiciel BioMed CaChe	38
Résultats du couplage	40
Analyse du couplage	41
Transition vers la synthèse	42
Chapitre 4, Planification pour l'obtention des produits	
Discussion sur la méthode de synthèse du ligand	44
Le polymère	49

Le greffage du ligand	52
Chapitre 5, La synthèse des produits et résultats	
Le ligand	54
Greffage du ligand sur le polymère	74
Conclusions et perspectives	78
Bibliographie	83

Liste des tableaux

- Tableau 1 Liaison aux récepteurs d'intégrine des antagonistes qui contiennent un groupe benzimidazole.
- Tableau 2 Effet des substitutions dans la position 4 des antagonistes des intégrines basés sur le noyau de benzodiazépine.
- Tableau 3 Résumé du pointage du couplage avec GOLD pour les deux ligands, incluant l'évaluation des types d'interactions moléculaires.

Liste des figures

- Figure 1: Schéma de la sous unité structurale d'un récepteur cellulaire intégrine de surface qui s'attache à la MEC. Les chaînes α et β sont liées par des liaisons non-covalentes.
- Figure 2: Structure moléculaire du ligand à synthétiser, protégé par un ester sur la fonction carboxylique et avec un hydroxyle disponible pour se lier chimiquement à un polymère.
- Figure 3: Ligand modifié dans la position 4 pour être greffé sur un polymère. Ce ligand possède une activité supposée d'antagonisme puissant et spécifique sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.
- Figure 4: Ligand contenant la séquence RGD en configuration cyclique, correspondant à la structure Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val.
- Figure 5: Site actif pour la liaison des ligands du type RGD dans l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

- Figure 6: Ligand RGD cyclique couplé dans le site actif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.
- Figure 7: Distribution de la polarité sur la surface du récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$, avec le ligand RGD cyclique couplé dans le site actif.
- Figure 8: Le site accepteur du récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le ligand RGD couplé, montrant les résidus impliqués dans les interactions principales entre le ligand et le récepteur.
- Figure 9: Résultats fournis par GOLD qui correspondent à la matrice de la racine de la moyenne des carrés des erreurs (*rmsd*) entre les diverses positions possibles du ligand RGD cyclique.
- Figure 10: Superposition de la meilleure configuration structurale (rose) et de la pire solution (bleue) du ligand cyclique RGD, trouvées grâce aux simulations du couplage réalisées avec le logiciel GOLD.
- Figure 11: Résultats fournis par GOLD qui correspondent à la matrice de la racine de la moyenne des carrés des erreurs (*rmsd*) entre les diverses positions possibles du ligand basé sur le noyau de benzodiazépine.
- Figure 12: Superposition de la meilleure configuration structurale (rose) et de la pire solution (bleue) du ligand basé sur le noyau de benzodiazépine, trouvées grâce aux simulations du couplage réalisées avec le logiciel GOLD.
- Figure 13: Liste du pointage des différentes configurations du ligand RGD cyclique, incluant l'évaluation des types d'interactions moléculaires.

- Figure 14: Liste du pointage des différentes configurations du ligand basé sur le noyau de benzodiazépine, incluant l'évaluation des types d'interactions moléculaires.
- Figure 15: Couplage automatique du ligand cyclique RGD dans le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le logiciel BioMed CaChe. Énergie = -131.336 kcal/mol.
- Figure 16: Couplage automatique du ligand basé dans le noyau de benzodiazépine dans le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le logiciel BioMed CaChe. Énergie = -136.704 kcal/mol.
- Figure 17: Polymère de PLA ramifié par l'insertion d'une fonction capable de fournir des fonctions allyle, alcool, acide ou halogénure d'acide.
- Figure 18: CCM réaction i): 1= Réactif; 2= Mélange réactionnel i) après 1h.
- Figure 19: CCM Réaction ii): 1= Produit de la réaction i); 2= Produit de la réaction ii).
- Figure 20: RMN ^1H composé (3).
- Figure 21: CCM Réaction iii): 1= Produit de ii); 2= Produit de la réaction iii).
- Figure 22: RMN ^1H composé (4).
- Figure 23: CCM Réaction iv): 1= Produit de la réaction iii); 2= Réactif DMAD; 3= Produit de la réaction iv).
- Figure 24: CCM réaction v): 1= Produit réaction iv); 2= Produit réaction v).
- Figure 25: CCM reaction vi): 1= Produit réaction v); 2= Reaction vi).

Figure 26: RMN ^1H composé (8).

Figure 27: CCM réaction vii).

Figure 28: CCM Réaction ix): 1= Produit de vii); 2= Produit de ix).

Figure 29: RMN composé (9.2).

Figure 30: CCM réaction x) (X=I). 1= produit de x).

Figure 31: RMN section aromatique du produit 10 (X=I).

Figure 32: CCM réaction x): 1= Produit réaction ix); 2= Produit réaction x) (X=Br).

Figure 33: RMN section aromatique du produit 10 (X=Br).

Figure 34: CCM Réaction xi): 1= Réactif 11; 2= Produit réaction xi).

Figure 35: RMN composé (12).

Figure 36: CCM réaction xii), 1= Réactif 10, 2=Réactif 12, 3=Produit réaction xii).

Figure 37: RMN produit (13).

Figure 38: CCM réaction xiii: 1= produit (13), 2= Produit réaction xiii).

Figure 39: RMN ^1H produit (14).

Figure 40: RMN ^1H produit (16).

Figure 41: RMN ^1H produit (17).

Liste des abréviations

ARG	Arginine
ASN	Asparagine
ASP	Acide aspartique
CAM	Molécules de adhésion cellulaire (cell adhesion molecules)
CCM	Chromatographie sur couche mince
CE	Cellules endothéliales
DCC	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
DIEA	N,N'-diisopropyléthylamine
DMAD	Diméthyl acétylènedicarboxylate
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMSO-d ⁶	Dimethylsulfoxyde deutéré
GLU	Acide glutamique
GLY	Glycine
GOLD	<i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i> – Optimisation génétique pour les liaisons des ligands-.
HIS	Histidine
MEC	Matrice extracellulaire
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PHE	Phénylalanine
PIM	Complexe iodure monochlorure de pyridine
PLA	Acide polylactique
PMF	Potentiel de la force moyenne

RGD	Séquence peptidique ARG-GLY-ASP
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMSD	Racine carrée des carrées des déviations moyennes (Root mean square deviations)
SER	Serine
THR	Thréonine
CCM	Chromatographie sur couche mince
TYR	Tyrosine
VAL	Valine

Chapitre 1, Contexte

Introduction

Le présent travail de recherche s'inscrit dans le domaine de la technologie pharmaceutique appliqué au ciblage thérapeutique. Le ciblage est planifié au moyen de vecteurs nano-particulaires capables de se diriger vers certaines structures biologiques, grâce à la présence d'un ligand sur sa surface qui est spécifique pour se coupler à un récepteur distinctif.

Le développement d'un vecteur comme celui énoncé précédemment, comprend plusieurs étapes de recherche, en commençant par l'identification de la cible et le ligand nécessaire pour la cibler, jusque la formulation d'un produit acceptable pour être administré chez l'humaine, visant le traitement de la maladie d'intérêt. En général, il est possible de résumer l'ensemble des étapes impliquées dans le développement, comme suit:

- i) Établir le champ d'action, c'est-à-dire, la maladie que l'on veut traiter.
- ii) Identifier la cible biologique spécifique (récepteur) qui permettra d'interférer sur cette maladie.
- iii) Reconnaître les types moléculaires qui sont actifs comme ligands du récepteur choisi.
- iv) Trouver un ligand spécifique et puissant qui produit l'effet désiré et qui puisse être greffé sur le polymère qui formera les nano-particules.
- v) Mettre au point la technique de greffage chimique du ligand sur le polymère et les modifications structurales nécessaires sur le ligand pour réaliser le greffage.
- vi) Effectuer des simulations numériques du couplage du ligand modifié dans le site accepteur du récepteur, afin de comparer son activité par rapport l'activité d'un ligand naturel, et établir si l'activité du ligand modifié n'est

pas affectée pour la transformation structurelle réalisée et pour son greffage sur le polymère.

- vii) Proposer une voie de synthèse chimique pour produire le ligand, incluant sa modification structurelle pour le greffer sur le polymère.
- viii) Synthétiser le ligand modifié en caractérisant les produits intermédiaires et le produit final.
- ix) Greffer chimiquement le ligand sur le polymère et caractériser le matériel produit qui sera utile pour préparer les vecteurs actifs.
- x) Fabriquer des nano-particules avec le polymère incluant le ligand greffé.
- xi) Réaliser des essais biologiques *in-vitro* pour déterminer la liaison des nano-particules sur le récepteur ciblé et pour vérifier la libération prévue des médicaments.
- xii) Exécuter études de toxicité pour établir la sécurité du vecteur et sa pharmacocinétique, et pour vérifier aussi la cinétique de livraison des médicaments à partir du vecteur.
- xiii) Établir preuves des effets *in-vivo* du vecteur.
- xiv) Effectuer des essais cliniques pour déterminer l'activité chez des volontaires humaines en bonne santé, puis chez des volontaires malades, pour déterminer l'efficacité du médicament dans le traitement d'une maladie ou d'une affection particulière. Les résultats des études cliniques aident à décider si le médicament devrait être commercialisé.

Ainsi, le présent travail de recherche consiste en la réalisation des étapes i) à ix); les étapes restantes s'accompliront dans de prochains projets du groupe de recherche du Dr. Hildgen.

En conséquence, le présent travail se base sur l'hypothèse qu'il est possible de modifier chimiquement un ligand pour le greffer sur un polymère, tout sans affecter sa puissance et sélectivité de couplage. En tant qu'hypothèse secondaire, on propose l'utilisation des logiciels de couplage, pour vérifier -avant de commencer les travail de synthèse- que le ligand modifié est encore approprié pour cibler le récepteur; en même temps, les

simulations permettent de examiner que les fonctions essentiels pour les interactions du ligand avec le polymère, ne seront pas obstruées par le greffage. Les simulations numériques sont très convenables pour optimiser l'utilisation du temps de la recherche et pour éviter la déprédation des ressources.

Or, les objectifs du présent travail seront énoncés par la suite, en expliquant postérieurement les fondements théoriques biologiques et techniques qui ont permis de proposer les hypothèses précédentes, sur les quelles repose l'exercice de recherche réalisé.

En premier, les récepteurs intégrines seront décrits brièvement, et leur fonctionnalité sera également expliquée. Spécifiquement, les commentaires se concentrent sur le sous-type $\alpha_v\beta_3$, qui est la cible du ligand obtenu dans ce travail. En fait, un survol bibliographique sera aussi fait pour de nombreux ligands d'intégrine déjà synthétisés et de leur activité.

En outre, une partie très importante du travail réalisé repose sur l'exécution de modélisations et de simulations numériques, qui imitent les interactions entre le récepteur et le ligand et qui permettent de prédire l'affinité et le niveau de l'activité biologique des molécules. Les principes des processus de couplage numérique entre molécules seront exposés aussi dans cette introduction.

Objectifs de la recherche

L'objectif général du travail de recherche réalisé, comporte la modification et la synthèse d'un ligand qui se fixe d'une manière stable et spécifique au récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le ligand choisi possède une activité antagoniste pour bloquer l'activité angiogénique du récepteur. La modification appliquée au ligand permettra son greffage ultérieur sur un polymère. Ce dernier est destiné à produire par la suite, des nanoparticules, ciblant activement des processus d'angiogenèse dans des tissus cancéreux.

L'accomplissement de cet objectif impliquait l'exécution de plusieurs tâches subséquentes, en commençant par la recherche bibliographique des ligands des intégrines, notamment du sous-type $\alpha_v\beta_3$, afin d'en trouver un assez spécifique et puissant en tant qu'antagoniste. En plus, le ligand choisi doit être facilement modifiable, pour pouvoir ajouter une fonction chimique qui permettrait de faire une réaction de greffage sur le polymère. Enfin, on cherchait à trouver un ligand correspondant à une petite molécule suffisamment stable et relativement facile à synthétiser.

Une fois que la recherche bibliographique a fourni le type de ligand adéquat pour le modifier chimiquement et permettre son greffage sur un polymère approprié pour produire des nanoparticules, on a effectué des simulations numériques des interactions entre le ligand modifié et le récepteur d'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ces simulations ont été réalisées au moyen des logiciels qui effectuent le couplage numérique des molécules dans les sites actifs des récepteurs. Ces différents logiciels appliquent différentes approches conceptuelles et mathématiques, par conséquent les résultats obtenus ont été confirmés en utilisant au moins deux logiciels distincts.

Après que l'étude numérique des interactions entre le ligand modifié et le récepteur ait indiqué que le ligand continuerait à être puissant et spécifique sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, la suite du travail consistait à concevoir une voie de synthèse du ligand, incluant la modification structurale proposée. Le but était de proposer une synthèse facile, rapide et efficace.

L'étape finale de ce travail de recherche comprend la synthèse du ligand modifié et la réalisation de la réaction de greffage sur le polymère, en s'assurant que les produits attendus à chaque étape aient été obtenus et que les rendements soient acceptables.

Contexte Biologique

L'union de la matrice extracellulaire (MEC) aux cellules, suppose l'existence des protéines d'adhérence transmembranaires. Elles agissent comme récepteurs de la matrice et l'attachent au cytosquelette des cellules. Les principaux récepteurs sur les cellules animales liant la plupart des protéines extracellulaires (collagènes, la fibronectine, la vitronectine et des laminines) sont les intégrines.

Les intégrines font partie de la famille nombreuse des protéines homologues transmembranaires, qui ont pour fonction d'agir comme récepteurs d'adhérence cellule-matrice (points focaux d'adhésion), et correspondent aux complexes hétéro dimériques composés de deux chaînes liées de façon non-covalente, une large chaîne α et une plus petite β ; toutes les deux contiennent un grand domaine extracellulaire, une région intramembranaire et un domaine cytoplasmique relativement petit. Les parties extracellulaires des deux sous-unités s'associent pour former un récepteur fonctionnel qui sert de récepteur à la MEC.

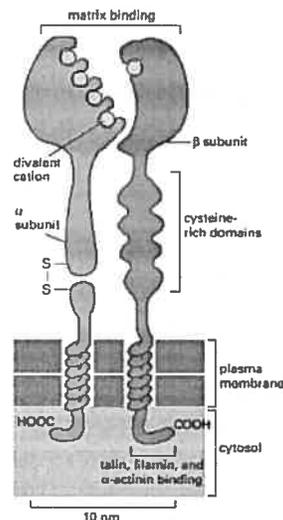


Figure 1. Schéma de la sous unité structurelle d'un récepteur cellulaire intégrine de surface qui s'attache à la MEC. Les chaînes α et β sont liées pour des liaisons non-covalentes.¹

Actuellement, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β sont connues, formant 24 hétérodimères α - β différents; dix-huit de ces récepteurs reconnaissent et s'attachent aux protéines de la matrice extracellulaire, tandis que d'autres ont comme contre-récepteurs des protéines extérieures des autres cellules.² La structure et la diversité fonctionnelle de la famille des intégrines se basent sur la capacité d'appariement des sous-unités individuelles α et β . Cependant, la clef pour l'occurrence des interactions moléculaires entre les récepteurs d'intégrine et leurs ligands respectifs est l'identification de la séquence Arg-Gly-Asp (RGD), connue pour être présente dans la plus part des composants de la MEC, comme par exemple dans la fibronectine, la vitronectine, le collagène, le fibrinogène, et le facteur de Von Willebrand.

Ainsi, le premier motif moléculaire identifié en détail, correspondant à la séquence reconnaissable par les intégrines dans les ligands, est la séquence maintenant classique arginine-glycine-ac.aspartique, trouvée par exemple dans la fibronectine.³ Cependant, pas toutes les intégrines n'identifient cette séquence; on a vu par exemple, que d'autres motifs dans la fibronectine peuvent également servir de motif d'identification pour les intégrines; en fait, la plupart des ligands d'intégrine ne contiennent pas un emplacement fonctionnel pour le motif RGD.⁴

Par conséquence, en tant que la séquence de base (RGD) des ligands naturels reconnaissables par plusieurs des intégrines est présente dans diverses molécules endogènes, les fonctions des divers intégrines se chevauchent. Plusieurs récepteurs peuvent se lier au même ligand; donc, la plupart des intégrines sont considérés promiscues, signifiant qu'elles peuvent s'attacher à plusieurs ligands.

Ce qui est devenu clair dernièrement, c'est que les intégrines ne sont pas simplement des emplacements d'adhérence (points focaux d'adhésion) sur la surface des cellules. Les activités de beaucoup des intégrines peuvent être radicalement modulées par les cellules, et alternativement les intégrines peuvent moduler l'activité cellulaire d'une manière très éloignée de l'adhérence. Aujourd'hui, comme des autres récepteurs, les

intégrines sont généralement considérées comme des récepteurs plurifonctionnels, qui interagissent avec l'extérieur et l'intérieur de la cellule. C'est-à-dire, les intégrines transmettent les signaux de l'extérieur de la cellule pour contrôler par exemple le mouvement cellulaire, la morphologie, la croissance et l'expression génétique, et de la même manière, elles peuvent être contrôlées de l'intérieur de la cellule pour moduler leur affinité aux ligands. En conséquence, on suppose que la possibilité d'interférer avec les fonctions des intégrines ouvre plusieurs opportunités d'intervention thérapeutique, dans des maladies aussi diverses que la thrombose, l'inflammation et le cancer.³

Les intégrines et le cancer

Les intégrines jouent plusieurs rôles dans un certain nombre de processus cellulaires qui ont un grand impact sur le développement des tumeurs, y compris la régulation de la prolifération, la motilité et l'invasion cellulaire ou encore l'identification des métalloprotéinases à la surface des cellules, l'angiogenèse et l'apoptose. D'ailleurs, en raison de la relation des intégrines avec les interactions cellulaires d'adhérence, plusieurs études ont proposé qu'un sous-ensemble de ces récepteurs, la série α_v , puisse être impliqué dans la progression et la production des métastases. En conséquence, l'activité des intégrines peut s'observer de plusieurs façons dans le développement du cancer.^{5,6} Nonobstant, le présent travail se concentre sur les processus d'angiogenèse.

Il est bien connu que pendant la génération de nouveaux vaisseaux sanguins (néovasculogénèse), la liaison des intégrines $\alpha_v\beta_3$ sur la surface des cellules endothéliales est une étape critique pour la différenciation et la maturation des nouveaux vaisseaux.⁷ Ceci est une caractéristique essentielle des tumeurs solides cancéreuses. Sans aucun doute, la prévention des interactions intégrine-ligand pourrait supprimer la croissance cellulaire ou induire la mort des cellules par apoptose.^{8,9}

En bref, la famille des récepteurs intégrines influence plusieurs aspects de la progression et de la métastase des tumeurs, y compris, la survie des cellules, leur prolifération, leur migration, et l'angiogenèse.¹⁰ Des intégrines spécifiques, telles que la $\alpha_v\beta_3$ et la $\alpha_v\beta_5$, sont impliquées dans la régulation de la fonction des cellules endothéliales (CE), et ainsi de l'angiogenèse, qui dépend en grande partie des interactions des CE avec la MEC et les péricytes. Les intégrines peuvent contribuer non seulement à l'angiogenèse en favorisant et en commençant le développement des nouveaux vaisseaux sanguins, mais également en participant à la survie de la vascularisation nouvellement formée.¹¹

Les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ semblent être étroitement associées aux processus d'angiogenèse^{12,13} et spécifiquement à l'angiogenèse dans les tumeurs.^{14,15,16,17} En fait, elles sont exprimées d'une façon minime dans des vaisseaux sanguins déjà établis, alors que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est sensiblement sur-exprimée pendant le processus d'angiogenèse.¹⁸ Par exemple, lorsque l'angiogenèse est induite sur les molécules de l'adhésion cellulaire (cell adhesion molecules –CAM) des oisillons avec des cytokines purifiées, l'expression des $\alpha_v\beta_3$ est stimulée près de quatre fois dans un délai de 72 heures.

Les antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (pas de l'intégrine de $\alpha_v\beta_5$) ont démontré leurs puissance comme inhibiteurs de l'angiogenèse lorsque ils sont testés dans un certain nombre de modèles animaux. Par exemple, l'administration topique ou systémique du LM609, un anticorps monoclonal antagoniste de $\alpha_v\beta_3$, inhibe l'angiogenèse, tandis que d'autres anticorps antagonistes d'autres sous unités d'intégrine sont inefficaces.¹⁴ De même, l'administration du LM609 ou d'un peptide cyclique RGD antagoniste de $\alpha_v\beta_3$, a réduit la croissance des vaisseaux sanguins dans des tumeurs en croissance sur la surface des CAM. Il est important de souligner que l'anticorps LM609 n'a pas eu aucun effet sur les vaisseaux sanguins préexistants; en fait, l'anti $\alpha_v\beta_3$ a induit l'apoptose des cellules dans les vaisseaux sanguins en prolifération (angiogenèse), sans affecter les vaisseaux sanguins déjà établis; donc, la thérapie avec un anti- $\alpha_v\beta_3$ semble viser

seulement des vaisseaux sanguins en germination sans affecter les CEs dans des vaisseaux mûrs.¹⁹

Ainsi, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des capillaires préexistants est une séquence d'événements qui a une importance primordiale dans un large ensemble de processus physiologiques et pathologiques; néanmoins, l'angiogenèse n'est pas habituellement active chez l'adulte normal, excepté pendant la réparation des blessures, l'ovulation et la menstruation.

Dans des procès cancéreux, l'angiogenèse dépend de la stimulation des cellules vasculaires par des facteurs de croissance libérés par des tumeurs ou d'autres tissus malades; également, elle dépend de l'interaction des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ avec leurs ligands. Le mécanisme d'action des antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour bloquer l'angiogenèse semble être lié à leur capacité de favoriser sélectivement la mort programmée des cellules (apoptose) des nouveaux vaisseaux sanguins en croissance.¹⁹ Par conséquent, l'inhibition de l'angiogenèse (néovascularisation) peut fournir des moyens de contrôle de la croissance tumorale et également des métastases, sans affecter les tissus existants.^{20,24} De plus, dans certains cancers, tels que le cancer du sein, l'expression du récepteur $\alpha_v\beta_3$ semble être en corrélation avec l'agressivité de la maladie.^{21,22}

Dans plusieurs études, certains auteurs ont proposé que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ favorise l'invasion par les cellules de mélanome *in vitro*. Dans la plupart des cas la capacité de produire des métastases est corrélée avec l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.²³ Lorsque l'expression de l'hétérodimère α - β a été comparée au potentiel cancérigène, il était clair que les lignées les plus agressives ont tendance à exprimer les niveaux les plus élevés d'intégrine $\alpha_v\beta_3$.²⁴

En outre, les antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ non seulement préviennent la croissance des vaisseaux sanguins associés aux tumeurs, mais *in vivo* ils provoquent aussi la régression des tumeurs déjà établies.¹⁹ En conclusion, ces résultats suggèrent que

l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle important dans l'événement décisif de la formation des nouveaux vaisseaux sanguins pendant l'angiogenèse tumorale.^{25,26} Cependant, la corrélation avec la clinique n'existe pas toujours. Actuellement, la thérapie d'anti-angiogenèse est considérée au niveau mondial comme un approche qui peut mener aux avancées nécessaires dans la lutte contre le cancer et d'autres maladies proangiogéniques.^{27,28,29}

Alternativement, d'autres données ont indiqué un autre rôle significatif pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$, dans la régulation de la croissance pendant la progression et la métastase des tumeurs, ce qui n'est pas relié à son expression par les cellules néoplasiques elles-mêmes mais plutôt à son expression par les cellules endothéliales hôtes normales. Par exemple, le nombre de micro-vaisseaux dans les tumeurs du sein est corrélé avec le risque de métastases. Cependant, dans les tumeurs expérimentales, on ne voit pas survenir de métastases avant la néo-vascularisation. On établit une corrélation entre le pouvoir métastatique des cellules tumorales et l'importance de la vascularisation de la tumeur primitive.

Ainsi, l'angiogenèse est cruciale pour le développement initial des tumeurs, et constitue aussi un facteur définitif pour la production des métastases. En fait, la capacité des tumeurs de se développer au delà du diamètre de 2 millimètres dépend de leur capacité d'induire une réponse angiogénique qui génère nouveaux vaisseaux sanguins pour répondre à l'augmentation des besoins métaboliques et assurer l'apport continue des nutriments et d'oxygène.³⁰ Par exemple, lorsque les cellules tumorales sont inoculées dans un organe avasculaire, elles prolifèrent jusqu'à une taille d'environ 1 mm³, puis stagnent et deviennent 'dormantes'; lorsqu'elles sont inoculées de nouveau dans des organes vasculaires, elles prolifèrent donnant naissance à une tumeur massive et à des métastases.^{31,32}

D'après tous ces faits, des anticorps et des petites molécules inhibitrices (peptidiques et non peptidiques) ont été développés en tant qu'antagonistes, comme agents anti-angiogénese potentiels, impliquant que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sur les CE peuvent être une

cible potentielle pour développer une alternative de thérapie anti-angiogénique et arriver à diminuer la croissance des tumeurs et le développement de nouveaux vaisseaux, aussi bien que pour l'augmentation de l'index d'apoptose des cellules malignes.^{19,33,34,35}

Étant donné qu'on a observé beaucoup d'associations entre l'expression des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et les caractéristiques malignes des lignées de cellules humaines de mélanome,³⁶ il est clair que la modulation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ au moyen des anticorps, par la régulation des gènes ou par des agents pharmacologiques, puisse changer le comportement des tumeurs.³⁷ Les intégrines sont un système de reconnaissance cellulaire fascinant, qui a le potentiel de devenir l'un des systèmes protéine-protéine le mieux compris, avec un impacte thérapeutique très profonde.

Les ligands des intégrines

La séquence térapeptidique -Arg-Gly-Asp-Ser est la structure minimale qui peut être reconnu par les récepteurs des cellules dans la grosse glycoprotéine adhésive nommée fibronectine. Il est bien connu que l'arginine, la glycine, et les résidus d'acide aspartique sont absolument nécessaires pour l'identification des cellules par les récepteurs intégrines, et que les acides aminés environnants peuvent jouer un rôle important dans l'expression de l'activité d'attachement des cellules avec la fibronectine et d'autres protéines ayant cette séquence.³⁸ Donc, il était d'intérêt de produire des ligands avec une activité améliorée, supérieur à l'activité modeste du inhibiteur peptidique naturel (RGD) dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire ($IC_{50} = 100\mu M$), et fournir d'antagonistes efficaces, métaboliquement stables, et oralement actifs, qui imitent la séquence d'identification RGD pour lier le récepteur.

Beaucoup d'intégrines qui lient les glycoprotéines de la MEC, incluant le tripeptide arg-gly-asp (RGD), ont été identifiées par différentes approches. On pense que cette séquence joue un rôle principal dans l'adhésion des cellules. En fait, presque la moitié des intégrines connues lient la séquence tripeptidique (RGD), incluant par exemple, les intégrines $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_8\beta_1$.³⁹

Malgré leur petite taille, les peptides RGD montrent un niveau remarquablement élevé de spécificité. Le simple changement d'un acide aminé ou de l'acide aspartique (GRGDSP) en acide glutamique (GRGESP) dans la fibronectine a conduit à des résultats montrant une réduction de 100 fois de l'activité d'attachement.⁴⁰ Cette spécificité se fonde sur la nature de la conformation de l'emplacement pour le RGD.

La dépendance de la spécificité de la séquence RGD pour la liaison aux intégrines, à l'égard de la conformation de l'emplacement du RGD et la nature des acides aminés environnants, a été utilisée avec succès dans la conception des peptides sélectifs pour s'attacher sur les intégrines. Les peptides d'adhérence, les RGD en particulier, ont fourni beaucoup d'informations au sujet des mécanismes d'adhérence des cellules et ont servi comme base pour le développement d'un nouveau groupe d'agents pharmaceutiques peptidiques et non-peptidiques.

En particulier, beaucoup d'études appuient l'hypothèse que les différents récepteurs d'adhésion qui reconnaissent la séquence Arg-Gly-Asp, peuvent identifier aussi des différences dans la conformation et l'environnement du tripeptide Arg-Gly-Asp. De plus, ces études établissent la possibilité d'obtenir des molécules synthétiques plus sélectives pour différents récepteurs, et même plus puissantes que les peptides ayant la séquence naturelle des molécules adhésives (RGD).⁴¹

Une des premières approches pour créer des ligands non peptidiques pour les récepteurs des intégrines a été l'utilisation des composés qui possédaient des fonctions amines et carboxyles, séparés par des distances de 10-20 Å (semblable à la distance entre la guanidine basique et l'acide carboxylique dans la séquence l'Arg-Gly-Asp). Toutefois, ces composés ont été examinés seulement pour l'inhibition de la liaison du ¹²⁵I-fibrinogène, suggérant la possibilité d'inhiber spécifiquement l'agrégation des plaquettes au moyen du GPIIb/IIIa.⁴²

Lors de l'étude des conditions structurales pour l'identification appropriée du motif RGD par les intégrines, il a été démontré que les contributions les plus importantes à l'affinité des ligands qui contiennent la séquence RGD dépendent de: (a) les groupes guanidinium et carboxylate des résidus d'acides aminés arginine et aspartate respectivement (les études des relations structure-activité ont démontré le rôle indispensable de ces résidus pour l'identification par l'intégrine), et (b) l'espacement de 11 atomes entre les deux groupes fonctionnels ioniques, basé sur l'évidence que des peptides analogues contenant la séquence Arg-Gly-Glu (RGE) avec une chaîne d'espacement de 12 atomes entre les deux groupes ioniques, manquent de spécificité pour la liaison sur les intégrines. Ainsi, une molécule relativement flexible avec des parties fonctionnelles convenablement espacées, peut acquérir une configuration comme celle de la séquence RGD. Ainsi, beaucoup de ligands non-peptidiques ont été conçus et construits, sachant que la chaîne centrale du peptide a une contribution directe mineure sur l'efficacité d'un ligand donné, mais sert principalement à dicter l'espacement et l'orientation des groupes fonctionnels.^{43,44}

Les premières petites molécules antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont été décrites dans la décennie passée.^{45,46,47,48,49} Par la suite, d'autres groupes de recherche ont obtenu des résultats dans le domaine, prouvant que différents types moléculaires répondant aux conditions structurales spécifiques, ne se limitaient pas aux peptides cycliques.^{50,51,52,53}

Plus récemment, d'autres ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ possédant des structures avec une forte affinité pour le récepteur RGD ont été décrits. Ils déviaient de manière significative du cadre classique des peptides. Ainsi, pour la conception et la synthèse des antagonistes potentiels pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, beaucoup de groupes de recherche ont développé des structures qui contiennent par exemple un noyau de benzène, de benzodiazépine, ou d'urée,^{54,55,56} portant des fonctions carboxylate et des groupes guanidine; ils ont également utilisé des structures d'hydrates de carbone,^{57,58} des séries de composés basés sur des structures de nitroaryl,⁵⁹ de composés d'indazole,⁶⁰ d'isoxazolines⁶¹ et de noyaux d'hydantoine,⁶² parmi beaucoup d'autres.

En conclusion, il est évident que beaucoup de types moléculaires pourraient présenter une activité comme ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, naturellement à condition de respecter les exigences d'adaptation à la structure du récepteur.

Chapitre 2, Approche générale au problème

Recherche d'un ligand

L'approche du problème de recherche d'un ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, susceptible d'être greffé sur un polymère grâce à une modification structurale et sans affecter son activité biologique, trouve fondement dans des travaux précédents réalisés par le group de recherche du Dr Hildgen; en particulier, ceux au sujet de la fabrication d'un vecteur actif visant la sélectine E, les processus inflammatoires et la neoangiogénèse tumorale.⁶³

Les buts de ce projet de recherche, sont de viser spécifiquement le récepteur d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à l'aide d'un nano-vecteur pour modifier ou inhiber l'activité angiogénique des tumeurs et en même temps, pour libérer les drogues anticancéreuses. Donc, il était nécessaire de trouver un ligand efficace, susceptible de subir la modification structural proposée pour le lier chimiquement à un polymère, tout cela sans perdre son activité biologique.

Un ligand spécifique et puissant pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

La révision bibliographique nous a conduit vers l'étude d'un genre particulier de molécules non peptidiques qui miment la structure de la séquence RGD, et qui se basent sur le noyau 1,4-benzodiazépine; ce type de molécules agissent comme antagonistes très efficaces et sélectifs des intégrines.⁶⁴

Keenan et ses collaborateurs⁶⁵ ont évalué un très grand groupe d'agents mimétiques potentiels de l'arginine, correspondant à la série des 1,4-benzodiazépines substitués dans la position 7. Ils ont identifié que les dérivés 1,4-benzodiazépines contenant un benzimidazole sont des antagonistes efficaces et sélectifs de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.⁶⁶ De plus, les analogues avec une unité méthylène de plus ou de moins (plus courte) étaient beaucoup moins actifs que la quatrième molécule dans la table suivante, confirmant que la longueur de cette molécule a été optimisée pour interagir avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$.

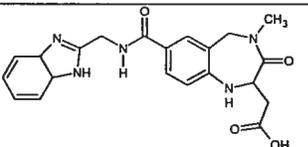
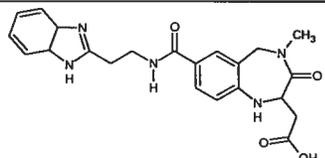
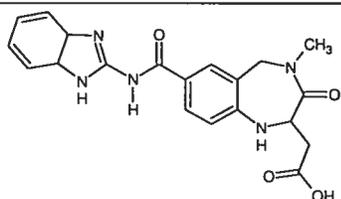
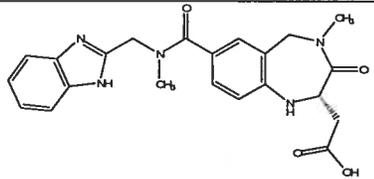
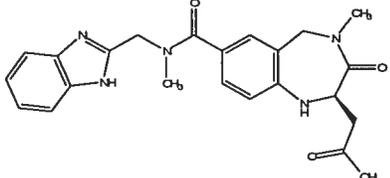
Structure	$\alpha_v\beta_3$ K_i (μM)	$\alpha_{IIb}\beta_3$ K_i (μM)
	0.024±0.002	40±1
	1.10±0.05	>50
	1.15±0.04	>50
	0.002±0.0001	30±2
	4.2±0.3	>50

Tableau 1. Liaison aux récepteurs d'intégrine des antagonistes qui contiennent un groupe Benzimidazole.⁶⁵

Il est aussi très important de souligner que dans le tableau 1, le quatrième composé montre une grande affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (2 nM) et aussi une grande sélectivité, puisque son affinité pour l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est seulement de 30 μ M. Les recherches de Keenan et ses collaborateurs montrent aussi la versatilité du noyau de benzodiazépine comme mimétique du peptide Gly-Asp y comme antagoniste efficace et non peptidique des intégrines, parce que clairement, la série de 1,4-benzodiazépines peut être conçue visant la sélectivité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ou l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, par exemple, simplement lorsque la longueur et la nature du mimétique d'Arg est changée.

L'examen des relations structure-activité des acides 3-oxo-1,4-benzodiazépine-2-acétique benzimidazole substitués, montre que, par rapport au groupe benzimidazole, pour avoir une attache optimale sur le récepteur de la vitronectine, il est important d'avoir la présence d'un groupe NH libre, une configuration particulière des azotes type amidine et un anneau aromatique ou aliphatique fusionné. En outre, il est clair que les substitutions sur l'amide de la position 7 de la benzodiazépine et sur l'amine de la position 4, ne changent pas de manière significative l'activité de la molécule.^{67,68}

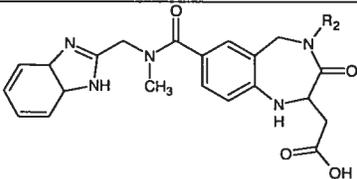
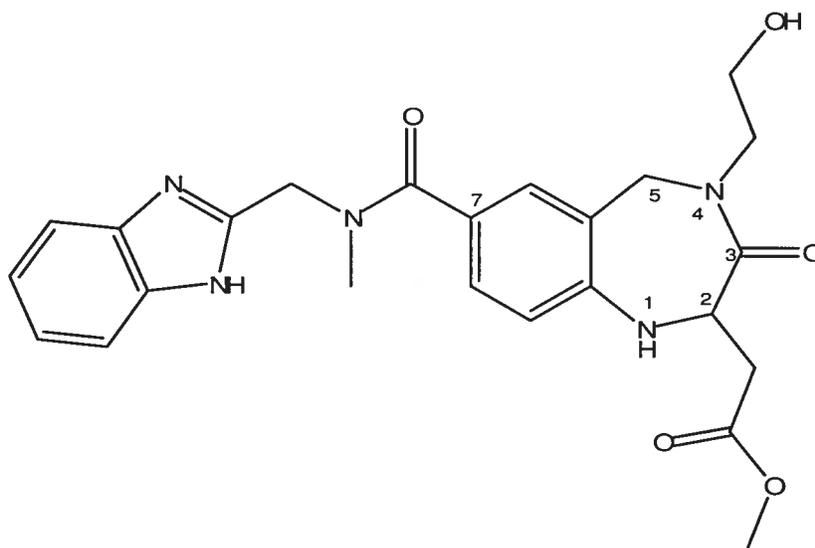
		
R2	$\alpha_v\beta_3$ Binding K_i (μ M)	$\alpha_v\beta_3/293$ adh. IC_{50} (nM)
H	6.5	500
CH ₂ CH ₂ Ph	4	90
CH ₂ CH ₂ O CH ₃	3	340
CH ₂ CH ₂ C(CH ₃) ₃	1.6	180
CH ₂ CH ₂ (3,4-O CH ₂ O)Ph	6	250
CH ₂ Ph	1.9	510

Tableau 2. Effet des substitutions dans la position 4 des antagonistes des intégrines basés sur le noyau de benzodiazépine.⁶⁷

Sachant que la modification de ce type de molécules sur l'amine en position 4 du noyau benzodiazépine n'affecte pas beaucoup l'affinité, la sélectivité et la puissance de ce genre d'antagonistes; cela permet d'envisager l'utilisation de cette position pour inclure un groupe fonctionnel supplémentaire afin de rendre possible l'union chimique du ligand sur un polymère.

Par conséquent, en se basant sur les données du tableau 2 on a établi l'objectif de synthétiser la molécule suivante (figure 2), correspondant au ligand désiré, avec le groupe acide de la position 2 protégé (en forme d'ester), et le groupe hydroxyle libre dans la position 4 (obtenu par enlèvement sélectif du groupe méthyle protecteur - éther-), pour ensuite effectuer le greffage du ligand au polymère grâce à une liaison de type ester.



méthyl 2-(7-(N-((1H-benzo[d]imidazol-2-yl)méthyl)-N-méthylcarbamoyl)-2,3,4,5-tétrahydro-4-(2-hydroxyéthyl)-3-oxo-1H-benzo[e][1,4]diazépin-2-yl)acetate

Figure 2: Structure moléculaire du ligand à synthétiser, protégé par un ester sur la fonction carboxylique et avec un hydroxyle disponible pour se lier chimiquement à un polymère.

Chapitre 3, Couplage

Simulations numériques

Les méthodes théoriques et informatiques sont largement utilisées pour analyser, étudier, et prévoir les interactions des ligands avec les macromolécules que sont ses récepteurs. Des études de ce type ont été effectuées pour le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$.^{69,70} Par ailleurs, les approches informatiques facilitent également la conception de nouvelles molécules utiles comme principes actifs pour un grand nombre de maladies, sans faire appel à des travaux expérimentaux qui, en général, sont très chers.⁷¹

Par conséquent, pour examiner la capacité du ligand modifié (figure 3) d'agir comme antagoniste sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, plusieurs logiciels spécialisés dans la simulation du couplage des ligands sur des protéines récepteurs ont été examinés, afin de confirmer l'habileté (puissance et spécificité) du ligand proposé pour se lier au récepteur, ceci en comparaison de l'activité de la séquence peptidique RGD. Néanmoins, il est bien connu que les prédictions de comment une petite molécule se liera à une protéine est difficile, et aucun logiciel ne peut garantir le succès. Cependant, les résultats des simulations numériques peuvent être considérés comme une indication approximative du vrai comportement des molécules.

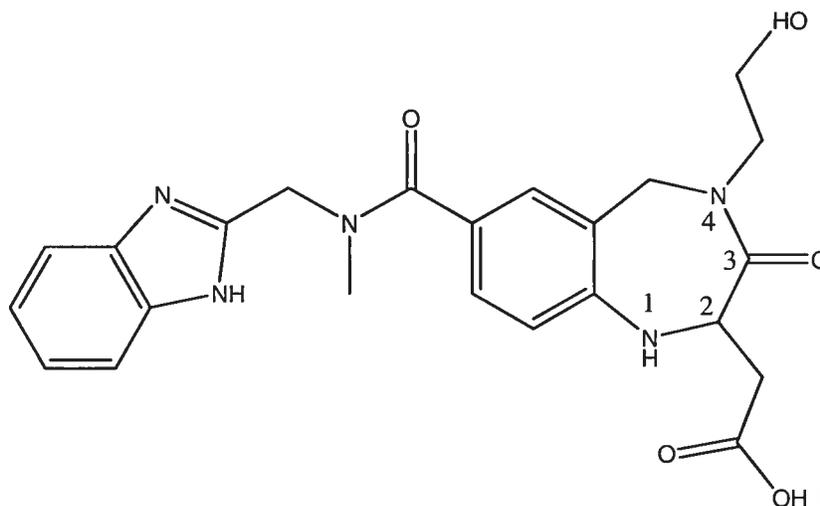


Figure 3: Ligand modifié dans la position 4 pour être greffé sur un polymère. Ce ligand possède une activité supposée d'antagonisme puissant et spécifique sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Le logiciel GOLD a été utilisé en premier.⁷² GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking -optimisation génétique pour les liaisons des ligands-) applique un algorithme génétique pour optimiser le couplage flexible des ligands dans les sites actifs des protéines. Pour garantir la précision et la fiabilité du logiciel, par exemple, la possibilité réelle que le logiciel puisse prédire avec succès les possibles liaisons dans un contexte donné, GOLD a été testé pour un grand nombre de complexes ligand-récepteur qui ont été extraits de la base de données PDB (Protein Data Bank).^{73,74} La conclusion globale de ces essais est que les meilleures propositions des interactions ligands-récepteurs fournies par le logiciel sont correctes dans 70 à 80% des cas.^{75,76}

Deuxièmement, le logiciel BioMed par Fujitsu, a été employé pour faire le couplage et la qualification automatique du couplage du ligand choisi et modifié dans le site actif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$; ce logiciel utilise la mesure du potentiel de force moyenne (PMF) avec un algorithme génétique de couplage.⁷⁷

Pour effectuer les simulations, on a utilisé les données structurales de la structure cristalline du segment extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, complexé avec un ligand du

type Arg-Gly-Asp.^{78,79,80,81} De l'étude de la structure de ce complexe et d'après la position du ligand RGD sur le récepteur, il a été possible de déterminer le site approprié, emplacement que l'on présume adéquat pour lier aussi des ligands analogues structuraux.

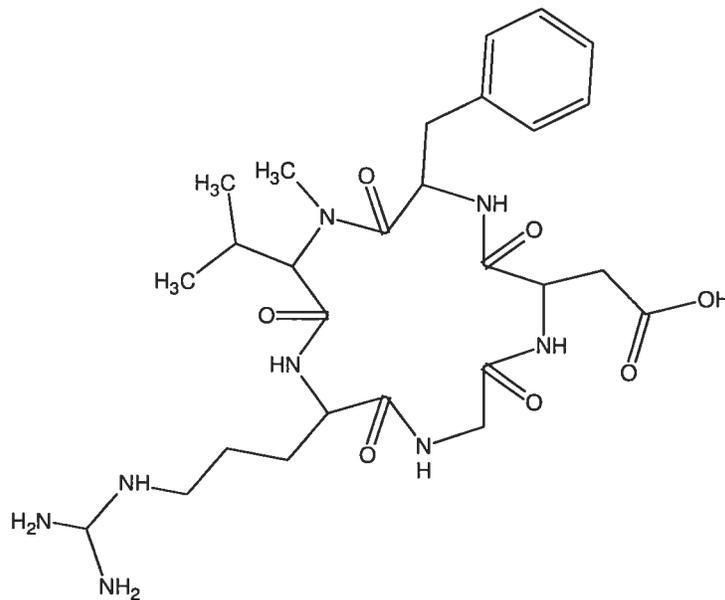


Figure 4, Ligand contenant la séquence RGD en configuration cyclique, correspondant à la structure Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val.

La prochaine série d'images⁸² montre d'abord la cavité dans l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, où le ligand RGD est couplé -complexé- dans la structure cristalline du segment extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Figure 5).

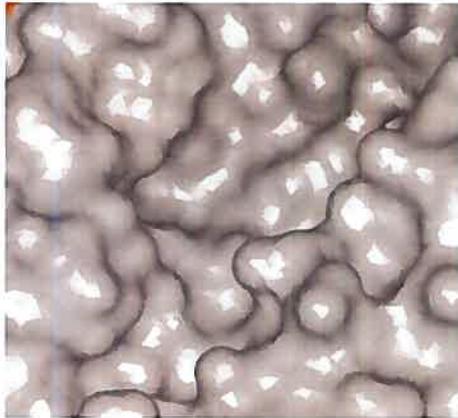


Figure 5, Site actif pour la liaison des ligands du type RGD dans l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Ensuite, on voit la séquence RGD dans sa configuration Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val cyclique, couplée à l'emplacement actif de la structure du segment extracellulaire du récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Figure 6).

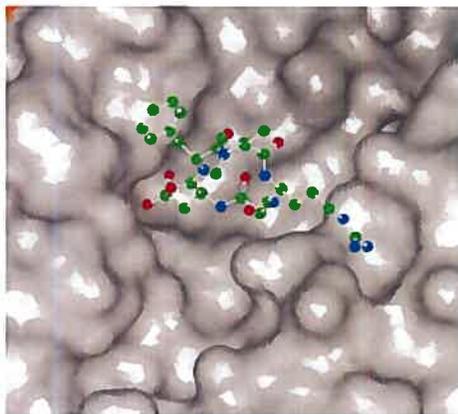


Figure 6, Ligand RGD cyclique couplé dans le site actif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

La distribution de la polarité sur la surface du récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le ligand RGD cyclique couplé dans le site actif est montrée dans la figure 7; cette image montre comment l'orientation des groupes polaires du ligand correspond à la polarité du récepteur, les atomes d'oxygène s'orientent vers les zones bleues de la surface et les atomes d'azote s'orientent vers les zones rouges (figure 7).

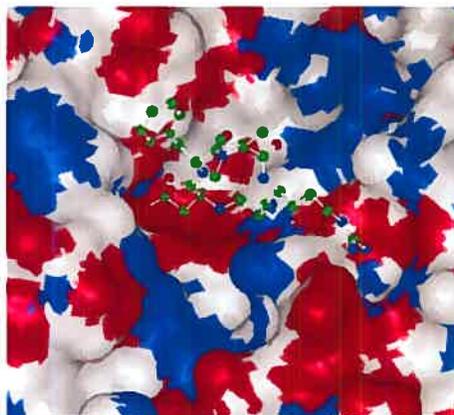


Figure 7, Distribution de la polarité sur la surface du récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$, avec le ligand RGD cyclique couplé dans le site actif.

Finalement, l'image suivante, montre le site accepteur élucidé pour le récepteur $\alpha_v\beta_3$ avec le ligand RGD couplé. De plus, l'image prouve que la localisation de l'accepteur est correcte, puisque sa position a été validée selon les données rapportées par Marinelli et al, qui révèlent que les résidus impliqués dans les interactions entre le ligand et le récepteur sont: l'Asp150, l'Asp218, l'Arg216, l'Asn215, le Ser123 et le Tyr122. On peut constater que tous les résidus mentionnés sont inclus sur le site accepteur identifié (figure 8).⁸³

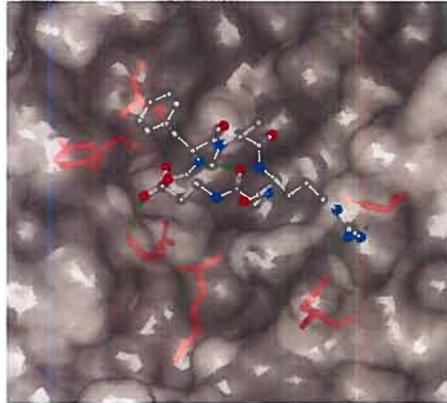


Figure 8, Site accepteur du récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le ligand RGD couplé, montrant les résidus impliqués dans les interactions principales entre le ligand et le récepteur.

Le couplage avec le logiciel GOLD.

Le logiciel GOLD a été employé d'abord pour déterminer les modes d'attache du ligand Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val cyclique (figure 4), molécule qui contient la séquence RGD qui se trouve sur tous les ligands naturels de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Ensuite, on a fait aussi le couplage du ligand ayant le noyau benzodiazépine proposé et synthétisé dans le cadre de ce travail de recherche.

Cependant, GOLD produit des résultats fiables seulement si les fichiers électroniques des données structurales pour la protéine et pour le ligand sont formatées correctement. Il est donc essentiel qu'un certain nombre d'étapes de configuration soient suivies pour préparer n'importe quelle structure pour son utilisation dans GOLD.

Préparation des données structurales de la protéine

Le fichier d'entrée correspondant à la protéine réceptrice intégrine $\alpha_v\beta_3$ utilisé pour la simulation, inclut les données de structure complètes de la protéine. Cependant, il est nécessaire de signaler au logiciel GOLD la localisation du site actif de liaison pour le ligand.

De plus, pour que les données soient acceptables, tous les atomes d'hydrogène doivent être présents sur la structure de la protéine avant la simulation. Des atomes d'hydrogène ont été placés sur la protéine (employant le programme de modélisation moléculaire CaChe 5.0 par Fujitsu) afin de s'assurer que l'ionisation et les états tautomériques sont définis clairement. Évidemment, ceci a impliqué de faire des hypothèses au sujet des états de protonation des résidus tels que His, Glu and Asp.

En outre, GOLD permet de faire les simulations en tenant compte des caractéristiques de flexibilité de la protéine, notamment le mouvement de torsion des angles des groupes hydroxyles des résidus de Ser, Thr et Tyr. Les liaisons peuvent pivoter pendant le couplage des ligands afin d'optimiser les liaisons d'hydrogène entre les molécules. Les fonctions ammonium (NH_3^+) dans les résidus de lysine sont optimisées de façon similaire. Tout le reste de la molécule de protéine est gardé rigide (statique).

Préparation des données structurales des ligands

Les données structurales du ligand contenant la séquence peptidique RGD et du ligand correspondant à l'antagoniste basé sur le noyau de benzodiazépine, ont été formatées selon les conditions de configuration nécessaires pour faire les simulations.

Les types de fichiers acceptables pour réaliser les simulations sont: le format MOL2 (par Tripos), ou le format MOL (par MDL –format SD-). En raison de la difficulté d'accès au

logiciel Sibyl de Tripos pour la modélisation moléculaire, le format des fichiers utilisés correspond au format MOL de MDL.

Par ailleurs, comme précédemment, tous les atomes d'hydrogène doivent être présents dans la structure d'entrée du ligand. Par conséquence, dans les structures des deux ligands, tous les atomes d'hydrogène ont été ajoutés en s'assurant que l'ionisation et les états tautomériques sont définis clairement.

En outre, grâce au logiciel de modélisation moléculaire CaChe 5.0, les ligands ont été configurés (minimisés) dans son état d'énergie le plus bas et les types d'atome dans le fichier PDB ont été examinés pour assurer l'exactitude de la structure.

Détermination du site de liaison du ligand sur le récepteur d'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Afin de faire les simulations du couplage des ligands avec le logiciel GOLD, il est nécessaire d'indiquer le centre approximatif et la taille du site accepteur dans la protéine réceptrice, ceci a été faite en désignant un atome proche au centre du site de liaison et accessible au solvant. Cet atome a été identifié grâce à l'étude de la position du ligand RGD sur la structure cristalline du segment extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ complexée avec le ligand Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val cyclique, correspondant à l'atome 16855, qui est l'atome d'oxygène sur le résidu 216ARG de la chaîne B.

Par ailleurs, le rayon approximatif du site de liaison sur le récepteur, à partir de l'atome central déjà déterminé, doit être également indiqué à GOLD. Dans ce cas-ci un rayon de 10.0 Å assure que la cavité réceptrice des ligands est assez grande pour contenir n'importe quelle configuration structurale possible des molécules ligands (RGD cyclique et l'antagoniste basé dans le noyau de benzodiazépine).

De plus, le logiciel GOLD offre l'option d'employer un algorithme de détection de cavité, LIGSITE, afin de limiter la région d'intérêt sur les surfaces concaves et accessibles aux solvants.

Évaluation du couplage (docking score)

Pendant l'exécution des simulations de couplage entre le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ et les ligands, les solutions trouvées par le logiciel GOLD sont évaluées selon une fonction mathématique d'estimation du couplement entre les molécules: la fonction utilisée par défaut pour le logiciel est la fonction GoldScore et c'est celle utilisée dans notre travail.

La fonction de GoldScore se compose de quatre éléments:

- Énergie des liaisons d'hydrogène protéine-ligand (external H-bond)
- Énergie des interactions de van der Waals protéine-ligand (external vdw)
- Énergie interne du ligand (internal vdw)
- Énergie de la tension de torsion du ligand (internal torsion)

GOLD emploie également des données de distributions des angles de torsion extraites à partir de la base de données structurales de Cambridge (CSD) pour limiter l'espace de conformation des ligands calculé par l'algorithme génétique.

Analyse des résultats

Après l'exécution de tous les essais du couplage entre le récepteur et les ligands, les différents résultats sont comparés. D'abord, un des fichiers des résultats produits inclut une matrice de racine carrée des carrés des déviations moyennes (root mean square deviations -rmsd) entre les diverses positions possibles du ligand couplé. En fait, la tâche effectuée par GOLD calcule plutôt l'estimation de la meilleure configuration structurale des molécules de ligands leur permettant de se coupler au récepteur. Plus

que l'affinité et la puissance, le but des simulations est de trouver la configuration structurelle tridimensionnelle la plus précise du ligand, pour produire son effet biologique grâce à l'union ligand - récepteur.

La configuration du logiciel utilisée essayait dix processus du couplage sur le récepteur pour chacun des ligands, et les progrès de l'algorithme génétique est contrôlé et enregistré pour tous les essais. Lorsque tous les essais de couplage sont terminés, les résultats pour chacune des configurations du ligand, sont comparés. Il est possible que les dix essais programmés ne soient pas complétés, quand par exemple, les meilleurs résultats obtenus ne présentent pas une déviation RMSD plus grande que 1.5 Å, c'est-à-dire, que les solutions obtenues fournissent essentiellement le même résultat. Dans cette situation, il est très probable que la solution trouvée soit correcte.

Ensuite, on montre les résultats obtenus par les simulations effectuées pour le ligand contenant la séquence peptidique RGD et pour le ligand basé sur le noyau de benzodiazépine.

Dans le cas du ligand contenant la séquence peptidique RGD correspondant à la structure Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val cyclique, le logiciel a proposé seulement trois configurations structurelles différentes, puisque la variation positionnelle entre les solutions fournit essentiellement le même résultat, d'après la déviation RMSD qui juge la symétrie dans les molécules (RMSD < 1.5 Å). Donc, l'exécution du couplage pour le ligand RGD a déterminé que la solution numéro 2 possède les meilleurs caractéristiques de configuration structurelle et que la solution numéro 3 détient les caractéristiques les moins appropriées.

```

gold_C-RGDH_3d_mi.log - Bloc notes
Fichier Edition Format Affichage ?
Current Ranking 2 3 1
Top 3 (of 3) solutions are within 1.500 RMSD, finishing docking D:/Docking.
GA execution time : total 81.0004 user 81.0003 sys 0.0001

Final Ranking 2 3 1
RMSD Matrix of RANKED solutions
      2 3
1 : 0.4 0.5
2 :      0.7

Clustering using complete linkage.
Structure ids are RANKING
Dist Clusters...
0.38 | 3 | 1 2 |
0.69 | 3 1 2 |

Finished Docking Ligand D:/Docking/study/Molecules/2set/Ligands/02-c-RGD/C-RGDH_3d.mo1

```

Figure 9: Résultats fournis par GOLD qui correspondent à la matrice de la racine de la moyenne des carrés des erreurs (*rmsd*) entre les diverses positions possibles du ligand RGD cyclique.

L'image suivante montre la superposition de la meilleure configuration structurale (rose) et la pire solution (bleue) du ligand cyclique RGD, trouvées grâce aux simulations du couplage réalisées avec le logiciel GOLD:

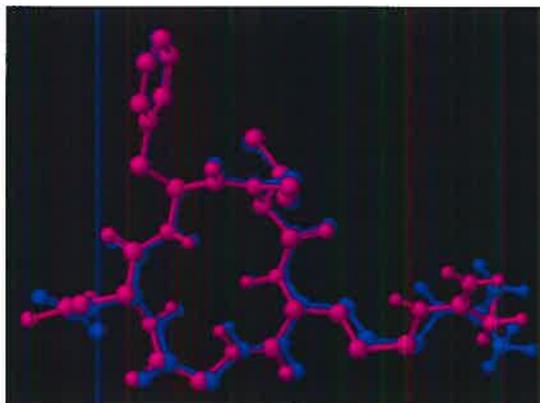


Figure 10, Superposition de la meilleure configuration structurale (rose) et de la pire solution (bleue) du ligand cyclique RGD, trouvées grâce aux simulations du couplage réalisées avec le logiciel GOLD.

D'autre part, dans le cas du ligand antagoniste de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ basé sur le noyau de benzodiazépine, GOLD a fourni dix configurations structurales différentes dont le couplage accomplie avec la solution numéro 7 a les meilleurs résultats pour le couplage sur le récepteur, tandis que la solution trouvée pour la configuration numéro 6 a les pires.

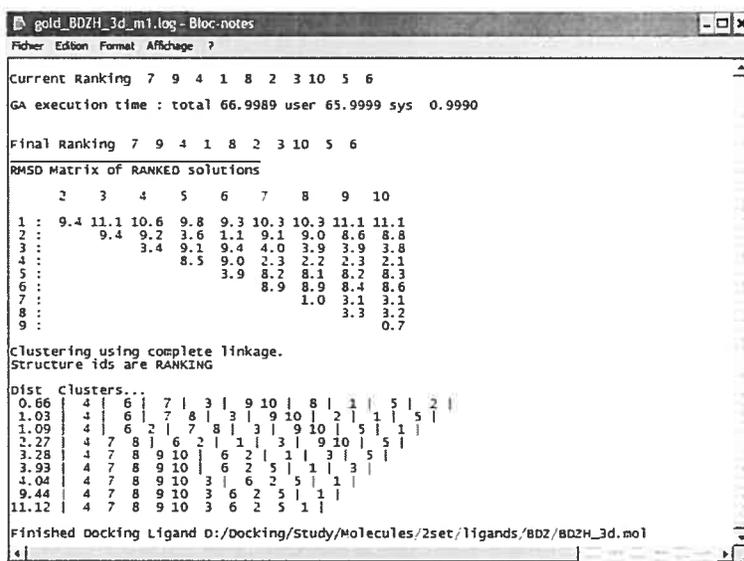


Figure 11: Résultats fournis par GOLD qui correspondent à la matrice de la racine de la moyenne des carrés des erreurs (*rmsd*) entre les diverses positions possibles du ligand basé sur le noyau de benzodiazépine.

L'image suivante montre la superposition de la meilleure configuration structurale (rose) et la pire solution (bleue) du ligand antagoniste basé sur le noyau de benzodiazépine, trouvées grâce aux simulations du couplage réalisées avec le logiciel GOLD:

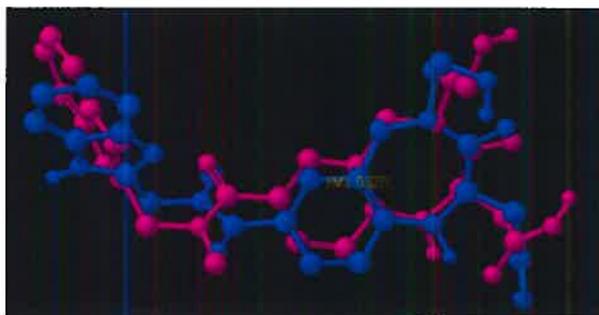


Figure 12, Superposition de la meilleure configuration structurale (rose) et de la pire solution (bleue) du ligand basé sur le noyau de benzodiazépine, trouvées grâce aux simulations du couplage réalisées avec le logiciel GOLD.

Par ailleurs, le processus du couplage des ligands sur un récepteur avec GOLD, fournit un deuxième rapport où les résultats concernant l'évaluation des forces intramoléculaires et intermoléculaires sont décrits. Pour chacun des ligands testés, ce fichier présente un sommaire incluant l'estimation des forces pour toutes les tentatives du couplage avec chacune des configurations structurales dévoilées dans les résultats précédents.

Les tentatives du couplage sont énumérées selon les pointages obtenus pour l'évaluation de l'attachement de la structure sur le récepteur, ainsi la meilleure solution est placée en premier, présentant le pointage correspondant à l'aptitude globale de couplage et ensuite l'analyse spécifique de chacune des composantes énergétiques. Ce sont les deux composantes énergétiques correspondant aux interactions de Van der Waals protéine-ligand $-S(vdw_ext)-$ et ligand interne $-S(int)-$, et les deux composantes énergétiques correspondant aux liaisons hydrogène protéine-ligand $-S(hb_ext)-$ et aux liaisons hydrogène internes du ligand $-S(hb_int)-$.

Les résultats obtenus pour le ligand RGD cyclique montrent que les interactions de liaison avec le récepteur sont dues principalement aux forces de Van der Waals ligand-récepteur, et deuxièmement aux liaisons d'hydrogène ligand-récepteur.

Mol No	Fitness	s(hb_ext)	s(vdw_ext)	s(hb_int)	s(int)
2	44.32	7.38	33.85	0.00	-9.60
3	43.97	9.80	32.31	0.00	-10.25
1	41.43	0.96	35.16	0.00	-7.89
Average Values:					
	43.24	6.05	33.78	0.00	-9.25

Figure 13, Liste du chifrage des différentes configurations du ligand RGD cyclique, incluant l'évaluation des types d'interactions moléculaires.

En outre, les résultats obtenus pour le ligand antagoniste de benzodiazépine, incluant la modification proposée pour permettre la liaison chimique à un polymère, montrent de la même façon que les interactions de liaison avec le récepteur sont dues principalement aux forces de Van der Waals ligand-récepteur, et deuxièmement à liaisons d'hydrogène ligand-récepteur.

Mol No	Fitness	s(hb_ext)	s(vdw_ext)	s(hb_int)	s(int)
7	58.26	15.62	37.88	0.00	-9.45
9	44.38	13.91	34.31	0.00	-16.72
4	44.07	13.58	31.80	0.00	-13.23
1	43.94	5.80	36.84	0.00	-12.51
8	43.16	3.99	34.21	0.00	-7.86
2	43.01	12.55	30.31	0.00	-11.22
3	42.01	2.11	36.98	0.00	-10.95
10	41.66	2.27	38.41	0.00	-13.42
5	38.63	8.37	28.89	0.00	-9.46
6	37.73	10.34	27.93	0.00	-11.02
Average values:					
	43.69	8.85	33.76	0.00	-11.58

Figure 14, Liste du pointage des différentes configurations du ligand basé sur le noyau de benzodiazépine, incluant l'évaluation des types d'interactions moléculaires.

En résumé, pour les deux ligands GOLD a fourni les résultats suivants:

Ligand	Fitness	S(hb_ext)	S(vdw_ext)	S(hb_int)	S(int)
RGD-cyclique	44.32	7.38	33.85	0.00	-9.60
Benzodiazépine	58.26	15.62	37.88	0.00	-9.45

Tableau 3, Résumé du chiffrage du couplage pour les deux ligands, incluant l'évaluation des types d'interactions moléculaires.

Finalement, les résultats précédents démontrent que nonobstant la modification effectuée au ligand de benzodiazépine, ce ligand continue d'être plus puissant que celui correspondant à la séquence peptidique RGD, puisque le pointage final déterminé est plus élevé, aussi que les forces de liaison estimées sont plus grandes. Cependant, on remarque que pour le ligand de benzodiazépine la proportion des liaisons hydrogène avec le récepteur sont plus importantes et constituent un composant plus important pour le couplage.

Couplage avec le logiciel BioMed CaChe

Pour réaliser l'étude comparative du couplage entre les ligands avec le logiciel BioMed CaChe de Fujitsu, on s'est servi une fois encore des données de la structure cristalline du segment extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ complexé avec le ligand RGD cyclique, pour identifier d'abord le site accepteur et pour y lier ensuite les ligands.

Lorsqu'un fichier PDB qui contient l'information structurale sur une protéine est ouvert dans le logiciel CaChe, de nouvelles informations sont automatiquement calculées et ajoutées au fichier. Cependant, l'information exigée pour effectuer une bonne modélisation moléculaire doit encore être ajoutée, comme par exemple, les atomes d'hydrogène, l'hybridation d'atomes et les types des liaisons pour des groupes HET et des résidus non standards. En outre, s'il y a des résidus absents ou incomplets, il peut être nécessaire de corriger leurs structures. Néanmoins, le logiciel CaChe possède des fonctions intégrées qui font ces tâches de façon semi-automatique.

L'analyse des propriétés de protéines qui contiennent des milliers d'atomes est mieux accomplie en représentant les propriétés moléculaires avec des images et des graphiques qui réduisent la complexité et facilitent la compréhension. Étant donné que les processus du couplage de ligands s'effectuent seulement sur une partie relativement petite de la structure de la protéine où la petite molécule de ligand s'attache, il est très important de visualiser facilement seulement le site actif accepteur des ligands.

Par l'analyse de la structure cristalline du segment extracellulaire du récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ complexé avec le ligand cyclique RGD, on a localisé le emplacement du ligand en signalant les résidus comprenant le site de liaison actif, correspondant aux résidus voisins autour du ligand RGD dans un rayon de 7 Å.

Ensuite, les deux ligands (le RGD cyclique et ligand de benzodiazépine) ont été couplés automatiquement dans l'emplacement actif choisi, en utilisant la méthode qui tient compte du potentiel de la force moyenne (PMF) avec un algorithme génétique de couplage.⁸⁴ Le potentiel de la force moyenne est une approche basée sur la connaissance des potentiels pour paires atomiques extraits de à partir de l'information structurale des complexes bien connus de protéine-ligand contenus dans la banque de données des protéines PDB. Il est clair que le PMF montre une corrélation significative entre les affinités de liaison déterminées expérimentalement et les prédictions estimées à partir des pointages calculés par ordinateur pour les complexes de divers ensembles protéine-ligand.^{85,86,87,88}

Le couplage automatique a été fait pour chaque ligand dans une boîte de 20x20x20 Å, placée de façon concentrique, dans le site actif de liaison déjà déterminé, en utilisant un modèle d'ensemble d'atomes basé sur les valeurs de la force moyenne (les atomes explicites d'hydrogène ne sont pas considérés), avec un algorithme du couplage qui a une population de 50 chromosomes exécuté par 3.000 générations.

À la 3000^{ème} génération, le processus se termine, et à ce moment il est possible de visualiser les images présentant les ligands couplés dans le site actif du récepteur et les données résultantes du couplage.

Résultats du Couplage

Les images suivantes montrent celles des ligands couplés dans le site récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, d'abord pour le ligand cyclique RGD et ensuite pour le ligand basé sur le noyau de benzodiazépine; on montre également le pointage final du couplage estimé en kcal/mole.

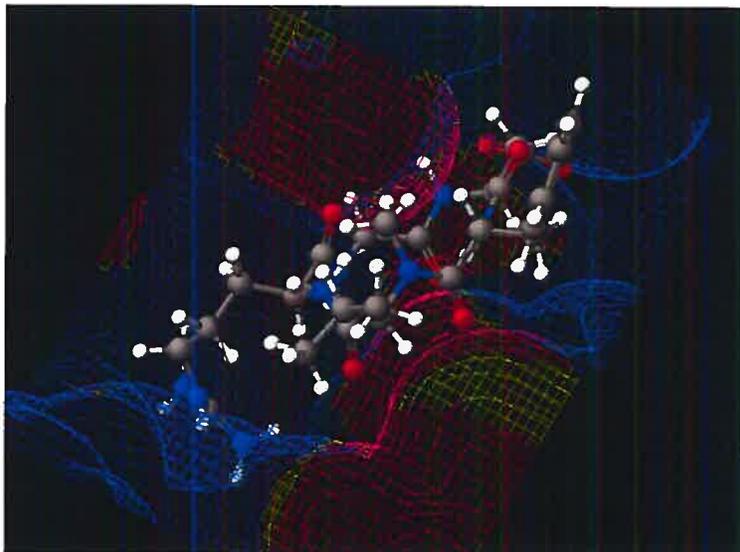


Figure 15, Couplage automatique du ligand cyclique RGD dans le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le logiciel BioMed CaChe. Énergie = -131.336 kcal/mol

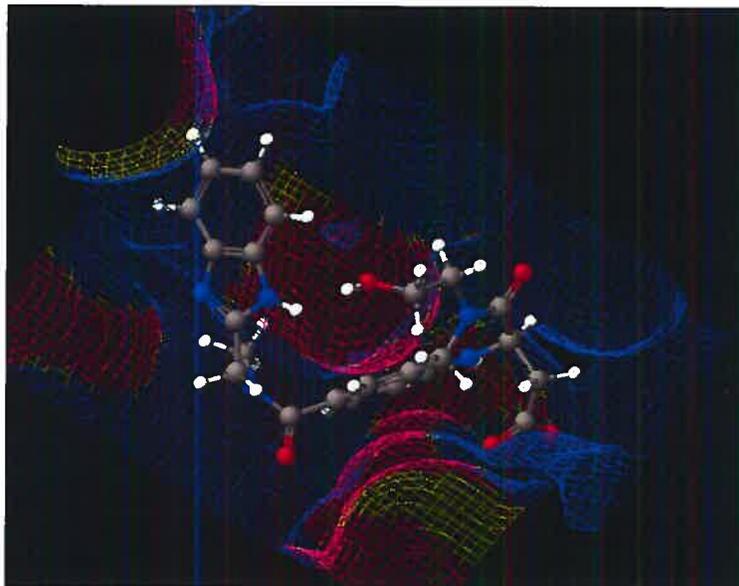


Figure 16, Couplage automatique du ligand basé dans le noyau de benzodiazépine dans le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le logiciel BioMed CaChe. Énergie = -136.704 kcal/mol

Analyse du couplage

Dans les images précédentes, la couleur bleue dénote une surface où la protéine a besoin de groupes donneurs d'hydrogène dans le ligand, la couleur crème marque une surface hydrophobe. Donc, avec BioMed CaChe, il est possible de reconnaître la surface du récepteur selon les couleurs affichées, et ainsi il est très facile d'évaluer la position de couplage des ligands et de déterminer si son orientation est correcte.

Par conséquent, les ligands qui se couplent correctement sur le récepteur doivent avoir par exemple des groupes accepteurs de liaisons d'hydrogène (par exemple -C=O) qui touchent la surface rouge et des groupes contenant la fonction NH avec la liaison NH orientée vers la surface bleu. Après l'analyse des images, il faut remarquer que dans le couplage du ligand de benzodiazépine les groupes donneurs de liaisons

hydrogène coïncident avec la région de la surface bleu et que les groupes accepteurs des liaisons d'hydrogène sont bien orientés vers les surfaces rouges.

Notons également que dans le ligand de benzodiazépine, le groupe d'hydroxyle sur la position 4 est orienté vers la partie externe de la région d'attachement du récepteur; ceci démontre que le greffage du ligand sur le polymère de PLA n'affectera pas l'affinité ni la liaison de cette molécule avec le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Le couplage des ligands sur le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le logiciel BioMed CaChe confirme que la liaison du ligand basé sur le noyau de benzodiazépine est plus forte et plus stable, même avec la modification proposée sur la position 4, que la liaison du ligand RGD cyclique, puisque les énergies de liaison rapportées pour le logiciel sont respectivement -136.704 kcal/mol et -131.336 kcal/mol.

En conclusion, on a démontré que le ligand de benzodiazépine modifié se couple dans le même site accepteur du récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$, avec une affinité plus élevée que celle du ligand RGD cyclique, et par ailleurs confirmant que l'hydroxyle disponible pour lier le ligand avec le polymère est libre et ne participe pas aux interactions de liaison avec le récepteur. Cette analyse nous a aidé à confirmer l'affinité du ligand proposé et nous a permis de planifier la modification pour le greffer sur un polymère et éventuellement produire de nanoparticules actives ciblant le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Transition vers la synthèse

Après avoir choisi un ligand puissant et sélectif pour cibler les récepteurs $\alpha_v\beta_3$, et avoir proposé une modification structurelle qui permettra de le greffer sur le polymère, il a été possible de confirmer, grâce aux simulations numériques, que l'habileté du ligand pour cibler le récepteur n'est pas affectée pour l'addition de une petite chaîne de deux carbones qui agisse comme pont de liaison entre le ligand et le polymère qui formera les nanoparticules. En fait, la modification proposée respecte intégralement les conditions

structurelles principales pour que le couplage ait lieu entre le récepteur et ligand; ainsi, la modification pour effectuer le greffage ne change pas des facteurs comme la longueur de la molécule, le groupe NH libre, la configuration des azotes type amidine et le anneau aromatique fusionné. Par contre, cette modification structurelle a été soigneusement planifiée sur le site de la molécule qui a été démontré ne changent pas de manière significative l'activité.

Les simulations démontrent que le ligand modifié est même plus puissant que le ligand naturel (RGD) des récepteurs intégrines $\alpha_v\beta_3$. On a pu prouver que la réalisation de ces simulations numériques résulte très convenable, parce qu'elles permettent de anticiper et prédire si malgré la modification structurelle, le ligand est encore capable de cibler le récepteur avec un degré acceptable de sélectivité et puissance. De plus, les simulations numériques augmentent la probabilité de succès, en évitant aussi de dépenses non nécessaires pour la synthèse de molécules qui pourraient perdre son activité due aux modifications ou parce que son orientation envers le récepteur peut ne pas être la correcte après son greffage.

En conséquence, les simulations numériques effectuées ont montré que le ligand est adéquat pour être greffé sur un polymère et pour produire des nano-particules qui seront actives ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$. Maintenant il est possible de procéder à la synthèse chimique du ligand modifié et son greffage sur le polymère, avec un certain grade de confiance que d'obtenir le produit attendu, celui va probablement cibler le récepteur désiré, parce que son configuration structurale est appropriée pour interagir et s'attacher dans le poche du récepteur. À continuation, la méthode planifiée pour synthétiser le ligand et le greffer sur le polymère sera expliquée; ensuite, les résultats de cette synthèse seront présentés et analysés.

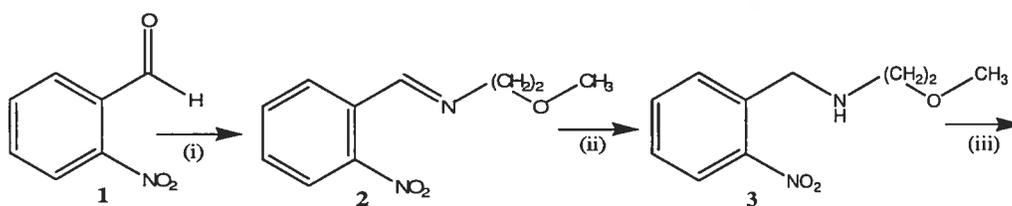
Chapitre 4, Planification pour l'obtention des produits

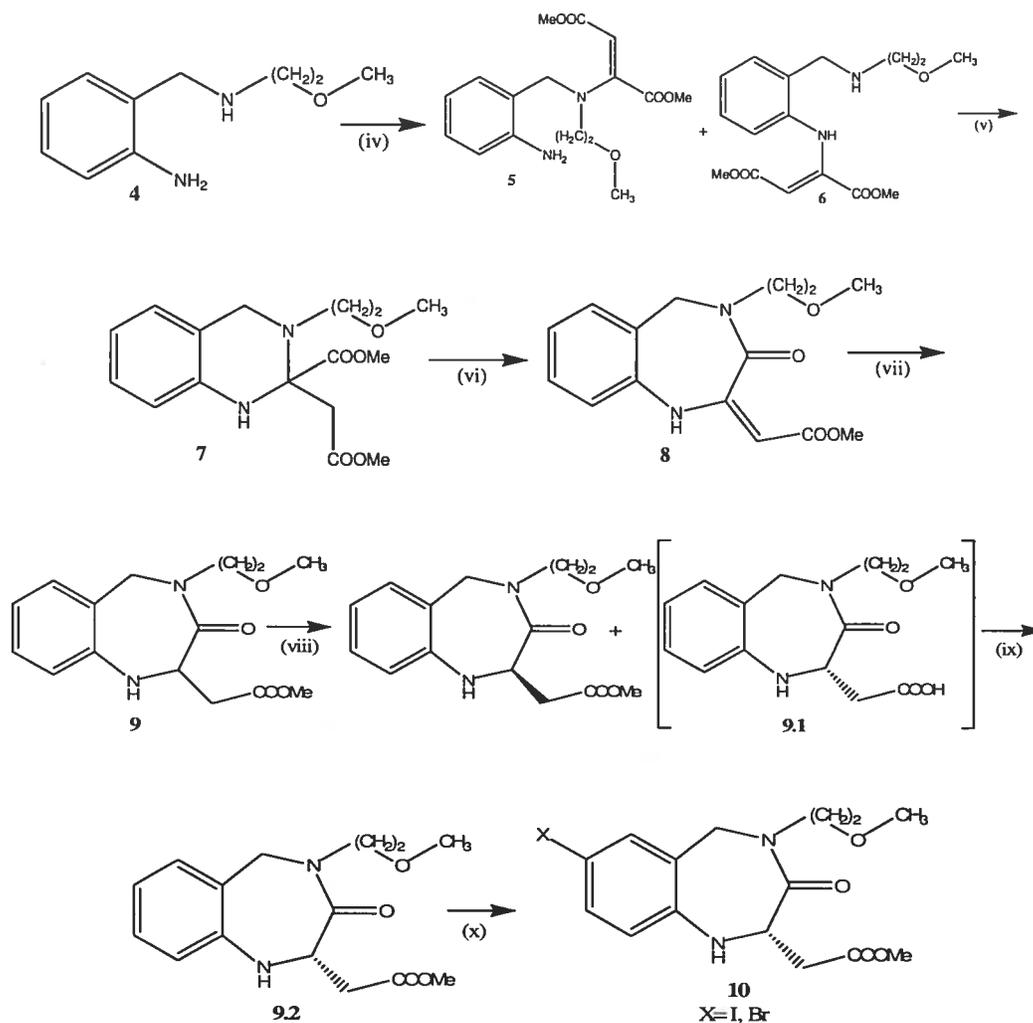
Discussion sur la méthode de synthèse du ligand

De nombreux groupes de recherche ont synthétisé des analogues structuraux à la séquence peptidique RGD; entre les analogues développés ils se trouvent plusieurs méthodes pour fabriquer des antagonistes d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ basés sur le noyau de benzodiazépine, correspondant au type des ligands possédant les caractéristiques de puissance et sélectivité envers le récepteur choisi.

En premier, la méthode de synthèse pour fabriquer le ligand de la figure 2, incluant la fonction chimique nécessaire pour permettre son greffage sur le polymère, a été inspirée pour le travail de Atkins et collaborateurs, ainsi que par d'autres travaux. La fonction disponible pour greffer le ligand –le groupe hydroxyle dans la position 4 du noyau de benzodiazépine- ne fait pas partie du groupe pharmacophore du ligand. Par conséquent, l'un des objectifs de cette recherche est d'adapter ces méthodes et de proposer une voie de synthèse simple, efficace et économique pour produire le noyau de benzodiazépine et le ligand envisagé. Le résultat de cet exercice est présenté dans les schémas de synthèse 1 à 4, grâce auxquels le produit projeté est obtenu. Pour commencer, dans le schéma 1, la synthèse utilise dix réactions, dans laquelle, les sept premières réactions sont effectuées de façon consécutive dans un même réacteur sans avoir besoin de purifier les intermédiaires, tout cela avec un rendement très acceptable.

Schéma 1:





i) $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ dans CH_3OH ; ii) NaBH_4 , H_2O ; iii) H_2 , Pd-C; iv) diméthyl acétylènedicarboxylate (DMAD); v) CH_3COOH , Δ ; vi) NaOCH_3 , Δ ; vii) Pd-C, NaBH_4 , H_2O , NaOH ; viii) Novozym 435, t-BuOH, H_2O , HN_3 ; ix) DCC, 4-pyrrolidinopyridine, Et_2O ; x) si X=I: complexe iodure monochlorure de pyridine, H_2O , NaOH ; si X=Br: Bu_4NBr , N-Bromosuccinimide, NaHCO_3 , H_2O .

Dans cette procédure, la synthèse commence avec la transformation du 2-nitrobenzaldéhyde (1). (i, ii) D'abord, la conversion du réactif (1) en l'intermédiaire (3) est faite par amination réductive avec la 2-méthoxyéthylamine en présence de

borohydrure de sodium dans du méthanol, en passant par le composé intermédiaire N-(2-nitrobenzylidene)-2-methoxyethanamine (2). Le méthanol est aussi le solvant dans lequel sont faites les réactions suivantes, ce qui facilite le processus et favorise la synthèse du noyau benzodiazépine dans un même réacteur, sans besoin d'isoler les intermédiaires et en fournissant un rendement plus élevé. **(iii)** Ensuite, le composé N-(2-nitrobenzyl)-2-méthoxyéthanamine (3) est réduit dans la position 2 afin de convertir le groupe nitro en amine, cette réduction est réalisée facilement par hydrogénation catalytique sur Pd-C produisant le composé 2-((2-méthoxyéthylamino)méthyl)benzèneamine (4).^{89,90,91} **(iv)** La réaction subséquente du composé (4) avec le réactif DMAD (diméthyl acétylènedicarboxylate) fournit le conjugué des composés (5) et (6), **(v)** lesquels produisent, par traitement avec de l'acide acétique, la quinazoline: méthyl 2-((méthoxycarbonyl)méthyl)-1,2,3,4-tétrahydro-3-(2-méthoxyéthyl)quinazoline-2-carboxylate (7). **(vi)** Ultérieurement, la réaction de la quinazoline (7) avec le méthanoate de sodium provoque une réorganisation structurelle pour former le noyau benzodiazépine désiré: méthyl 2-(4,5-dihydro-4-(2-méthoxyéthyl)-3-oxo-1H-benzo[e][1,4]diazépine-2(3H)-ylidène)acétate (8). On présume que cette réorganisation structurelle de la quinazoline, produisant une expansion de l'anneau, se passe par déprotonation du carbone alpha de l'ester de méthyle, suivi par la rupture de l'anneau pour produire un azote anionique qui réagit avec le groupe ester et forme ensuite une diazépine insaturée. La réaction **(vii)** correspond à la réduction de la double liaison présente sur la position 2 de l'anneau de benzodiazépine, en utilisant comme catalyseur une fois encore Pd-C et duNaBH₄.⁹²

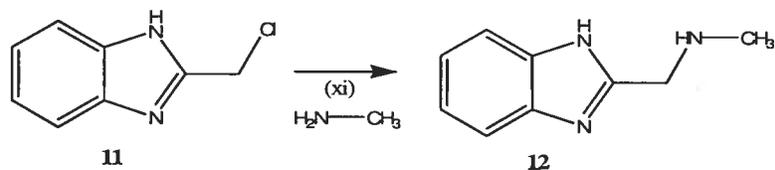
D'après la littérature, l'activité biologique des dérivées de benzodiazépine sur les récepteurs d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est presque exclusive de l'énantiomère (S), par conséquence, il était nécessaire de séparer le mélange racémique du composé (9). **(viii)** La séparation des énantiomères du mélange racémique des analogues du composé (9) a été faite avec succès dans le passé grâce à l'utilisation des méthodes biocatalytiques, utilisant des enzymes qui sont capables d'hydrolyser sélectivement l'ester racémique pour produire l'acide avec la stéréochimie (S). L'enzyme lipase B provenant du *Candida Antartica* possède spécifiquement ces caractéristiques, elle est

capable d'hydrolyser l'énantiomère (S) sans convertir l'énantiomère (R). Ainsi, le produit commercial Novozime 435, correspondant à la lipase B immobilisée sur un support inerte (résine de polyacrylamide), a été utilisée. Après que la réaction enzymatique énantiosélective ait été réalisée, il fallait séparer physiquement l'acide (9.1) de l'ester, ce qui a été fait par solubilisation de l'acide dans une base faible en milieu aqueuse pour permettre à l'ester insoluble de cristalliser et de faciliter sa séparation par filtration.^{93,94}

Il faut noter qu'afin de pouvoir greffer le ligand sur le polymère au moyen de la fonction hydroxyle dans la chaîne à deux carbones en la position 4, la fonction acide de la position 2 (voir figure 3) doit être préalablement protégé. **(ix)** Alors, après l'obtention de la solution aqueuse du composé (9.1), cet acide a été traité afin de produire une fois encore le méthyle acétate de la benzodiazépine: méthyle 2-(4,5-dihydro-4-(2-méthoxyéthyl)-3-oxo-1H-benzo[e][1,4]diazépine-2(3H)-ylidène) acétate, mais cette fois exclusivement dans sa configuration (S), l'énantiomère pur. La protection du groupe acide est faite grâce à une méthode facile et douce qui permet la conversion des acides carboxyliques en éthers à température de la pièce dans conditions essentiellement neutres; l'utilisation de DCC permet la conversion avec des quantités isomolaires de l'acide et de l'alcool.^{95,96,97,98,99}

Par la suite, pour compléter le travail sur le noyau de benzodiazépine protégé pour les fonctions hydroxyle et acide, il fallait réaliser l'union de la deuxième moitié du ligand qui correspondait à la section centrale méthyle acétamide et à celle du méthyle benzimidazole. Afin de pouvoir introduire ladite moitié, le noyau de benzodiazépine devait posséder un groupe halogène dans la position appropriée sur laquelle cette moitié serait fixée (position 7). Il existait deux possibilités, **(x)** ajouter un atome d'iode ou ajouter un atome de brome; dans le premier cas, la réaction s'effectue en utilisant l'agent d'iodation « pyridine iode monochloride complex (PIM) » duquel on espérait une réaction propre et spécifique sur le carbone 7; la deuxième possibilité proposait l'introduction d'un atome de brome, utilisant Bu_4NBr et le N-bromosuccinimide. Avec n'importe laquelle de ces deux options, l'objectif était de produire le composé (10).¹⁰⁰

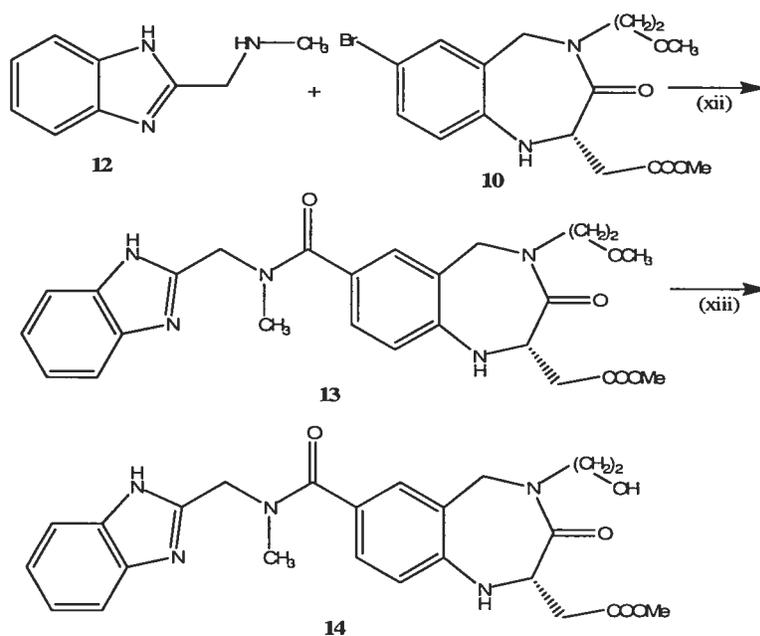
Schéma 2:



xi) Dans Ethyle Ether à 0°C.

La deuxième étape dans la procédure de synthèse du ligand correspond à la fabrication de la moitié contenant l'extrémité de méthyle benzimidazole, contenant la fonction d'azote que constituerait le centre d'acétamide du ligand. (xi) Le produit (12) est obtenu facilement grâce à la réaction des produits commerciaux « chlorométhylbenzimidazole » (11) et « méthyle amine ». ^{101,102,103} La fonction amine secondaire est le groupe nécessaire et adéquat pour attacher la molécule (12) au noyau de benzodiazépine.

Schéma 3:



xii) Si X=Br: triphénylphosphine, n-Bu₃N, (Ph₃P)₄Pd, N-méthyl-2-pyrrolidinone, Ar, CO, NaOH. Si X=I: N,N'-diisopropyléthylamine (DIEA), (Ph₃P)₂PdCl₂, N-méthyl-2-pyrrolidinone, CO; xii) CH₂Cl₂ sèche, 15-crown-5, NaI, BBr₃, NaHCO₃

L'assemblage final du ligand correspond à la liaison du composé (13) « (1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-N-méthylméthanamine » dans la position 7 du noyau de benzodiazépine (10) « (S)-1,2,4,5-tétrahydro-7-halogén-4-(2-méthoxyéthyl)-2-(2-oxopropyl)benzo[e][1,4]diazépine-3-one ». (xii) La procédure pour lier les deux parties du ligand comporte une seule réaction d'aminocarbonilation catalysée par palladium. Il est alors possible de joindre les deux composés en incluant une fonction carbonyle entre eux, caractéristique essentielle pour l'activité biologique du ligand sur l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Pour cette réaction, les paramètres les plus importants à contrôler sont l'addition du catalyseur et l'addition d'un ligand pour lier et stabiliser le catalyseur; d'après la littérature, la triphénylphosphine est le ligand recommandé pour faire cette réaction d'aminocarbonilation; d'autres ligands peuvent rendre le catalyseur inerte ou peuvent ne pas fournir la stabilisation nécessaire pour que la réaction ait lieu. Entre autre, dans la réaction, une base est utilisée pour libérer l'amine.¹⁰⁰

Finalement, afin de préparer le ligand pour son greffage sur un polymère, la fonction hydroxyle sur la chaîne du position 4 doit être disponible. Par conséquence, après la réaction d'aminocarbonilation, le groupe méthoxy dans cette position est éliminé pour rendre disponible l'hydroxyle. (xiii) La déprotection du groupe méthoxy est faite au moyen d'une méthode de déméthylation spécifique des éthers aliphatiques attachés à des atomes de carbone primaires ou secondaires, par le réactif 15-crown-5.^{104,105}

Le polymère

Les nanoparticules qui seront fabriquées pour cibler les récepteurs intégrines $\alpha_v\beta_3$ des tissus cancéreux, transporter un principe actif antinéoplasique (vectoriser) et contrôler les processus d'angiogenèse des tumeurs, doivent être composées d'au moins trois

parties: le ligand spécifique et puissant pour cibler et inhiber l'activité du récepteur, un polymère capable de conformer le corps (la matrice) des nanoparticules et de supporter le ligand, un principe actif que l'on veut transporter jusqu'aux tumeurs.

L'objectif de la vectorisation des médicaments est le transport des molécules biologiquement actives au moyen des microparticules, jusqu'à leur cible biologique ; dans ce cas, les intégrines $\alpha_v\beta_3$, visant à modifier la distribution d'un agent cytotoxique en le délivrant sélectivement au niveau de la tumeur. Après administration intravasculaire, les vecteurs particuliers sont distribués en permettant le ciblage (les nanoparticules s'adsorberont à la surface des cellules cancéreuses, grâce aux liaisons du ligand présent dans la surface de la nanoparticule avec le récepteur ciblé). Les nanoparticules libèrent alors le médicament encapsulé dans l'environnement immédiat de la membrane cellulaire des cellules néoplasiques. Au même temps, la vectorisation réduit aussi les concentrations des médicaments anticancéreux au niveau de la circulation général, effet grandement désiré puisque ces médicaments sont d'habitude toxiques, en protégeant aussi le principe actif de la métabolisation avant d'atteindre la cible. Par la suite, en plus de la livraison spécifique des médicaments, on espère que le ligand greffé sur la nanoparticule agira en tant que antagoniste des récepteurs ciblés, en bloquant l'activité angiogénique des tumeurs et même en provoquant la régression des tissus néoplasiques.

Or, le présent travail vise à fournir un moyen d'amélioration de la sélectivité des agents anticancéreux vis-à-vis des cellules tumorales, grâce à la production de vecteurs actifs constitués par nanoparticules polymériques décorées avec le ligand défini auparavant. En ce qui concerne le polymère qui constituera les nanoparticules, celui-ci doit tout d'abord être biocompatible et facilement biodégradable.

Le travail de recherche de Leclair et al., a montré que la fabrication de nanoparticules à partir d'un copolymère d'acide polylactique (PLA) –polyester de l'acide lactique- est possible et mène aux résultats désirés pour les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules et leur comportement biologique.⁶³ Par exemple, le métabolisme du PLA

produit essentiellement des résidus de dégradation de faible toxicité et hydrophiles qui sont rapidement éliminés par l'organisme; en plus, le PLA est un polymère hydrophobe permettant l'encapsulation plus facile des composés hydrophobes anticancéreux.

Or, afin de permettre le greffage du ligand sur le polymère, celui-ci devrait inclure également un groupe fonctionnel qui permet la liaison chimique entre les deux molécules. Conformément à la description précédente, le ligand possède un groupe d'alcool primaire libre, disponible pour réagir avec le polymère et constituer le conjugué prévu; par conséquent une des fonctions les plus appropriées qui peut être portée par le polymère serait un groupe chlorure d'acide qui permet de créer une liaison type ester et ainsi greffer le ligand d'une façon stable.

Finalement, le copolymère de PLA utilisé pour y greffer le ligand, correspond au polymère fonctionnalisé au moyen de l'insertion d'un élément qui fournit le groupe chimique désiré. En résumé, le copolymère de PLA est fabriqué avec des fonctions allyle, lesquelles peuvent être modifiées facilement en plusieurs autres fonctions. Selon la fonction nécessaire, on fait par exemple un alcool, un acide ou un halogénure d'acide (figure 17); dans le cas du ligand d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ de ce projet, la fonction nécessaire pour réaliser la liaison chimique entre les deux molécules est précisément l'halogénure d'acide.

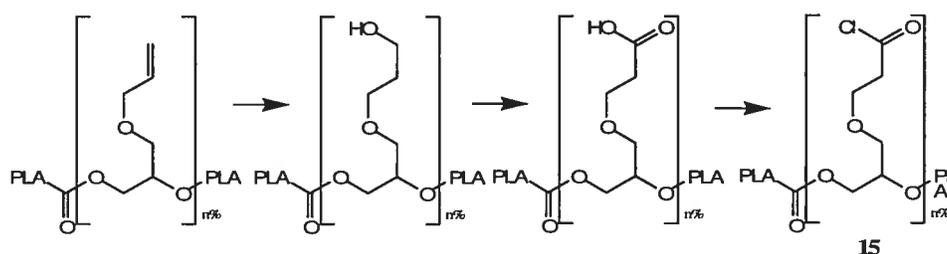


Figure 17, Polymère de PLA ramifié par l'insertion d'une fonction capable de fournir des fonctions allyle, alcool, acide ou halogénure d'acide.

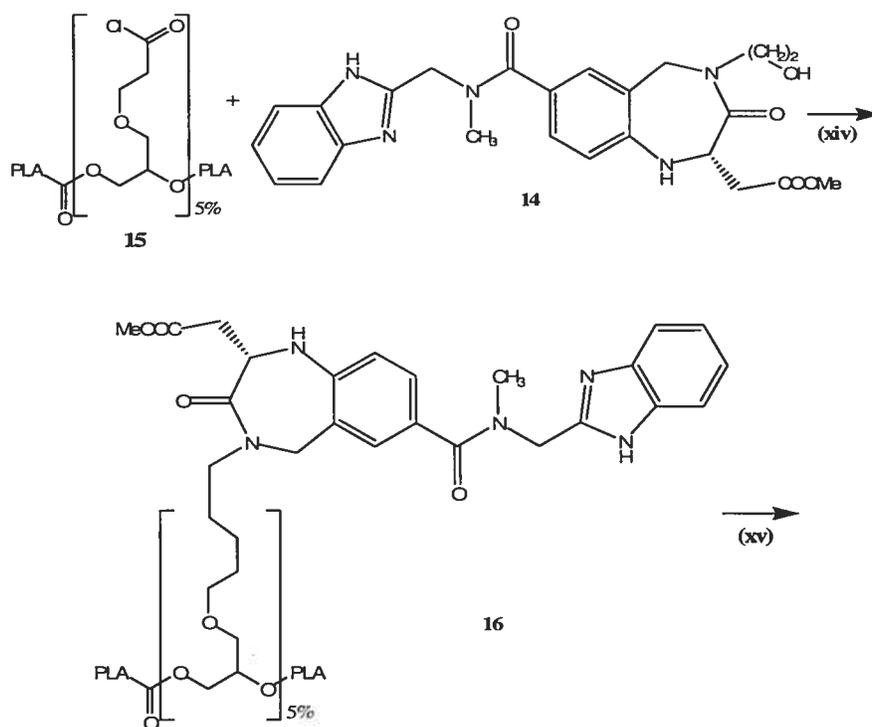
Les travaux précédents du laboratoire ont produit des polymères de PLA ramifiés avec des fonctions allyle, alcool, acide et halogénure d'acide à des concentrations de 1%,

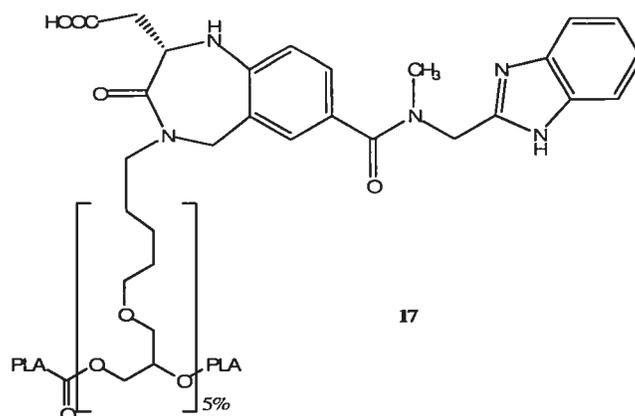
5%, 20% et 30%; en ce qui concerne le projet présent, le polymère utilisé correspond au polymère de PLA ramifié avec des fonctions chlorure d'acide (15) à une concentration de 5%.

Le greffage du ligand

Après avoir introduit précédemment les éléments nécessaires pour la fabrication du matériel constitutif des éventuelles nanoparticules actives, en ce qui concerne le ligand des récepteurs intégrine $\alpha_v\beta_3$ et le polymère pour le greffer; le couplage du polymère et du ligand par une liaison ester est ensuite réalisé.

Schéma 4:





xiv) 4-Diméthylaminopyridine (DMAP), pyridine, HCl; **xv)** LiOH, H₂O, HCl.

La méthode pour greffer le ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sur le polymère comprend le couplage à partir du chlorure d'acide (15) et catalysé par le DMAP. **(xiv)** Dans cette procédure le ligand (14) est utilisé en excès afin d'assurer la fixation totale sur toutes les fonctions disponibles du polymère.

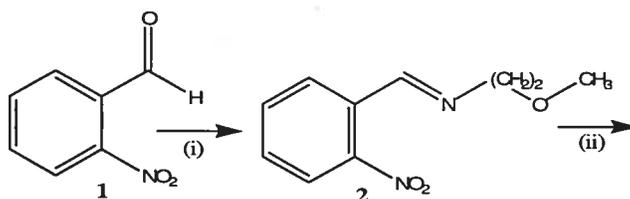
La dernière étape **(xv)** correspond à la déprotection du ligand greffé afin de restaurer le groupe acide carboxylique sur le ligand, qui est une fonction indispensable pour que la liaison sur le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ ait lieu. L'élimination du méthyle est faite par une simple hydrolyse qui n'affecte pas la liaison ester entre le ligand et le polymère, puisque cette fonction est protégée par effet stérique dans le complexe.^{103,102}

Chapitre 5, La synthèse des produits et résultats

Le ligand

Schéma 1:

Selon les descriptions précédentes, la synthèse du ligand commence par l'amination du 2-nitrobenzaldéhyde avec la 2-méthoxyéthylamine, en présence de borohydrure de sodium dans le méthanol:



- (i) Une solution de 2-nitrobenzaldéhyde (1) 10g (66.17 mmol) dans du méthanol (60mL) est traitée avec une solution de 2-méthoxyéthylamine (2) 9.94g (132.34 mmol) dans 25 mL d'eau (40%). Le mélange est agité durant 1h à température de la pièce.

Après 1 heure, une fois terminée la réaction, une chromatographie sur couche mince (CCM) du réactif (2-nitrobenzaldéhyde) et du mélange réactionnel est faite avec une phase mobile composée d'acétate d'éthyle et de toluène (7:3), ce qui a donné les résultats suivants:

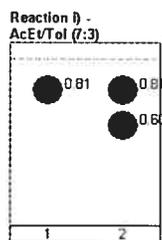
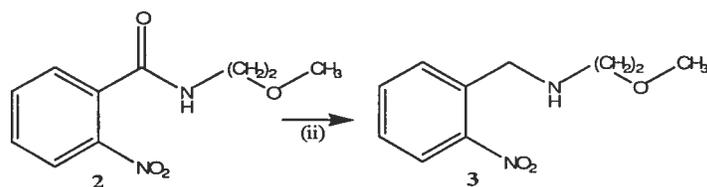


Figure 18, CCM réaction i):1= Réactif; 2= Mélange réactionnel i) après 1h



- (ii) Une solution de borohydrure de sodium 1,9g, (50mmol) dans de l'eau (10mL) est ajouté en 10 minutes à température de la pièce, goutte à goutte au mélange réactionnel provenant de la réaction (i); ensuite le mélange est agité pour 3 heures à température de la pièce.

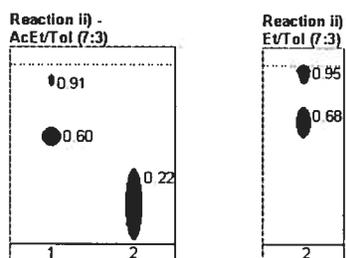


Figure 19, CCM Réaction ii): 1= Produit de la réaction i); 2= Produit de la réaction ii)

0,2 g du produit de la réaction ii) sont purifiés par chromatographie sur colonne (Et/Tol 7:3) et 0,18 g d'un produit avec un $R_f=0.68$ ont été obtenus (rendement 90% à partir de (1)). Ce produit a été analysé par RMN (résonance magnétique nucléaire) des protons (^1H) dans le chloroforme deutéré (CDCl_3). On obtient le spectre suivant:

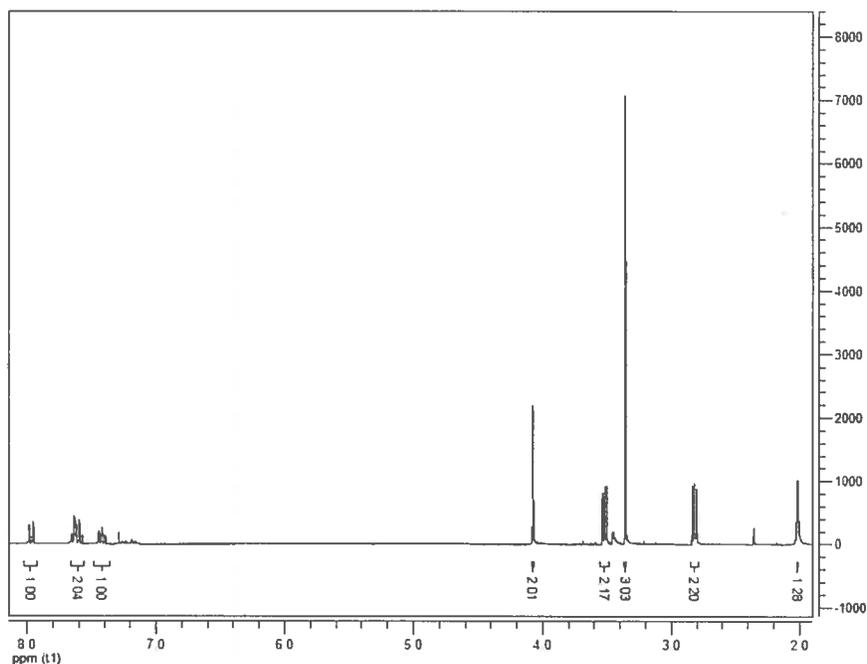
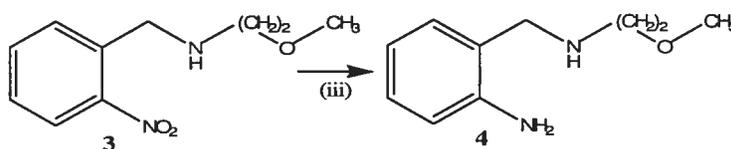


Figure 20, RMN ^1H composé (3).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2.01 (s, 1H, NH), 2.82 (t, 2H, CH_2), 3.36 (s, 3H, CH_3), 3.52 (t, 2H, CH_2), 4.07 (s, 2H, CH_2), 7.42 (t, 1H), 7.54-7.65 (m, 2H), 7.97 (d, 1H).



(iii) Le produit de la réaction précédente (ii) est hydrogéné par hydrogénation catalytique. 0,4 g de Pd-C 10% dans 0,7 mL d'eau sont ajoutés et du H_2 est mis à barboter bulle à bulle dans la solution à température de la pièce pendant 48 heures sous 1 atmosphère de pression. Ensuite, le mélange est filtré sur Celite® et le résidu est lavé avec du méthanol (20mL). L'ensemble des filtrats est extrait en utilisant un système acétate d'éthyle/eau, la partie aqueuse est ensuite re-extraite avec de l'acétate d'éthyle. L'ensemble des phases organiques est séché

avec du sulfate de magnésium (MgSO_4) et évaporé pour fournir le composé 4 (huile marron).

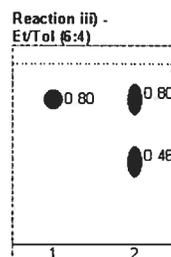


Figure 21, CCM Réaction iii): 1= Produit de ii); 2= Produit de la réaction iii)

Ensuite, 0,20 g du produit de la réaction iii) sont purifiés par chromatographie sur colonne avec un système AcEt/Et (6:4) et on obtient 0,16 g du produit avec un $R_f=0.46$ (rendement 80% à partir de (1)). Le produit a été analysé par RMN ^1H dans CDCl_3 et on obtient le spectre suivant:

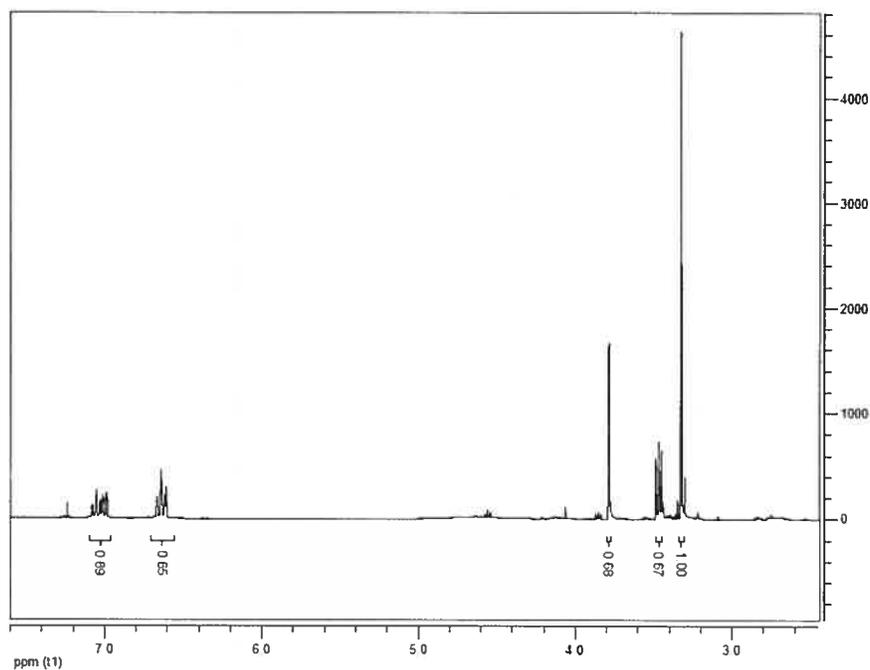
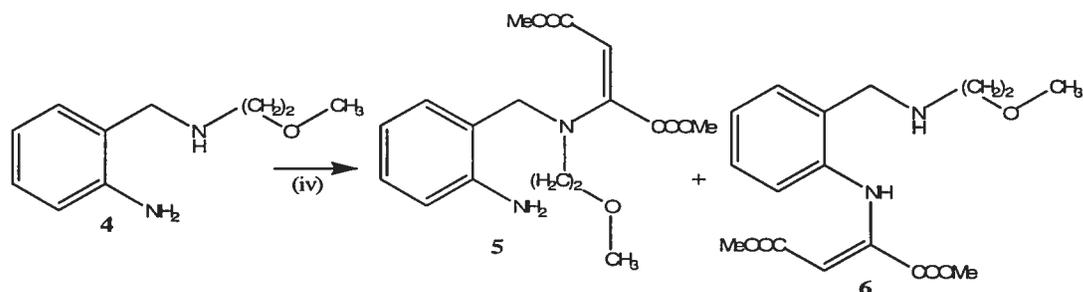


Figure 22, RMN ^1H composé (4).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2.02 (s, 1H, NH), 2.75 (t, 2H, CH_2), 3.32 (s, 3H, CH_3), 3.47 (t, 2H, CH_2), 3.78 (s, 2H, NH_2), 6.64 (t, 2H, $J = 7.4, 1.3$ Hz), 6.93-7.09 (m, 2H, $J = 7.2, 1.2$ Hz)



(iv) À une solution du produit impur de la réaction iii) (diamine (4) ≈ 60 mmol) dans du méthanol (45 mL) est ajoutée une solution de DMAD 8.53 g (60 mmol) dans 20 mL de méthanol, goutte à goutte en 30 minutes. Le mélange est agité par 1 heure à température de la pièce.

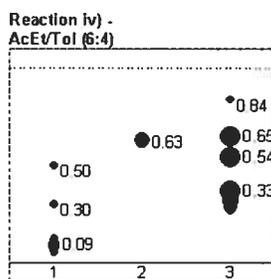
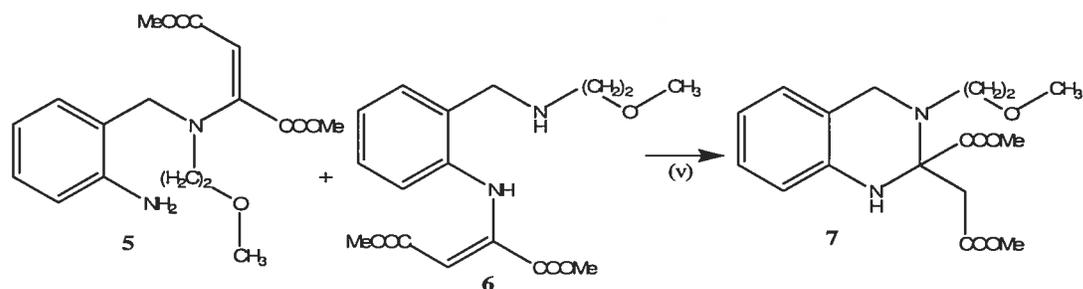


Figure 23, CCM Réaction iv): 1= Produit de la réaction iii); 2= Réactif DMAD; 3= Produit de la réaction iv)



- (v) Au produit impur de la réaction iv) sont ajoutés 0.5 g (8.22 mmol) d'acide acétique glacial, ensuite la solution est chauffée au reflux pendant 1 heure.

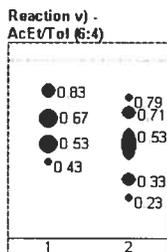
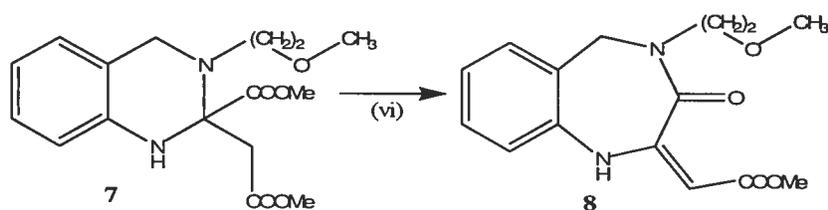


Figure 24, CCM réaction v): 1= Produit réaction iv); 2= Produit réaction v)



- (vi) Après que la solution produite par la réaction v) ait été refroidi à 50°C, 3.9 mL d'une solution à 30% de NaOCH₃ (1.16 g, 21.5 mmol) dans méthanol est ajoutée et le mélange est chauffé pendant 2 heures. Ensuite, le mélange est refroidi à 50°C et 1.3 g (21.7 mmol) d'acide acétique glacial sont ajoutés, subséquemment 75 mL d'eau sont ajoutés aussi à 50°C. Par la suite, le mélange est refroidi en 1 heure jusqu'au à 0°C et agité à cette température pour 5 heures, puis il est laissé pendant la nuit à la même température. Le solide correspondant au composé (8) est récupéré par filtration, lavé avec un mélange eau:méthanol (3:2) (50 mL) et laissé sécher à l'air.

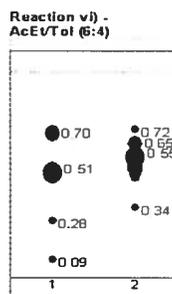


Figure 25, CCM reaction vi): 1= product from v); 2= reaction vi)

Ensuite, 0.3 g du produit de la réaction vi) sont purifiés par chromatographie sur colonne avec le mélange AcEt/Tol (6:4) comme éluant et 0,20 g d'un produit avec un $R_f=0.55$ sont obtenus (rendement 66% à partir de (1)). Le produit a été analysé par RMN ^1H dans CDCl_3 le spectre suivant a été obtenu:

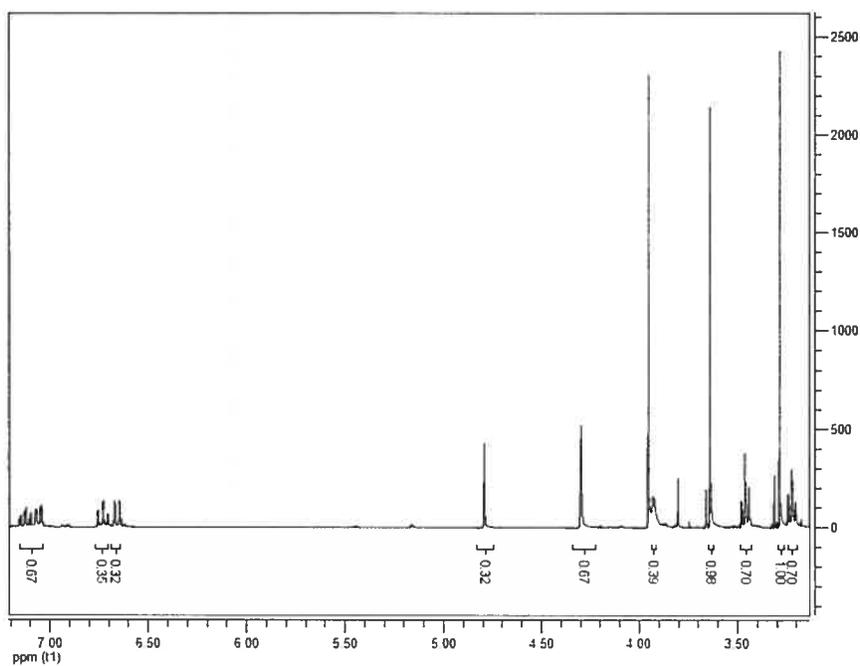
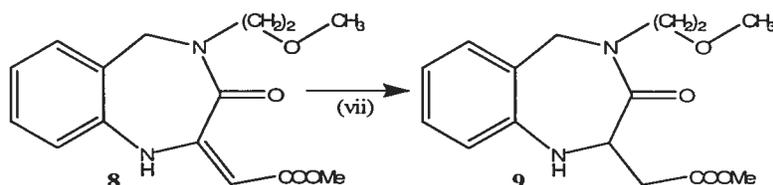


Figure 26, RMN ^1H composé (8).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 3.22 (t, 2H, CH_2 , $J= 16.3, 7.6$ Hz), 3.29 (s, 3H, CH_3), 3.46 (s, 2H, CH_2), 3.64 (s, 3H, CH_3), 3.93 (s, 1H, NH), 4.30 (s, 2H, CH_2), 4.79 (s, 1H, CH), 6.65 (d, 1H $J= 5.3$ Hz), 6,73 (t, 1H, $J= 7.7, 1.5$ Hz), 7,07-7.31 (m, 2H).



(vii) Le pH de une solution de méthanol (50 mL) du produit de la réaction vi) est ajusté à 7.5, avec de l'acide acétique glacial. La solution est agitée pendant 30 minutes à une température de 30-35°C. Ensuite, 0,6 g de Pd-C 10% dans 0.5 mL d'eau sont ajoutés, et postérieurement une solution de 1.4 g de NaBH_4 (37 mmol) et 0,5g NaOH dans de l'eau (10 mL) sont ajoutés goutte à goutte pendant une heure. Le mélange est chauffé à 40-45°C, agité pour 1 heure. Ensuite, le pH de la solution est amené de 9.6 à 7.0 avec de l'acide acétique. 40 mL de CH_2Cl_2 sont ajoutés, le mélange est filtré à travers de la Celite® à une température de 35°C et le filtrat est lavé avec CH_2Cl_2 à 30°C (2x 20 mL). La phase organique est séparée, séchée sur MgSO_4 et évaporée pour concentrer le produit de la réaction.

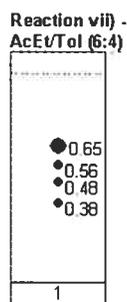
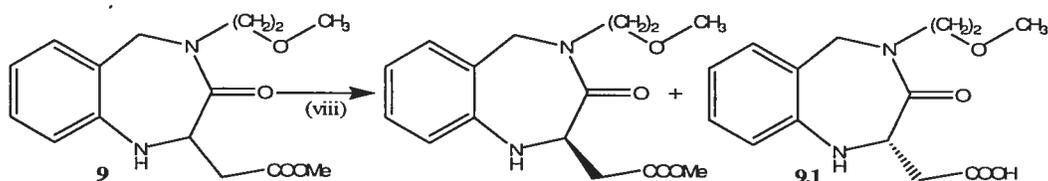
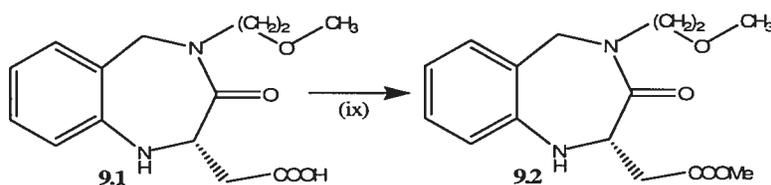


Figure 27, CCM réaction vii)

Le mélange résultant de la réaction vii) est purifié au complet au moyen de la chromatographie sur colonne avec une phase mobile composée de AcEt/Tol (6:4), et 11.8 g du produit (9) sont obtenus ($R_f = 0.65$), ce qui signifie un rendement de 61% à partir de (1).



(viii) Le produit (9) (11.8 g, 40.4 mmol) et 3 g de Novozyme 435 sont mélangés dans du t-BuOH à 88% (100 mL). Le mélange est agité et chauffé à 50°C pendant 10h, tout en contrôlant le pH à 7.0 par l'addition d'ammoniaque à 88% dans t-BuOH. Ensuite, le mélange de réaction est filtré et le filtrat est lavé avec t-BuOH. Une solution de NaHCO_3 8% w/v (22 mL) est ajoutée et le pH est ajusté à 7.5 par l'addition de HCl 0,5 M (10 mL typiquement). La solution totale est évaporée sous vide à une température mineur de 50°C. De l'eau est additionnée (30 mL), la solution se laisse refroidir à température de la pièce et elle est agitée pendant 1 heure. Le solide est séparé par centrifugation et le liquide surnageant est lavé avec du CH_2CL_2 , ensuite le CH_2CL_2 est jeté et la phase aqueuse contenant l'acide (9.1) est conservée. Le produit (9.1) est isolé par acidification avec du HCl, le précipité est filtré et lavé avec de l'eau et du i-PrOH et séché à l'air. Ils sont obtenus 5.5 g (18.8 mmol) de l'énantiomère (S) – (9.1), ce qui représente un rendement de 45% à partir du mélange racémique (9).



- (ix) Une solution de 5.5 g de l'acide 9.1 (18.8 mmol), 4.3 g de N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (20.68 mmol), 1 g de MeOH (31.25 mmol) et 3.11 g de 4-pyrrolidinopyridine (2 mmol), dans 50 mL de l'éther est laissée à la température de la pièce pour 20 heures. Une fois que l'estérification est terminée, le N,N-dicyclohexyl urea est filtré et le filtrat est lavé avec de l'eau (3x50 mL), avec une solution à 5% de l'acide acétique (3x50 mL) et une autre fois avec de l'eau (3x50 mL), puis séché sur MgSO₄ et évaporé pour obtenir le produit désiré (9.2).

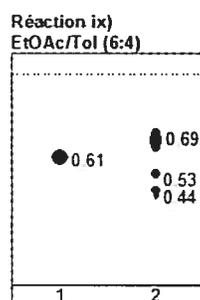


Figure 28, CCM Réaction ix): 1= Produit de vii); 2= Produit de ix)

0.3 g du produit de la réaction ix) est purifié par chromatographie sur colonne avec EtOAc/Tol (6:4) et 0,28 g du produit avec un Rf=0,69 sont obtenus (rendement 93% à partir de (9.1)). Le produit a été analysé par RMN ¹H dans CDCl₃ et donne le spectre suivant:

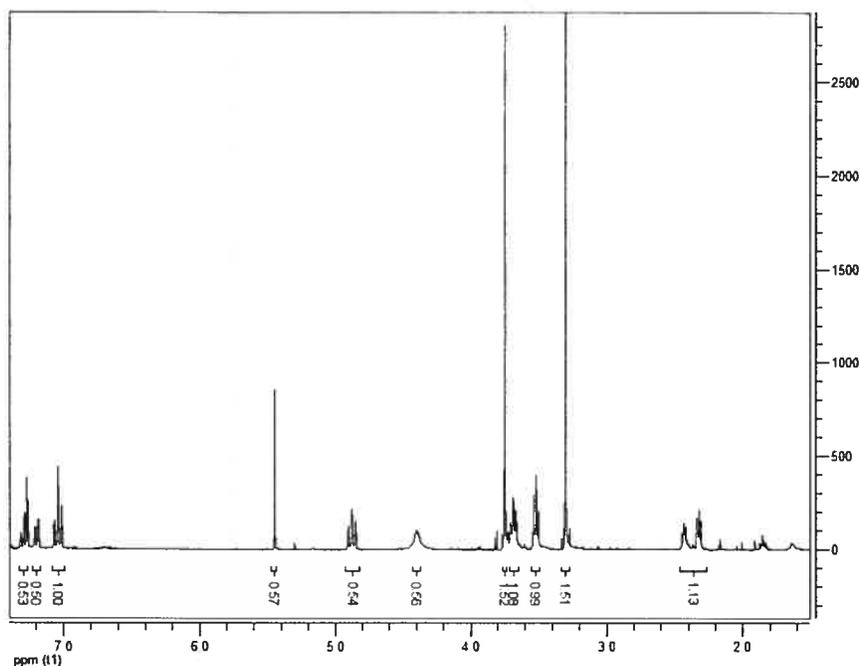
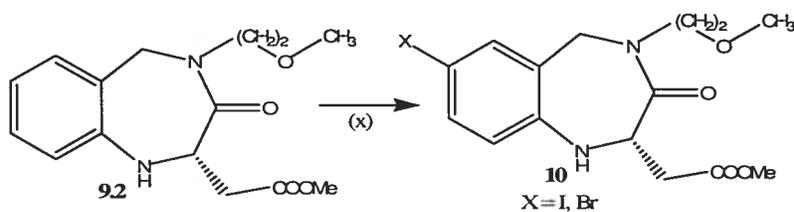


Figure 29, NMR composé (9.2)

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2.36 (m, 2H, CH_2), 3.30 (s, 3H, CH_3), 3.52 (t, 2H, CH_2), 3.69 (t, 2H, CH_2), 3.75 (s, 3H, CH_3), 4.40 (s, 1H, NH), 4.79 (t, 1H, CH), 5.45 (s, 2H, CH_2), 7.04(t, 2H), 7.20 (d, 1H), 7.28 (ddd, 1H)



(x) A: X=I

0.5 g du produit de la réaction ix) sont dissous dans un mélange de CH_2Cl_2 :MeOH (1:1), le pH de la solution est ajusté à 7.0 par addition de NaOH à 47%. 0.14 g (0.6 mmol) du complexe Pyridine-Iode monochlorure (PIM) sont ajoutés doucement à la solution en 30 minutes. Le pH est soigneusement contrôlé pendant l'addition du PIM par l'addition de NaOH 1M afin de le maintenir

dans un intervalle de 6.5 à 7.5, aussi la température est ajustée à 10°C. Ensuite le mélange est agité pour 40 minutes à 10°C, pendant que le pH est à 7.0. 1.1 mL de CH₂Cl₂ sont ajoutés et la température est ramenée à la température de la pièce; la phase organique est jetée et la phase aqueuse est lavée avec plus de CH₂Cl₂. Subséquemment la phase aqueuse est acidifiée par l'addition du HCL 1M pour obtenir un pH entre 3.5 et 4.0. Le mélange est agité pour 30 min et ensuite il est filtré, le solide est lavé avec de l'eau, de l'i-PrOH est ensuite séché à 50°C pendant 12 heures.

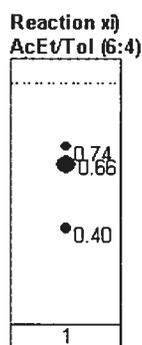


Figure 30, CCM réaction x) (X=I). 1= produit de x)

Ensuite, 0.2 g du produit de la réaction x) sont purifiés par chromatographie en colonne avec AcEt/Tol (6.5:3.5) et 0,08 g du produit avec R_f=0.66, 0,04 g du produit avec R_f=0.40 et 0,04 g du produit avec R_f=0.74 sont obtenus. Ces produits sont analysés par RMN ¹H dans CDCl₃. On obtient un produit majoritaire qui a le spectre suivant, en particulier, la section aromatique; le reste du spectre est omis puisque ses caractéristiques sont essentiellement égales au spectre de la figure 30:

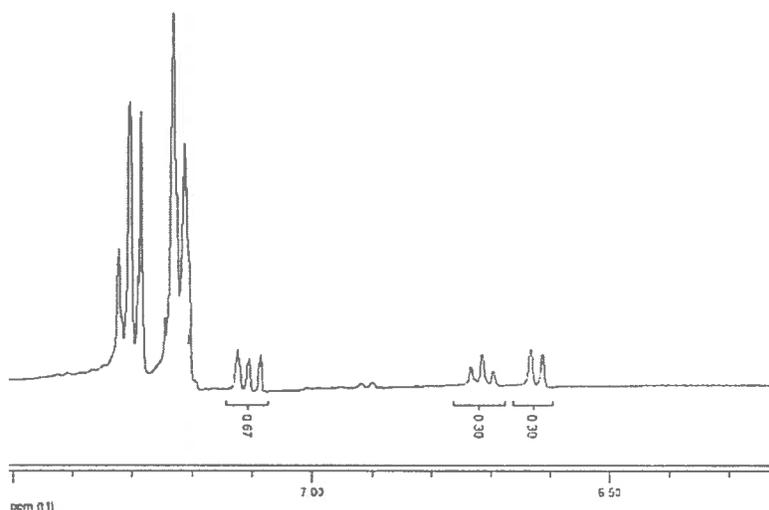


Figure 31, RMN section aromatique du produit 10 (X=I).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) –SECTION AROMATIQUE- δ 6,63 (d, 1H), 6,72 (t, 1H), 7,11 (t, 2H).

Le spectre précédent montre que la réaction d'iodation du composé 9 n'a pas eu lieu et la partie aromatique du composé est intacte. Par conséquent, la stratégie établie est d'essayer l'halogénéation du composé avec du Brome.

B: X=Br

Le composé (9.2) provenant de la réaction x) (5 g, 17.1 mmol), est mélangé avec 0.65 g de $n\text{-Bu}_4\text{NBr}$ (0.2 mmol) dans 50 mL de CH_2Cl_2 , le mélange est chauffé à reflux pendant 30 minutes. Ensuite, la température est refroidi à 30°C et 3.64 g de N-bromosuccinimide (20.5 mmol) sont ajoutés petit à petit. La réaction est agitée à température de la pièce par 1 heure et postérieurement lavée avec une solution du NaHCO_3 5% (20 mL) et deux fois avec de l'eau (20 mL). Le liquide est ensuite évaporé par portions et le volume de CH_2Cl_2 éliminé (40 mL) est remplacé par de l'hexane; la suspension résultante est refroidie, filtré et lavé avec

de l'hexane. Le produit est ensuite séché pendant 10 heures, fournissant 4.5 g d'un solide (rendement de 90% à partir de (9.2)).

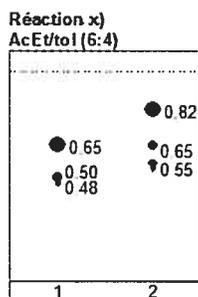


Figure 32, CCM réaction x): 1= Produit réaction ix); 2= Produit réaction x) (X=Br).

Le mélange résultant de la réaction x) (X=Br) est purifié au complet par chromatographie sur colonne avec un éluant composé de AcEt/Tol (6:4). 3.8 g du produit (10) sont obtenus ($R_f = 0.82$), ce qui signifie un rendement de 76% à partir de (9.2). L'analyse RMN ^1H de ce dernier produit fournit le spectre suivant:

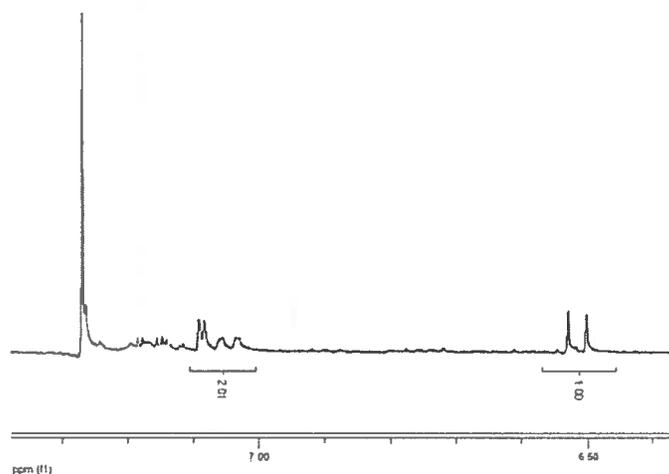
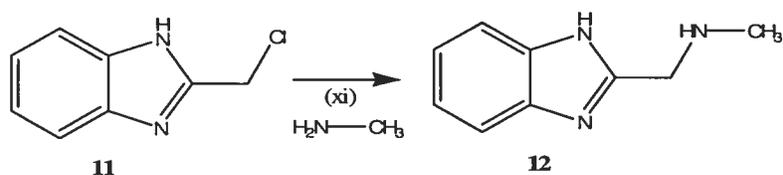


Figure 33, RMN section aromatique du produit 10 (X=Br).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) –SECTION AROMATIQUE- δ 6,51 (d, 1H), 7,11 (t, 2H).

Le spectre précédent montre que la réaction de bromination du composé 9 est fructueuse et fournit le composé halogéné dans la position 7. En plus, le rendement obtenu avec cette réaction est très acceptable.

Schéma 2:



- (xi) 8,95 g (12.8 mL, 0.28 mol) de méthylamine sont dissous dans une solution composée par 200 mL de diéthyl éther et 10 mL de MeOH à 0°C. Ensuite, 23.45 g (0.14 mol) de 2-chlorométhylbenzimidazole sont additionnés lentement et le mélange est agité pour 3 heures à température de la pièce; par la suite, la réaction est continuée toute la nuit. 400 mL plus d'éther sont additionnés et le mélange est refroidi dans la glace pour 3 heures. Le précipité est filtré. Le filtrat est saturé avec HCl et ensuite filtré et concentré.

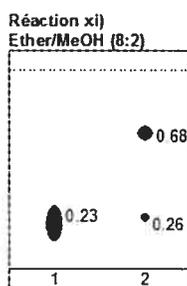


Figure 34, CCM Réaction xi): 1= Réactif 11; 2= Produit réaction xi)

Ensuite, le produit de la réaction x) est purifié au complet par chromatographie sur colonne avec Éther/MeOH (8:2) et 27.9 g (0.12 mmol) du produit de R_f=0.68 sont obtenus (rendement 86% à partir de (11)). Ensuite, ce produit a été analysé par RMN ¹H dans CDCl₃, obtenant et le spectre suivant:

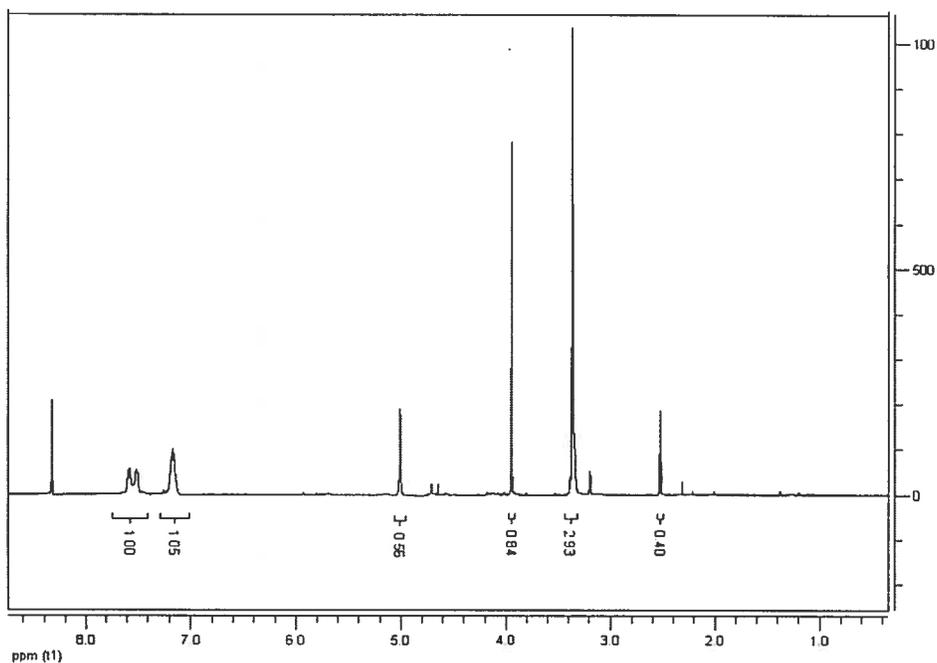
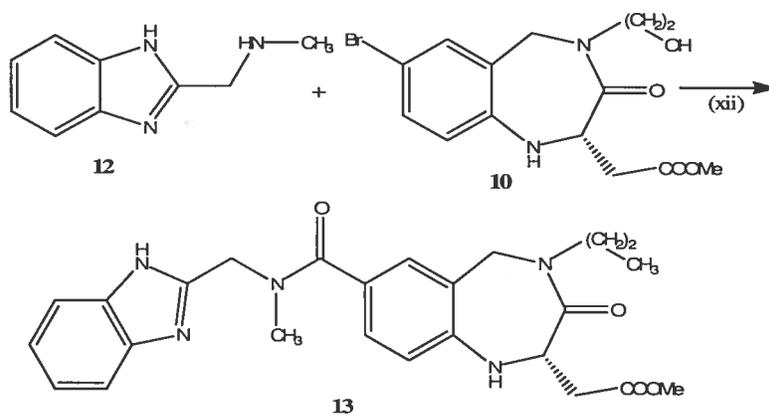


Figure 35, NMR composé (12)

RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 2,46 (s, 1H, NH), 3,37 (s, 3H, CH_3), 3,98 (s, 2H, CH_2), 5,03 (s, 1H, NH), 7,17 (s, 2H), 7,53 (d, 2H).



(xii) De l'argon est mis à barboter dans un mélange de 3.5 g (9.46 mmol) du composé (10), 5.23 g (22.35 mmol) du composé (12), 2.94 g (11.18 mmol) du

triphénylphosphine, 15.5 g (78.24 mmol) n-Bu₃N et 2.57 g (2.24 mmol) de (Ph₃P)₄Pd dans 47 mL de N-méthyle 2-pyrrolidinone. Ensuite, CO (monoxyde de carbone) est mis à barboter pendant 30 min. Le mélange est chauffé à une température de 100-105°C sous atmosphère de CO pendant 12 heures. Par la suite le mélange est refroidi et acidifié à pH=2 avec de HCl concentré. La solution est extraite avec du EtOAc et la phase organique est ensuite éliminée. La phase aqueuse est neutralisée avec du NaOH à 30% et ensuite extraite avec CH₂Cl₂. Les phases organiques sont séchées avec MgSO₄, concentrées et purifiées au complet par chromatographie sur colonne avec une phase mobile de MeOH/CH₂Cl₂ (1:9).

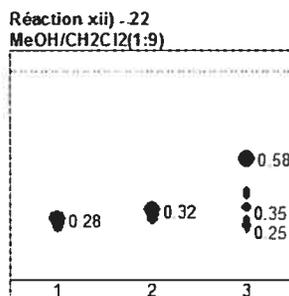


Figure 36, CCM réaction xii), 1= Réactif 10, 2=Réactif 12, 3=Produit réaction xii)

La chromatographie sur colonne a fourni 3.35 g (7.0 mmol) du produit (13) avec R_f=0.58, ce qui signifie un rendement de 74% à partir du produit 10. L'analyse ¹H RMN du produit montre le spectre suivant:

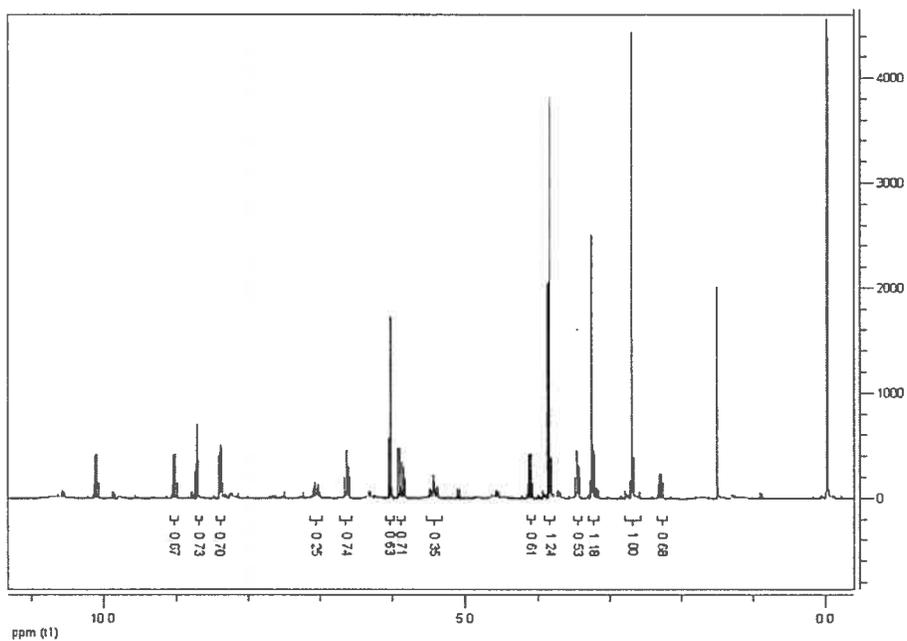
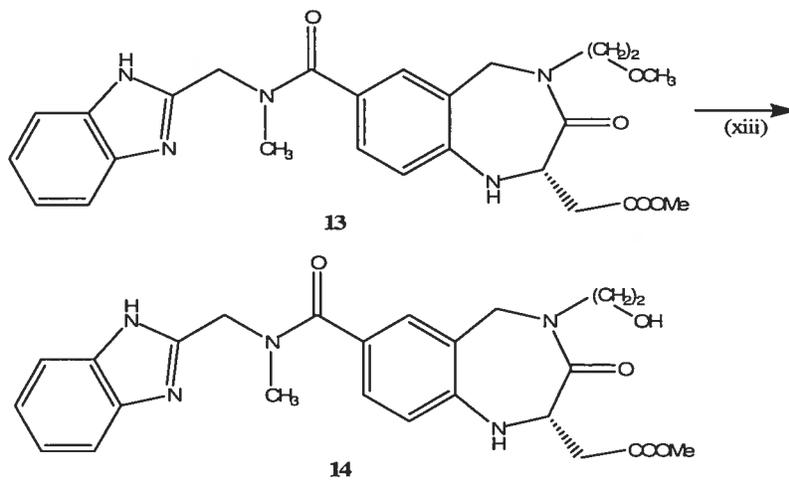


Figure 37, RMN product (13).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) δ 2,23 (m, 2H, CH_2 , $J= 16.3, 7.6$, Hz), 2,73 (s, 3H, CH_3), 3,11 (s, 3H, CH_3), 3,32 (t, 2H, CH_2), 3,93 (s, 3H, CH_3), 4,06 (t, 2H, CH_2 , $J= 16.3, 6.9$ Hz), 5,43 (t, 1H, CH), 5,96 (m, 2H, CH_2), 6,06 (d, 2H, CH_2 , $J= 5.9$ Hz), 6,72 (t, 2H, NH, $J= 7.6$ Hz), 7,18 (m, 1H, $j= 5.3$ Hz), 8,46 (d, 2H), 8,67 (d, 2H), 8,02 (t, 2H).



(xiii) Une solution du composé (13) -méthyle éther- à déprotéger (2.0 g, 4.7 mmol), dans CH_2Cl_2 (20 mL) est agitée pendant 15 minutes sous une atmosphère d'argon et à une température de -30°C ; ensuite, 20 mL d'une solution d'éther couronne 15-Crown-5 (12.24 mmol) et de NaI (12.24 mmol) dans CH_2Cl_2 sont ajoutés; par la suite, 6.3 mL d'une solution de BBr_3 1M sont aussi ajoutés. La réaction est agitée à la même température (-30°C) pour 3 heures. Pour terminer la réaction, 10 mL d'une solution saturée aqueuse de NaHCO_3 . La phase organique est lavée avec de l'eau et ensuite évaporé; le concentré est purifié par chromatographie sur colonne avec $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (7:3). 1.78 g (3.82 mmol) du composé (14) ($R_f=0.46$) sont obtenus (rendement 89% à partir de (13)); ce produit est analysé par ^1H RMN.

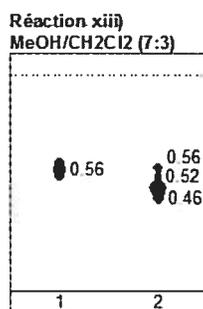


Figure 38, CCM réaction xiii: 1= produit (13), 2= Produit réaction xiii)

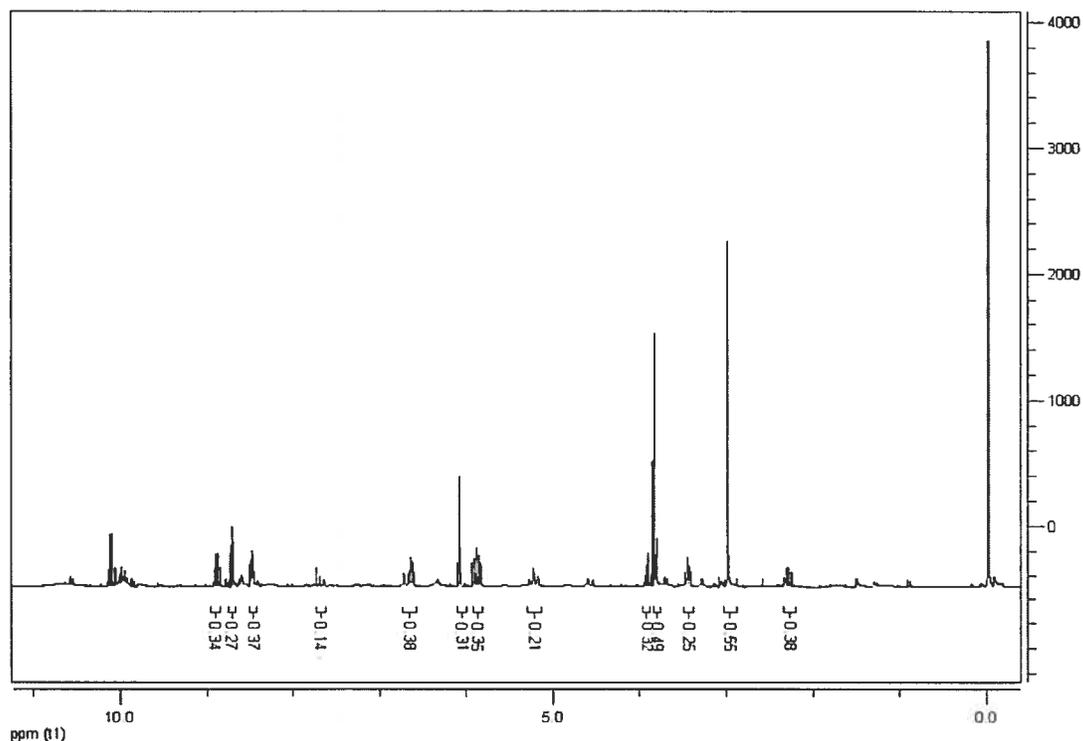
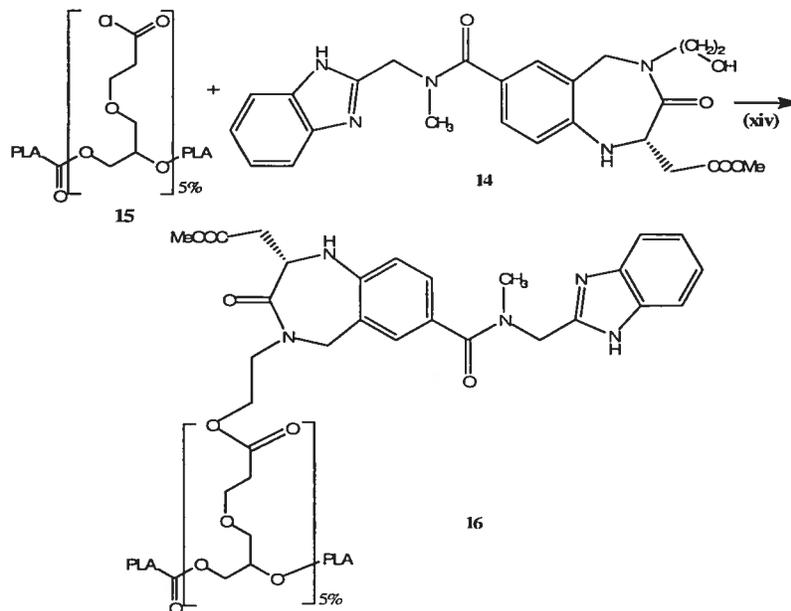


Figure 39, RMN ^1H produit (14).

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.23 (m, 2H, CH_2), 2.09 (t, 1H, CH_2), 2.97 (s, 3H, CH_3), 3.43 (t, 2H, CH_2), 3.84 (s, 3H, CH_3), 3.95 (t, 2H, CH_2 , $J=15.0$ Hz), 5.16 (t, 1H, CH, 4.8 Hz), 5.94 (m, 2H, CH_2), 6.06 (d, 2H, CH_2 , $J=16.4$ Hz), 6.70 (t, 2H, 2xNH), 7.79 (m, 1H), 8.42 (d, 2H), 8.81 (d, 2H), 8.91 (t, 2H).

Le spectre précédent démontre l'absence du pic correspondant au groupe méthyle de la chaîne de deux carbones dans la position 4 du noyau benzodiazépine, ce qui indique que la déprotection sélective du groupe méthoxy, afin d'obtenir le groupe hydroxyle libre, a été fructueuse.

Greffage du ligand sur le polymère



(xiv) Une solution de 1mg/mL du polymère fonctionnalisé (15) dans du chloroforme est mélangée avec une autre solution de 1.5g (3.22 mmol) du composé (14) dans 13 mL de chloroforme (7.5 equiv) et avec une dernière solution à 10% de DMAP dans la pyridine (1 μ L/mg de produit 14). Le mélange est agité pendant 3 heures et ensuite de l'HCL 1M est ajouté en quantité suffisante pour neutraliser la pyridine. Puis, le chloroforme est évaporé et la phase aqueuse est filtrée pour récupérer le ligand protégé greffé sur le polymère (16). Le ligand protégé est lavé avec de l'eau (150 mL) à fin d'assurer l'élimination du ligand protégé non greffé. L'observation des propriétés du ligand protégé (14) a montré que cette molécule est légèrement soluble dans l'eau, ce fait a été confirmé par des estimations réalisées à l'aide des logiciels qui son capables de calculer et prédire ce paramètre; ainsi, la solubilité du ligand protégé (14) est approximativement de 1.22g/100mL (0.026 mol/L).¹⁰⁶ En conséquence, il a été possible d'assumer que le produit (16) de la réaction correspond au complexe ligand-polymère où il ne reste pas de ligand protégé non greffé.

Le complexe ligand-polymère protégé est analysé par ^1H RMN, et le spectre suivant est obtenu:

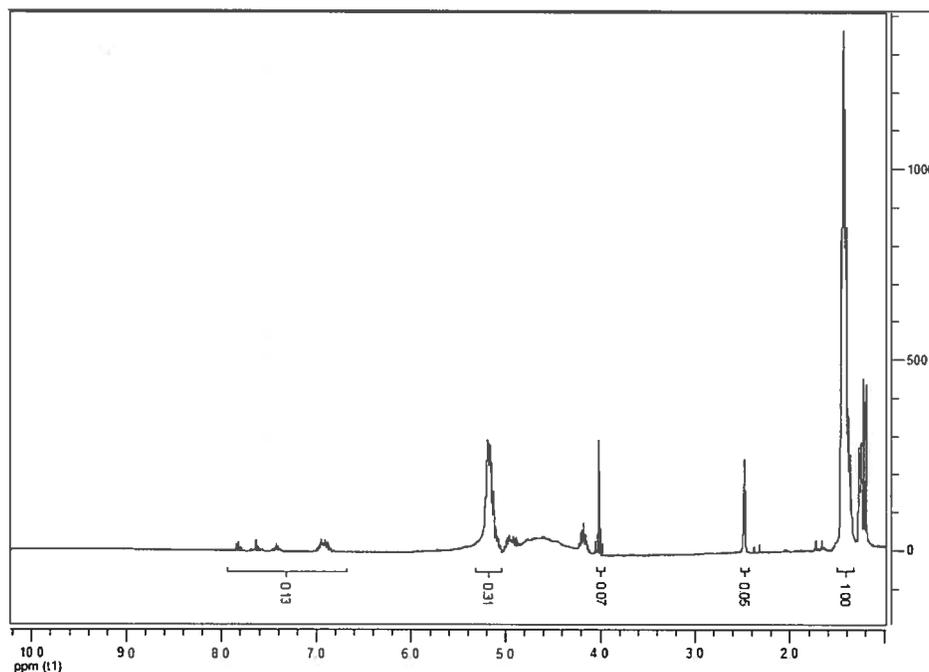
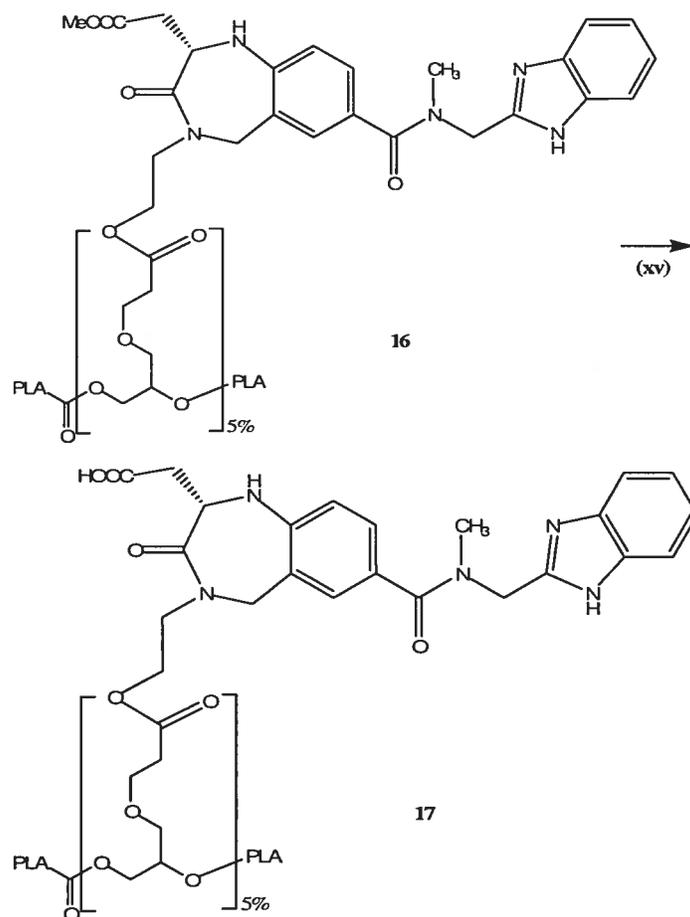


Figure 40, RMN ^1H produit (16)

À cause de la faible concentration de ligand greffé sur le polymère (5%) et des signaux propres du polymère, il n'est pas possible de bien reconnaître toutes les caractéristiques structurales du ligand dans le spectre. Cependant, on observe des signaux qui indiquent la présence du ligand dans l'échantillon analysé, par exemple, le pic à δ 2.26 ppm correspond clairement au groupe méthyle sur l'atome d'azote de la fonction acétamide centrale; de même le pic à δ 3.97 correspond au groupe méthyle de l'ester dans la position 2 de l'anneau de benzodiazépine. Une autre indication claire du greffage du ligand sur le polymère sont les signaux à δ 6.82-7.83 ppm, qui démontrent la présence des hydrogènes aromatiques, dans la proportion correcte correspondant aux groupes aromatiques du ligand, c'est-à-dire, approximativement 7 hydrogènes; Il faut noter que la seule

source de protons aromatiques est le ligand, puisque le polymère fonctionnalisé ne possède pas des fonctions aromatiques. Par ailleurs, le reste de signaux sur le spectre de la figure 40 sont caractéristiques du copolymère PLA.



- (xv) Une solution de 1.0 g du composé (16) dans un mélange de THF et d'eau (1:1) (40 mL), est traitée avec 6.0 mL d'une solution 1.0 N de LiOH (6 mmol) qui est ajouté lentement à température de la pièce. Le mélange est agité pour 24 heures, puis le produit est récupéré dans du chloroforme qui postérieurement est éliminé par évaporation en présence d'un même volume d'eau; le produit 17 précipite dans la phase aqueuse. Cette dernière étape est répétée deux fois pour bien laver le polymère. De la même manière que dans la réaction *xiv*, le produit

précipité a été lavé avec de l'eau à fin de assurer l'élimination de tout reste du ligand non greffé. Nonobstant que l'on a présumé que le lavage du produit (16) avait éliminé le excès su ligand non greffé (protégé), dans le cas qu'il reste du ligand non greffé, déprotégé après la réaction xv, celui (produit 17) est encore plus soluble dans l'eau que le produit (16) et par conséquence est aussi éliminé du produit (17) par le lavage final.

L'analyse ^1H RMN du produit obtenu dans DMSO-d_6 fournit le spectre suivant:

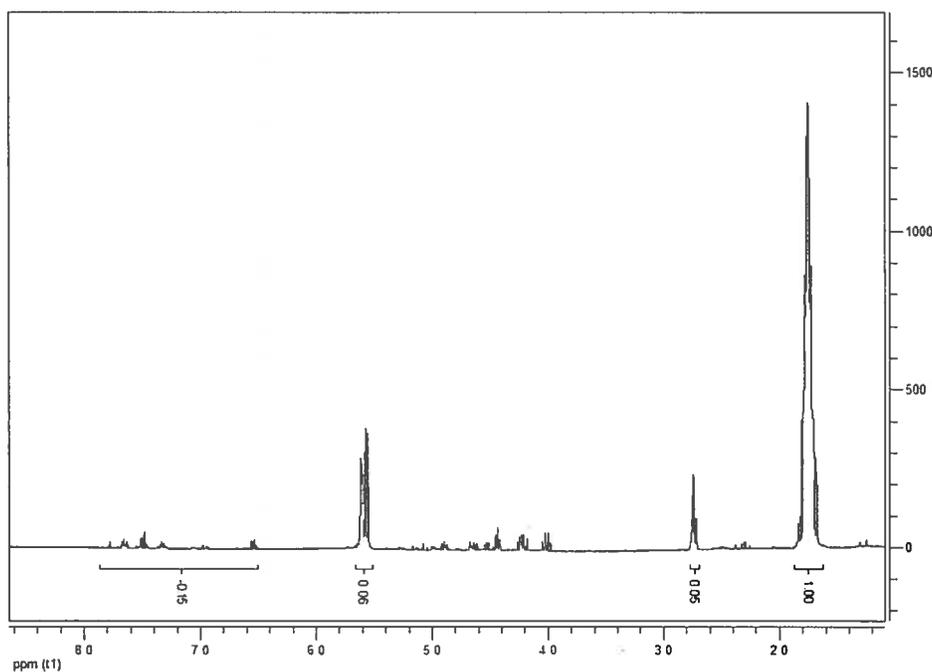


Figure 41, RMN ^1H produit (17)

Dans le spectre précédent, il est facile de remarquer l'absence du pic *singulet* dans les environs de 4.00 ppm, signal qu'avait été reconnu dans la figure 40 comme le pic caractéristique du groupe méthyle protecteur de l'acide carboxylique dans la position 2 du noyau de benzodiazépine. Le reste du spectre est essentiellement équivalent au spectre de la figure 40, démontrant que la déprotection du groupe acide s'est passée avec succès et que le ligand de benzodiazépine déprotégé est correctement greffé sur le polymère. Le lavage

des produits 16 et 17, à la fin des réactions xiv et xv respectivement, assure que le ligand non greffé a été éliminé et que le matériel obtenu et analysé par RMN corresponde au ligand greffé sur le polymère.

En plus, il est possible de vérifier le greffage du ligand sur le polymère au moyen des essais de chromatographie GPC (chromatographie d'exclusion stérique), qui permet de déterminer les masses molaires moyennes des polymères. Cette technique indique la masse molaire moyenne en fonction du volume hydrodynamique des macromolécules. En théorie, le volume hydrodynamique est différent pour deux macromolécules de même masse molaire mais d'architecture différente, par exemple, une macromolécule non linéaire occupera un plus grand volume qu'une macromolécule de même masse molaire linéaire et sera donc élué plus rapidement même si les deux masses molaires sont identiques; ainsi, le polymère contenant le ligand greffé sera élué plus rapidement que le polymère sans ligand.¹⁰⁷

Conclusions et perspectives

Ce travail de recherche démontre la possibilité de modifier un ligand connu, qui cible une structure biologique particulière, spécifiquement les récepteurs intégrine $\alpha_v\beta_3$, afin de permettre son greffage sur un polymère ramifié qui est le matériel le plus approprié pour fabriquer des nanoparticules. En plus d'être capable de transporter un médicament antinéoplasique jusqu'aux tissus cancérigènes qui surexpriment les récepteurs cibles, ils seront capables d'inhiber dans une certaine mesure le processus de développement des vaisseaux sanguins des tumeurs. Ils pourraient ainsi provoquer la régression de ces maladies et antagoniser l'activité du récepteur.

Le ligand greffé sur le PLA a été choisi en fonction de sa puissance d'inhibition et sa très grande affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Pour confirmer l'hypothèse de liaison du ligand modifié sur le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$, des simulations numériques ont été faites grâce

à l'utilisation des logiciels qui effectuent le couplage de la molécule sur le site actif de la protéine et évaluent divers paramètres de l'adhésion.

Le couplage fait entre les molécules imite les interactions physicochimiques entre le récepteur et le ligand, estime les forces inter moléculaires, la configuration structurelle spatiale correcte et la flexibilité du ligand pendant le couplage, pour pouvoir prédire l'affinité et la capacité de produire une activité biologique dérivée de la liaison.

Les simulations du couplage du ligand modifié ont été comparées avec les résultats du couplage obtenus pour le ligand conformé par la séquence peptidique RGD, qui correspond à la séquence naturelle présente dans les ligands capables de lier le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$; en plus, le site de liaison spécifique sur la protéine a été déterminé avec précision et ainsi, les essais de liaison ont été réalisés.

En résumé, les essais de couplage effectués avec le logiciel GOLD ont fait le couplage appliquant les caractéristiques de flexibilité du ligand, fournissant la configuration structurelle la plus appropriée de la molécule et montrant le modèle d'attache le plus convenable du ligand sur le récepteur. Le rapport contenant les résultats concernant l'évaluation des forces intramoléculaires et intermoléculaires signale que pour le deux ligands, les interactions de liaison avec le récepteur sont dues principalement aux forces de Van der Waals, et deuxièmement à des liaisons hydrogène; de plus, il est clair que la liaison du ligand de benzodiazépine est plus puissante que celle du ligand RGD.

En conclusion, les simulations avec GOLD démontrent que la modification effectuée au ligand de benzodiazépine, n'affecte pas sa puissance et sa spécificité puisque le pointage final déterminé par le logiciel est assez élevé et que les forces de liaison estimées sont très significatives en comparaison avec les résultats pour le ligand RGD.

Les essais faits avec le logiciel BioMed, qui utilise la mesure du potentiel de la force moyenne (PMF) avec un algorithme génétique de couplage, ont montré que l'orientation des groupes fonctionnels des ligands coïncide avec les caractéristiques nécessaires

pour que la liaison ait lieu dans le site actif du récepteur (les groupes donateurs de liaisons hydrogène coïncident avec la région de la surface bleu du récepteur et que les groupes accepteurs des liaisons hydrogène sont bien orientés vers les surfaces rouges du récepteur). L'analyse numérique de la liaison du ligand de benzodiazépine permet d'observer clairement que le groupe d'hydroxyle sur la chaîne de deux carbones dans la position 4 est orienté vers la partie externe de la région d'attachement du récepteur, démontrant que le greffage du ligand sur un polymère de PLA n'affectera pas l'affinité ni la liaison de cette molécule sur le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$. Finalement, le couplage des ligands avec le logiciel BioMed CaChe confirme que la liaison du ligand de benzodiazépine est plus forte et plus stable, même avec la modification proposée sur la position 4, que la liaison du ligand RGD cyclique, selon l'estimation effectuée des forces intermoléculaires.

En conclusion, les simulations numériques démontrent que le ligand modifié de benzodiazépine se couple dans le même site accepteur que le ligand naturel, par ailleurs elles confirment que l'hydroxyle disponible pour lier le ligand sur le polymère est libre et ne participe pas aux interactions de liaison avec le récepteur. Malgré la modification réalisée pour rendre possible l'attachement de la molécule sur le polymère pour fabriquer des nanoparticules, le ligand continue d'être puissant et spécifique pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, produisant un effet plus fort que celui prévu avec la séquence de liaison naturel RGD.

Par rapport au travail de synthèse, la tâche accomplie fournit le ligand sélectif pour les intégrines $\alpha_v\beta_3$. Les étapes de synthèse comme telles, ne sont pas nouvelles, elles sont connues et constitue un travail chimique conventionnel, mais l'ensemble de la procédure pour obtenir le ligand de la figure 2 est nouvelle. La voie de synthèse du ligand protégé a été mise au point comme l'un des objectifs principaux de ce travail de maîtrise.

Concernant le greffage du ligand sur le polymère de PLA fonctionnalisé et ramifié, le type de liaison utilisé entre les deux molécules correspond à un ester. Ce type de liaison a été choisie principalement parce que sa synthèse n'est pas très complexe à

partir du chlorure d'acide du polymère ramifié, aussi parce que la génération de la liaison ester fournit un haut taux de couplage, et finalement parce que les liaisons ester facilitent la biodégradabilité du matériel.

Pour la création de la liaison ester, un alcool primaire de deux carbones dans la position 4 du noyau benzodiazépine qui est très réactif face au chlorure d'acide du polymère est utilisé. En plus, il a été prouvé grâce aux simulations numériques que ce groupe fonctionnel ne fait pas partie du pharmacophore du ligand, c'est-à-dire, cette portion de la molécule n'interagit pas avec le récepteur. Les tests de couplage moléculaire entre le ligand modifié et attaché au polymère montrent que le ligand conserve son activité malgré qu'il a été modifié et greffé de façon directe au polymère. Pendant la synthèse du ligand et du complexe ligand-polymère, l'obtention des intermédiaires et des produits a été contrôlée par spectrométrie RMN.

En conclusion, le modèle appliqué a fourni finalement un ligand présumé puissant et spécifique envers les récepteurs intégrine $\alpha_v\beta_3$; il est modifié chimiquement pour permettre son attachement sur un polymère de PLA ramifié et fonctionnalisé; il permettra de fabriquer des nanoparticules, avec le but de cibler de façon spécifique les nouvelles structures vasculaires générées dans les tissus tumoraux. Il pourra participer à l'inhibition du processus d'angiogenèse et provoquer la régression des maladies cancéreuses, pendant qu'en même temps, grâce aux nanoparticules, des médicaments antinéoplasiques seront libérés dans la tumeur. Le choix de développer le matériel constitutif du vecteur ciblant le récepteur $\alpha_v\beta_3$ vise profiter de la surexpression de cette structure biologique dans les tissus cibles dans la condition pathologique tumorale.

Bien que le travail réalisé tout au long de cette maîtrise est considéré complet par l'obtention avec succès du matériel constitutif du vecteur ciblant les intégrines $\alpha_v\beta_3$, c'est-à-dire, par la production d'un polymère incluant un ligand spécifique pour les structures cellulaires d'intérêt capable de produire des nanoparticules, le travail relié à ce projet continuera dans le groupe de recherche du Dr. Hildgen. Des nanoparticules actives seront fabriquées avec le matériel produit, et au moyen des expériences il sera

possible de prouver sa capacité pour s'attacher sur les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et inhiber le processus d'angiogénèse.

En premier, la capacité du vecteur pour cibler les intégrines $\alpha_v\beta_3$, qui son surexprimées dans certains tissus où la génération de nouveaux vaisseaux sanguins est active (angiogénèse), peut être prouvée au moyen de la méthodologie implémentée par Leclair, et al.,⁶³ en utilisant au moins deux lots différents de microsphères, l'un incluant le ligand greffé sur le polymère et l'autre constitué seulement par le polymère (témoin), où chaque un des lots est marqué au moyen d'un colorant. Cette expérience peut être réalisée avec des anneaux aortiques de rat, puisque il est bien connu que ce tissu est très actif dans la génération de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénique). Lorsque le tissu angiogénique est mis en contact avec un mélange des deux lots de microsphères colorées (les microsphères avec le ligand greffé et colorées, et les microsphères témoin de couleur différente), on espère que les microsphères avec le ligand vont s'attacher aux intégrines du tissu et vont rester après le lavage qui élimine les microsphères témoin; ainsi, par analyse d'images il est possible de reconnaître les microsphères liés au tissu grâce au colorant qui les différencie.

En outre, il est possible d'estimer l'activité anti-angiogénique des antagonistes des intégrines grâce à cultures des anneaux aortiques de rat dans gels de fibrine ou collagène. Cet essai facilite l'appréciation du développement de nouveaux microvaisseaux, et en présence du vecteur conçu, permettra d'évaluer le degré d'inhibition en la formation de ce réseau vasculaire provoqué par le ligand antagoniste greffé sur les nanoparticules.^{108,109}

Une fois que la suite des travaux permet de fabriquer les nanoparticules contenant le ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, il sera possible de prouver que le vecteur conçu est capable de cibler ledit récepteur, inhiber l'angiogénèse et libérer des médicaments antinéoplasiques dans des tissus cancéreux de manière spécifique. Pour le moment, le présent travail de recherche constitue le commencement du parcours qui peut conduire au développement d'une alternative thérapeutique spécifique pour le traitement du cancer.

Bibliographie

- ¹ Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. "The Cell", © 2002.
- ² Ivaska J., Heino J. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57: 16-24, 2000.
- ³ Pierschbacher, M. D. and Ruoslahti, E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309, 30-33, 1984.
- ⁴ Hynes R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11-25, 1992.
- ⁵ Pratima Nangia-Makker, Sara Baccarini and Avraham Raz. Carbohydrate-recognition and angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews* 19: 51–57, 2000.
- ⁶ Judith A Varner and David A Gheresht. Integrins and cancer. *Current Opinion in Cell Biology* 1996, 8:724-730
- ⁷ Christopher J. Drake¹, David A. Cheresh and Charles D. Little., An antagonist of integrin α - β 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *Journal of Cell Science* 108, 2655-2661 (1995).
- ⁸ Montgomery AMP, Reisfeld RA, Cheresh DA: Integrin α - β 3 rescues melanoma from apoptosis in a three-dimensional dermal collagen. *Proc Nat/Acad Sci USA* 1994, 91:8856-8860.
- ⁹ Judith A. Varner, David A. Emerson, Rudolph L. Juliano. Integrin α 5 β 1 Expression Negatively Regulates Cell Growth: Reversal by Attachment to Fibronectin. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 6, 725-740, June 1995.
- ¹⁰ Leavesley DI, Ferguson GD, Wayner EA, Cheresh DA (1992) Requirement of the integrin α subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *J Cell Biol* 117:1101-1107.
- ¹¹ Bischoff J: Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest.* 99: 373–376, 1997
- ¹² Friedlander M., Theesfeld C. L., Sugita M., Fruttiger M., Thomas M. A., Chang S., Cheresh D. A. Involvement of integrins α β 3 and α β 5 in ocular neovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9764-9769, 1996.

-
- ¹³ Luna, Jose; Tobe, Takao; Mousa, Shaker A.; Reilly, Thomas M.; Campochiaro, Peter A. Antagonists of Integrin [alpha]_v[beta]₃ Inhibit Retinal Neovascularization in a Murine Model. *Nature Lab. Inv.* Volume 75(4), October 1996, pp 563-573
- ¹⁴ Brooks P. C., Clark R. A., Cheresch D. A. Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis. *Science (Wash. DC)*, 264: 569-571, 1994.
- ¹⁵ Grietje Molema and Arjan W. Griffioen. Rocking the foundations of solid tumor growth by attacking the tumor's blood supply. *Immunology Today* Volume 19, Issue 9, 1 September 1998, Pages 392-394.
- ¹⁶ H Jin1 and J Varner, Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *British Journal of Cancer* (2004) 90, 561 – 565.
- ¹⁷ Peter C. Brooks, Steve Silletti, Tami L. von Schalscha, Martin Friedlander, and David A. Cheresch. Disruption of Angiogenesis by PEX, a Noncatalytic Metalloproteinase Fragment with Integrin Binding Activity. *Cell*, Vol. 92, 391–400, February 6, 1998.
- ¹⁸ Stromblad S, Cheresch DA: Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chem Biol* 3: 881–885, 1996
- ¹⁹ Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA (1994) Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumour regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79:1157-1164.
- ²⁰ Ikuo S., Murata J. Inhibition of tumor angiogenesis by a synthetic cell-adhesive polypeptide containing the arg-gly-asp (RGD) sequence of fibronectin, poly(RGD). *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 668-675 June/July 1990.
- ²¹ Gasparini G., Brooks P. C., Biganzoli E., Vermeulen P. B., Bonoldi E., Dirix L. Y., Ranieri G., Miceli R., Cheresch D. A. Vascular integrin $\alpha(v)\beta 3$: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 4: 2625-2634, 1998
- ²² Peter C. Brooks, Staffan Stromblad, Richard Klemke, Daniel Visscher, Fazlul H. Sarkar and David A. Cheresch. Antiintegrin $\alpha v \beta 3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J. Clin. Invest.* Volume 96, October 1995, 1815-1822
- ²³ Gehlsen KR, Davis GE, Sriramarao P (1992) Integrin expression in human-melanoma cells with differing invasive and metastatic properties. *Clin Exp Metastasis* 10:111-120.
- ²⁴ Marshall J, Hart I. The role of αv -integrins in tumour progression and metastasis. *seminars in CANCER BIOLOGY*, Vol 7, 1996: pp 129–138

-
- ²⁵ Brian P. Eliceiri and David A. Cheresh. The role of α v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest*, May 1999, Volume 103, Number 9, 1227-1230.
- ²⁶ Chabannes Eric; Bernardini Stéphane; Wallerand Hervé; Bittard Hugues; Patard Jean-Jacques. L'angiogenèse dans les tumeurs vésicales: indicateur pronostique et cible thérapeutique. *Commentaire. Progrès en urologie*, 2001, vol. 11, no3, pp. 417-427.
- ²⁷ Arjan W. Griffioen and Grietje Molema. Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation. *Vol. 52, Issue 2, 237-268, June 2000.*
- ²⁸ Grietje Molema, Dirk K. F. Meijer and Lou F. M. H. de Leij. Tumor Vasculature Targeted Therapies. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 55, pp. 1939–1945, 1998.
- ²⁹ Grietje Molema and Arjan W. Griffioen. Rocking the foundations of solid tumor growth by attacking the tumor's blood supply. *Immunology Today*, Volume 19, Issue 9, 1 September 1998, Pages 392-394.
- ³⁰ M. Scalerandi and M. Griffa, Physical Modelling and Simulations of Tumour Growth and Angiogenesis: Predictions and New Hypotheses. *Physica Scripta*. Vol. T118, 179–182, 2005
- ³¹ Brem, S., Brem, H., Folkman, J., et al.: 1976, 'Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous', *Cancer Research* 36, 2807–2812.
- ³² Jerome Gross, Richard G. Azizkhan, Chitra Biswas, Romaine R. Bruns, Dean S. T. Hsieh, Judah Folkman. Inhibition of Tumor Growth, Vascularization, and Collagenolysis in the Rabbit Cornea by Medroxyprogesterone *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 78, No. 2, [Part 2: Biological Sciences] (Feb., 1981), pp. 1176-1180.
- ³³ Kerr J. S., Wexler R. S., Mousa S. A., Robinson C. S., Wexler E. J., Mohamed S., Voss M. E., Devenny J. J., Czerniak P. M., Gudzelak A., Jr., Slee A. M. Novel small molecule α v integrin antagonists: comparative anti-cancer efficacy with known angiogenesis inhibitors. *Anticancer Res*, 19: 959-968, 1999.
- ³⁴ Wadih Arap, Renata Pasqualini, Erkki Ruoslahti. Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model. *SCIENCE*, VOL. 279, 16 JANUARY 1998.
- ³⁵ CP Carron, DM Meyer, JA Pegg, VW Engleman, MA Nickols, SL Settle, WF Westlin, PG Ruminski and GA Nickols. A peptidomimetic antagonist of the integrin α (v) β 3 inhibits Leydig cell tumor growth and the development of hypercalcemia of malignancy. *Cancer Research*, Vol 58, Issue 9 1930-1935

-
- ³⁶ Giancotti F., Mainiero F., Integrin-mediated adhesion and signalling in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1198 (1994) 47-64.
- ³⁷ Renata Pasqualini, Erkki Koivunen, Erkki Ruoslahti. Alphav Integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. *Nature Biotech.* Volume 15, June 1997.
- ³⁸ M.D. Pierschbacher and E. Ruoslahti, Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984), pp. 5985–5988
- ³⁹ E. Ruoslahti, RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12 (1996), pp. 697–715.
- ⁴⁰ Hautanen A.; Gailit J.; Mann D.M.; Ruoslahti E. Effects of modifications of the RGD sequence and its context on recognition by the fibronectin receptor. *J. BIOL. CHEM.* Volume 264, Issue 3, 1989, Pages 1437-1442.
- ⁴¹ Michael D. Pierschbacher and Erkki Ruoslahti, Influence of Stereochemistry of the Sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on Binding Specificity in Cell Adhesion. *The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 262, No. 36, Issue of December 25, pp. 17294-17298.1987.
- ⁴² George D. Hartman, Melissa S. Egbertson, Wasy Halczenko, William L. Laswell, Mark E. Duggan, Robert L. Smith, Adel M. Naylor, Patricia D. Manno, Robert J. Lynch, Guixiang Zhang, Charles T.4. Chang, and Robert J. Gould., Non-Peptide Fibrinogen Receptor Antagonists. Discovery and Design of Exosite Inhibitors. *J. Med. Chem.* 1992,35, 4640-4642.
- ⁴³ Noam Greenspoon Rami Hershkoviz, O Ronen Alon, il David Varon, Boris Shenkman, Gerard Marx, Silvina Federman, i Galina Kapustina, and Ofer Lider. Structural Analysis of Integrin Recognition and the Inhibition of Integrin-Mediated Cell Functions by Novel Nonpeptidic Surrogates of the Arg-Gly-Asp Sequence. *Biochemistry* 1993, 32, 1001-1008.
- ⁴⁴ V. Wayne Engleman, G. Allen Nickols, F. Patrick Ross, Michael A. Horton David W. Griggs, Steven L. Settle, Peter G. Ruminiski, Steven L. Teitelbaum. A Peptidomimetic Antagonist of the $\alpha v \beta 3$ Integrin Inhibits Bone Resorption In Vitro and Prevents Osteoporosis In Vivo. *J. Clin. Invest.* Volume 99, Number 9, May 1997, 2284–2292.
- ⁴⁵ Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Aumailley, M.; Timpl, R. *Eur. J. Biochem.* 1992, 210, 911.
- ⁴⁶ Muller, G.; Gurrath, M.; Kessler, H.; Timpl, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992, 31, 326.
- ⁴⁷ Aumailley, M.; Gurrath, M.; Muller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H. *FEBS Lett.* 1991, 291, 50.

-
- ⁴⁸ Pfaff, M.; Tangemann, B.; Muller, B.; Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H., Timpl, R; Engel, J. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 20233.
- ⁴⁹ Haubner, R.; Gratiyas, R.; Diefenbach, B.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7461.
- ⁵⁰ Bach, A. C.; Espina, J. R.; Jackson, S. A.; Stouten, P. F. W.; Duke, J. L.; Mousa, S. A.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 293.
- ⁵¹ Peishoff, C. E.; Ali, F. E.; Bean, J. W.; Calvo, R.; D'Ambrosio, C. A.; Eggleston, D. S.; Kline, T. P.; Koster, P.; Nicols, A.; Powrs, D.; Romoff, T.; Samanen, J. M.; Stadel, J.; Vasco, J.; Wong, A.; Kopple, K. D. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 3962.
- ⁵² Burgess, K.; Lim, D. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 4520.
- ⁵³ Tran, T.-A.; Matttern, R.-H; Zhu, Q.; Goodman, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 997.
- ⁵⁴ Duggan, M. E.; Fisher, J. E.; Gentile, M. A.; Hartman, G. D.; Hoffman, W. F.; Huff, J. R.; Ihle, N. C.; Krause, A. E.; Leu, T. C.; Nagy, R. M.; Perkins, J. J.; Rodan, G. A.; Rodan, S. B.; Wesolowski, G.; Whitman, D. B. Abstracts of Papers, 211th ACS National Meeting, New Orleans, LA, March 1996; MEDI 234.
- ⁵⁵ Corbett, J. W.; Graciani, N. R.; Mousa, S. A.; DeGrado, W. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 1371.
- ⁵⁶ Gadek, T. R.; McDowell, R. S. Abstracts of Papers, 211th ACS National Meeting, New Orleans, LA, March 1996; MEDI 235.
- ⁵⁷ Hirschmann, R.; Nicolaou, K. C.; Pietranico, S.; Leahy, E. M.; Arison, B.; Cichy, M. A.; Spoons, P. G.; Shakespeare, W. C.; Sprengler, P. A.; Hamley, P.; Smith, A. B.; Reisine, T.; Raynor, K.; Maechler, L.; Donaldson, C.; Vale, W.; Freidinger, R. M.; Cascieri, M. R.; Strader, C. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 12550.
- ⁵⁸ Nicolaou, K. C.; Trujillo, J. I.; Chibale, K. *Tetrahedron* 1997, 53, 8751.
- ⁵⁹ K. C. Nicolaou, John I. Trujillo, Bernd Jandeleit, Kelly Chibale, M. Rosenfeld, B. Diefenbach, D. A. Cheresh and S. L. Goodman. Design, synthesis and biological evaluation of nonpeptide integrin antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 6, Issue 8, August 1998, Pages 1185-1208.
- ⁶⁰ Douglas G. Batt, Joseph J. Petraitis, Gregory C. Houghton, Dilip P. Modi, Gary A. Cain, Martha H. Corjay, Shaker A. Mousa, Peter J. Bouchard, Mark S. Forsythe, Patricia P. Harlow, Frank A. Barbera, Susan M. Spitz,

-
- Ruth R. Wexler, and Prabhakar K. Jadhav. Disubstituted Indazoles as Potent antagonists of the Integrin $\alpha v\beta 3$. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 41-58
- ⁶¹ William J. Pitts, John Wityak,, Joanne M. Smallheer, A. Ewa Tobin, James W. Jetter, Jennifer S. Buynitsky, Patricia P. Harlow, Kimberly A. Solomon, Martha H. Corjay, Shaker A. Mousa, Ruth R. Wexler, and Prabhakar K. Jadhav. Isoxazolines as Potent Antagonists of the Integrin $\alpha v\beta 3$. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 27-40
- ⁶² Anusch Peyman, Volkmar Wehner, Jochen Knolle, Hans Ulrich Stilz, Gerhard Breipohl, Karl-Heinz Scheunemann, Denis Carniato, Jean-Marie Ruxer, Jean-Francois Gourvest, Thomas R. Gadek c and Sarah Bodary. RGD Mimetics Containing a Central Hydantoin Scaffold: $\alpha v\beta 3$ vs $\alpha IIb\beta 3$ Selectivity Requirements. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10 (2000) 179±182
- ⁶³ Leclair Grégoire, Vecteur microparticulaires adhésifs spécifiques des sélectines. Thèse présenté à la faculte des études supérieures. Université de Montreal, 2002.
- ⁶⁴ Thomas W. Ku, William H. Miller, William E. Bondinell, Karl F. Erhard, Richard M. Keenan, Andrew J. Nichols, Catherine E. Peishoff, James M. Samanen, Angela S. Wong, and William F. Huffman. Potent Non-peptide Fibrinogen Receptor Antagonists Which Present an Alternative Pharmacophore. *J. Med. Chem.* 1995,38, 9-12.
- ⁶⁵ Richard M. Keenan, William H. Miller, Chet Kwon, Fadia E. Ali, James F. Callahan, Raul R. Calvo, Shing-Mei Hwang, Kenneth D. Kopple, Catherine E. Peishoff, James M. Samanen, Angela S. Wong, Chuan-Kui Yuan, and William F. Huffman. Discovery of Potent Nonpeptide Vitronectin Receptor ($\alpha v\beta 3$) Antagonists. *J. Med. Chem.* Volume 40, Number 15, 1997.
- ⁶⁶ William H. Miller, William E. Bondinell, Russell D. Cousins, Karl F. Erhard, Dalia R. Jakas, Richard M. Keenan, Thomas W. Ku, Kenneth A. Newlander, Stephen T. Ross, R. Curtis Haltiwanger, Jeremy Bradbeer, Fred H. Drake, Maxine Gowen, Sandra J. Hoffman, Shing-Mei Hwang, Ian E. James, Michael W. Lark, Beata Lechowska, David J. Rieman, George B. Stroup, Janice A. Vasko-Moser, Denise L. Zembryki, Leonard M. Azzarano, Paula C. Adams, Kevin L. Salyers, Brian R. Smith, Keith W. Ward, Kyung O. Johanson, and William F. Huffman. Orally bioavailable nonpeptide vitronectin receptor antagonists with efficacy in an osteoporosis model. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 9 (1999) 1807-1812.
- ⁶⁷ Richard M. Keenan, William H. Miller, M. Amparo Lago, Fadia E. Ali, William E. Bondinell, James F. Callahan, a Raul R. Calvo, Russell D. Cousins, Shing-Mei Hwang, Dalia R. Jakas, Thomas W. Ku, Chet Kwon, a Thomas T. Nguyen, Valerie A. Reader, David J. Rieman, Steven T. Ross, Dennis T. Takata, Irene N. Uzinskas, Catherine C. K. Yuan, and Brian R.

Smith. Benzimidazole Derivatives As Arginine Mimetics In 1,4-Benzodiazepine Nonpeptide Vitronectin Receptor (α V β 3) Antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8 (1998) 3165-3170.

⁶⁸ Richard M. Keenan, M. Amparo Lago, William H. Miller, Fadia E. All, Russell D. Cousins, Leon B. Hall, Shing-Mei Hwang, Dalia R. Jakas, Chet Kwon, Calvert Loudon, Thomas T. Nguyen, Eliot H. Ohlstein, David J. Rieman, Steven T. Ross, James M. Samanen, Brian R. Smith, Jeffrey Stadel, Dennis T. Takata, Lynne Vickery, Catherine C. K. Yuan, and Tian-Li Yue. Discovery of an imidazopyridine-containing 1,4-benzodiazepine Nonpeptide vitronectin receptor (α V β 3) antagonist with efficacy in a restenosis model. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8 (1998) 3171-3176.

⁶⁹ Nicolas Moitessier, Christophe Henry, Bernard Maigret, and Yves Chapleur. Combining Pharmacophore Search, Automated Docking, and Molecular Dynamics Simulations as a Novel Strategy for Flexible Docking. Proof of Concept: Docking of Arginine-Glycine-Aspartic Acid-like Compounds into the α V β 3 Binding Site. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 4178-4187.

⁷⁰ Luciana Marinelli, Antonio Lavecchia, Kay-E. Gottschalk, Ettore Novellino, and Horst Kessler. Docking Studies on α V β 3 Integrin Ligands: Pharmacophore Refinement and Implications for Drug Design. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 4393-4404.

⁷¹ Gane, P. J. and Dean, P. M., "Recent advances in structure-based rational drug design", *Current Opinion in Structural Biology*, 2000, 10, 401-404.

⁷² http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/

⁷³ G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach and R. Taylor, Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking *J. Mol. Biol.*, 267, 727-748, 1997

⁷⁴ J. W. M. Nissink, C. Murray, M. Hartshorn, M. L. Verdonk, J. C. Cole and R. Taylor, A new test set for validating predictions of protein-ligand interaction., *Proteins*, 49(4), 457-471, 2002

⁷⁵ M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshorn, C. W. Murray and R. D. Taylor, Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD., *Proteins*, 52, 609-623, 2003

⁷⁶ J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P. E. Bourne, The Protein Data Bank H. M. Berman., *Nucleic Acids Res.*, 28, 235-242, 2000

⁷⁷ Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, Jr., K.M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., and Kollman, P.A., "A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules", *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 5179-5197.

- ⁷⁸ W. I. F. David, K. Shankland, N. Shankland, Routine determination of molecular crystal structures from powder diffraction data. *Chem. Commun.*, 931-932, 1998
- ⁷⁹ Crystal Structure Of The Extracellular Segment Of Integrin Avb3 In Complex With An Arg-Gly-Asp Ligand, available at <http://www.rcsb.org/pdb/>. Structure: 1L5G, Authors: J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, Exp. Method: X-ray Diffraction , Resolution: 3.20 Å, Deposited: 06-Mar-2002.
- ⁸⁰ Jian-Ping Xiong, Thilo Stehle, Beate Diefenbach, Rongguang Zhang, Reinhardt Dunker, David L. Scott, Andrzej Joachimiak, Simon L. Goodman, M. Amin Arnaout. Crystal structure of the extracellular segment of Integrin $\alpha V\beta 3$. *SCIENCE VOL 294 12 OCTOBER 2001*.
- ⁸¹ Jian-Ping Xiong, Thilo Stehle, Rongguang Zhang, Andrzej Joachimiak, Matthias Frech, Simon L. Goodman, M. Amin Arnaout. Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin $\alpha V\beta 3$ in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. *SCIENCE VOL 296 5 APRIL 2002*.
- ⁸² Images générées avec le logiciel VIDA®, fourni par OpenEye Scientific Software. La sources des données structurales est le structure cristalline du segment extracellulaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ complexé avec le ligand RGD, disponible dans le site <http://www.rcsb.org/pdb/>.
- ⁸³ Luciana Marinelli, Antonio Lavecchia, Kay E. Gottschalk, Ettore Novellino and Horst Kessler Docking Studies on $\alpha v\beta 3$ Integrin ligands: Pharmacophore Refinement and Implications for drug design. *J. Med Chem.* 2003, 46, 4393-4404.
- ⁸⁴ Muegge, I., and Martin, Y., "A General and Fast Scoring Function for Protein-Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach", *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 791-804.
- ⁸⁵ Muegge, I., "The Effect of Small changes in Protein Structure on Predicted Binding Modes of Known Inhibitors of Influenza Virus Neuraminidase: PMF-scoring in Dock4", *Med. Chem. Res.*, 1999, 9, 490- 500.
- ⁸⁶ Meugge, I., Martin, Y., Hajduk, P. J., and Fesik, S. W., "Evaluation of PMF Scoring in Docking Weak Ligands to the FK506 Binding Protein", *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 2498-2503;
- ⁸⁷ Ha, S., Andreani, R., Robbins, A., and Meugge, I., "Evaluation of docking/scoring pproaches: A comparative study based onMMP3 inhibitors", *J. Comp.-Aided Mol. Design*, 2000, 14, 435-48
- ⁸⁸ Muegge, I. and Rarey, M., "Small Molecule Docking and Scoring", *Rev. in Comp. Chem.*, 2001, 17, 1-60
- ⁸⁹ Lee M., Lown W., Synthesis of (4S) and (4R)-Methyl 2-amino-1-pyrroline-5-carboxylates and their application to the preparation of (4S)-(+)- and 4(R)-(-)-dihydrokikumycin B. *J. Org. Chem.* 1987, 52, 5717-5721 (Reference pour l'hydrogenation catalitique iii - Schéma 1)

-
- ⁹⁰ Sleath P., Noar J., Eberlein G., Bruce T. Synthesis of 7,9-didecarboxymethoxatin (4,5-dihydro-4,5-dioxo-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2-carboxylic acid) and comparison of its chemical properties with those of methoxatin and analogous o-quinones. Model studies directed toward the action of PQQ requiring bacterial oxidoreductases and mammalian plasma amine oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107, 3328-3338. (Reference pour l'hydrogenation catalitique iii - Schéma 1)
- ⁹¹ Burdeska K., Uber 4,6-disubstituierte 2-aminophenole, *Synthesis*, 940, (1982)
- ⁹² Ian P. Andrews, Richard J. Atkins, Gary F. Breen, John S. Carey, Michael A. Forth, David O. Morgan, Amin Shamji, Andrew C. Share, Stephen A. C. Smith, Timothy C. Walsgrove, and Andrew S. Wells. The Development of a Manufacturing Route for the GPIIb/IIIa Receptor Antagonist SB-214857-A. Part 1: Synthesis of the Key Intermediate 2,3,4,5-Tetrahydro-4-methyl-3-oxo-1 H-1,4-benzodiazepine-2-acetic Acid Methyl Ester, SB-235349. *Organic Process Research & Development* 2003, 7, 655-662
- ⁹³ Richard J. Atkins, Adam Banks, Richard K. Bellingham, Gary F. Breen, John S. Carey, Stephen K. Etridge, Jerome F. Hayes, Nigel Hussain, David O. Morgan, Paul Oxley, Stephen C. Passey, Timothy C. Walsgrove, and Andrew S. Wells. The Development of a Manufacturing Route for the GPIIb/IIIa Receptor Antagonist SB-214857-A. Part 2: Conversion of the Key Intermediate SB-235349 to SB-214857-A. *Organic Process Research & Development* 2003, 7, 663-675
- ⁹⁴ Anderson, E. M.; Larrson, K. M.; Kirk, O. *Biocatal. Biotransform.* 1998, 16, 181. *BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATION* -Formerly published as *BIOCATALYSIS*. ISSN 1024-2422
- ⁹⁵ Haslam E., Recent developments in methods for the esterification and protection of the carboxyl group. *Tetrahedron*, Volume 36, Issue 17, 2409-2433 (1980) (Reference pour l'esterification ix - Schéma 1)
- ⁹⁶ Hassnet A., Alexanian V., Direct room temperature esterification of carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* No. 46, pp 4475-4478, 1978.
- ⁹⁷ Buckley B.R., Katritzky, A. R., Taylor, R. J. K. Carboxylic esters and lactones. *Comprehensive organic functional group transformations II*. Elsevier, V5, p127, 2005.
- ⁹⁸ Gibson F. S., Park M. S., Rapoport H., Bis[[4-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolyl)]methyl]-carbodiimide (BDDC) and Its Application to Residue-Free Esterifications, Peptide Couplings, and Dehydrations. *J. Org. Chem.*, 59, 7503, 1994.

-
- ⁹⁹ Timothy C. Walsgrove, Lawson Powell and Andy Wells, A Practical and Robust process to Produce SB-214857, Lotrafiban, ((2S)-7-(4,4-Bipiperidinylcarbonyl)-2,3,4,5-tetrahydro-4-methyl-3-oxo-1H-1,4-Benzodiazepine-2-acetic Acid) Utilising an Enzymic Resolution as the Final Step. *Organic Process Research & Development* 2002, 6, 488-491
- ¹⁰⁰ International Patent Application, WO 97 24336, Process For The Aminocarbonylation Of Benzazepines And Benzodiazepines, Publication 10-07-1997.
- ¹⁰¹ Bernd Kauoo, Klaus Sailer. Imidazo[1,2-e]triazepine derivatives: First representatives of a new heterocyclic system. *Angew. Chem. Int. Engl.* 29 (1990) No. 8
- ¹⁰² International Patent Application, WO 96 00730, Vitronectin Receptor Antagonists, Publication 11-01-1996.
- ¹⁰³ International Patent Application, WO 98 15278, Method For Stimulating Bone Formation. Publication 16-04-1998.
- ¹⁰⁴ Brindaban C. Ranu, Sanjay Bhar, Dealkylation of Ethers, a Review. *Organic Preparations and Procedures International. The New Journal for Organic Synthesis. Table of Contents Volume 28, 1996, 373.* (Référence pour la deprotection xiii- Schéma 3)
- ¹⁰⁵ H. Niwa, T. Hida and K. Yamada. A new method for cleavage of aliphatic methyl ethers. *Tetrahedron Lett.* Volume ALOGPS 2.1 22, Issue 42, 4239-4240, 1981.
- ¹⁰⁶ La solubilité des molécules organiques (produits 16 et 17) à été prédite et confirmée par l'utilisation de deux logiciels qui calculent la solubilité des molécules organiques dans l'eau. Interactive Analysis (<http://www.logp.com>) et Virtual Computational Chemistry Laboratory (<http://146.107.217.178/lab/alogps/start.html>) présentent des sites d'internet (Log P et ALOGPS 2.1) où il est possible de prédire la solubilité des substances organiques dans l'eau à partir des données des structures moléculaires en utilisant technologies de algorithmes génétiques.
- ¹⁰⁷ Lorsque le produit 17 a été obtenu, il y a eu des problèmes logistiques pour effectuer les essais avec l'équipe de GPC (déménagement de la faculté et indisponibilité d'une colonne appropriée dans notre laboratoire). Cependant, ces preuves pourront être effectuées avec des échantillons qui seront fabriqués pour continuer le projet de recherche.
- ¹⁰⁸ Nicosia RF, Ottinetti A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta: A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 1990;63:115-122.
- ¹⁰⁹ Masson V, Ve, Devy L, Grignet-Debrus C, Bernt S, Bajou K, Blacher S, Roland G, Chang Y, Fong T, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A. Mouse Aortic Ring Assay: A New Approach of the Molecular Genetics of Angiogenesis. *Biol Proced Online.* 2002 Oct 28;4:24-31.