

50376
1996
464
1

ANNEE 1996

THESE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Spécialité :

Chimie Organique et Macromoléculaire

présentée

par

Anne MAURIN

CONCEPTION, SYNTHÈSE ET
EVALUATION PHARMACOLOGIQUE
D'ANTAGONISTES NON PEPTIDIQUES
DES RECEPTEURS DE L'ANGIOTENSINE II

VOLUME I / II

Soutenu le 19 juin 1996

Membres du jury :

M. GRANDCLAUDON	Président
M. S. GOLDSTEIN	Rapporteur
M. S. RICHARD	Rapporteur
M. D. LESIEUR	Directeur de recherches
M. J.P. HENICHART	Directeur de recherches



Je tiens à remercier les membres du jury :

Monsieur le Docteur S. GOLDSTEIN

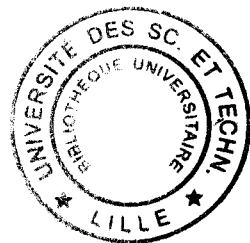
Monsieur le Professeur GRANDCLAUDON

Monsieur le Professeur J.P. HENICHART

Monsieur le Professeur D. LESIEUR

Monsieur le Docteur S. RICHARD

qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.



gu-20000620

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à :

Monsieur Serge RICHARD, Président Directeur Général du CERB pour la confiance qu'il m'a témoigné en me proposant d'effectuer cette thèse dans le cadre d'une convention CIFRE et pour m'avoir offert l'opportunité de découvrir le monde industriel.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre HENICHART, pour m'avoir accueillie dans son équipe en me confiant ce sujet de recherche et pour avoir initié la collaboration avec UCB Secteur Pharma.

Monsieur le Professeur Daniel LESIEUR, Directeur de l'Institut de Chimie Thérapeutique de Lille pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son laboratoire et pour sa collaboration active à ce travail.

Monsieur Pascal CHAMPEROUX, Responsable du Département Pharmacologie au CERB, qui a eu la rude tâche d'initier un ingénieur chimiste à la Pharmacologie.

Messieurs Jean-Pierre GEERTS et Solo GOLDSTEIN de la firme UCB, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et les conseils qu'ils m'ont donnés.

Monsieur Raymond HOUSSIN, pour sa disponibilité et les conseils qu'il m'a prodigués.

A tous mes collègues de l'ICPL et plus particulièrement à mes amis de l'équipe "Angiotensine II", les chimistes : "Grand Chef" Saïd YOUS, Emmanuelle MEULON, Domitille COLLE, Habib ABDELHAOUI et Bertrand LE BOURDENEC qui ont participé aux travaux de synthèse; les pharmacologues : Nathalie MESTDAGH et Jean François GOOSSENS qui ont réalisé les études de binding.

A toute l'équipe du CERB qui m'a aidé dans la réalisation de la partie pharmacologique de ce travail.

A toutes les personnes qui ont effectué les analyses chimiques à la faculté de Pharmacie de Lille et à UCB.

A mes parents,

A mon frère,

A mes grand-parents.

PREFACE

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le cadre d'une Convention CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche). L'objectif de cette convention est "de permettre aux entreprises qui embauchent de jeunes ingénieurs ou cadres débutants, de les affecter à un premier poste de Recherche ou de Développement ayant *un réel caractère formateur*. Ce poste correspond à un travail de Recherche ou de Développement dont les caractéristiques sont les suivantes :

- il est réalisé en collaboration directe avec un ou plusieurs laboratoires;
- le laboratoire impliqué dans le projet de l'Entreprise est extérieur à celle-ci et se voit confier par l'Entreprise la responsabilité de l'encadrement scientifique direct des travaux du jeune ingénieur ou cadre;
- ce travail est effectué dans le cadre d'*une formation par la recherche*.

Les Conventions CIFRE correspondent à *un début de carrière en entreprise*, qui doit donc donner lieu à *une réelle expérience professionnelle*. En conséquence, les travaux prévus ne devront pas, en principe, être réalisés à plein temps à l'extérieur de l'entreprise. Si cependant ce devait être le cas, des périodes devront être prévues, au cours desquelles le jeune cadre sera à plein temps dans son entreprise, pour y *acquérir une réelle connaissance de celle-ci et une expérience professionnelle effective*." (extrait du dossier de présentation de la convention CIFRE)

Trois partenaires ont donc été impliqués dans ce projet :

- une entreprise : le Centre de Recherches Biologiques (CERB)
- un laboratoire : l'Institut de Chimie Pharmaceutique de l'Université de Lille II (ICPL)
- un jeune diplômé : moi-même, ingénieur chimiste de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille (ENSCL).

Un quatrième partenaire est venu s'ajouter à cette collaboration, l'entreprise UCB Secteur Pharma, le thème des travaux appartenant à un programme de recherche exploratoire mené en collaboration avec l'ICPL.

Les recherches qui m'ont été confiées appartiennent au domaine de la Chimie Thérapeutique, c'est à dire qu'elles avaient pour objectif la conception et la synthèse de molécules originales en vue de leur évaluation pharmacotoxicologique. Les deux premiers volets, conception et synthèse, ont été réalisés au sein du Département Pharmacochimie de l' ICPL de septembre 1992 à septembre 1994. Le troisième volet, l'évaluation pharmacologique, a été réalisé dans les laboratoires du CERB de septembre 94 à décembre 95.

ABREVIATIONS

AA	Acide arachidonique	IP ₃	Inositol triphosphate
AC	Adénylate cyclase	iv	intraveineuse
ACE	Enzyme de conversion de l'Ang I	LH	Luteinizing Hormone
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique	LHRH	LH Releasing Hormone
Ang	Angiotensine	MEM	Méthoxyéthoxyméthyle
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor	MOM	Méthoxyméthyle
DAG	Diacylglycérol	NCS	N-chlorosuccinimide
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide	PDGF	Platelet Derived Growth Factor
DCU	Dicyclohexylurée	PLC, PLD, PLA ₂	Phospholipases C, D ou A ₂
DMF	Diméthylformamide	PKC	Phosphokinase C
DTT	Dithiothreitol	PPA	Acide polyphosphorique
ED _{30, 50}	Dose efficace 30 ou 50	PTPase	Phosphotyrosine phosphatase
F(mut)	Facteur multiplicateur	po	<i>per os</i>
GABA	Acide gamma aminobutyrique	RHR	Rat hypertendu rénal
GC _p	Guanylate cyclase particulaire	RSH	Rat spontanément hypertendu
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique	SRA	Système rénine-angiotensine
HVG	Hypertrophie ventriculaire gauche	TEA	Triéthylamine
IC	Insuffisance cardiaque	TFA	Acide trifluoroacétique
IC ₅₀	Concentration inhibitrice 50	TGFβ	Tumor Growth Factor β
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion	THF	Tétrahydrofuranne
1D	1 dimension		
2D	2 dimensions		

Acides aminés

A	Ala	Alanine	M	Met	Méthionine
C	Cys	Cystéine	N	Asn	Asparagine
D	Asp	Acide aspartique	P	Pro	Proline
E	Glu	Acide glutamique	Q	Gln	Glutamine
F	Phe	Phénylalanine	R	Arg	Arginine
G	Gly	Glycine	S	Ser	Sérine
H	His	Histidine	T	Thr	Thréonine
I	Ile	Isoleucine	V	Val	Valine
L	Leu	Leucine	W	Tryp	Tryptophane
K	Lys	Lysine	Y	Tyr	Tyrosine

SOMMAIRE

VOLUME I

1. INTRODUCTION	1
2. GENERALITES	
2.1 LE SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE	5
2.1.1. Biosynthèse et métabolisme de l'Ang II	5
2.1.1.1. SRA circulant	5
2.1.1.2. SRA tissulaire	7
2.1.2. Les récepteurs de l'Ang II	9
2.1.2.1. Hétérogénéité des récepteurs	9
2.1.2.2. Localisation des récepteurs de l'Ang II	9
2.1.2.2.1. Localisation des récepteurs AT ₁	9
2.1.2.2.2. Localisation des récepteurs AT ₂	11
2.1.2.3. Clonage et systèmes de transduction des récepteurs de l'Ang II	11
2.1.2.3.1. Récepteurs AT ₁	11
2.1.2.3.2. Récepteurs AT ₂	14
2.1.2.4. Nomenclature des récepteurs de l'Ang II	16
2.1.3. Propriétés physiologiques de l'Ang II	18
2.1.3.1. Ang II et équilibre hémodynamique	18
2.1.3.1.1. Actions vasopressives de l'Ang II	18
2.1.3.1.2. Actions de l'Ang II sur le coeur	18
2.1.3.1.3. Actions régulatrices de fonctions cellulaires de l'Ang II	19
2.1.3.2. L'Ang II et croissance cellulaire	22
2.1.3.3. Autres actions de l'Ang II	24
2.1.3.4. Contrôle des effets de l'Ang II	24
2.1.4. Comment et pourquoi bloquer le SRA ?	26
2.1.4.1. Les inhibiteurs du SRA	26
2.1.4.1.1. Les inhibiteurs de l'ACE ou IEC	26
2.1.4.1.2. Les inhibiteurs de la rénine	26
2.1.4.1.3. Les antagonistes des récepteurs de l'Ang II	27

2.1.4.2. Perspectives thérapeutiques pour les antagonistes des récepteurs de l'Ang II	27
2.1.4.2.1. L'hypertension	28
2.1.4.2.2. L'insuffisance cardiaque	28
2.1.4.2.3. Les ischémies , infarctus et arythmies myocardiques	29
2.1.4.2.4. Les processus sténotiques et thrombotiques (resténose et athérosclérose)	29
2.1.4.2.5. Les maladies rénales	31
2.2 LES LIGANDS PEPTIDIQUES DES RECEPTEURS DE L'ANG II	32
2.2.1. Relations structure-activité des agonistes	32
2.2.2. Relations structure-affinité des antagonistes	36
2.2.2.1. Les antagonistes de type I	36
2.2.2.2. Les antagonistes de type II	36
2.3. LES LIGANDS NON PEPTIDIQUES DES RECEPTEURS DE L'ANG II	38
2.3.1. Les antagonistes des récepteurs AT ₁ de l'Ang II	38
2.3.1.1 Le DuP 753 et le SKF 108566	38
2.3.1.1.1. Conception du DuP 753	41
2.3.1.1.2. Conception du SKF 108566	42
2.3.1.1.3. Nouvelles superpositions des antagonistes avec l'Ang II	44
2.3.1.1.4. Antagonistes compétitifs et non compétitifs	46
2.3.1.2. Les antagonistes inspirés du DuP 753	47
2.3.1.2.1. Les antagonistes conservant la structure biphényle	48
2.3.1.2.1.1 Modification des substituants de l'imidazole	48
2.3.1.2.1.2. Remplacement de l'imidazole par d'autres hétérocycles	50
2.3.1.2.2. Les antagonistes avec modification du biphényltétrazole	60
2.3.1.2.2.1. Modification de la structure biphényle	60
2.3.1.2.2.2. Bioisostères du tétrazole	63
2.3.1.3. Les antagonistes triacides	64
2.3.2. Les ligands des récepteurs AT ₂ de l'Ang II	66
2.3.2.1. Conception du PD 123319	66
2.3.2.2. Les nouveaux antagonistes des récepteurs AT ₂	67
2.3.2.2.1. Les dérivés tétrahydroisoquinoléiques	67
2.3.2.2.2. Les dérivés pipéraziniques	67

2.3.3. Les antagonistes non sélectifs des récepteurs de l'Ang II	68
2.3.3.1. Elaboration des premiers antagonistes non sélectifs AT ₁ /AT ₂	68
2.3.3.2. Les triazolinones	70
2.3.3.3. Les imidazoles	73
2.3.3.4. Les imidazopyridines	74
2.3.4. Les agonistes non peptidiques des récepteurs de l'Ang II	72
2.4. PHARMACOPHORE ET SITES DE LIAISON DES LIGANDS DES RECEPTEURS DE L'ANGII	76
2.4.1. Modèle hypothétique du pharmacophore des ligands des récepteurs de l'Ang II	76
2.4.2. Etudes de mutagenèse dirigée des récepteurs AT ₁	83
2.4.3. Modèles hypothétiques des sites de liaison des ligands des récepteurs de l'Ang II	89
2.4.3.1. Site de fixation de l'Ang II	90
2.4.3.2. Site de fixation des ligands non peptidiques de l'Ang II	92
3. CONCEPTION	96
MOLECULES ORIGINALES INSPIREES DE LA CONFORMATION "SCORPION" DE L'ANG II	99
4. SYNTHESSES CHIMIQUES	
4.1. SYNTHESE DE DEUX ANTAGONISTES DE REFERENCE : LE DUP 753 ET LE PD 123177	108
4.1.1. Synthèse du DuP 753	109
4.1.1.1. Synthèse des matières premières	110
4.1.1.1.2. Préparation du 2-butyl-5(4)-chloro-4(5)-hydroxyméthylimidazole 4	110
4.1.1.1.3. Synthèse des substituants biphényles 23 et 24	112
4.1.1.2. Synthèse du composé 8 ou DuP 753	115
4.1.2. Synthèse du PD 123177	119
4.1.2.1. Synthèse du composé 28	120
4.1.2.2. Synthèse du composé 30	121
4.1.2.3. Synthèse du composé final 34 ou PD 123177	123
4.1.2.4. Stéréospécificité de la synthèse	124

4.2. SYNTHÈSE DES MOLECULES ORIGINALES INSPIREES DE LA CONFORMATION "SCORPION" DE L'ANG II 125

4.2.1. Synthèse des 4-(2-alkoxybenzyl)-1-benzyl imidazoles	125
4.2.1.1. Synthèse des 4-(2-alkoxybenzyl)imidazoles 47	127
4.2.1.2. Synthèse du substituant indolique : 3-cyanométhyl-5-halogénométhyl indole	133
4.2.1.3. Alkylation des synthons 4-(2-alkoxybenzyl) imidazoles 47 par les substituants aromatiques-acides	139
4.2.2. Synthèse des (2-alkoxyphényl)-[(1-benzyl) imidazol-4-yl] cétones	142
4.2.3. Identification des isomères de position	146
4.2.3.1. Etude des isomères 4- et 5-(butoxybenzyl)-1-[(2'-cyanobiphényl-4-yl)méthyl] imidazoles 67a_{1,4} et 67a_{1,5}	147
4.2.3.2. Etude des isomères (2-benzyloxyphényl)-[1-(4-carboxybenzyl)imidazol-4 et 5-yl] cétones 80a_{1,4} et 80a_{1,5}	160
4.2.3.3. Conclusion	172
4.2.4. Synthèses régiosélectives	174
4.2.4.1. Première approche d'alkylation régiosélective envisagée	174
4.2.4.2. Synthèse du 2-butyl-4-chloro-5-(2-hydroxybenzyl)-1-[[2'-(1H-tétrazol-5-yl)biphényl-4-yl)méthyl] imidazole 90	176

5. EVALUATION PHARMACOLOGIQUE

5.1. GENERALITES	178
5.1.1. Etudes de liaison (binding)	178
5.1.1.1. Notions de liaison spécifique et liaison non spécifique	178
5.1.1.2. Etude des caractéristiques de la liaison d'un radioligand par expériences de saturation	180
5.1.1.3. Etude des caractéristiques de la liaison d'un ligand froid par expériences de compétition	181
5.1.2. Etudes fonctionnelles	182
5.1.2.1. Notions d'agonistes et d'antagonistes	182
5.1.2.1.1. Définitions	182
5.1.2.1.2. Les agonistes	183
5.1.2.1.3. Les antagonistes	184

5.2. MODELES DEVELOPPES POUR L'EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DES MOLECULES SYNTHETISEES	185
5.2.1. Screening <i>ex vivo</i>	185
5.2.1.1. Screening réceptologique	185
5.2.1.1.1. Binding des récepteurs AT ₁	186
5.2.1.1.2. Binding des récepteurs AT ₂	188
5.2.1.2. Screening fonctionnel : test sur organe isolé	189
5.2.2. Screening <i>in vivo</i>	193
5.2.2.1 Test d'observation neurocomportemental d'IRWIN	193
5.2.2.2 Screening cardiovasculaire : effet antihypertenseur chez le rat hypertendu rénal (RHR) vigile	193
5.2.3. Stratégie pour l'évaluation pharmacologique des molécules synthétisées	196
 6. RESULTATS-DISCUSSION	
6.1. MOLECULES INSPIREES DE LA CONFORMATION "SCORPION" : 4- ET 5-(2-ALKOXYBENZYL)-1-BENZYL-IMIDAZOLES ET (2-ALKOXYPHENYL)- [(1-BENZYL)-IMIDAZOL-4 ET 5-YL) CETONES	199
6.2. NOUVELLE HYPOTHESE DE TRAVAIL ET NOUVELLE STRUCTURE ORIGINALE D'ANTAGONISTES NON PEPTIDIQUES DES RECEPTEURS DE L'ANG II	202
 7. CONCLUSION	203
 8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	206

VOLUME II

PARTIE EXPERIMENTALE

Sommaire

Chimie

Pharmacologie

INTRODUCTION

Le système rénine-angiotensine ou SRA est reconnu aujourd'hui comme l'un des principaux systèmes régulateurs des fonctions cardiovasculaires et rénales de l'organisme. Avec d'autres systèmes neuronaux et hormonaux comme le système nerveux sympathique, la vasopressine, les kinines, les prostaglandines, les peptides natriurétiques, l'oxyde nitrique et l'endothéline, le SRA participe au contrôle de la pression artérielle.

Les composants de la cascade biologique du SRA sont : la rénine, sécrétée par les reins, l'angiotensinogène, synthétisé par le foie et qui est converti sous l'action de la rénine en un décapeptide, l'angiotensine I ou Ang I. L'Ang I, peptide inactif, est clivé en un octapeptide, l'angiotensine II ou Ang II sous l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou ACE, enzyme répartie de façon ubiquitaire dans l'organisme mais dont une forte concentration est présente dans les poumons.

L'Ang II, Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, hormone douée de propriétés vasopressives très puissantes est la principale substance active du SRA. Elle agit en stimulant des récepteurs membranaires et induit un grand nombre d'effets physiologiques comme la vasoconstriction, la sécrétion d'aldostérone, la libération de catécholamines par les surrénales, la stimulation du système nerveux sympathique, la rétention hydrosodée, la sécrétion de vasopressine et même la croissance cellulaire...

Dates	Découvertes
1898	démonstration de l'existence d'une substance vasopressive dans des extraits de reins
1956-1957	isolement et synthèse de l'octapeptide "Ang II"
1971	découverte de la Saralazine, premier antagoniste peptidique des récepteurs de l'Ang II
1977	découverte du Captopril, premier IEC non peptidique
1982	découverte par Furukawa de la structure N-benzylimidazole et des premiers antagonistes non peptidiques des récepteurs de l'Ang II
1988-90	découverte du Losartan (DuP 753), antagoniste non peptidique leader
1989	démonstration de l'existence de sous-types de récepteurs de l'Ang II : AT ₁ , AT ₂
1991	clonage des récepteurs AT ₁
1993	clonage des récepteurs AT ₂

Cent ans de recherches sur le SRA
(d'après Timmermans et al., 1993 et références citées)

Pour arriver à ce niveau de connaissance du SRA, cent ans se sont écoulés à compter de la découverte de la rénine à la fin du siècle dernier. Plusieurs découvertes importantes ont jalonné ce siècle de recherches comme l'identification de l'angiotensine II, tout d'abord appelée hypertensine dans les années 1950. Entre temps, le lien entre hypertension et SRA s'est précisé et les années 1950-60 marquent le début d'une prise de conscience par les chercheurs de l'intérêt que pourraient avoir des substances capables de bloquer le SRA sur un plan fondamental, mais aussi et surtout dans le traitement de l'hypertension.

La découverte du Captopril, inhibiteur de l'ACE (IEC) en 1977 constitue la première avancée majeure dans le domaine des inhibiteurs du SRA. Très rapidement le Captopril et d'autres IEC ont montré tous les bénéfices que peut apporter une inhibition du SRA. Prescrits dans un premier temps dans les cas d'hypertensions rénales sévères, leur champ d'applications s'est vite étendu aux autres formes d'hypertension et à d'autres pathologies comme l'insuffisance cardiaque. Les IEC font partie à l'heure actuelle des traitements de première intention de l'hypertension aux côtés des diurétiques, des β bloquants et des inhibiteurs des canaux calciques. Récemment, des effets bénéfiques ont été montrés pour les IEC dans le traitement de certaines complications dues à l'hypertension. Par exemple, ils abaissent la mortalité des patients suite à un infarctus cardiaque et diminuent l'hypertrophie ventriculaire gauche (études cliniques SAVE, CONSENSUS (Timmis et al., 1994)). A l'avenir, les IEC sont appelés à occuper une place encore plus importante dans le traitement des maladies cardiovasculaires, car en plus de leur capacité à normaliser les chiffres tensionnels, ils sont susceptibles d'atténuer les complications liées à l'hypertension artérielle (remodelage cardiovasculaire, dysfonctionnements rénaux et cardiaques...).

Néanmoins, un inconvénient est rencontré avec les IEC, leur action n'est pas spécifique au SRA, l'ACE intervenant notamment dans la dégradation de la bradykinine. Les bénéfices des IEC liés à leur action sur d'autres systèmes que le SRA ne sont pas encore bien évalués. En revanche, il est reconnu que cette non spécificité est à l'origine de certains effets secondaires dont le principal est l'apparition d'une toux sèche. Pour cette raison, la rénine, enzyme spécifique au SRA et les récepteurs de l'Ang II sont devenus des cibles importantes pour le développement de nouveaux inhibiteurs du SRA.

Les premiers antagonistes des récepteurs de l'Ang II ont été des dérivés peptidiques comme la Saralazine [Sar¹, Val⁵, Ile⁸] Ang II, dont l'intérêt thérapeutique est limité à cause de leur activité agoniste partielle, de leur courte durée d'action et de leur faible biodisponibilité orale.

En 1982, la parution dans deux brevets de dérivés du N-benzylimidazole qui présentent une affinité pour les récepteurs de l'Ang II certes faible, mais sélective et qui sont dénués d'activité agoniste résiduelle marque le début d'une recherche intense d'antagonistes non peptidiques. Ces travaux atteignent leur apogée avec l'élaboration du DuP 753 ou Losartan en 1990-91, seul antagoniste non peptidique commercialisé à ce jour sous le nom de COZAAR[®]. Depuis, une multitude de nouveaux antagonistes a été synthétisée. En plus de leur intérêt comme agents thérapeutiques, ces dérivés sont de formidables outils pharmacologiques et ils ont permis de

progresser encore plus loin dans la connaissance du SRA, avec notamment la mise en évidence de différents sous-types de récepteurs de l'Ang II : AT₁, AT₂. Une nouvelle progression a été réalisée avec le clonage de ces deux récepteurs en 1991 et 1993. A l'heure actuelle, les études de mutagenèse dirigée apportent de nombreuses informations sur les interactions ligand-récepteur qui vont aboutir certainement à la détermination du ou des sites de liaison des différents ligands (agonistes, antagonistes, peptidiques ou non) sur ces récepteurs. Cette découverte marquera une nouvelle étape importante dans la connaissance du SRA et devrait ouvrir la voie à l'élaboration de nouveaux ligands encore plus affins, plus sélectifs...

Le SRA n'a pas révélé tous ses secrets. De nombreuses questions restent encore sans réponse :

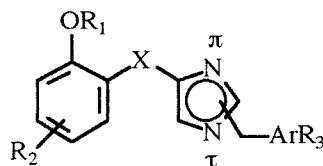
- pourquoi existe-t-il un SRA circulant et des SRA tissulaires? Quels rôles jouent-ils les uns par rapport aux autres? Comment un tissu cible peut-il faire la distinction entre l'Ang II circulante et celle produite localement? Quels facteurs régulent la génération d'Ang II par les tissus?
- quels sous-types de récepteurs de l'Ang II sont présents chez l'homme? Quel est le rôle physiologique de chacun d'eux? Quelles conséquences peut avoir la surstimulation d'un sous-type de récepteur suite au blocage d'un autre?
- quel est le rôle exact de l'Ang II dans les phénomènes d'hypertrophie, d'hyperplasie cellulaires?

Toutes ces interrogations et la perspective de nouvelles applications thérapeutiques très prometteuses comme la resténose, responsable de 30% des échecs rencontrés après une angioplastie, font que la recherche de nouveaux inhibiteurs du SRA est en pleine effervescence.

En ce qui nous concerne, nous avons choisi comme cible pour bloquer le SRA les récepteurs de l'Ang II. Pourquoi ce choix et pas celui d'inhibiteurs de la rénine ou de l'ACE? Comme nous l'avons vu, l'ACE n'est pas spécifique du SRA, d'où des risques d'effets secondaires. Il existe de plus des voies de synthèse détournées de l'Ang II qui n'impliquent ni la rénine, ni l'ACE. Avec des inhibiteurs de ces enzymes, il est donc impossible d'inhiber totalement le SRA. Enfin par le blocage de ces enzymes, l'action sur le SRA est assez "grossière", on bloque la production d'Ang II et donc l'ensemble de ses effets. Avec des antagonistes des récepteurs de l'Ang II, l'action sur le SRA peut être beaucoup plus fine. On peut par exemple avec l'emploi d'un antagoniste sélectif d'un sous-type particulier obtenir une sélectivité du tissu cible ou de l'action de l'Ang II à inhiber.

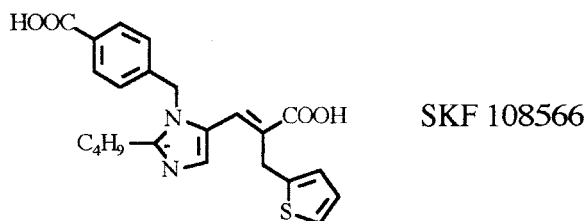
Une particularité de la recherche des antagonistes de l'Ang II est l'approche rationnelle qui a été suivie pour leur élaboration. La découverte du DuP 753, antagoniste "leader" est un merveilleux exemple. Ce composé est né de la découverte par la firme Takeda de la structure N-benzylimidazole et de la volonté des chercheurs de la firme Du Pont de copier à partir de cette structure non peptidique celle de l'Ang II. Par une approche identique, nous avons cherché à superposer la structure N-benzylimidazole sur une conformation particulière de l'Ang II décrite

par Moore et Matsoukas, appelée conformation "scorpion" (Moore et al., 1985b; Matsoukas et al., 1990). Un squelette original : 1-benzyl-4-(2-alkoxybenzyl)imidazole nous est alors apparu intéressant et plusieurs points de pharmacomodulation ont été envisagés.



X = CH₂, CHOH, CO
 R₁ = H, C_nH_{2n+1}, CH₂C₆H₅...
 R₂ = H, C_nH_{2n+1}
 ArR₃ : ensemble acide - aromatique

Parallèlement, une deuxième famille de composés a été élaborée au sein du laboratoire et nous avons participé à leur évaluation pharmacologique. La structure de base a également été conçue suite à une réflexion rationnelle faisant appel au drug design. L'application de la théorie des cycles potentiels et de principes de bioisostérie à la structure du SKF 108566, antagoniste sélectif des récepteurs AT₁ conçu par la firme SmithKline Beecham a donné naissance à un deuxième squelette original, dont la structure ne pourra cependant pas être dévoilée ici pour des raisons de confidentialité.



SKF 108566

Après un tour d'horizon des connaissances actuelles sur le SRA, nous essaierons de présenter les différents antagonistes des récepteurs de l'Ang II découverts à ce jour. A travers cette revue, nous tenterons de mettre en avant les différentes relations structure - affinité et activité mises en évidence pour aboutir à la proposition d'un pharmacophore hypothétique des ligands des récepteurs de l'Ang II. Enfin nous essaierons de faire l'ébauche d'un site de liaison des antagonistes des récepteurs AT₁ en mentionnant pour chacun des éléments de ce pharmacophore le ou les résidus du récepteur susceptibles d'interagir avec eux, et ceci à partir des résultats publiés et obtenus lors des premières études de mutagenèse dirigée.

Dans la seconde partie de ce mémoire, nous présenterons les travaux effectués. Après l'exposé de notre première hypothèse de travail ayant conduit à l'élaboration des composés inspirés de la conformation "scorpion" de l'Ang II, nous décrirons leur synthèse. La synthèse de deux substances de référence, le DuP 753, antagoniste AT₁ sélectif et le PD 123177, antagoniste AT₂ sélectif sera également décrite. Ces molécules de référence nous ont permis de valider les modèles pharmacologiques que nous avons développés et utilisés pour l'évaluation pharmacologique des composés originaux synthétisés. Nous terminerons par la présentation des résultats obtenus avec les différents composés synthétisés.

GENERALITES

2.1 LE SYSTEME RENINE-ANGIOTENSINE (Timmermans et al., 1993; Bottari et al., 1993)

2.1.1. Biosynthèse et métabolisme de l'Ang II

2.1.1.1. SRA circulant

Le système rénine-angiotensine ou SRA est un système hormonal endocrine comprenant une cascade de transformations enzymatiques aboutissant à la synthèse de l'Ang II, puissant agent vasoconstricteur et stimulateur de la sécrétion d'aldostérone.

Les principales étapes du SRA sont présentées sur la figure 1 :

- la rénine, aspartyl protéase sécrétée dans la circulation au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire rénal clive l'angiotensinogène, macroglycoprotéine synthétisée et libérée principalement par le foie, en angiotensine I ou Ang I, décapeptide dépourvu d'activité hypertensive.

- l'Ang I est alors rapidement convertie en Ang II sous l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou ACE, carboxypeptidase aspécifique qui clive le dipeptide C-terminal de divers peptides. Cette enzyme est présente un peu partout dans l'organisme, mais elle est particulièrement abondante à la surface des cellules endothéliales de la microvasculature pulmonaire où la majeure partie de l'Ang II circulante est produite. L'ACE n'est pas spécifique au SRA, elle participe également à la dégradation des kinines (bradykinine, substance P).

- l'Ang II a une durée de vie assez courte et est dégradée par diverses angiotensinases. Certains peptides formés présentent des activités diverses :

- l'angiotensine III ou Ang III est un heptapeptide obtenu par clivage de l'aspartique N-terminal de l'Ang II par l'angiotensinase A, aminopeptidase plasmatique surtout présente dans la glande surrénale. Il possède une affinité pour les mêmes récepteurs que l'Ang II et semble surtout jouer un rôle dans la sécrétion d'aldostérone, mais reste néanmoins moins actif que l'Ang II.
- l'angiotensine IV ou Ang IV et l'angiotensine 1-7 ou Ang 1-7, deux autres peptides fragments de l'Ang II, semblent également avoir certaines activités. L'existence de récepteurs propres à chacun de ces peptides est suspectée. Des actions de l'Ang IV sur la mémoire et de l'Ang 1-7 sur les fonctions rénales sont avancées (Dellipizzi et al., 1994; Pörsti et al., 1994; Wright et al., 1995). Ces résultats demandent confirmation.

Mais l'Ang II reste tout de même le principal peptide actif du SRA.

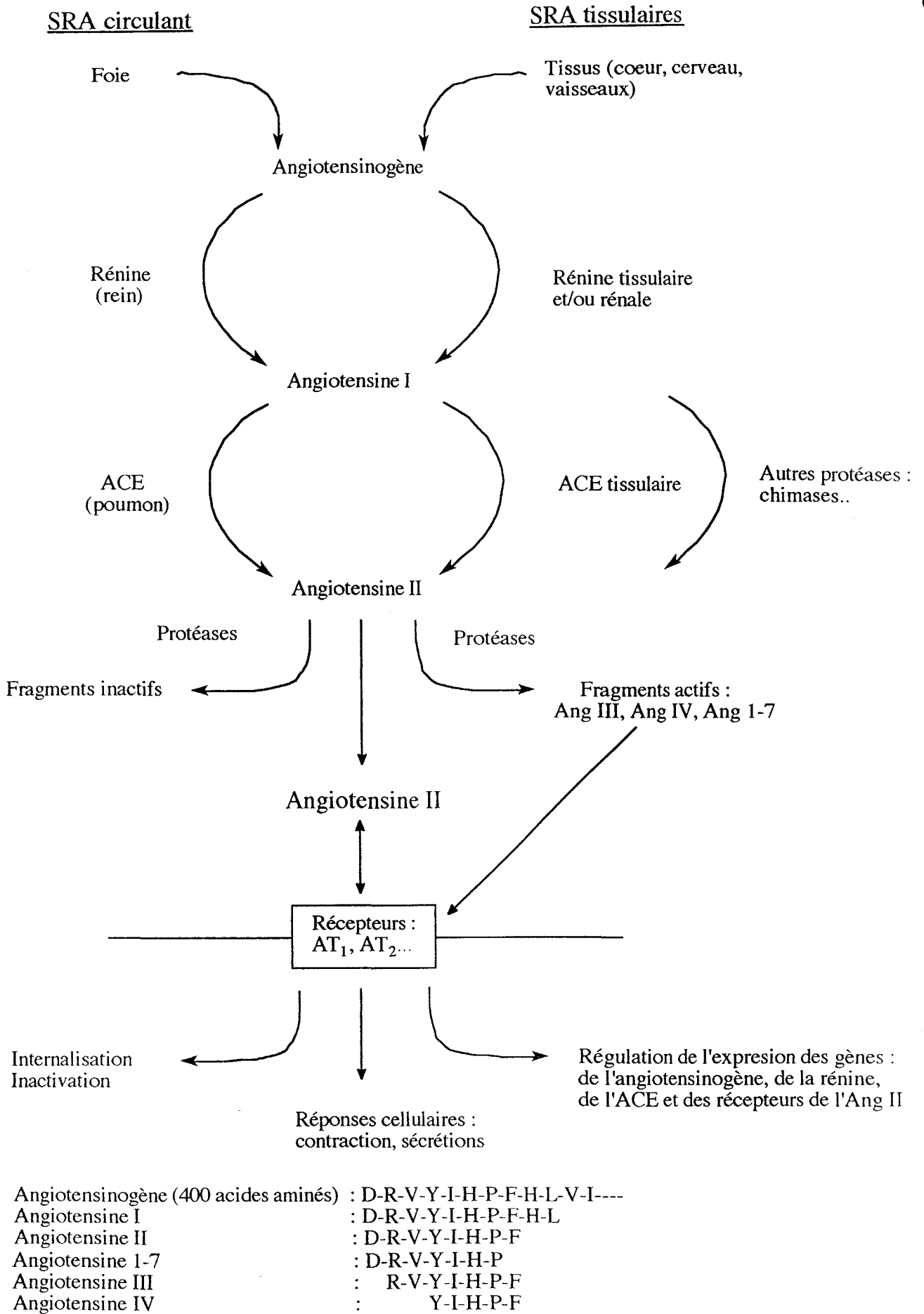


Figure 1: Les systèmes rénine-angiotensine (Timmermans et al., 1993)

- l'Ang II exerce ses principaux effets en stimulant des récepteurs spécifiques AT₁. Des récepteurs AT₂ ont été caractérisés, mais leurs rôles restent encore incomplètement élucidés.

Le SRA est régulé par le taux de rénine circulant, la première étape de la cascade étant limitante. La libération de rénine par les cellules des artéroles afférentes des reins est contrôlée par des facteurs :

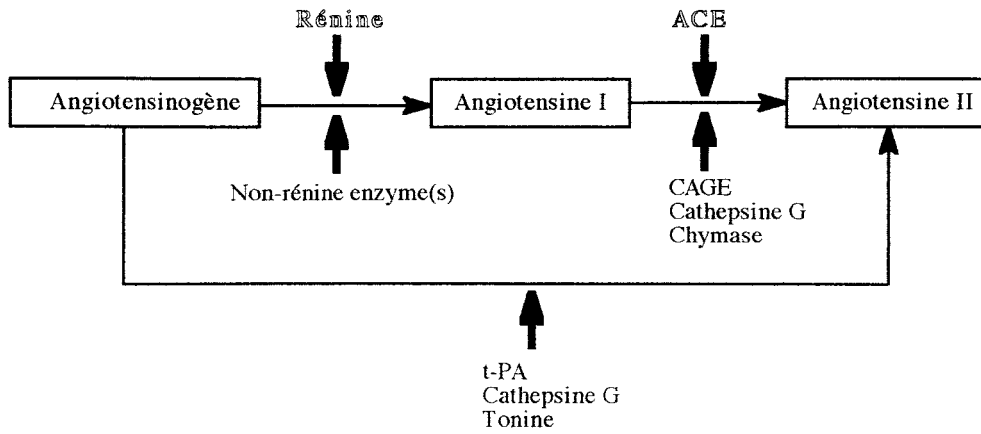
- hémodynamiques : une baisse de la pression artérielle détectée par les barorécepteurs intrarénaux stimule directement la libération de rénine,
- neurogènes : l'activation du système nerveux sympathique entraîne la libération de noradrénaline qui, par activation des récepteurs β_1 rénaux stimule la sécrétion de rénine,
- ioniques : les cellules de la *macula densa* agissent comme chimiorécepteurs. Elles contrôlent la composition en ions Cl⁻ et Na⁺ de l'urine. En réponse à une baisse de leurs concentrations dans le fluide présent dans le tube distal, elles déclenchent la libération de rénine.

2.1.1.2. SRA tissulaires

Le SRA est classiquement considéré comme un système endocrine où l'Ang II synthétisée dans le plasma serait responsable des effets. La découverte de tous les composants du SRA dans de nombreux tissus de l'organisme autres que ceux impliqués dans la production de l'Ang II circulante (cœur, tissus vasculaires, cellules endothéliales, cerveau...) suppose l'existence d'un ou de SRA tissulaires (Vinson et al., 1995). L'Ang II peut être formée localement et peut, par conséquent, posséder des actions autocrines et / ou paracrines.

Au niveau tissulaire, à côté de la cascade rénine-ACE-angiotensinases présentée précédemment, existent d'autres voies de synthèse de l'Ang II. Il a été notamment démontré l'existence d'enzymes capables de produire de l'Ang II à partir de l'angiotensinogène et d'autres susceptibles de remplacer la rénine ou l'ACE (cf fig 2) (Dzau et al., 1993).

Ces observations découlent principalement d'études *in vitro*, mais certains résultats *in vivo* viennent conforter cette hypothèse. Un taux d'Ang II est détectable après un traitement chronique par des inhibiteurs de l'ACE et une sérine protéase (hHC ou human Heart Chymase), capable de transformer spécifiquement l'Ang I en Ang II, a été identifiée et purifiée dans le tissu cardiaque (remarque : elle n'est pas sensible aux inhibiteurs de l'ACE).



CAGE : chymostatin-sensitive angiotensin generating enzyme
 t-PA : tissue-plasminogen activator

Figure 2 : Autres voies de synthèse de l'Ang II

Les rôles relatifs et les liens entretenus entre les systèmes circulants et tissulaires ne sont pas totalement compris aujourd'hui. Le SRA circulant interviendrait plus particulièrement dans la régulation de la pression sanguine, effets à courts termes et les SRA tissulaires pourraient avoir des effets à plus longs termes et ciblés sur les organes où ils sont présents : régulation de la croissance et/ou différenciation cellulaires. Leur hyperactivation pourrait être à l'origine ou du moins jouer un rôle dans diverses pathologies comme l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, la resténose...

2.1.2. Les récepteurs de l'Ang II

Une revue récente fait le point de toutes les connaissances actuelles sur les récepteurs de l'Ang II : localisation, différents sous-types, systèmes de transduction, rôles physiologiques... (de Gasparo et al., 1995a)

2.1.2.1. Hétérogénéité des récepteurs

L'existence de plusieurs types des récepteurs de l'Ang II a été suggérée depuis de nombreuses années (Carey et al., 1978; Garcia-Sainz et al., 1987). Cette conclusion était basée initialement sur les différences de relations structure-activité de l'Ang II suivant les tissus. Puis l'observation que certains agents réducteurs comme le dithiothréitol ou DTT influençaient différemment le binding de l'Ang II sur divers tissus vint conforter cette hypothèse (Whitebread et al., 1989; Chiu et al., 1989).

La découverte de ligands peptidiques et non peptidiques hautement spécifiques a permis la caractérisation de deux types de récepteurs de l'Ang II, les récepteurs AT₁ et AT₂ (Dudley et al., 1990).

2.1.2.2. Localisation des récepteurs de l'Ang II

Avec le développement de ligands radioactifs, la distribution anatomique des récepteurs de l'Ang II a fait l'objet de très nombreuses recherches ces dernières années. Le tableau 1 illustre la distribution des récepteurs AT₁ et AT₂ à partir d'études effectuées chez le rat, le lapin, le boeuf, le singe et l'homme.

La première remarque est que, d'une espèce à l'autre, cette distribution peut varier. Par exemple, chez le rat, les récepteurs AT₁ sont majoritaires dans le cortex surrénalien et les récepteurs AT₂ dans la medulla alors que chez le boeuf, on ne trouve dans ces deux régions que le récepteur AT₁. Pour l'instant, ces variations suivant les espèces n'ont pas trouvé d'explication.

2.1.2.2.1. Localisation des récepteurs AT₁

Ils sont présents dans la majorité des organes et des tissus impliqués dans la régulation de la pression artérielle et de la balance hydrosodée, par exemple sur les cellules musculaires lisses vasculaires, dans les surrénales, les reins et les régions du cerveau responsables du contrôle cardiovasculaire.

Leur stimulation semble responsable de la plupart, voire de la totalité, des effets connus de l'Ang II, notamment la vasoconstriction, la libération d'aldostérone, la rétention hydrosodée, la stimulation de la soif, la sécrétion de vasopressine...

		AT ₁	AT ₂
<u>A. Localisation périphérique</u>			
• surrénales			
- cortex	rat, lapin, chien, homme	+	+
	boeuf	+	-
- médullo	rat homme	±	+
	boeuf	+	-
• aorte	lapin, porc, chien	+	-
	rat, singe	+	+
• artère rénale	homme	+	+
• coeur	lapin, porc, singe, homme	+	+
• rein	rat, homme	+	?
	lapin	+	-
	singe	+	+
• capsule rénale	lapin	+	+
• poumon	rat	+	-
• foie	rat, lapin	+	-
• duodénum, iléon	cobaye	+	-
• pancréas	chien	-	+
• utérus	lapin, rat	+	+
	singe, homme	-	+
• ovaires	rat, boeuf	-	+
• placenta	homme	+	-
• vas deferens	lapin	+	-
• epididyme	rat	+	-
• vessie	cobaye	+	-
<u>B. Localisation centrale</u>			
• cerveau	rat, lapin, singe	+	+
• cerebellum	rat, boeuf	±	+
	homme	+	+
• hypophyse antérieure	tumeur	+	-
<u>C. Cultures</u>			
• cellules musculaires lisses	rat, homme	+	-
• cellules R3T3		-	+
• hybridome NG108		-	+
• phéochromocytome PC12W	rat	-	+

Tableau 1 : Distribution des récepteurs AT₁ et AT₂ de l'Ang II (Bottari et al., 1993)

2.1.2.2. Localisation des récepteurs AT₂

Une logique dans la répartition des récepteurs AT₂ est plus difficile à établir, d'autant que leurs rôles physiologiques ne sont pas encore connus.

Chez l'animal adulte, les récepteurs AT₂ sont peu présents. Les trois localisations principales sont le cerveau, les surrénales et les organes reproducteurs de la femelle. Une surexpression des récepteurs AT₂ a également été observée dans les tissus lésés comme la néointima et la peau.

Au contraire, chez le fœtus et le nouveau-né, ces récepteurs sont beaucoup plus présents. Une forte densité est détectée au niveau de la peau, des tissus conjonctifs, du diaphragme, du tractus gastrointestinal et enfin du cerveau, notamment dans des régions où à l'âge adulte il n'en reste plus aucune trace (régions liées aux fonctions visuelles, au contrôle de la motricité, de la sensibilité...).

Cette forte expression des récepteurs AT₂ chez le jeune animal, qui régresse avec l'âge, et sur les tissus lésés, suggère un rôle de ces récepteurs dans la croissance et / ou la différenciation cellulaire.

2.1.2.3. Clonage et systèmes de transduction des récepteurs de l'Ang II

2.1.2.3.1. Récepteurs AT₁

Clonage

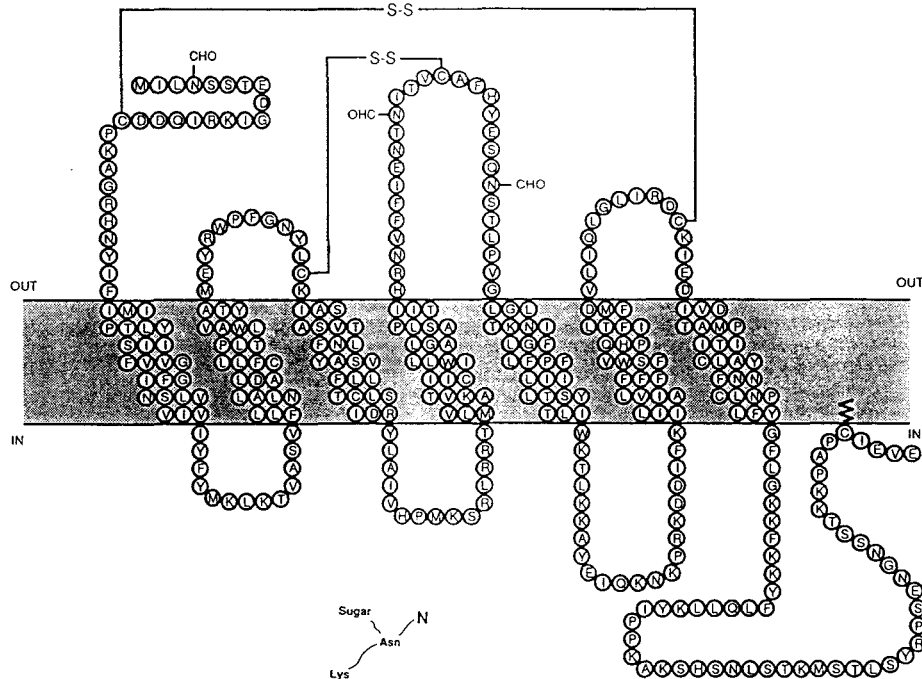
Le récepteur AT₁ a été cloné chez de nombreux mammifères : rat, souris, lapin, porc, chien, boeuf et homme (Sasaki et al., 1991; Murphy et al., 1991; Sandberg et al., 1992; Furuta et al., 1992; Bergsma et al., 1992; Itazaki et al., 1993; Burns et al., 1994). Chez le rat et la souris uniquement, deux sous-types ont été décrits : AT_{1A} et AT_{1B}. Il n'existe pas de différences pharmacologiques ou fonctionnelles entre ces deux récepteurs. Leurs séquences peptidiques ne diffèrent que de dix huit acides aminés.

Remarque : une troisième isoforme AT_{1C} a été isolée à partir de placenta de rat (Hahn et al., 1993a). Chez l'homme, une autre isoforme a également été caractérisée à partir de placenta. Mais les informations sur ces sous-types sont peu nombreuses et demandent à être confirmées pour pouvoir les considérer comme de véritables sous-types de récepteurs.

La séquence peptidique de ces récepteurs est organisée en sept hélices transmembranaires hydrophobes. Leur appartenance à la grande famille des récepteurs couplés à une protéine G a également été prouvée (sensibilité à la toxine de coqueluche et au GTPγS) (cf fig 3). Les quatre résidus cystéine sur chacune des boucles extracellulaires du récepteur participent à la création de

deux ponts disulfure. Le changement de conformation induit par la destruction de ces ponts disulfure par le DTT peut expliquer la diminution d'affinité de l'Ang II pour le récepteur. Trois sites de glycosylation (Asn-X-Ser / Thr) sont présents, un dans le domaine N-terminal extracellulaire et deux dans la seconde boucle extracellulaire. Plusieurs sérines et thréonines sont également présentes dans la seconde boucle et le domaine C-terminal cytoplasmiques. Elles représentent des sites possibles de phosphorylation. Enfin la cystéine située dans le domaine C-terminal intracellulaire constitue un site probable de palmitoylation.

a)



b)

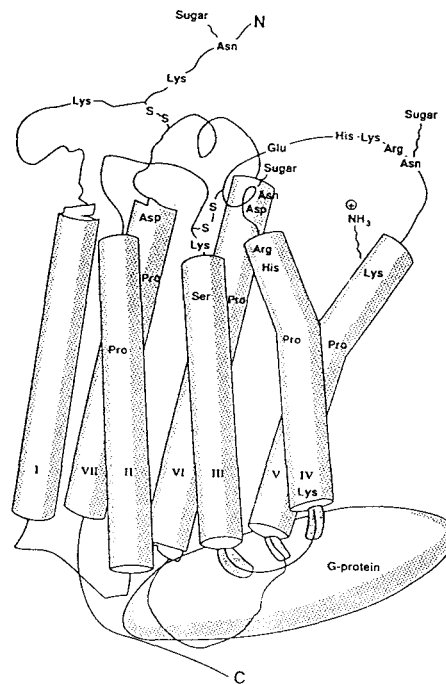


Figure 3 : a) Séquence du récepteur AT₁ de boeuf. Les sites de glycosylation sont mentionnés (-CHO), les ponts disulfure sont représentés par -S-S-, le site de palmitoylation par ζ
 b) Organisation tridimensionnelle hypothétique du récepteur AT₁ de rat (Harris et al., 1995).

Systèmes de transduction

Le récepteur AT₁ apparaît réguler une série de seconds messagers générés par diverses enzymes et divers systèmes transporteurs d'ions (de Gasparo et al., 1995; Harris et al., 1995).

Stimulation d'une phospholipase C ou PLC

Cette voie apparaît comme la plus importante et la plus répandue des systèmes de transduction de l'Ang II.

La stimulation d'une PLC par l'Ang II passe par l'activation d'une protéine G_q et conduit à la formation d'inositol triphosphate ou IP₃ et de diacylglycérol ou DAG.

La stimulation du réticulum sarcoplasmique par IP₃ induit une augmentation rapide de la concentration intracellulaire en Ca²⁺, reliée par une entrée massive de Ca²⁺ extracellulaire par ouverture des canaux calciques. Les réponses cellulaires initiées par cette augmentation du Ca²⁺ intracellulaire sont nombreuses : synthèse et sécrétion d'aldostérone, sécrétion d'hormones peptidiques (prolactine, ACTH ou hormone corticotrophine, vasopressine, ocytocine), vasoconstriction des cellules musculaires lisses par activation de la calmoduline...

Le DAG active diverses protéines kinases dont une PKC qui, en phosphorylant de multiples protéines, agit en synergie avec l'augmentation du Ca²⁺ cytoplasmique pour réguler le fonctionnement cellulaire. Un autre rôle important de la PKC est sa participation au phénomène de désensibilisation des récepteurs AT₁. Le rétrocontrôle négatif passe probablement par une phosphorylation du récepteur et / ou de la protéine G.

Le DAG formé sous l'action d'une DAG lipase est aussi une source d'acide arachidonique.

Stimulation d'une protéine tyrosine kinase ou PTK

Un système de transduction pour l'Ang II impliquant la phosphorylation de résidus tyrosine de protéines a été caractérisé dans des cellules musculaires lisses vasculaires de rat et dans des cellules musculaires lisses gastriques de cobaye (Molloy et al., 1993; Yang et al., 1993; Butcher et al., 1993; Turner et al., 1995).

Ce système serait impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire par l'Ang II. En effet de nombreux récepteurs de facteurs de croissance (Platelet Derived Growth Factor ou PDGF ...) possèdent cette activité. Mais à la différence de ces récepteurs, le récepteur AT₁ est dépourvu de toute activité tyrosine-kinase directe. Il semble que l'activation d'une cascade complexe de protéines kinases (sérine-, thréonine-kinases) soit également impliquée dans ce système.

Il a été montré que l'Ang II, par l'intermédiaire des récepteurs AT_{1A}, active un système de transduction nucléaire Stat 91 capable d'assurer le lien entre le récepteur et le noyau. L'activation de ce système impliquerait justement des tyrosine-kinases (Bhat et al., 1994).

Stimulation d'une phospholipase A₂ ou PLA₂

L'Ang II stimule par l'intermédiaire d'une protéine G une PLA₂ qui, activée, hydrolyse les phospholipides et libère l'acide arachidonique. Le métabolisme de celui-ci conduit à la formation de diverses substances dont certaines ont un rôle important dans le contrôle de fonctions locales. Ainsi les prostaglandines influent sur le tonus vasculaire et l'agrégation plaquettaire, tout comme le thromboxane A₂ ou TXA₂.

Stimulation d'une phospholipase D ou PLD

L'Ang II est également capable de stimuler l'activité d'une phospholipase D ou PLD dans des cellules mésangiales et glomérulaires avec génération d'acide phosphatidique et de choline. Dans les cellules vasculaires, l'activation d'une PLD paraît plus intense dans les cellules en croissance.

Modulation d'une adénylate cyclase ou AC

Le rôle de l'AC dans le mécanisme de transduction de l'Ang II porte à discussion. La majorité des résultats suggèrent que l'Ang II inhibe l'AC en stimulant une protéine G_i sensible à la toxine de coqueluche. Mais à l'opposé, certaines observations montrent une augmentation de l'activité de l'AC en présence d'Ang II, par exemple dans les fibroblastes de fœtus. Mais cet effet de l'Ang II semble être indirect et médié par l'activation d'une PKC ou par la voie Ca²⁺-calmoduline. Le couplage direct et positif des récepteurs AT₁ à l'AC reste à démontrer.

Modulation de l'activité des canaux ioniques

L'Ang II peut réguler l'ouverture des canaux calciques, potassiques et sodiques. La stimulation des canaux Ca²⁺ voltage-dépendants de type T et le blocage des canaux K⁺ jouent un rôle important dans la sécrétion d'aldostérone stimulée par l'Ang II.

2.1.2.3.2. Récepteurs AT₂ (Hodges et al., 1994; Nahmias et al., 1995; Harris et al., 1995)

Clonage

Le récepteur AT₂ a été cloné dans un premier temps chez le fœtus de rat et dans une lignée cellulaire PC12W (Mukoyama et al., 1993; Kambayashi et al., 1993), puis chez l'homme et la souris (Nakajima et al., 1993; Martin et al., 1994).

Une recherche de séquences hydrophobes montre une structure en sept hélices transmembranaires (cf fig 4). Mais le couplage à une protéine G reste controversé. Les premières études montraient une non sensibilité au GTPγS (Bottari et al., 1991). Mais d'autres auteurs ont clairement démontré qu'une protéine G est impliquée dans la modulation de canaux potassiques par les récepteurs AT₂ dans des cultures de neurones de rat ou dans l'inhibition d'une phosphotyrosine phosphatase dans les cellules PC12W (Takahasi et al., 1994). Ces

résultats, en apparence contradictoires, sont peut être dus à l'existence de sous-types de récepteurs ou, comme certains auteurs le supposent, à l'existence de protéines G encore non caractérisées (Nahmias et al., 1995).

L'homologie des séquences peptidiques entre les récepteurs AT₁ et AT₂ n'est que de 32-35%. On retrouve les résidus cystéine sur les boucles extracellulaires et pourtant les récepteurs AT₂ ne sont pas sensibles au DTT, une sensibilisation est même observée. L'action des agents réducteurs sur les récepteurs de l'Ang II reste une énigme. Cinq sites de glycosylation sur la partie N-terminale, plusieurs sites de phosphorylation dans la partie C-terminale ainsi qu'un site de palmitoylation sont présents.

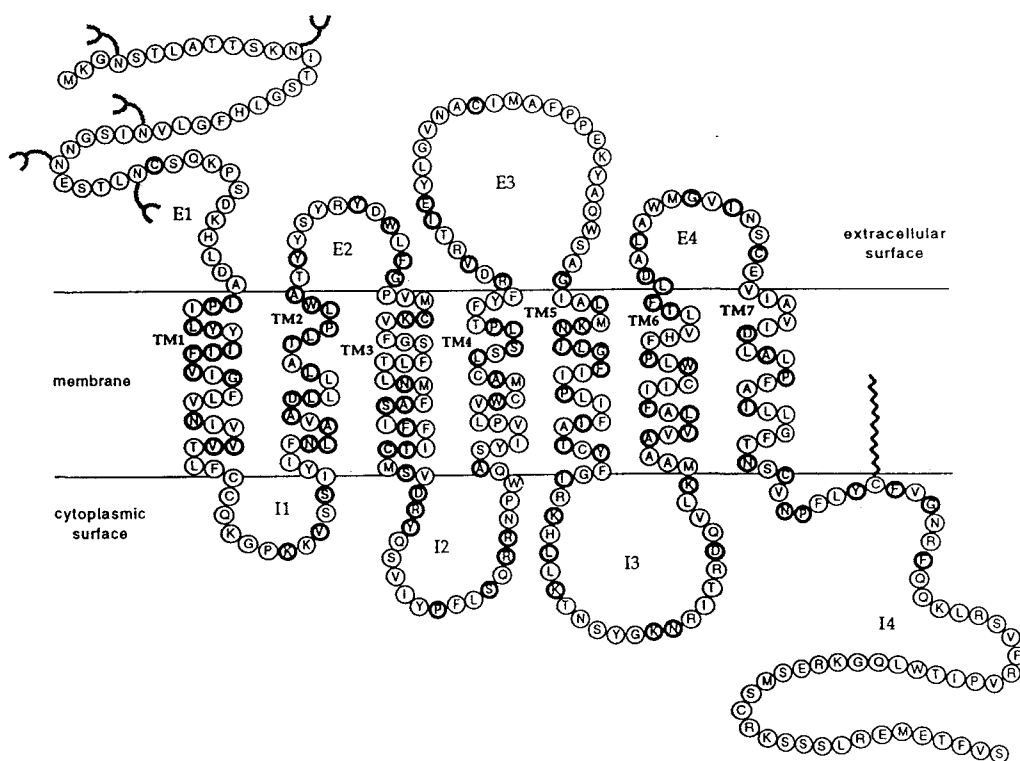


Figure 4: Séquence du récepteur AT₂ humain. Les sites de glycosylation sont représentés par ⌘ et le site de palmitoylation par ⊗ (Nahmias et al., 1995).

Systèmes de transduction

A l'heure actuelle, seules des hypothèses peuvent être faites. Les résultats, parfois contradictoires demandent à être confirmés.

Le tableau suivant rassemble les différents systèmes évoqués lors d'études sur des cultures cellulaires (Nahmias et al., 1995 et références citées).

Souches cellulaires	Effets	Sensibilité à TC
NG108-15	canaux Ca ²⁺ type T	-
Neurones	ouverture de canaux K ⁺	+
Neurones	diminution du GMP _c	nd
PC12W	diminution du GMP _c	-
Myocytes cardiaques	activation PLA ₂	nd
PC12W	stimulation PTP	-
PC12W	inhibition PTP	+
N1E-115	diminution PY	nd

nd : non déterminée; PLA₂ : phospholipase A₂; PTP : activité protéine tyrosine phosphatase; PY : protéines tyrosine phosphorylées; TC : toxine de coqueluche

Bottari et ses collaborateurs ont montré à travers de nombreux travaux un lien entre la stimulation de protéines tyrosine phosphatases et l'inhibition d'une guanylate cyclase particulière qui entraînerait une diminution du taux de GMP_c (Bottari et al., 1992; Brechler et al., 1994).

2.1.2.4. Nomenclature des récepteurs de l'Ang II

A partir de tous les renseignements connus sur les récepteurs de l'Ang II, une nomenclature a été établie récemment par le comité de l'IUPHAR (cf tableau 2) (De Gasparo et al., 1995b).

Deux autres types de récepteurs ont été décrits, mais les connaissances sur ceux-ci sont encore insuffisantes pour les inclure dans la classification :

- AT₃ : isolé de cellules de neuroblastomes neuro 2A. Il est reconnu par l'Ang II, mais peu ou pas par l'Ang III et par les antagonistes non peptidiques DuP 753 et PD 123319. Sa stimulation activerait une guanylate cyclase soluble par un processus encore inconnu.
- AT₄ : site de liaison de l'Ang IV, présent dans le coeur, le poumon, le rein, le foie... Aucun autre ligand que l'Ang IV n'est connu pour ce récepteur. Sa séquence, ses systèmes de transduction ne sont pas connus. Il serait impliqué dans l'irrigation cérébrale et rénale (Wright et al., 1995).

Chez les non mammifères, des récepteurs de l'Ang II ont également été isolés :

- chez un amphibien, *Xenopus* AT : il présente les mêmes propriétés fonctionnelles que les récepteurs AT₁ mais ne reconnaît que le CGP 42112 (Bergsma et al., 1993),
- chez des microorganismes comme *Mycoplasma*.

Nomenclature	AT₁	AT₂
Sous-types	rat, souris : AT _{1A} , AT _{1B}	?
Localisation	AT _{1A} : poumon, foie, cerveau, rein, cellules musculaires lisses vasculaires AT _{1B} : surrénales, hypophyse	tissus fœtaux, cerveau, tissus des organes reproducteurs, tissus lésés
Affinité	ANG II > ANG III	ANG II = ANG III
Sensibilité aux agents réducteurs	inactivation	insensible ou légère suractivation
Agonistes sélectifs	-	CGP 42112
Antagonistes sélectifs	Losartan (DuP 753) Valsartan (CGP 48933) Eprosartan (SKF 108566)...	PD 123177 PD 123319
Mécanismes de transduction	protéines G : G _i , G _q	protéine G ?
Effecteurs principaux	PLC, PLA ₂ , PLD, AC, canaux calciques	PTPase ?
Gène	<i>at1</i>	<i>at2</i>
Informations structurales	359 acides aminés 7 hélices transmembranaires	363 acides aminés 7 hélices transmembranaires

Tableau 2

2.1.3. Propriétés physiologiques de l'Ang II

2.1.3.1. Ang II et équilibre hémodynamique

L'Ang II est une hormone clé de l'appareil cardiovasculaire. Contrôlant à la fois le bilan hydrosodé, la volémie et le tonus vasculaire, l'Ang II est au centre de l'équilibre hémodynamique.

Ses actions peuvent être classées en deux catégories :

- actions vasopressives
- actions régulatrices de fonctions cellulaires

2.1.3.1.1. Actions vasopressives de l'Ang II

Effets directs

L'Ang II est un des agents vasopresseurs les plus puissants connus après l'endothéline. A concentration moléculaire égale, son pouvoir vasoconstricteur est quarante fois supérieur à celui de la noradrénaline.

Elle exerce un effet direct sur les muscles lisses vasculaires et joue un rôle majeur dans le contrôle de la pression artérielle. L'influence sur le tonus vasculaire varie d'un tissu à l'autre. Ainsi les vaisseaux des reins (artérioles afférentes et efférentes), du mésentère, de la peau sont plus sensibles à ce peptide que ceux du cerveau, des poumons...

Effets indirects

L'Ang II a la capacité de stimuler le système nerveux sympathique au niveau central ou périphérique par action au niveau des ganglions ou des terminaisons nerveuses sympathiques. Il en résulte une augmentation de la libération de catécholamines qui vont exercer leur pouvoir vasoconstricteur et cardiotonique en stimulant les récepteurs α et β adrénergiques. L'effet vasoconstricteur direct de l'Ang II est alors amplifié par l'augmentation concomitante de l'activité sympathique.

2.1.3.1.2. Actions de l'Ang II sur le coeur (Dostal et al., 1993)

De par ses actions diverses et complexes sur plusieurs tissus et systèmes impliqués dans la régulation cardiaque (corticosurrénales, système nerveux central, muscle lisse vasculaire), les effets propres de l'Ang II sur le coeur sont difficilement observables *in vivo*. Par exemple, son effet inotrope positif, qui a été caractérisé *in vitro* est masqué *in vivo* par l'action des systèmes de régulation réflexe. Par conséquent, la plupart des effets cardiaques du SRA ont été étudiés *in vitro*, sur organes isolés.

Comme au niveau vasculaire, l'Ang II stimule l'activité sympathique en augmentant la quantité de neurotransmetteur libéré et en inhibant sa recapture par les terminaisons nerveuses sympathiques. Cette stimulation contribue à l'action inotrope positive de l'Ang II. L'Ang II exercerait également un effet direct chronotrope positif.

Au niveau de la circulation coronaire, l'Ang II induit une diminution du débit.

2.1.3.1.3. Actions régulatrices de fonctions cellulaires de l'Ang II

L'action régulatrice de l'Ang II est très étendue. Elle agit sur de multiples organes et tissus et interagit avec de nombreux systèmes biologiques.

Contrôle de la volémie

Action sur les surrénales

L'Ang II stimule la stéroïdogénèse surrénalienne à des concentrations bien inférieures à celles nécessaires pour son action vasoconstrictrice. Elle stimule la synthèse et la sécrétion d'aldostérone par le cortex surrénalien. Après libération dans la circulation, l'aldostérone agit sur le tube distal rénal et les canaux collecteurs et induit la réabsorption de Na⁺.

Action sur les reins

Au niveau des reins, l'Ang II régule trois fonctions qui vont concourir à une augmentation de la volémie :

- l'absorption tubulaire de l'eau et du Na⁺ : en plus de l'action de l'aldostérone, l'Ang II est capable de stimuler directement une rétention hydrosodée rénale en augmentant l'activité de l'échangeur Na⁺/H⁺ des cellules épithéliales du tube contourné proximal.
- l'hémodynamique rénale : l'Ang II induit la vasoconstriction des artérioles afférentes et efférentes au glomérule.
- la perméabilité glomérulaire : l'Ang II régule la vitesse de filtration glomérulaire en contrôlant l'hémodynamique rénale.

Action sur le système nerveux central

Enfin l'Ang II agit au niveau central en stimulant la soif, la libération par l'hypothalamus de vasopressine (hormone antidiurétique à faible concentration et vasoconstrictrice à plus forte dose).

L'action vasoconstrictive et la régulation de la balance hydrosodée sont les deux actions premières de l'Ang II. On peut constater que ces deux actions sont intimement liées. On peut penser que suite à une déplétion en Na⁺, le SRA est activé pour stimuler la réabsorption rénale et la libération d'aldostérone. En même temps, la stimulation de la soif et de la sécrétion de vasopressine ont pour objectif de combler ce déficit. Dans le cas où la volémie n'est pas

rétablie, la concentration en Ang II est augmentée pour atteindre un taux suffisant et exercer son action vasoconstrictrice et prévenir tout risque de collapsus.

Pour le contrôle hémodynamique, le SRA circulant semble être le principal système impliqué. Il est donc lié aux effets à courts termes de l'Ang II. Seule la stimulation des récepteurs AT₁ semble responsable des effets décrits précédemment.

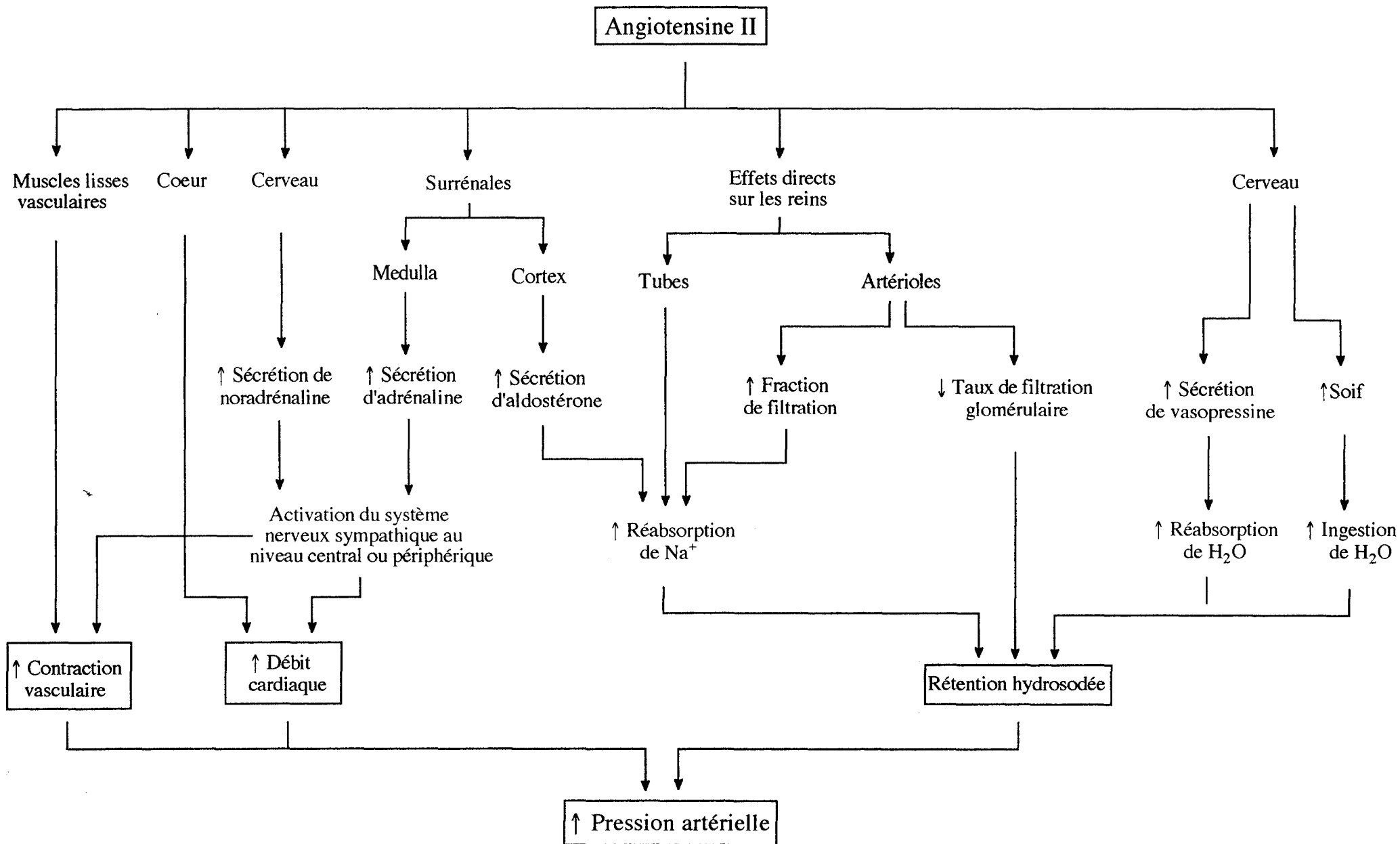


Tableau 3 : Effets de l'Ang II participant à l'augmentation de la pression artérielle (d'après Eberhardt et al., 1993)

2.1.3.2. Ang II et croissance cellulaire

De multiples observations ont très tôt soulevé l'idée d'une implication de l'Ang II dans les processus de croissance cellulaire.

La découverte en 1989 de l'inhibition de l'hyperplasie myointimale après lésion vasculaire chez le rat par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou IEC a posé la question d'une éventuelle implication du SRA dans les phénomènes de prolifération cellulaire (Powell et al., 1989). Puis les premières expériences réalisées avec des antagonistes des récepteurs de l'Ang II ont conforté cette idée. Le DuP 753, le TCV 116, deux antagonistes AT₁ sélectifs, inhibent l'épaississement de l'intima après lésion de la carotide chez le rat (Kauffman et al., 1991; Taguchi et al., 1993; Kawamura et al., 1993).

Daemen a montré d'autre part qu'une perfusion continue d'Ang II chez le rat induit une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires de carotides saines ou lésées (Daemen et al., 1991).

Les effets bénéfiques observés avec les IEC dans les cas d'hypertrophie ventriculaire et de remodelage cardiaque apportent une preuve supplémentaire pour une implication de l'Ang II dans les processus d'hypertrophie et d'hyperplasie cellulaires (Pinto et al., 1995; Struijker-Boudier et al., 1995).

Tous ces résultats *in vivo* suggèrent un potentiel important de l'Ang II pour promouvoir une prolifération et / ou une hypertrophie cellulaire. Elle agirait soit directement, soit en interagissant avec les principaux facteurs de croissance et cytokines impliquées dans ces phénomènes.

Pour essayer de mieux comprendre les mécanismes d'action de l'Ang II, des études *in vitro* ont été réalisées. Une grande variabilité des effets de l'Ang II a été observée. Suivant la souche cellulaire, les conditions de culture, notamment par la présence ou non de sérum, l'Ang II induit soit une hypertrophie, soit une hyperplasie (Bunkenburg et al., 1992; Sadoshima et al., 1993a). Par exemple l'Ang II induit la prolifération de cellules vasculaires humaines ou mésentériques de rat en présence de sérum. En revanche, d'autres auteurs ont rapporté que l'Ang II n'a qu'un effet hypertrophiant (avec ou sans polypléidie) sur des cultures de cellules vasculaires préparées à partir d'aorte thoracique de rat en l'absence de sérum. L'exposition des cellules à des facteurs de croissance apportés par le sérum est peut être la condition nécessaire pour avoir une réponse hyperplasique suite à une stimulation par l'Ang II *in vitro*.

L'Ang II aurait donc un effet indirect sur la croissance cellulaire, dépendant d'autres facteurs de croissance. Elle agirait en quelque sorte comme agent comitogène. De nombreux travaux montrent en effet une action de l'Ang II sur la synthèse de divers facteurs de croissance : PDGF (Platelet Derived Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), TGFβ (Tumor Growth Factor) (Itoh et al., 1993). Une étape essentielle est l'induction de proto-oncogènes ou gènes d'action précoce : c-fos, c-myc et c-jun qui activent ou répriment la transcription d'autres gènes impliqués dans la croissance cellulaire et la synthèse de protéines (Sadoshima et al.,

1993b). Récemment, un système de transduction reliant directement le récepteur et le noyau a été mis en évidence (Bhat et al., 1994).

Le SRA tissulaire semble être le plus impliqué dans les actions trophiques et mitogènes de l'Ang II. Une surexpression de l'ACE dans les vaisseaux lésés, une hyperactivité du SRA local dans les pathologies cardiaques ont notamment été démontrées (Dzau et al., 1992; Rakugi et al., 1994; Holtz et al., 1993).

Remarque : Le SRA est aussi appelé système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). L'aldostérone est connue depuis longtemps comme une hormone minéralocorticoïde contrôlant la réabsorption du sodium dans la partie distale du néphron. Or, depuis plusieurs années, des chercheurs mettent en évidence des effets beaucoup plus variés et parfois inattendus de l'aldostérone dans des cellules différentes des cellules rénales. Notamment l'existence, comme pour tous les éléments du SRA, d'une synthèse d'aldostérone dans les parois vasculaires, ou d'une action dans le développement d'une fibrose cardiaque ventriculaire gauche et vasculaire et dans celle de l'épaississement intimal après angioplastie. L'aldostérone apparaît donc comme un partenaire très efficace de l'Ang II en agissant en synergie avec celle-ci dans tous ces processus de croissance. Les anti-aldostérones comme la Spironolactone font d'ailleurs l'objet d'un regain d'intérêt (Jaillon et al., 1995).

Le rôle respectif des récepteurs de l'Ang II n'est pas encore totalement élucidé. L'implication des récepteurs AT₁ est certaine. Une surexpression a été décrite dans l'aorte de rat après angioplastie (Viswanathan et al., 1994). L'inhibition de la formation de la néointima par les antagonistes AT₁ sélectifs est une preuve supplémentaire.

En revanche, le rôle joué par les récepteurs AT₂ est moins clair. Une perfusion de CGP 42112, agoniste AT₂ et non antagoniste comme mentionné par Janiak, inhibe la formation de la néointima après angioplastie chez le rat (Janiak et al., 1992). Une étude récente montre également que ces récepteurs exercent un effet inhibiteur sur la prolifération induite par stimulation des récepteurs AT₁ (Stoll et al., 1995). Ces résultats jettent le trouble sur le rôle des récepteurs AT₂. Longtemps considérés comme médiateurs des effets trophiques de l'Ang II, ils exerceraient au contraire un effet antitrophique par rétrocontrôle négatif sur les récepteurs AT₁.

Remarque : ces résultats remettent en cause l'intérêt pour les antagonistes non sélectifs AT₁ / AT₂. Une stimulation des récepteurs AT₂ après blocage des AT₁ serait peut-être bénéfique...

2.1.3.3. Autres actions de l'Ang II

A coté de ces deux actions principales sur le contrôle de l'équilibre hémodynamique et sur la croissance cellulaire, l'Ang II agit également :

- sur la régulation du flux sanguin cérébral. Fait assez surprenant, elle induirait une relaxation des artères cérébrales par stimulation des récepteurs AT₂. Elle est soupçonnée également d'intervenir dans les processus de la mémoire, de l'apprentissage ou du comportement en interagissant avec de nombreux neurotransmetteurs impliqués dans ces processus : acétylcholine, GABA, dopamine, sérotonine (Wright et al., 1995)...
- sur le cycle reproducteur. Elle module la sécrétion de LHRH ou Luteinizing Hormone Releasing Hormone, dont dépend celle de LH ou Luteinizing Hormone.
- sur la contraction de muscles lisses non vasculaires : utérus, tractus gastrointestinal...

2.1.3.4. Contrôle des effets de l'Ang II

Il est important de replacer l'Ang II et ses activités au sein des équilibres contrôlant la vasomotricité et la vasotrophie.

La régulation de ces deux phénomènes est assurée par l'équilibre entre un système neurohormonal relaxant, antitrophique et un système constricteur, trophique.

Systèmes neurohormonaux et cellule musculaire lisse	
relaxant antitrophique	constricteur trophique
Oxyde nitrique NO° Facteur Atrial Natriurétique (ANF) stimulation β sympathique Prostacycline	Endothéline Ang II stimulation α sympathique Thromboxane A ₂ (TXA ₂)

Chacun des effets de l'Ang II peut donc être contrebalancé par l'action des autres facteurs impliqués dans ces équilibres, d'autant qu'elle est capable de stimuler la libération de certains d'entre eux : l'Ang II stimule par exemple la libération d'ANF (Atrial Natriuretic Factor)...

L'Ang II est également capable d'autoréguler sa propre synthèse, en exerçant un rétrocontrôle négatif sur celle de la rénine.

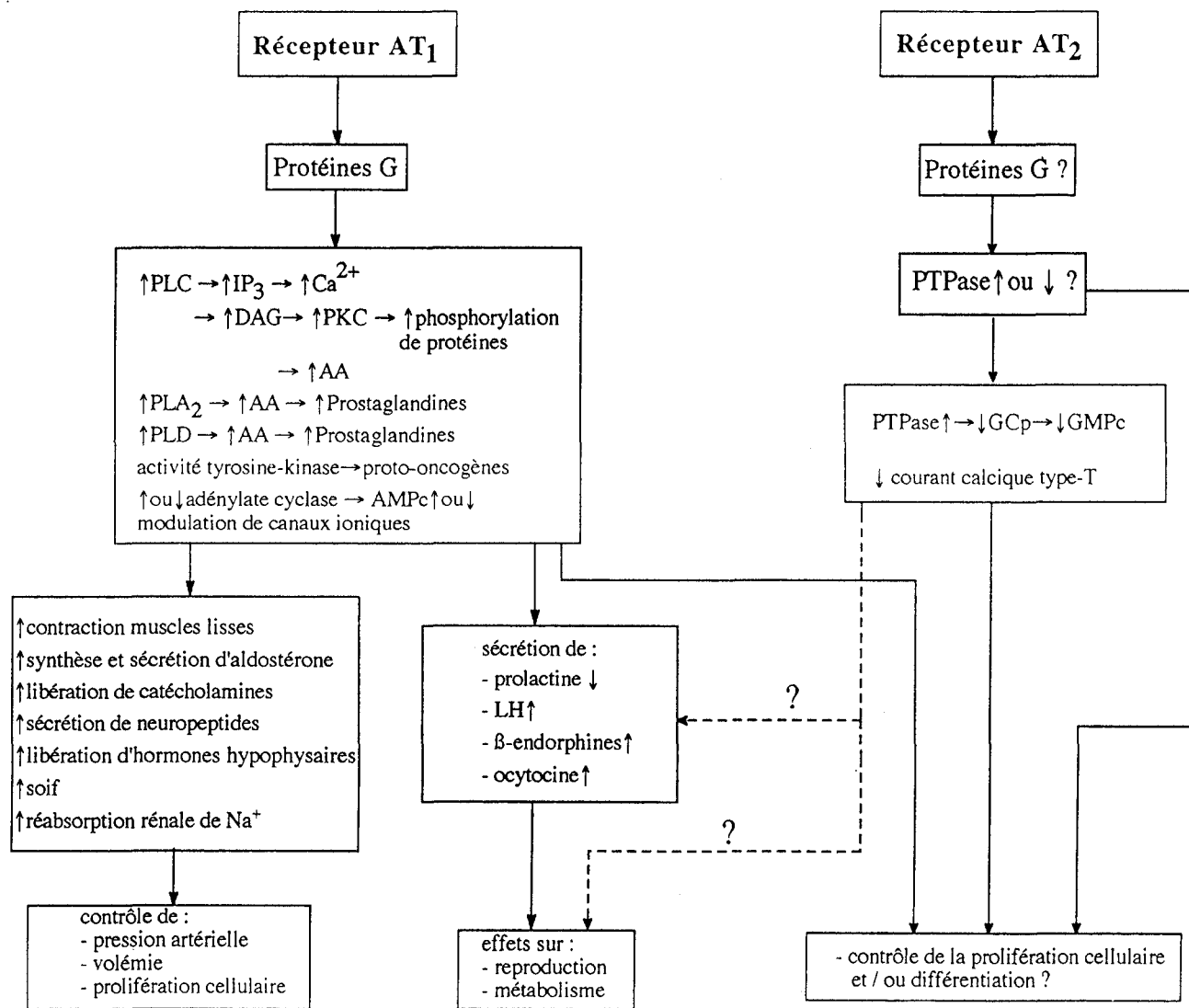


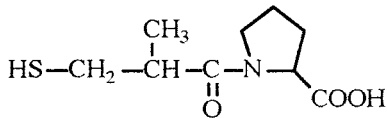
Tableau 4 : L'Ang II : ses récepteurs et leurs systèmes de transduction, les réponses biologiques associées à leur activation (d'après Bottari et al., 1993)

2.1.4. Comment et pourquoi bloquer le SRA ?

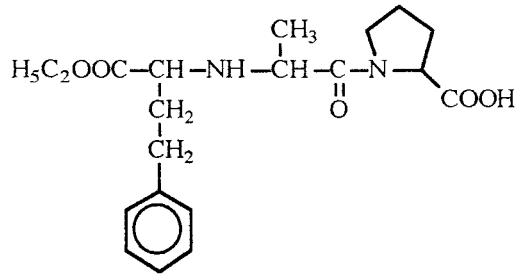
2.1.4.1. Les inhibiteurs du SRA

2.1.4.1.1. Les inhibiteurs de l'ACE ou IEC

Les deux premiers inhibiteurs de l'ACE actifs *per os* découverts sont le Captopril et l'Enalapril. Depuis, d'autres molécules (Ramipril, Bénazépril...) ont été synthétisées et actuellement quinze spécialités (sans compter les associations avec les diurétiques) peuvent être recensées dans le Vidal.



Captopril



Enalapril

Leurs deux principales indications thérapeutiques sont l'hypertension artérielle essentielle et l'insuffisance cardiaque. Ils sont en général bien tolérés. Des troubles digestifs (composés à caractère acide), rénaux (insuffisance rénale aiguë, sténose de l'artère rénale), allergiques et des possibilités d'hypotension peuvent apparaître mais sont généralement sans gravité. L'apparition d'une toux sèche et des risques d'œdème de Quinck, les deux principaux effets secondaires des IEC, résultent de l'aspécificité de l'ACE qui régule notamment le métabolisme de la bradykinine, médiateur de l'inflammation. Il apparaît ici une des limites des inhibiteurs de l'ACE due à la non-spécificité de cette enzyme pour le SRA.

2.1.4.1.2. Les inhibiteurs de la rénine

Trois notions théoriques sont en faveur de l'inhibition de la rénine pour bloquer le SRA :

- l'enzyme est **spécifique** : elle n'intervient dans aucun autre système biologique, son unique substrat est l'angiotensinogène,
- il s'agit de l'**étape limitante** : la vitesse globale de la chaîne de réactions dépend de la concentration en rénine; son inhibition modérée doit être théoriquement immédiatement sensible,
- il s'agit de la **première étape** de la série de réactions : l'accumulation d'angiotensinogène, dénué de toute activité biologique à la différence des angiotensines, est sans gravité.

Les recherches dans ce domaine ont débuté par la conception de pseudopeptides, analogues de l'état de transition tétraédrique adopté lors de l'hydrolyse de l'angiotensinogène par la rénine.

Mais des problèmes de biodisponibilité et de manque d'activité per os ont retardé l'avancée des travaux. Les premiers inhibiteurs de rénine non peptidiques commencent juste à apparaître et il n'y a pas encore de résultats d'études cliniques.

Les deux principales limites de ces inhibiteurs d'enzyme (rénine et ACE) résident :

- premièrement, dans l'existence de différents récepteurs de l'Ang II : AT₁ (AT_{1A}, AT_{1B}), AT₂. On peut penser que cette hétérogénéité a des implications physiologiques importantes. Il apparaît alors que le blocage spécifique de l'un ou l'autre de ces récepteurs pourrait être très intéressant sur le plan pharmacologique,
- deuxièmement, dans l'existence d'autres voies de synthèse de l'Ang II que la cascade enzymatique rénine-ACE. Il est donc impossible avec ce genre de molécules de bloquer totalement le SRA, en particulier les SRA locaux où ces voies de synthèse détournées de l'Ang II semblent être assez importantes (cf coeur).

Ainsi se justifie l'intérêt pour la troisième famille d'inhibiteurs du SRA : les antagonistes des récepteurs de l'Ang II. On peut espérer avec ces molécules obtenir des médicaments avec une efficacité au moins égale aux IEC et mieux tolérés car plus spécifiques.

2.1.4.1.3. Les antagonistes des récepteurs de l'Ang II

Jusqu'en 1982, seuls des antagonistes peptidiques des récepteurs de l'Ang II (Sarmesine, Saralazine...) étaient décrits. Ces antagonistes ont été très peu utilisés en clinique. Ils ont une faible biodisponibilité, une brève durée d'action à cause de leur structure peptidique sensible aux enzymes et une activité agoniste partielle.

Puis la découverte fortuite par Furukawa des effets antagonistes de dérivés du N-benzyl imidazole (S 8307-S8308) sur les propriétés contracturantes de l'Ang II a ouvert la voie à la conception d'antagonistes non peptidiques (Furukawa et al., 1982a, 1982b).

Plusieurs antagonistes non peptidiques des récepteurs de l'Ang II sont aujourd'hui en développement clinique. Le Losartan, antagoniste AT₁ sélectif est l'unique représentant de cette famille commercialisé depuis peu sous le nom de COZAAR®. L'indication thérapeutique principale est l'hypertension essentielle. Mais il existe de grands espoirs pour voir ces indications étendues à de nombreuses autres pathologies : insuffisance cardiaque, infarctus, ischémie cardiaque, athérosclérose, resténose, maladies rénales...

2.1.4.2. Perspectives thérapeutiques pour les antagonistes des récepteurs de l'Ang II

La première indication qui vient à l'esprit est bien entendu l'hypertension. Mais dans ce domaine la concurrence est importante avec les diurétiques, les β -bloquants, les IEC, les antagonistes calciques, médicaments qui ont fait leurs preuves depuis plusieurs années.

La mise en évidence des actions de l'Ang II sur les processus de croissance et les premiers résultats obtenus avec les IEC et les antagonistes des récepteurs de l'Ang II au cours d'études cliniques ou sur modèles animaux (Nelson et al., 1995) laissent envisager d'autres indications, plus séduisantes qui sont les dysfonctionnements cardiaques (insuffisance, ischémie, infarctus, hypertrophie ventriculaire gauche), l'athérosclérose, la resténose, les dysfonctionnements rénaux .

2.1.4.2.1. L'hypertension

Une hyperactivation du SRA est fréquemment observée dans les hypertensions malignes et rénovasculaires et chez certains patients présentant de l'hypertension essentielle, en particulier, chez ceux en déplétion sodée. Les IEC ont largement fait leurs preuves dans le traitement de l'hypertension. Il était donc tout à fait raisonnable de penser que les antagonistes des récepteurs de l'Ang II seraient également de bons antihypertenseurs. Les résultats obtenus avec le Losartan) et toutes les molécules en développement clinique n'ont pas déçu. Les effets sur la pression artérielle sont tout à fait comparables à ceux des IEC (Wong et al., 1995; Nelson et al., 1995). Le Losartan semble très bien toléré, seuls de légers vertiges ont été ressentis par certains patients. Les problèmes de toux observés avec les IEC ne semblent pas se manifester avec le Losartan.

2.1.4.2.2. L'insuffisance cardiaque

Plusieurs études cliniques ont montré qu'un traitement par des IEC est bénéfique dans les cas d'insuffisance cardiaque (IC) congestive (SAVE (Survival and Ventricular Enlargement), SOLVD (Studies of Left Ventricular Dysfunction) et CONSENSUS (Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study)) (Timmis et al., 1994). Dans ces études, les IEC améliorent la qualité de vie et prolongent la durée de survie des patients en particulier dans les cas d'IC sévères.

Ces études cliniques ont montré la capacité des IEC à diminuer l'hypertrophie du ventricule gauche (HVG), complication grave de l'IC. Le résultat important est que cet effet n'est pas uniquement dû à la normalisation de la pression artérielle. Une diminution de l'HVG chez des modèles d'IC a été observée avec des doses d'IEC trop faibles pour affecter la pression artérielle ou la postcharge. En revanche, d'autres vasodilatateurs capables de normaliser les paramètres tensionnels mais n'appartenant pas à la famille des IEC se sont montrés totalement

inefficaces contre l'HVG. Cela prouve que l'action de l'Ang II dans le phénomène d'hypertrophie cardiaque est directe et qu'elle n'est pas simplement une conséquence des effets de l'Ang II sur la pression artérielle (Dostal et al., 1993).

Le SRA cardiaque paraît jouer un rôle important dans les diverses complications associées à l'IC : hypertrophie et dilatation ventriculaire gauche, remodelage cardiaque avec synthèse de matrice extracellulaire et dépôt de collagène (Dostal et al., 1993; Hahn et al., 1993b; Ishiye et al., 1995).

Sur des modèles animaux d'IC, les antagonistes des récepteurs de l'Ang II ont également montré des effets bénéfiques (Ishiye et al., 1995). Ces résultats restent à confirmer chez l'homme. Une comparaison IEC-antagonistes de l'Ang II serait alors intéressante; une meilleure inhibition du remodelage cardiaque par les seconds pouvant être espérée grâce à leur meilleure capacité théorique à bloquer le SRA tissulaire (Ruzicka et al., 1993).

2.1.4.2.3. Les ischémies, infarctus et arythmies du myocarde

L'Ang II pourrait participer aux complications ischémiques associées à l'insuffisance cardiaque. L'Ang II, par son puissant pouvoir vasoconstricteur des artères systémiques et coronaires, par sa capacité à stimuler le système nerveux sympathique et la libération de catécholamines, peut aggraver l'ischémie du myocarde en réduisant l'apport en oxygène, tout en augmentant ses besoins via un accroissement des effets inotropes et de la post-charge.

La prescription d'IEC dans la phase aiguë ou dans les jours suivant l'infarctus semble diminuer les risques de récurrences et la mortalité (études SAVE, CONSENSUS). L'amélioration des paramètres hémodynamiques et l'action sur le remodelage cardiovasculaire post-infarctus semblent expliquer cette action bénéfique.

2.1.4.2.4. Les processus sténotiques et thrombotiques (resténose et athérosclérose)

L'angioplastie constitue un des traitements de choix de l'angine de poitrine. Mais l'intérêt pour ce traitement est modulé par l'importance des rechutes liées au phénomène de resténose qui touchent entre 30-40% des patients.

La découverte d'"antiresténotiques" fait l'objet de très nombreuses recherches. Les approches thérapeutiques sont très diverses et ceci parce que les phénomènes intervenant au cours de la resténose sont très nombreux : agrégation plaquettaire, prolifération et migration des cellules musculaires lisses, synthèse de matrice extracellulaire (O'Brien et al., 1994). Il apparaît immédiatement l'intérêt que pourraient avoir les inhibiteurs du SRA dans la lutte contre cette pathologie, l'Ang II étant supposée impliquée dans au moins trois de ces événements (migration, prolifération cellulaires et synthèse de matrice extracellulaire).

Les résultats sur certains modèles animaux étaient très encourageants, les IEC et les antagonistes des récepteurs AT₁ inhibant très significativement la formation de néointima après angioplastie chez le rat principalement (Prescott et al., 1991, 1993). Mais ces premières observations ont été remises en question lorsque chez d'autres espèces (singe, porc) et surtout chez l'homme, les IEC se sont révélés inefficaces contre l'épaississement vasculaire après angioplastie (Hanson et al., 1991; Lam et al., 1992). Dans l'étude MERCATOR (Multicenter European Research Trial with Cilazapril after Angioplasty to prevent Transluminal coronary Obstruction and Restenosis), aucune prévention contre la resténose coronarienne n'a été observée après traitement par le Cilazapril à la dose de 5 mg b.i.d. (Mercator Study Group, 1992). Ce résultat a jeté le doute sur toutes les théories selon lesquelles l'Ang II était impliquée dans les processus de migration, de prolifération cellulaires. Mais après analyse du protocole suivi dans cette étude clinique, plusieurs discordances apparaissent par rapport aux protocoles suivis chez l'animal. Les doses testées chez l'animal sont largement supérieures et, fait très important, le traitement est débuté six jours avant l'intervention. Mais il faut tout de même reconnaître que ces modèles animaux ne sont pas tout à fait adaptés : la lésion est réalisée sur une artère saine alors que l'angioplastie chez l'homme est effectuée sur un vaisseau athéromateux. Il est évident que cela peut introduire des différences fondamentales dans les mécanismes de sténose.

Il est toutefois trop tôt pour bannir totalement les inhibiteurs du SRA dans la prévention et le traitement de la resténose, d'autres études cliniques sont en cours et les résultats sont attendus avec impatience, en particulier ceux de l'étude MARCATOR (Multicenter American Research Trial with Cilazapril after Angioplasty to prevent Transluminal coronary Obstruction and Restenosis) où des doses supérieures de Cilazapril (2,5; 5 et 10 mg b.i.d.) sont testées.

Une étude avec un antagoniste de l'Ang II serait également très intéressante. Dans les modèles de resténose chez l'animal, les antagonistes de l'Ang II semblent inhiber à la fois la migration et la prolifération cellulaires, alors que les IEC ne semblent agir que sur la migration (Prescott et al., 1991). L'action antiproliférative de l'Ang II par stimulation des récepteurs AT₂, si elle est confirmée, peut constituer un deuxième avantage pour les antagonistes des récepteurs AT₁. L'augmentation du taux d'Ang II observée au cours du traitement par ces antagonistes peut induire une surstimulation des récepteurs AT₂ qui pourrait donc être bénéfique...

L'athérosclérose présente des points communs avec la resténose (migration et prolifération des cellules musculaires lisses). Un traitement par les inhibiteurs du SRA est donc envisageable. Les résultats obtenus sur les modèles animaux sont partagés, mais il faut noter que ces modèles sont souvent imparfaits car ils ne reproduisent que partiellement les processus athéromateux rencontrés dans les vaisseaux humains (Prescott et al., 1993).

Au cours de l'hypertension artérielle surviennent des altérations structurales particulières qui touchent en premier lieu les vaisseaux, puis le cœur. Ces modifications concernent essentiellement les parois de ces différents organes : les cellules myocytaires s'y trouvent augmentées en volume et en nombre, alors que la matrice protéique extracellulaire voit sa composition biochimique remaniée. Tous ces événements s'inscrivent dans les processus de remodelage cardiovasculaire. C'est pourquoi, au-delà de la baisse des chiffres tensionnels, un traitement antihypertenseur doit désormais viser à la restauration de l'intégrité structurale des différents éléments anatomiques concernés pour améliorer leurs fonctions. La réparation des tissus cardiovasculaires, par opposition au remodelage, devient un objectif de la thérapie antihypertensive future.

L'action hypertrophique et hyperplasique de l'Ang II sur les vaisseaux et le cœur fait des inhibiteurs du SRA de bons candidats sur un plan théorique pour cette thérapie du futur. Les IEC ont déjà montré qu'ils pouvaient apporter des bénéfices pour lutter contre ce remodelage chez l'homme. Tout reste à démontrer avec les antagonistes des récepteurs de l'Ang II.

2.1.4.2.5. Les maladies rénales

L'hypertension est un facteur de risque majeur dans l'apparition de dysfonctionnements rénaux. Les études cliniques et précliniques ont montré qu'un antihypertenseur peut réduire l'altération des fonctions rénales. Les inhibiteurs du SRA sont d'autant plus concernés que le SRA, en plus de son action sur l'hémodynamique rénale, intervient aussi sur les transports tubulaires, sur les fonctions glomérulaires (Nelson et al., 1995)... Les IEC et le Losartan ont déjà montré des effets bénéfiques par vasodilatation des artères rénales et par maintien du taux de filtration glomérulaire. Le Losartan a montré un effet diurétique en bloquant la réabsorption du sodium au niveau du segment tubulaire proximal S₁. Un effet uricosurique a été détecté avec le Losartan, mais cette action ne serait pas liée à une action sur le SRA.

Enfin des effets protecteurs rénaux ont été montrés pour les IEC et les antagonistes des récepteurs de l'Ang II chez des patients avec des insuffisances rénales. Ils diminuent notamment la protéinurie, l'apparition de scléroses glomérulaires et cela aussi bien dans les cas de néphropathies diabétiques et non diabétiques (Kohzuki et al., 1995).

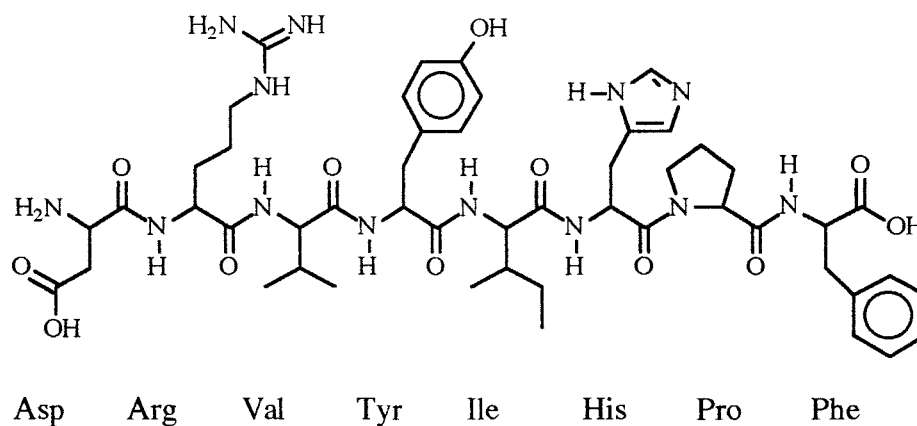
2.2 LES LIGANDS PEPTIDIQUES DES RECEPTEURS DE L'ANG II

Depuis que sa séquence en acides aminés a été élucidée (Elliott et al., 1956), l'Ang II a fait l'objet de nombreuses études aboutissant à la découverte d'antagonistes de ces récepteurs.

L'établissement de relations structure-activité de l'angiotensine et d'analogues a permis dans un premier temps, l'élaboration d'antagonistes peptidiques. Ces composés n'ont cependant jamais pu être développés comme agents thérapeutiques. La structure peptidique leur confère une faible biodisponibilité orale, une courte durée d'action (exposition aux peptidases) et souvent une action agoniste partielle résiduelle. La seule exception est la Saralazine [Sar¹, Val⁵, Ala⁸] Ang II, seul antagoniste peptidique à avoir reçu l'accord de la FDA pour usage clinique. En revanche, ces composés sont de formidables outils pharmacologiques pour l'étude des relations structure-activité ou affinité de l'interaction ligand-récepteur de l'Ang II.

2.2.1. Relations structure-activité des agonistes

L'étude systématique de chacun des huit acides aminés de l'Ang II a révélé le rôle et l'importance de chacun d'eux.



Angiotensine II

Asp¹ : rôle conformationnel

Ce résidu admet un grand nombre de modifications sans perte d'activité. La charge positive du N-terminal intervient pour l'affinité, en revanche la charge négative sur la chaîne latérale n'est pas primordiale.

Son remplacement par la sarcosine (N-méthylglycine) en position 1 produit une augmentation de l'affinité des agonistes et des antagonistes (Hall et al., 1974). Elle est d'ailleurs fréquemment utilisée puisque la majorité des antagonistes et des agonistes peptidiques synthétisés possède cet acide aminé en position 1.

Initialement, cet effet était attribué à une protection contre les aminopeptidases, mais il a été démontré que la sarcosine jouerait un rôle stabilisateur de la conformation du peptide (Matsoukas et al., 1988, 1994).

Arg² : rôle conformationnel

Dans l'hypothèse d'un arrangement en cluster des trois résidus aromatiques Tyr⁴, His⁶, Phe⁸ et d'un transfert de charge entre l'hydroxyle phénolique de la tyrosine, le noyau imidazolique de l'histidine et l'acide carboxylique terminal, l'arginine par la charge positive de son groupe guanidinium favoriserait ce transfert en stabilisant la forme phénolate de la tyrosine (Matsoukas et al., 1994).

Dans les peptides où l'Asp¹ est remplacé par une sarcosine, cette interaction entre la guanidine et le phénol serait favorisée, ce qui pourrait expliquer l'activité "superagoniste" du peptide [Sar¹]Ang II.

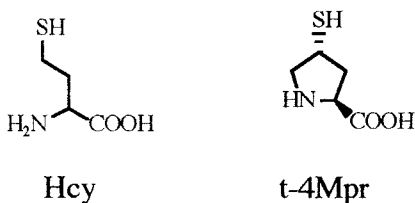
Ces deux premiers acides aminés sont souvent décrits comme non primordiaux pour l'affinité et l'activation. Cependant, la perte d'affinité observée avec le peptide tronqué [des 1,2]Ang II montre que le dipeptide N-terminal joue tout de même un rôle non négligeable pour la fixation du peptide à son récepteur.

Val³ et Ile⁵ : rôles conformationnels importants

Il semble en effet que ces deux acides aminés participent à un turn dont la nature (γ turn inversé, β turn ...) est encore controversée (Nikiforovich et al., 1993). De nombreux peptides cycliques ont été élaborés pour tenter de rigidifier cette structure : l'établissement d'un pont disulfure reliant les positions 3 et 5 donne des peptides rigidifiés possédant une activité équivalente à l'Ang II : [Sar¹, Hcy^{3,5}] Ang II, [Sar¹, Cys^{3,5}] Ang II, (Hcy : homocystéine) (Spear et al., 1990; Samanen et al., 1991).

Un résultat intéressant a été obtenu avec l'introduction d'un nouvel acide aminé : trans-4-mercaptoproline (t-4Mpr), analogue rigide de l'Hcy, combinant les propriétés de l'homocystéine et de la proline. L'analogue cyclique de l'Ang II : [Sar¹, t-4Mpr³, Hcy⁵] Ang II est trente fois moins actif sur les récepteurs AT₁, mais quinze fois plus actif sur le récepteur AT₂ que l'Ang II (Plucinska et al., 1993). Ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle l'Ang II adopte des conformations différentes pour interagir avec les différents sous-types de récepteurs.

D'autre part, la présence d'une chaîne carbonée ramifiée en position 5 des agonistes non cyclisés est indispensable pour conserver une bonne activité (Samanen et al., 1989b).



Tyr⁴ : rôle essentiel pour l'affinité et l'activation du récepteur

L'association avec le récepteur fait intervenir une interaction structurale et stérique du cycle aromatique phénolique avec une région hydrophobe assez étroite du récepteur, complétée par une liaison hydrogène ou ionique entre l'hydroxyle phénolique et le récepteur (Hsieh et al., 1979). La formation du phénolate paraît essentielle dans l'activation du récepteur.

His⁶ : rôle important pour l'affinité, mais non essentiel pour l'activité

Cet acide aminé peut remplir deux rôles dans la liaison au récepteur. Soit il interagit directement avec un résidu du récepteur, soit il participe à des interactions intramoléculaires qui maintiennent l'Ang II dans une conformation adéquate pour se lier au récepteur (Samanen et al., 1988).

L'His a été remplacée avec succès par une p-aminophénylalanine : [4-NH₂Phe⁶] Ang II. Ce peptide présente la caractéristique d'être un ligand hautement sélectif des récepteurs AT₂ et des récepteurs situés dans le cerveau (Speth et al., 1990).

Pro⁷ : rôle conformationnel important

Cet acide aminé secondaire est à l'origine du second turn présent dans la conformation de l'Ang II. L'étude de peptides cycliques a démontré la création par la proline d'un γ turn dans la partie C-terminale (Samanen et al., 1991; Matsoukas et al., 1993; Plucinska et al., 1993). Cette conformation paraît primordiale pour conserver une affinité. Le remplacement de la L-Pro par son énantiomère D-Pro fait disparaître toute affinité du peptide pour le récepteur (Samanen et al., 1988).

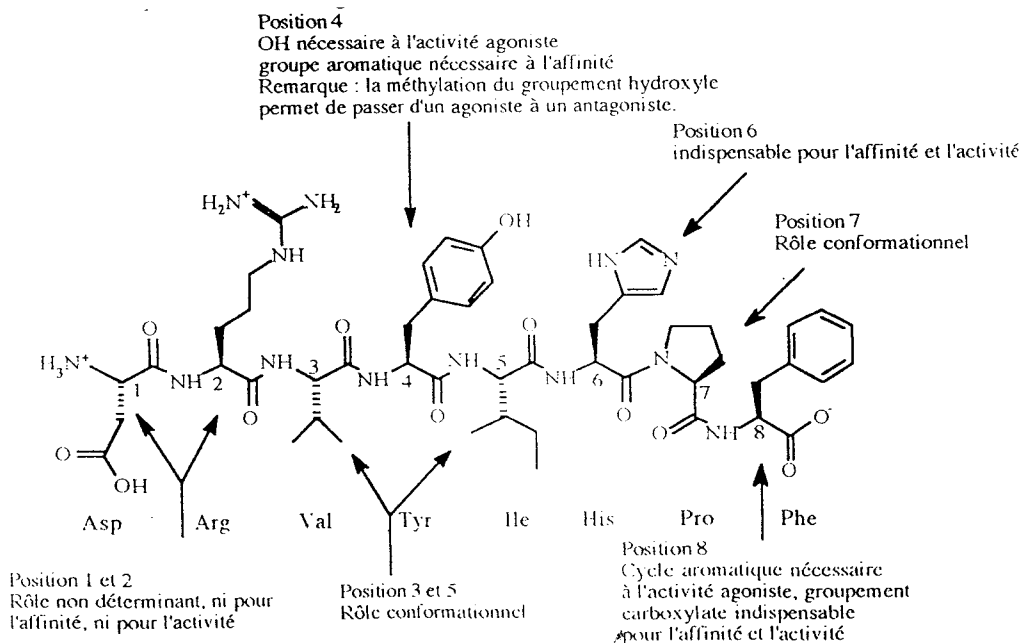
Phe⁸ : rôle essentiel pour l'affinité et l'activation du récepteur

Le COOH-terminal est indispensable pour l'affinité et interagit avec le récepteur par une liaison ionique (Hsieh et al., 1986).

Le cycle aromatique sur la chaîne latérale joue un rôle important pour l'activité, en particulier par son orientation dans l'espace. Il apparaît en effet que cette orientation influence et conditionne celle du phénol de la tyrosine, élément majeur pour l'activation du récepteur. Tout écart par rapport à la position de référence est sanctionné soit par une diminution de l'affinité, soit par le passage d'agoniste à antagoniste (Kohsla et al., 1974; Samanen et al., 1988; Hsieh et al., 1989).

Remarque : le peptide tronqué [Sar¹] Ang II¹⁻⁷, antagoniste du récepteur AT₁ possède une affinité comparable à l'Ang II (Bovy et al., 1989), résultat qui confirme bien l'importance du phényle pour l'activité agoniste et non pour l'affinité.

Il ressort de ces études que le **pentapeptide terminal Tyr-Ile-His-Pro-Phe est essentiel pour l'affinité et l'activité de l'Ang II**. Il rassemble la majorité des éléments indispensables à l'Ang II pour se fixer au récepteur (notion d'adresse) et pour déclencher une réponse (notion de message).



2.2.2. Relations structure-affinité des antagonistes

L'étude systématique de la séquence peptidique de l'Ang II a permis la découverte d'antagonistes peptidiques de l'Ang II.

Ils peuvent être classés en deux catégories :

- les antagonistes de type I : modification de l'acide aminé en position 8
- les antagonistes de type II : modification de l'acide aminé en position 4

2.2.2.1. Les antagonistes de type I (Khosla et al., 1974; Samanen et al., 1988; Hsieh et al., 1989)

Le remplacement de la Phe⁸ par des acides aminés non aromatiques confère à certains peptides une activité antagoniste :

exemples :

[Sar¹, Ile⁸] Ang II (Sarile)
 [Sar¹, Val⁵, Ala⁸] Ang II (Saralazine)
 [Sar¹, Thr⁸] Ang II

Dans cette famille, la position 1 est souvent occupée par une sarcosine, mais cela n'est pas d'une absolue nécessité.

Sur le plan pharmacologique, ces antagonistes sont compétitifs et lentement réversibles (pseudoirréversibles).

Ces molécules illustrent parfaitement la relation structure-activité mise en évidence pour les agonistes au niveau de la Phe⁸ : le cycle aromatique sur la chaîne latérale doit adopter impérativement une orientation précise pour contribuer à l'activation du récepteur (Samanen et al., 1988).

2.2.2.2. Les antagonistes de type II (Hsieh et al., 1979; Scanlon et al., 1984; Matsoukas et al., 1985; Samanen et al., 1989a)

Ici la modification porte sur la Tyr⁴. En effet la méthylation de l'hydroxyle phénolique ou sa substitution par un groupement incapable de former une liaison hydrogène a permis la découverte de cette nouvelle famille d'antagonistes peptidiques :

exemples :

[Sar¹, Tyr(OMe)⁴] Ang II (Sarmesine)
 [Sar¹, 4-Cl-Phe⁴] Ang II
 [Sar¹, Phe⁴] Ang II

Ces antagonistes diffèrent également des précédents par le fait que :

- le remplacement en position 1 par la sarcosine est d'une absolue nécessité (Matsoukas et al., 1988)
- sur le plan pharmacologique, ce sont des antagonistes compétitifs et réversibles.

Ces antagonistes confortent l'hypothèse du rôle déterminant de l'hydroxyle phénolique dans l'activation du récepteur.

Remarque : des antagonistes hybrides type I / type II ont été synthétisés, mais tous se révèlent moins actifs que les antagonistes de type I ou de type II correspondants. Ceci peut s'expliquer par une trop grande diminution de l'affinité de ces hybrides pour le récepteur (Matsoukas et al., 1985).

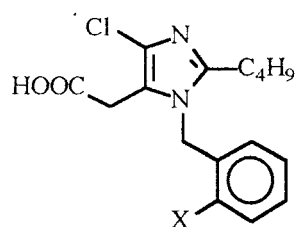
Des études comparables à celles effectuées sur les agonistes ont permis d'étudier les différents turns de la séquence peptidique de ces antagonistes. A quelques exceptions près, les résultats obtenus sur les agonistes sont valables pour les antagonistes. Par exemple, l'antagoniste cyclisé [Sar¹, Hcy^{3,5}, Ile⁸] Ang II possède une activité comparable à celle de son homologue non cyclisé [Sar¹, Ile⁸] Ang II. Il est à remarquer tout de même que les antagonistes de type II sont moins tolérants vis-à-vis de modifications supplémentaires que ceux de type I.

2.3. LES LIGANDS NON PEPTIDIQUES DES RECEPTEURS DE L'ANG II

2.3.1. Les antagonistes des récepteurs AT₁ de l'Ang II

2.3.1.1 Le DuP 753 et le SKF 108566

L'année 1982, onze ans après la découverte de la Saralaline, marque la parution de deux brevets par la firme Takeda (Furukawa et al., 1982a, 1982b). Ils rapportent que des dérivés du N-benzyl imidazole (S 8307, S 8308) possèdent des propriétés antagonistes faibles mais sélectives et compétitives des récepteurs de l'Ang II, sans action agoniste résiduelle.



S 8307, X = Cl

S 8308, X = NO₂

La firme Du Pont, puis la firme SmithKline Beecham utilisèrent ces deux molécules comme modèle possible de la conformation active de l'Ang II et les superposèrent au niveau de la partie C-terminale (cf fig 5) (Duncia et al., 1990; Weinstock et al., 1991). Ceci a inspiré deux modifications rationnelles et distinctes de la structure, chacune donnant naissance à une famille d'antagonistes non peptidiques de l'Ang II.

Les deux figures suivantes (cf fig 5 et 6) illustrent et résument les deux approches suivies, la première par Du Pont avec la création du DuP 753, la seconde par SmithKline Beecham avec celle du SKF 108566, chefs de file de deux familles d'antagonistes des récepteurs AT₁ de l'Ang II.

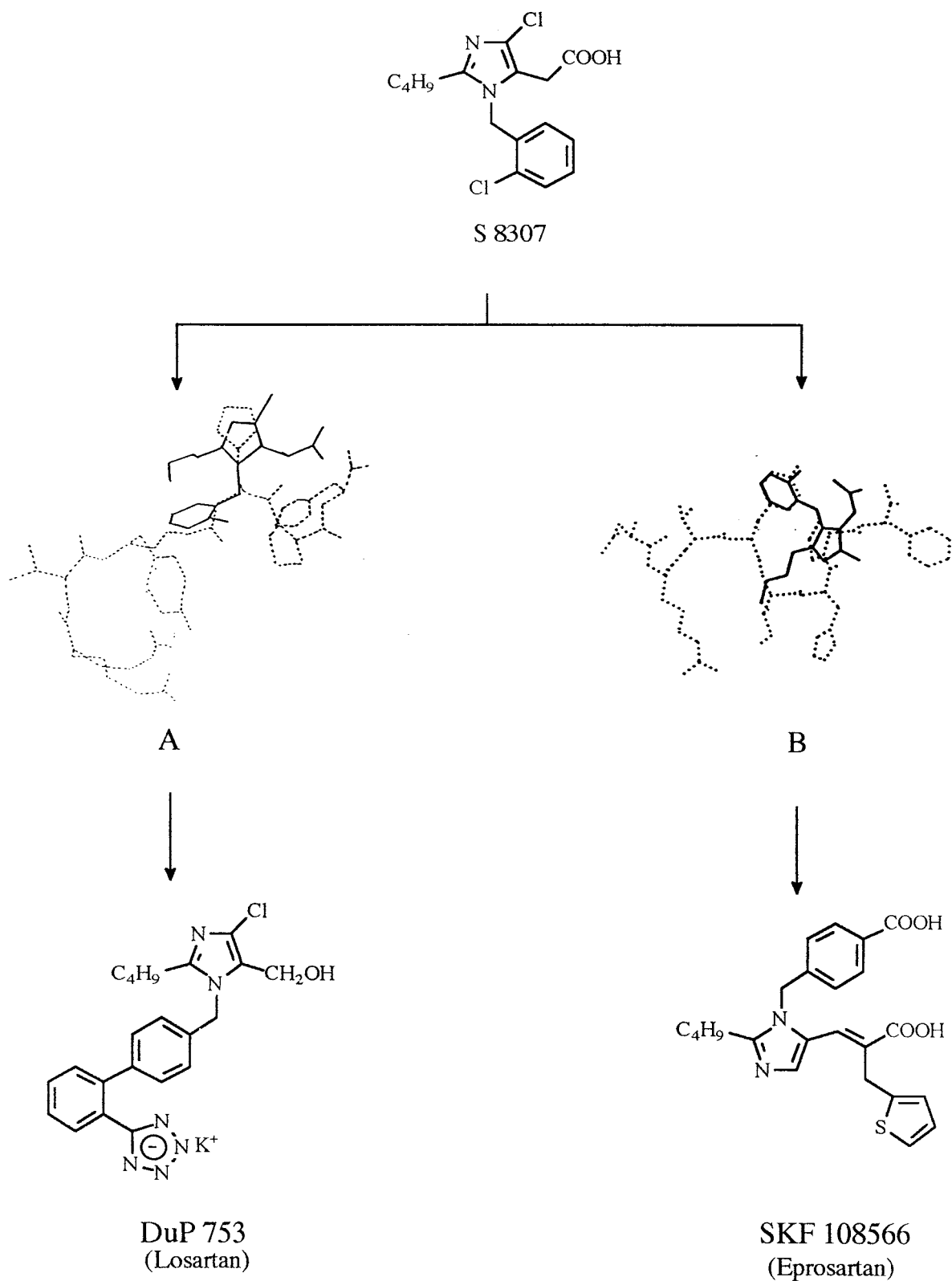
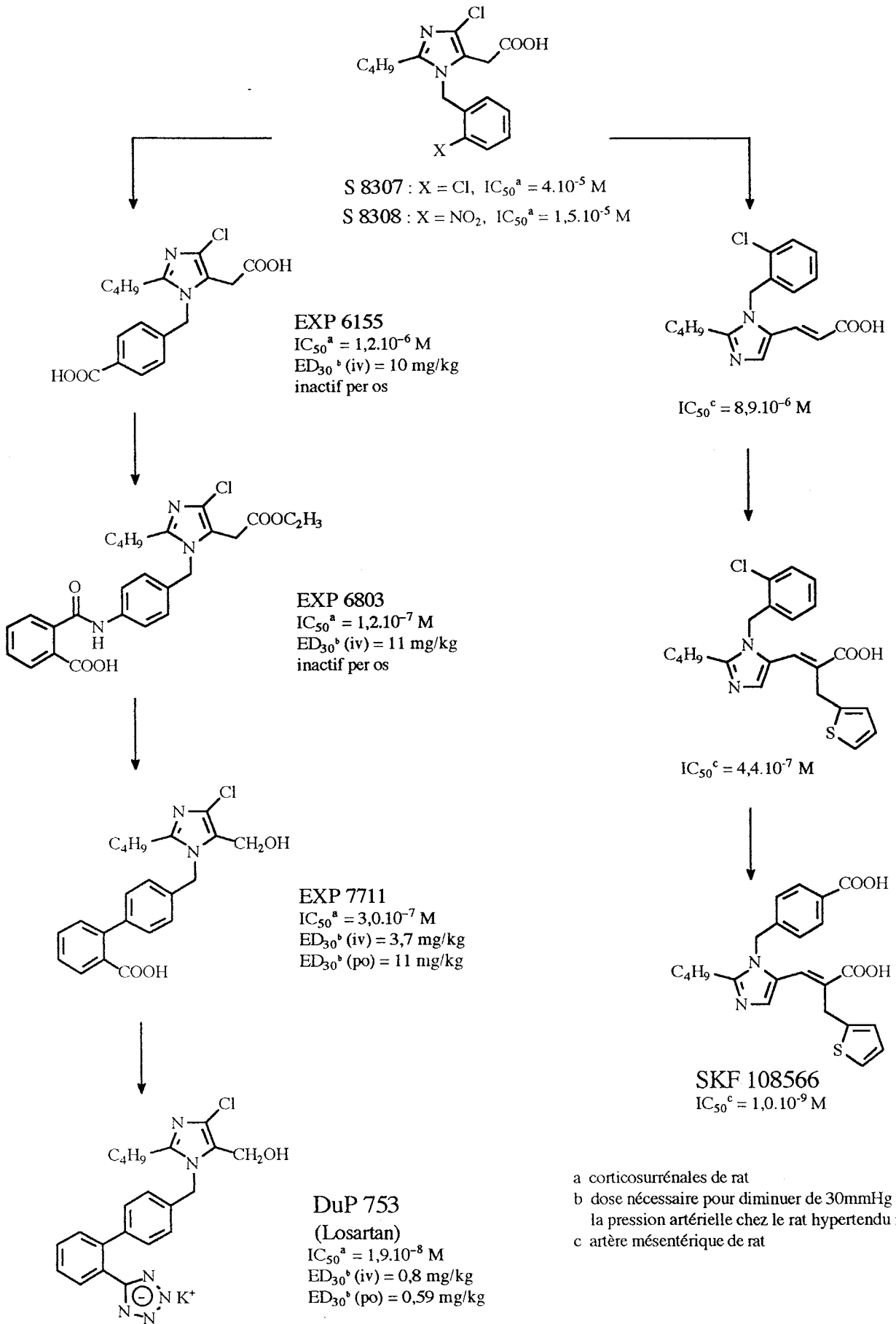


Figure 5 : Superposition du S 8307 et de l'Ang II selon Du Pont (A) et SmithKline Beecham (B) (Duncia et al., 1990; Weinstock et al., 1991)



a corticosurrénales de rat
 b dose nécessaire pour diminuer de 30mmHg la pression artérielle chez le rat hypertendu rénal
 c artère mésentérique de rat

Figure 6 : Découverte du DuP 753 et du SKF 108566

2.3.1.1.1. Conception du DuP 753

Les chercheurs de Du Pont ont superposé la molécule S 8307 sur la partie C-terminale de l'Ang II. Pour cela, ils ont pris comme modèle une conformation proposée par Smeby et Fermandjian (Smeby et al., 1978; Duncia et al., 1990) et ont émis trois hypothèses de travail (cf fig 5) :

- superposition du groupe carboxyle du S 8307 avec le COOH-terminal,
- superposition du noyau imidazolique avec celui de l'histidine,
- orientation du benzyle vers la partie N-terminale.

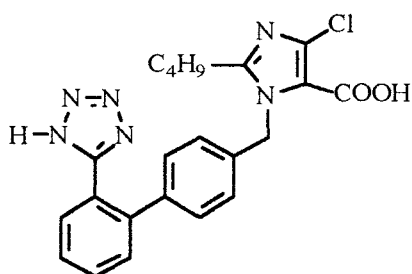
La position para du substituant benzylique du S 8307 apparaît comme un point d'ancrage intéressant pour fixer un groupe susceptible d'atteindre la partie N-terminale et notamment les deux résidus acides : Tyr⁴ et Asp¹.

La première modification fut donc l'introduction d'une fonction carboxyle (EXP 6155). Elle a permis de multiplier par dix l'affinité par rapport à celle du S 8307. Ces résultats encourageants ont suscité d'autres modifications comme l'introduction d'un substituant acide benzoïque relié au benzyle par un lien amide susceptible de mimer ceux présents dans l'Ang II. Mais tous les composés synthétisés comme par exemple le EXP 6803, bien que de plus en plus actifs *in vitro* et *in vivo*, se sont révélés inactifs *per os* (Duncia et al., 1990; Carini et al., 1990).

Une deuxième génération de molécules a alors été développée. Le système benzylbenzamide des dérivés de première génération est remplacé par un système biphényle. Le dérivé EXP 7711 est le premier antagoniste actif *per os*.

Enfin l'introduction d'un tétrazole, bioisostère plus lipophile du carboxyle, en 2' sur le biphényle, a donné naissance au DuP 753, un des meilleurs antagonistes des récepteurs AT₁ de l'Ang II en termes d'activité *in vitro* et d'efficacité *in vivo* connus à ce jour (Carini et al., 1991). Il est à l'heure actuelle le seul antagoniste de l'Ang II commercialisé, sous le nom de Cozaar[®].

Il est intéressant de noter qu'*in vivo*, le DuP 753 est métabolisé principalement en EXP 3174 par oxydation de la fonction 5-hydroxyméthyle en acide carboxylique. Les importantes activité et durée d'action de ce métabolite sont en partie responsables de l'activité du DuP 753 (Wong et al., 1991).



EXP 3174

IC₅₀^a = 3,7;10⁻⁸M

ED₃₀^b (iv) = 0,04 mg/kg

ED₃₀^b (po) = 0,66 mg/kg

a corticosurrénales de rat

b dose nécessaire pour diminuer de 30 mmHg

la pression artérielle chez le rat hypertendu rénal

2.3.1.1.2. Conception du SKF 108566

La réflexion de la firme SmithKline Beecham est basée sur une conformation de l'Ang II différente de celle prise comme référence par la firme Du Pont (cf fig 5) (Weinstock et al., 1991; Keenan et al., 1992; Samanen et al., 1993). La principale caractéristique de ce modèle est la proximité entre le résidu phénolique de la tyrosine et le COOH-terminal. La chaîne latérale de l'histidine est rejetée vers la partie dégagée de la structure.

La superposition du S 8307 et de la partie C-terminale de l'Ang II dans cette conformation est réalisée par alignement :

- de la fonction carboxylique en 5 sur l'imidazole avec le COOH-terminal,
- du N-benzyle avec le phénol de la tyrosine,
- de la chaîne butyle avec celle de l'isoleucine.

Le noyau imidazole n'a pas d'"équivalent direct". Il est positionné dans la région de la proline et semble reproduire le γ turn du tripeptide : His-Pro-Phe et servir de point d'ancrage aux trois éléments précédents.

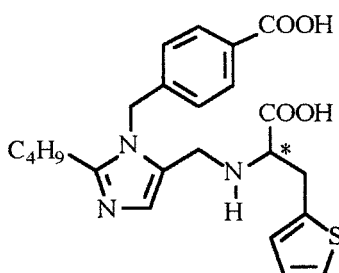
La région de la phénylalanine (partie C-terminale) apparaît alors comme la plus accessible par déploiement de la molécule. Trois modifications ont été envisagées :

- allongement de la chaîne liant la fonction carboxylique au cycle imidazolique en 5,
- introduction d'un cycle aromatique susceptible de recouvrir celui de la phénylalanine,
- substitution du N-benzyle pour copier au mieux le résidu phénolique de la tyrosine.

Allongement de la chaîne acide (Weinstock et al., 1991; Keenan et al., 1992)

Une chaîne trans acrylique offre les meilleurs résultats. Elle possède une longueur, mais surtout une rigidité et une configuration adéquates pour positionner convenablement la fonction carboxyle. La distance entre la tyrosine et le COOH-terminal est parfaitement reproduite.

L'unique pharmacomodulation décrite de la fonction acide acrylique est son remplacement par une fonction acide aminée. Ces structures présentent un carbone asymétrique. Tous les énantiomères de configuration D sont plus affins que leur analogue L. Ce résultat rappelle celui observé avec les ligands peptidiques où la configuration de la Phe⁸ est importante : la présence en position 8 d'une LPhe donne des agonistes, celle de DPhe des antagonistes. Cette relation structure-affinité conforterait l'hypothèse d'une superposition de cette portion du SKF 108566 avec la partie C-terminale de l'Ang II (Hill et al., 1995).



D : IC₅₀ = 36,7.10⁻⁹ M
L : IC₅₀ = 673.10⁻⁹ M

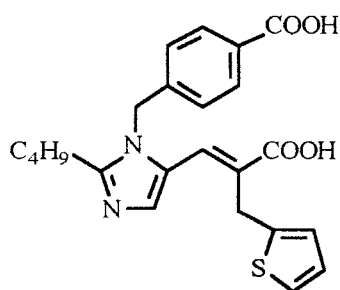
Introduction d'un cycle aromatique (Weinstock et al., 1991; Keenan et al., 1992)

La position α sur la chaîne trans acrylique constitue un point de fixation idéal. La substitution par un benzyle, puis par un thiénylméthyle sur cette position a permis d'obtenir des composés possédant une bonne affinité et surtout une activité orale appréciable.

Substitution du N-benzyle (Keenan et al., 1993)

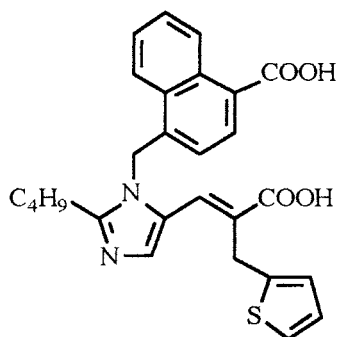
Dans l'hypothèse de travail, cet élément recouvre le phénol de la tyrosine, élément primordial pour l'activation du récepteur. La substitution du benzyle influence très profondément l'affinité. Le composé SKF 108566 où une fonction acide carboxylique est fixée en position 4 sur le benzyle est un des plus actifs, alors que l'analogue 2-COOH est presque "inactif".

La géométrie orthogonale des noyaux imidazolique et benzylique est très favorable. Le composé trisubstitué en 2 et 3 par des atomes de chlore et en 4 par un acide carboxylique sur le benzène a une affinité six fois supérieure à celle du SKF 108566. L'analogue naphthalénique du SKF 108566, le SB 203220 possède également une bonne affinité pour AT₁ et son activité antihypertensive in vivo est de plus longue durée (Weinstock et al., 1994).



SKF 108566
 $IC_{50}^a = 1,0 \cdot 10^{-9} M$
 $K_b^b = 2,1 \cdot 10^{-10} M$

a artère mésentérique de rat
 b aorte isolée de lapin



SB 203220
 $IC_{50}^a = 1,2 \cdot 10^{-9} M$
 $K_b^b = 5,9 \cdot 10^{-11} M$

Remarque : le rôle et l'importance du noyau imidazolique n'ont pour l'instant pas été totalement élucidés. Seuls un isomère de position et un analogue benzylique du SKF 108566 ont été synthétisés (Keenan et al., 1993). Dans les deux cas, l'affinité et l'activité chutent. Ce résultat est très intéressant et demande à être confirmé. L'imidazole, dans cette famille de dérivés pourrait jouer un rôle plus important que celui de simple point d'ancrage des éléments importants pour l'affinité.

2.3.1.1.3. Nouvelles superpositions des antagonistes avec l'Ang II

A l'origine, lorsque ces deux antagonistes ont été conçus, les correspondances avec l'Ang II étaient les suivantes :

Ang II	DuP 753	SKF 108566
COOH terminal	CH ₂ OH	COOH acrylique
Phényle de Phe ⁸	x	Thiényle
Imidazole de His ⁶	Imidazole	x
OH + phényle de Tyr ⁴	Tétrazole + second aromatique du biphenyle	COOH + phényle benzoïques
chaîne latérale de Ile ⁵	butyle	butyle

Puis au fur et à mesure des recherches une ambiguïté est apparue. En effet différents résultats laissent supposer notamment que la structure biphenyltétrazole du DuP 753 ne remplace pas la Tyr⁴, mais est plutôt orientée vers la partie C-terminale du peptide et que l'hydroxyméthyle en 5 sur l'imidazole se superposerait à l'hydroxyle phénolique. En fait pour les deux molécules existe au moins une deuxième façon de les superposer avec le peptide (Moore et al., 1994).

Ang II	DuP 753	SKF 108566
COOH terminal	Tétrazole	COOH benzoïque
Phényle de Phe ⁸	Second aromatique du biphenyle	Phényle de l'acide benzoïque
Imidazole de His ⁶	Imidazole ?	Thiényle ?
OH + phényle de Tyr ⁴	CH ₂ OH+ imidazole ?	COOH acrylique + ?
chaîne latérale de Ile ⁵	butyle	butyle

A l'heure actuelle personne ne peut dire quelle est la bonne solution. Les études de mutagenèse dirigée devraient donner la solution. Pour l'instant, seules des pistes sont ouvertes. La principale est que l'Ang II et les antagonistes non peptidiques ne se fixeraient pas sur le même site. Il en résulte que la recherche à tout prix d'une correspondance, équivalence entre chaque élément de l'antagoniste et du peptide n'est peut être plus justifiée.

De plus, d'une famille à une autre d'antagonistes, des différences importantes dans les relations structure-affinité et dans les caractéristiques pharmacologiques (antagonistes surmontables - insurmontables) sont observées. Ce fait peut être expliqué par l'existence également de sites de liaison différents entre antagonistes.

Les deux premiers antagonistes élaborés, le DuP 753 et le SKF 108566 illustrent parfaitement cette ambiguïté. Les chercheurs de SmithKline Beecham ont comparé les structures du

SKF 108566 et du DuP 753. Pour cela, ils ont essayé de superposer les deux molécules (Keenan et al., 1993).

Deux hypothèses sont envisagées :

1- la superposition est effectuée entre (cf fig 7) :

- l'acide benzoïque du SKF 108566 et le tétrazole du DuP 753
- l'acide acrylique du SKF 108566 et l'hydroxyméthyle du DuP 753.

Il en découle alors un parfait alignement des chaînes carbonées butyle et des cycles imidazoliques. En revanche le thiophène du SKF 108566 ne trouve aucun correspondant dans la structure du DuP 753.

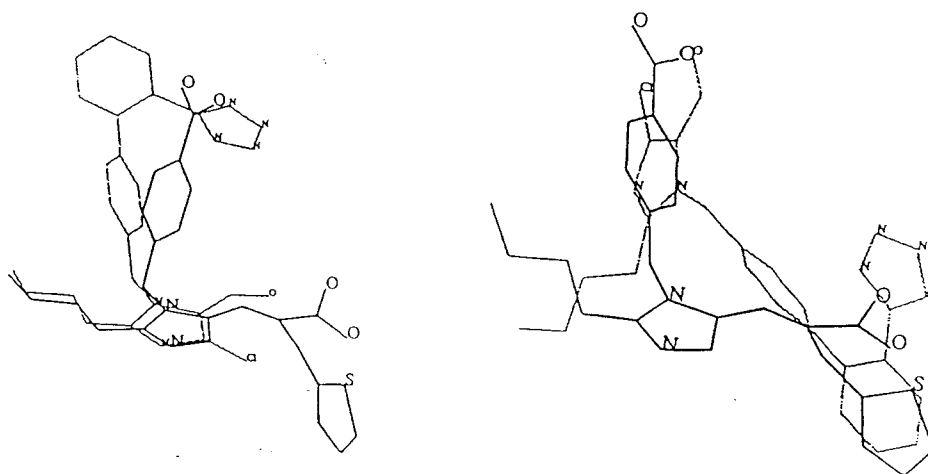
2- la superposition est effectuée entre (cf fig 7) :

- l'acide acrylique du SKF 108566 et le tétrazole du DuP 753
- l'acide benzoïque du SKF 108566 et l'hydroxyméthyle du DuP 753.

Cette fois le phényle terminal du biphenyle du DuP 753 et le thiophène du SKF 108566 se recouvrent assez bien. En revanche les chaînes carbonées et les cycles imidazoliques ne sont plus du tout alignés.

Des arguments en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses existent. Pour la première, la superposition des éléments importants : chaînes butyles, fonctions acides est presque parfaite. Mais la seconde permettrait d'expliquer les divergences entre les relations structure-affinité des deux composés. Par exemple si la première version était la bonne, le remplacement de l'acide benzoïque par la structure biphenyltétrazole devrait améliorer l'activité or on constate le contraire. De même, le remplacement du biphenyltétrazole du DuP 753 par un naphthalène diminue l'affinité alors que pour le SKF 108566, l'analogue naphthalénique est aussi affiné.

En fait, il est peut être vain de rechercher une correspondance exacte entre ces deux antagonistes car ils ne se fixent peut être pas au même endroit sur le récepteur et donc les éléments d'interaction sont peut être totalement différents...



Hypothèse 1

Hypothèse 2

Figure 7 : Superposition du DuP 753 et du SKF 108566

2.3.1.1.4. Antagonistes compétitifs et non compétitifs

Les études pharmacologiques réalisées sur les antagonistes peptidiques de l'Ang II ont mis en évidence deux types d'antagonistes (Wienen et al., 1992) :

- des antagonistes **compétitifs** ou **surmontables** : la Sarmesine, [Sar¹, Tyr(OMe)⁴] Ang II, et plus généralement les antagonistes de type II. La courbe dose-réponse de l'Ang II est translatée vers la droite, sans atténuation de la réponse maximale,
- des antagonistes **non compétitifs** ou **insurmontables** : la Sarile, [Sar¹, Ile⁸] Ang II, et plus généralement les antagonistes de type I. Ici la courbe dose-réponse est déplacée de manière non parallèle vers la droite et la réponse maximale est diminuée.

Le même phénomène est apparu avec les antagonistes non peptidiques :

- le DuP 753 présente toutes les caractéristiques d'un antagoniste compétitif et réversible
- le EXP 3174 présente celles d'un antagoniste non compétitif.

Par la suite d'autres antagonistes possédant une fonction acide en 5 sur l'imidazole (ou position équivalente sur d'autres hétérocycles) ont présenté le même profil pharmacologique que le EXP 3174 : exemples : Dup 532, GR 117289, CV 11974...

Mais cette relation cause-effet ne s'est pas confirmée et des exceptions sont apparues comme par exemple le SR 47436, antagoniste monoacide et pourtant non compétitif (Reitz et al., 1993) ou le SKF 108566, antagoniste diacide et compétitif (Cazaubon et al., 1993). D'autres exemples montrent qu'il n'y a pas de règle sur un plan structural pour expliquer pourquoi tel ou tel antagoniste est compétitif ou non (cf fig 8).

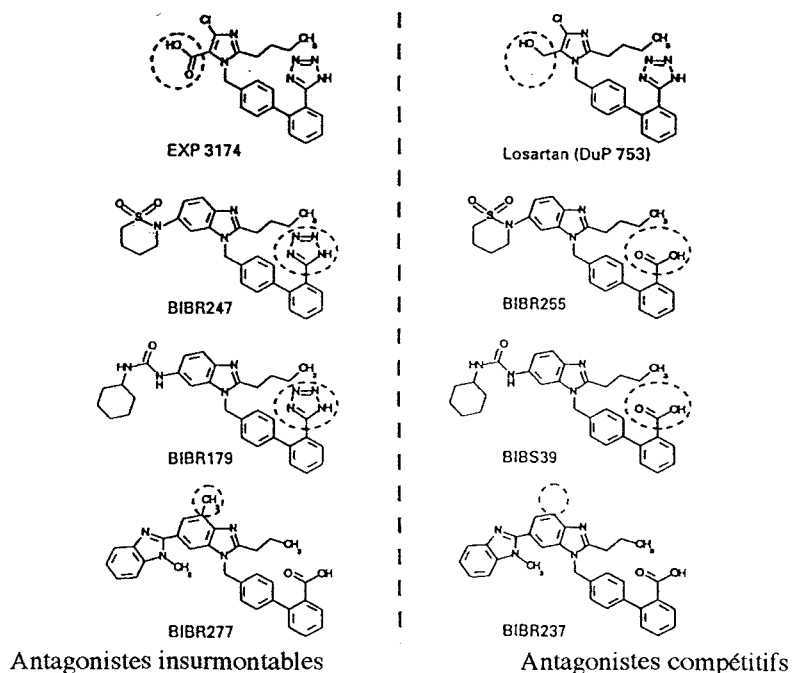


Figure 8

Plusieurs explications ont été proposées. Concernant la Sarile, l'hypothèse d'un antagonisme compétitif et pseudo-irréversible (restauration de la réponse maximale après lavage) semble la plus probable (Wienen et al., 1992).

Pour les antagonistes non peptidiques, diverses hypothèses sont avancées :

- le comportement apparemment non compétitif et insurmontable serait dû à une lente dissociation de l'antagoniste du récepteur (Hara et al., 1995).
- le récepteur existerait sous deux états en équilibre, un actif, l'autre inactif. Le caractère compétitif ou non dépendrait de l'affinité relative de l'antagoniste pour ces deux états (Robertson et al., 1994)
- une explication intéressante sur un plan moléculaire a été proposée par Kubo (Kubo et al., 1993a). Les boucles extracellulaires du récepteur AT₁ contiennent quatre résidus lysine qui pourraient être des cibles éventuelles pour le groupe acide supplémentaire. Cette interaction entraînerait un changement de conformation du récepteur qui pourrait stabiliser le complexe antagoniste-récepteur et expliquer l'irréversibilité et la diminution d'affinité de l'Ang II pour son site récepteur (allostérie). A l'heure actuelle, les études de mutagenèse n'ont pas encore confirmé ou infirmé cette hypothèse. Mais un résultat intéressant montre que le résidu N²⁹⁵ du récepteur AT₁ pourrait interagir différemment avec les deux types d'antagonistes (Schambye et al., 1994a, 1994b). On rejoindrait ici l'hypothèse précédente avec l'existence de différents sites de liaison pour les antagonistes non peptidiques.

Suite à la découverte des composés S 8307 et S 8308 et du DuP 753, de nombreuses firmes pharmaceutiques se sont lancées dans le recherche de nouveaux antagonistes. La majorité est inspirée du DuP 753, peu d'exemples de structures totalement différentes existent. Il faut noter que le dérivé SKF 108566 n'a pour ainsi dire pas été copié et aucun antagoniste en est inspiré.

2.3.1.2. Les antagonistes inspirés du DuP 753

Depuis la découverte du DuP 753 en 1991, une multitude d'antagonistes des récepteurs AT₁ de l'Ang II inspirés de cette structure ont été élaborés (Bühlmayer et al., 1992; Duddley et al., 1993). Plutôt qu'énumérer un à un tous ces antagonistes non peptidiques, nous allons essayer, à partir des principaux représentants de ces familles de mettre en évidence les éléments de drug-design qui ont inspiré leur élaboration. Nous tenterons également de dégager les nouvelles relations structure-affinité de l'interaction ligand-récepteur de l'Ang II révélées par ces antagonistes.

Sur un plan structural, ces antagonistes peuvent être séparés en deux classes :

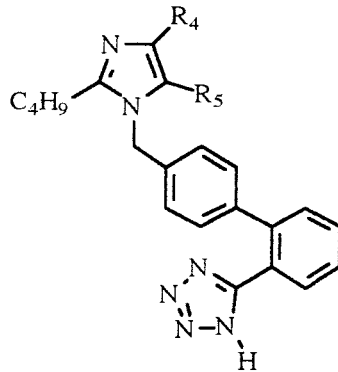
- les antagonistes conservant la structure biphényle reliée le plus souvent à un hétérocycle, imidazolique ou non,
- les antagonistes où la structure biphényle tétrazole est modifiée.

Remarque : une comparaison quantitative des caractéristiques pharmacologiques *in vitro* et *in vivo* des antagonistes est difficile, les modèles pharmacologiques variant d'un auteur à l'autre. Nous essaierons néanmoins et autant que possible de citer des données comparables et nous mentionnerons les modèles utilisés pour réaliser les tests.

2.3.1.2.1. Les antagonistes conservant la structure biphényle

2.3.1.2.1.1 Modification des substituants de l'imidazole

L'atome de chlore a été notamment remplacé par une chaîne éthyle (cf tableau 5) (Carini et al., 1994). Le dérivé DuP 581 présente une biodisponibilité supérieure au Dup 753. La fonction aldéhyde de ce composé est, comme pour le DuP 753, oxydée en acide carboxylique. Le dérivé obtenu DuP 811 est vingt fois plus actif, mais présente une faible biodisponibilité. Une prodrogue combinant la bonne biodisponibilité du DuP 581 et la bonne activité de son métabolite a alors été synthétisée par estérification de la fonction acide.



R4	R5	Nom	ED30 (iv) ^c mg/kg	ED30 (po) ^c mg/kg	Biodisponibilité orale
Cl	CH ₂ OH	DuP 753	0,80	0,59	33% ^a
CF ₂ CF ₃	COOH	DuP 532	0,042	0,21	12% ^b
C ₂ H ₅	CHO	DuP 581	0,11	0,027	65% ^a
C ₂ H ₅	COOH	DuP 811	0,005	0,03	11% ^a
C ₂ H ₅	COOCH ₂ O ₂ CC(CH ₃) ₃	Prodrogue	-	-	47% ^a

a biodisponibilité chez le rat

b biodisponibilité chez le chien

c pouvoir antihypertenseur par voie intraveineuse (iv) ou per os (po) chez le rat hypertendu rénal vigile. ED₃₀, dose nécessaire pour diminuer de 30 mmHg la pression artérielle

(Carini et al., 1994)

Tableau 5

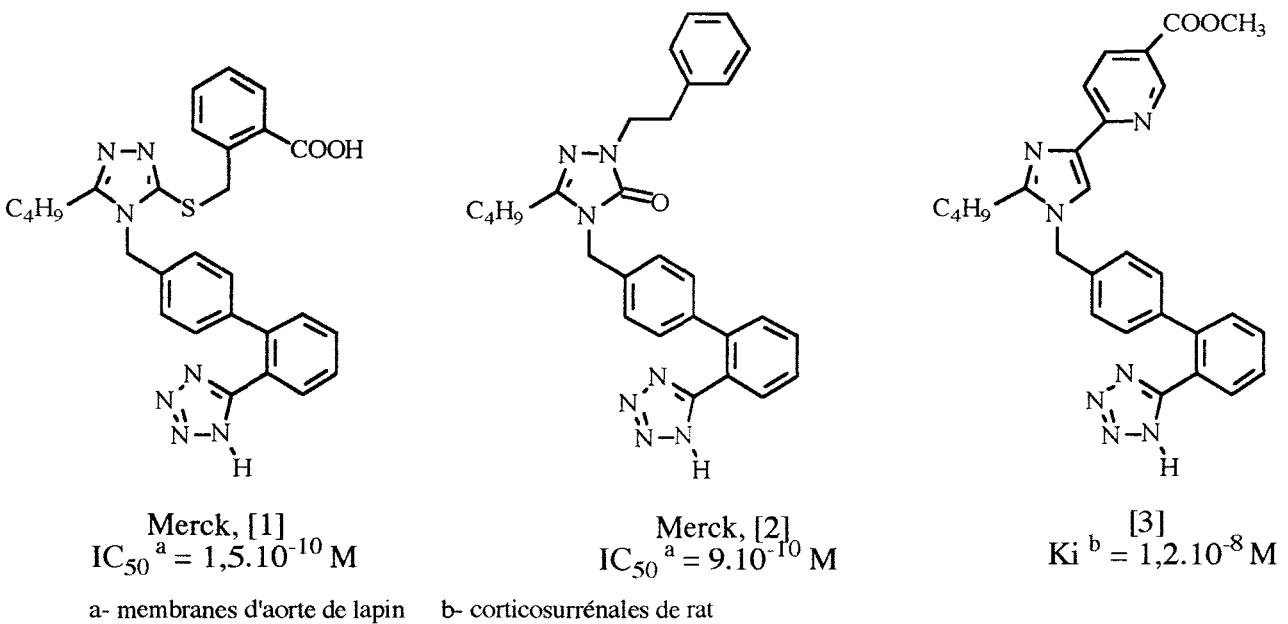
Après les premières études faites autour du DuP 753, le rôle des substituants en positions 4 et 5 de l'imidazole était resté ambigu. La préférence en 4 pour un groupe lipophile plus ou moins encombrant (Cl, CF₂CF₃ (Carini et al., 1993), pyrrole (Sircar et al., 1993a, 1993b)), laissait entrevoir tout de même l'existence d'une poche hydrophobe.

Des informations supplémentaires ont été apportées par la synthèse de dérivés 1,2,4-triazoliques substitués en 3, de 1,2,4-triazol-3-ones substitués en 2, de pyrazoles substitués en 2 (Ashton et al., 1993a, 1993b; Huang et al., 1993; Chang et al., 1993). Une pharmacomodulation au niveau des substituants fixés sur ces composés a permis de confirmer **l'existence d'une poche hydrophobe large, profonde et assez distante du site de fixation sur l'hétérocycle**. En effet, des groupements très volumineux tel un adamantyle sont bien tolérés à la condition qu'ils se trouvent au bout d'une chaîne carbonée souple de 2 à 3 carbones (Huang et al., 1993).

Dans cette région existe également **un résidu susceptible d'interagir avec un groupe acide**, comme l'acide benzoïque de l'antagoniste Merck [1] (Ashton et al, 1993b).

En position 5, les différentes pharmacomodulations réalisées sur le DuP 753 ont montré **la nécessité d'un groupe accepteur de protons** (Carini et al., 1991). Ce résultat a été confirmé par la suite avec le remplacement de l'imidazole par d'autres hétérocycles où la présence d'un groupe accepteur de protons dans une position équivalente à l'hydroxyméthyle du DuP 753 est toujours bénéfique (cf imidazopyridines, 7-carboxybenzimidazoles..), le dérivé [2] avec le cycle triazolinone est un exemple.

Ces relations structure-affinité sont confirmées par la synthèse récente d'analogues [3] du DuP 753 non substitués en 5 et portant en 4 des hétérocycles déficients en électrons (pyridine, diazine) (Harmat et al., 1995). Ces cycles remplacent à la fois l'atome de chlore en se logeant dans la poche hydrophobe et la fonction hydroxyméthyle, l'hétéroatome pouvant interagir avec le récepteur par une liaison hydrogène.



Une étude récente autour du métabolite du Dup 753, EXP 3174, montre que l'introduction en position 4 d'une fonction hydroxyalkyle, en particulier 1-hydroxy-1-méthyléthyle est bénéfique

pour l'affinité et l'activité *in vivo* (cf fig 9) (Yanagisawa et al., 1996). Les auteurs émettent l'hypothèse qu'une interaction intramoléculaire entre les fonctions hydroxyle en 4 et carboxylique en 5 confère à la molécule une conformation adéquate pour se lier au récepteur et proposent en conséquence une superposition originale de ce composé avec le pentapeptide terminale de l'Ang II (cf fig 9). La chaîne propyle en position 2, le groupe isopropyle en 4, le phényl terminal et le benzyle de la structure biphényle se superposent respectivement au groupe alkylène de la proline, à la chaîne latérale de l'isoleucine, au groupe phényle de la phénylalanine et au noyau imidazolique de l'histidine. Le tétrazole correspond alors au COOH-terminal et le groupe carboxyle en position 5 joue le rôle du groupe carbonyle de l'isoleucine en tant qu'accepteur de proton.

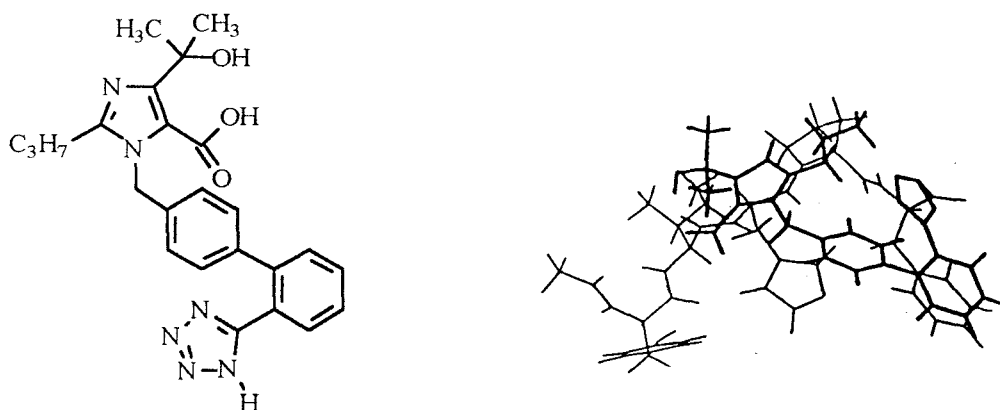


Figure 9

2.3.1.2.1.2. Remplacement de l'imidazole par d'autres hétérocycles

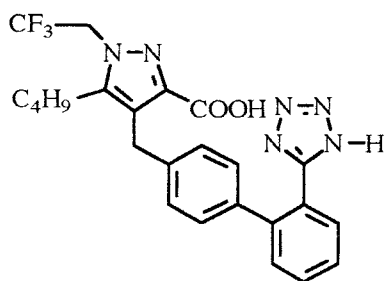
Très tôt, il est apparu intéressant de remplacer le noyau imidazolique par un autre hétérocycle. Une pléthore de noyaux a été testée (Bühlmayer et al., 1992; Duddley et al., 1993) : 4-oxothiéno-[2,3b] pyridines; pyrroles; pyrazoles; triazoles; triazolines; triazolines; triazolines; triazolines; triazolines; pyrimidines; pyrimidines; cycloheptimidazolones; benzimidazoles; imidazopyridines ou -pyrimidines ou -pyridazines ou -pyrazines ou -thiophènes; xanthines; quinoléines; quinazolinones...

Pyrroles, pyrazoles, triazoles

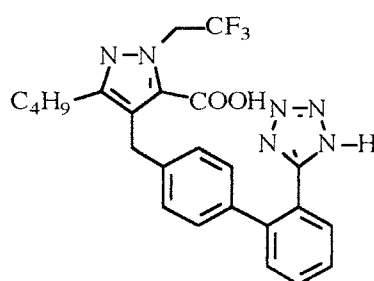
Tous ces cycles ont cinq chaînons et diffèrent par le nombre d'atomes d'azote dans le cycle. Le pyrrole (un azote) peut être considéré comme "l'analogue inférieur" de l'imidazole (deux azotes) et le triazole (trois azotes) comme "l'analogue supérieur". Le pyrazole avec deux azotes est en quelque sorte un cycle "isomère de position" de l'imidazole.

Seule la firme Du Pont a élaboré des antagonistes pyrroliques. En revanche de nombreux dérivés pyrazoliques N-, C-alkylés et des dérivés 1,2,3- ou 1,2,4-triazoliques N-, C-alkylés ont été synthétisés (Ashton et al., 1993a, 1993b; Watson et al., 1994; Reitz et al., 1994a,

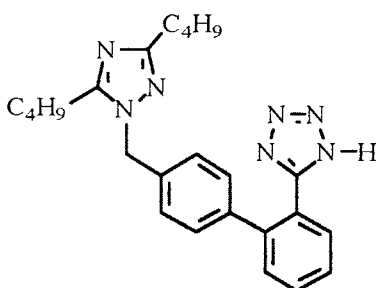
1994b). Ces azoles n'ont pas apporté un gain d'affinité et d'efficacité *in vivo* très important par rapport aux dérivés imidazoliques.



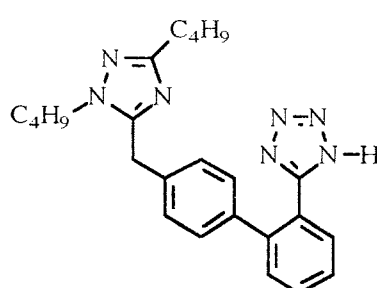
Glaxo, [4]
pK_b^a = 7,7



Glaxo, [5]
pK_b^a = 9,8



Searle, SC 50560
IC₅₀^b = 5,6 · 10⁻⁹ M
pA₂^a = 8,7



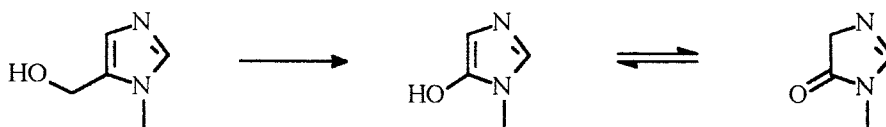
Searle, SC 51757
IC₅₀^b = 1,6 · 10⁻⁸ M
pA₂^a = 8,5

a- aorte isolée de lapin b- membranes d'utérus de rate

Ces pharmacomodulations mettent en évidence l'importance du noyau imidazolique et plus exactement de l'azote basique N3 en tant qu'accepteur de protons. Les noyaux pyrroles (absence d'azote basique), pyrazoles et triazoles sont connus comme étant de moins bons accepteurs de protons que l'imidazole (Abraham et al., 1989). La différence de deux unités logarithmiques entre les deux composés de Glaxo [4] et [5] montre également que la position relative de l'azote basique et de la chaîne butyle est importante.

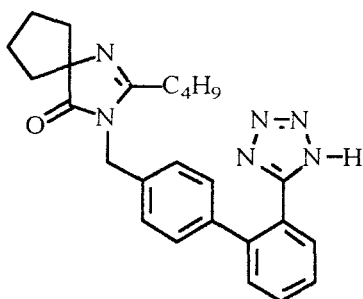
Pyrrolidinones, imidazolinones, triazolinones

L'idée de cycles carbonylés dérive de la présence d'un groupe capable de former une liaison hydrogène en 5 sur l'imidazole. Une fonction carbonyle est en effet tout à fait capable de remplir ce rôle. Bernhart a évoqué un équilibre tautomère pour justifier ce choix (Bernhart et al., 1993).

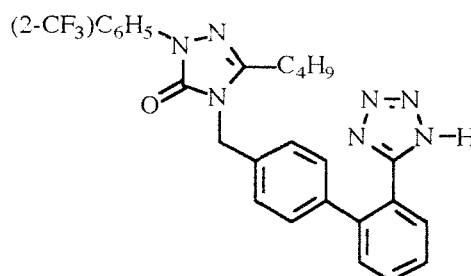


Remarque : cette hypothèse n'a pu être totalement vérifiée puisque seuls des dérivés disubstitués en 4, pour lesquels l'équilibre tautomère ne peut exister, ont pu être synthétisés. De plus le passage d'un groupe hydroxyméthyle à un groupe hydroxyle n'est pas justifié.

Cette voie de recherche a permis la découverte d'antagonistes très intéressants comme le SR 47436, chef de file des dérivés imidazolinones et triazolinones (Bernhart et al., 1993; Huang et al., 1993; Chang et al., 1993; Perreaut et al., 1994).



Sanofi, SR 47436
 $IC_{50}^a = 1,3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
 $IC_{50}^b = 4,0 \cdot 10^{-9} \text{ M}$



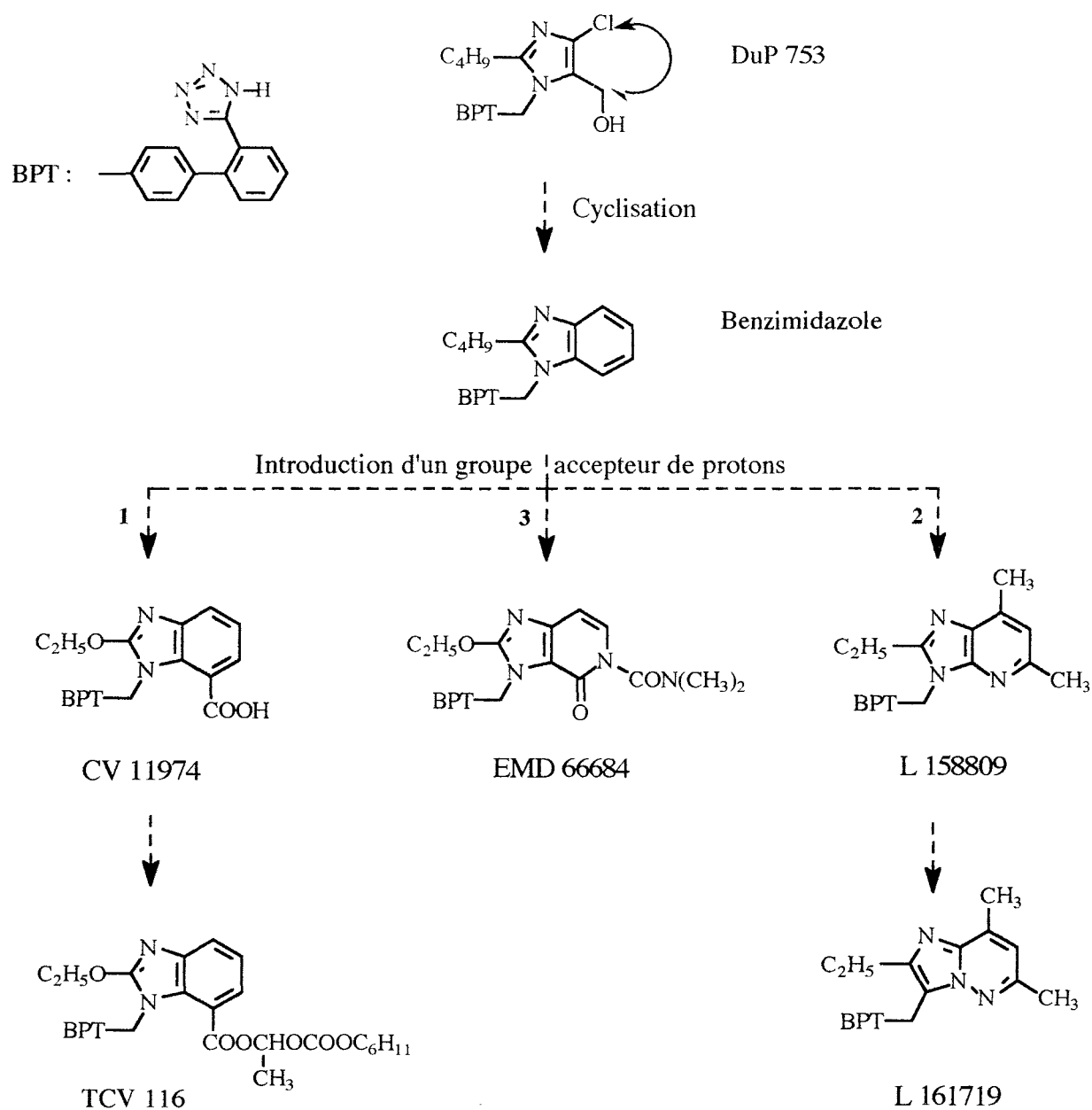
Merck, [6]
 $IC_{50}^b = 1,2 \cdot 10^{-9} \text{ M}$

a- membranes de cellules hépatiques de rat b- aorte isolée de lapin

Cette famille d'antagonistes carbonylés confirme **la nécessité d'un groupe capable d'établir une liaison hydrogène en position 5 sur l'imidazole (ou position équivalente dans les autres cycles)**. D'ailleurs le remplacement de la fonction carbonyle par une fonction thiocarbonyle ($C=O \rightarrow C=S$) diminue sensiblement l'affinité de la molécule, l'atome de soufre étant un moins bon accepteur de protons que l'oxygène (Bernhart et al., 1993).

Benzimidazoles, 7-carboxybenzimidazoles, imidazopyridines, 4,5-dihydro-4-oxo-3-imidazopyridines

Le développement de ces différentes structures est particulièrement intéressant.



	IC ₅₀ (M)	ED ₅₀ ^c (mg/kg)
Dup 753 ¹	1,5.10 ⁻⁷ a	3,027 po
Benzimidazole ¹	9.10 ⁻⁷ a	ND ^b
CV 11974 ¹	1,1.10 ⁻⁷ a	0,033 iv
TCV 116 ¹	ND ^b	0,069 po
EMD 66684 ²	0,7.10 ⁻⁹ c	ND ^b
L 158809 ³	0,3.10 ⁻⁹ d; 2,1.10 ⁻⁹ c	0,026 po
L 161719 ⁴	5,7.10 ⁻⁹ c	< 1 mg/kg (iv)

a Inhibition de la liaison spécifique de [¹²⁵I] Ang II sur corticosurrénales de boeuf

b ND : non déterminé

c Inhibition de la liaison spécifique de [³H] Ang II sur corticosurrénales de rat

d Inhibition de la liaison spécifique de [¹²⁵I] Ang II sur aorte de lapin

e Dose nécessaire pour atténuer de 50% la pression artérielle induite par Ang II (100 ng/kg) chez des rats normotendus

1 Kubo et al., 1993a, 1993b, 1993c; Shibouta et al., 1993

3 Mantlo et al., 1991

2 Mederski et al., 1994

4 Walsh et al., 1994

Elaboration des antagonistes 7-carboxybenzimidazoles, 4,5-dihydro-4-oxo-3-imidazopyridines et imidazopyridines

Le DuP 753 tolère en positions 4 et 5 sur l'imidazole une grande variété de substituants sans que l'affinité pour le récepteur AT₁ en soit affectée considérablement (Duncia et al., 1990; Carini et al., 1991). Partant de cette constatation, la fusion du noyau imidazole avec un autre cycle est tout à fait envisageable. Des dérivés benzimidazoles ont alors été synthétisés. Ces composés possèdent une bonne affinité pour les récepteurs AT₁, mais sont peu actifs *in vivo* et inactifs *per os* (Thomas et al., 1992; Kubo et al., 1993a).

Dans les molécules précédentes, le caractère accepteur de protons du substituant hydroxyméthyle en 5 de l'imidazole est absent. Pour pallier ce manque, une première approche a consisté à fixer une fonction carboxylique en position 7 sur le benzimidazole, CV 11974. L'affinité de ces composés a été légèrement améliorée, mais surtout ils ont acquis une activité *in vivo* satisfaisante (Kubo et al., 1993a, 1993b).

La présence d'une fonction carboxylique n'étant pas favorable à une bonne biodisponibilité orale, des esters ont été synthétisés. Une pharmacomodulation montre que le meilleur compromis entre lipophilie et sensibilité aux hydrolases est obtenu avec un groupe carbonate fixé sur la chaîne aliphatique d'un ester. La prodrogue obtenue, TCV 116, présente une activité *per os* particulièrement intéressante (Kubo et al., 1993c; Shibouta et al., 1993).

La deuxième approche a consisté à introduire un atome d'azote en position 7 du benzimidazole. L'imidazopyridine obtenue s'est avérée être une structure très intéressante : le composé L 158809 est un des plus puissants antagonistes non peptidiques connus à ce jour (Mantlo et al., 1991).

La structure imidazopyridine a été remplacée par un cycle imidazopyridazine, L 161719, avec succès. Le point original de cette structure est que le groupe biphenylméthyle est fixé sur un carbone et non sur un azote comme dans la majorité des antagonistes, structure plus stable car non sensible à la coupure de la liaison amine observée avec le dérivé L 158809 (Walsh et al., 1994).

Enfin la troisième approche a donné naissance aux dérivés 4,5-dihydro-4-oxo-3H-imidazopyridine, EMD 66684. Ici le groupe carbonyle en 4 remplit la fonction d'accepteur de protons. Divers substituants ont été fixés sur l'azote de la fonction lactame. Ils ont montré l'existence d'une région large, hydrophobe et d'un site d'interaction par liaison hydrogène ou ionique (Mederski et al., 1994). Ces relations structure-affinité rappellent celles décrites suite aux pharmacomodulations autour des substituants en 4 ou 5 sur l'imidazole (cf pages 48-49). On peut raisonnablement penser qu'il s'agit de la même région du récepteur qui est impliquée.

Remarque : dans la même logique, l'imidazole a été associé à de nombreux autres cycles : thiophène, cycles à 7 chaînons (4,5,6,7-tétrahydro-8-oxo-cycloheptyle...) (Yanagishawa et al., 1993)...

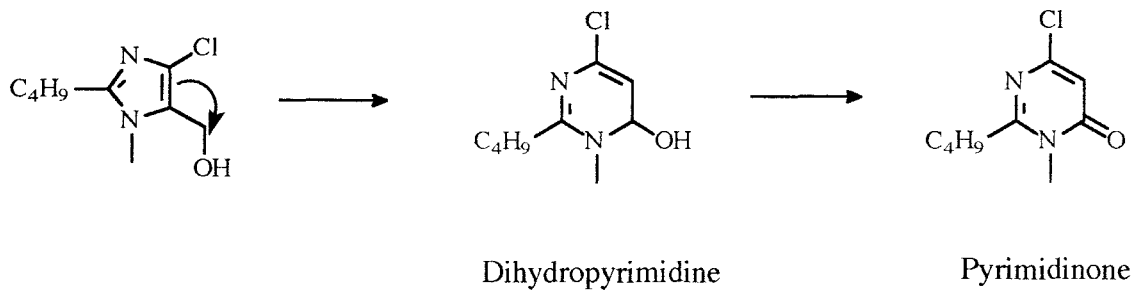
Sur le plan relations structure-affinité, ces antagonistes confirment :

- la présence d'**une poche hydrophobe** occupée par les substituants en positions 4 et 5 du DuP 753 et, qui ici accueille le cycle accolé au noyau imidazolique,
- l'importance d'**une fonction capable d'établir une liaison hydrogène**, voire ionique en 5 sur l'imidazole (ou position équivalente sur d'autres hétérocycles)
- l'importance de **l'azote basique N3 de l'imidazole**; des analogues indoliques voient leur affinité divisée par vingt cinq (Thomas et al., 1992).

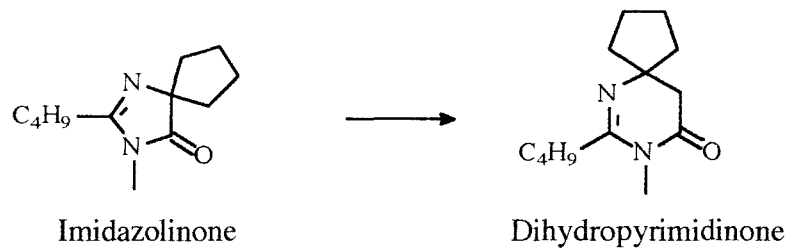
Dihydropyrimidines, pyrimidines, dihydropyrimidones, pyrimidinones

Partant de l'hypothèse que le récepteur tolère en lieu et place de l'imidazole un cycle plus grand, l'extension aux cycles à six chaînons est une alternative séduisante car elle offre davantage de possibilités de substitutions et de modifications.

Une explication rationnelle de la découverte de ces nouvelles structures à partir du DuP 753 peut également être proposée. L'inclusion du méthylène de l'hydroxyméthyle en 5 sur l'imidazole dans le cycle conduit à la structure dihydropyrimidine. L'application de "l'équivalence" : C-OH → C=O, mise en évidence avec les structures cycliques à cinq sommets (imidazolinones, triazolinones....) justifie la structure pyrimidinone. Ces structures conservent pour la plupart l'arrangement 1,3 des atomes d'azote présent dans le noyau imidazolique.

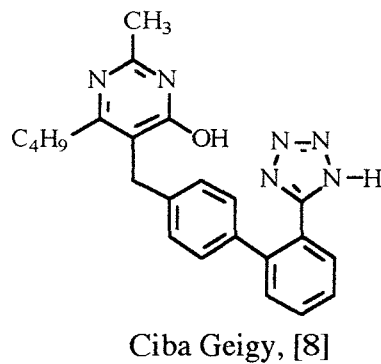
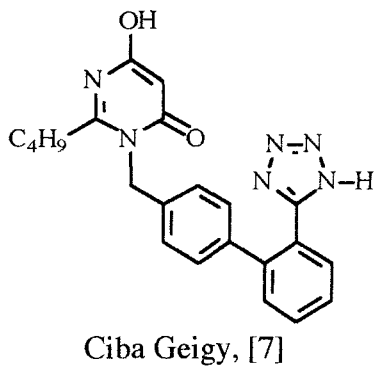


Des dérivés dihydropyrimidinones, analogues des pyrimidinones avec une insaturation en moins, ont été également synthétisés. Ces composés peuvent être aussi considérés comme des analogues à six chaînons du composé imidazolinone SR 47436.

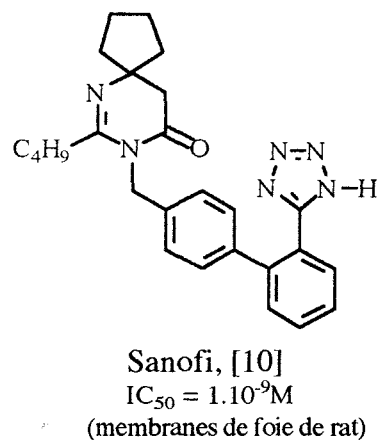
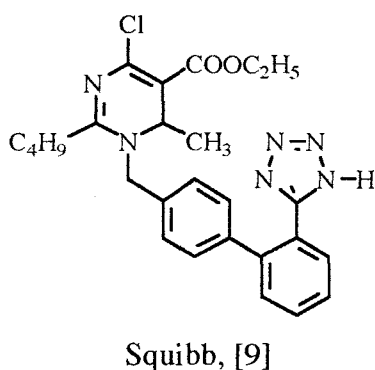


De nombreux composés ont été synthétisés, qui sont pour la plupart des antagonistes puissants *in vitro* et *in vivo*.

Pyrimidinones, pyrimidines

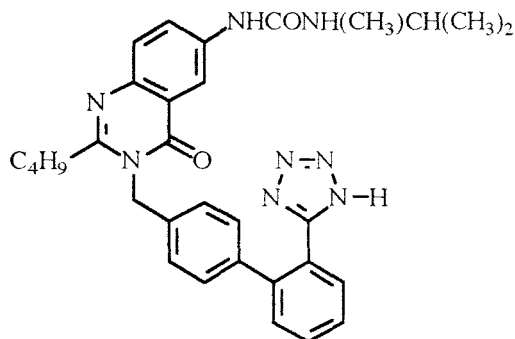


Dihydropyrimidines, dihydropyrimidinones (Atwal et al., 1992; Bernhart et al., 1994))

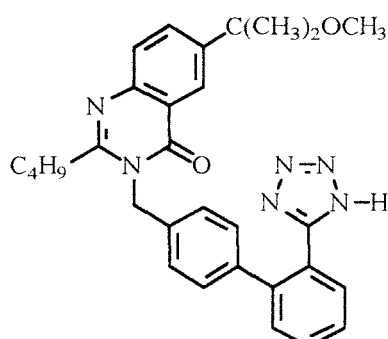


Dans la même logique que les dérivés imidazoliques, des structures bicycliques ont été élaborées (Nicolai et al., 1994). Les dérivés quinazolinones sont une famille importante (Levin et al., 1995).

Quinazolinones



Merck, L 159093
 $IC_{50} = 1.10^{-10}$ M
 (membranes d'aorte de lapin)

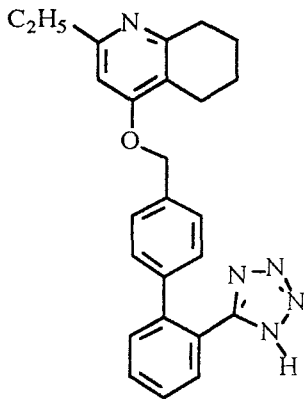


American Cyanamid, CL 329167
 $IC_{50} = 6.10^{-9}$ M (corticosurrénales de rat)

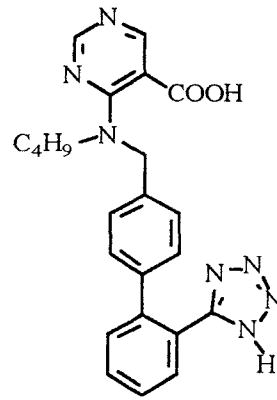
Ces nouvelles molécules montrent que **le noyau imidazole n'est pas indispensable**. D'autres hétérocycles qui portent également **deux groupements accepteurs de protons** (azote non protoné et hydroxyle ou carbonyle), **une chaîne carbonée** peuvent très bien remplacer l'imidazole. En fait, **le noyau imidazole**, outre sa capacité à former une liaison hydrogène par son azote N₃, remplit surtout le rôle de **tenseur**. Il sert d'ancrage aux éléments indispensables pour la fixation au récepteur et permet de les orienter convenablement dans l'espace.

Arylalkylaminopyrimidines, arylalkylaminopyridines, arylalkoxyypyridines, quinoléines, naphthyridines

La caractéristique commune à ces dérivés est la fixation de la structure biphenyle sur l'hétérocycle par un chaînon alkylamino ou alkoxy à la place de la charnière méthylène (De et al., 1992; Bradbury et al., 1992, 1993, 1994; Winn et al., 1993; Ryono et al., 1994a, 1994b; Zydowsky et al., 1994; Thomas et al., 1994).



Zeneca, ZD 6888
 $IC_{50}^a = 1,8 \cdot 10^{-8} M$
 $ED_{50}^b (iv) = 0,39 \text{ mg/kg}$



Abbott, A 81282
 $pK_i^c = 8,5$
 $pA_2^d = 9,6$

a membranes de surrénales de cobaye

b inhibition de l'augmentation de PA après administratin d'Ang II chez le rat normotendu

c membranes de foie de rat

d aorte isolée de lapin

Aucune des relations structure-activité décrites sur le DuP 753 ne laissait présager une bonne activité pour ces molécules avec plus de degrés de liberté. L'unique justification trouvée dans la littérature concerne la structure 4-aryloxyypyridine, qui a été choisie pour sa capacité d'accepteur de protons comparable à celle de l'imidazole (Bradbury et al., 1992). Des études de dynamique moléculaire ont montré ensuite que ces molécules possèdent deux conformations de basse énergie superposables à celles du DuP 753 (Bradbury et al., 1993; Winn et al., 1993), résultat qui peut expliquer leur bonne activité et conforte également le rôle de tenseur joué par le noyau imidazologique.

Autres

La firme Ciba-Geigy a élaboré des composés sans structure hétérocyclique, dérivés d'acides aminés α -N-acylés et -aryloxy (Bühlmayer et al., 1991, 1994). L'hypothèse de travail à l'origine de cette structure est que (cf fig 10):

- l'imidazole du DuP 753 mime la liaison peptidique entre Ile⁵ et His⁶,
- la chaîne butyle se superpose à celle de l'isoleucine,
- le tétrazole recouvre le COOH terminal.

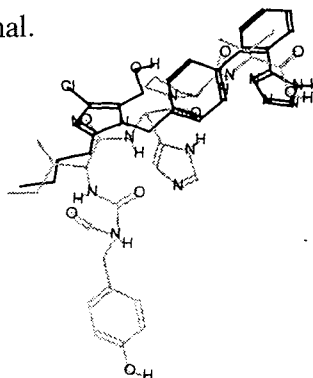


Figure 10: Superposition du DuP 753 avec la partie C-terminale de [Sar¹, Ile⁸]Ang II

A partir de cette hypothèse, des molécules de structure générale N-acyl, N-alkyl aminoacide ont été envisagées. Les diverses pharmacomodulations ont montré que les dérivés de configuration S sont plus affins que leurs analogues de configuration R. Une préférence pour des dérivés acides aminés aliphatiques est également observée, le CGP 48933 où le méthylène est substitué par un groupe isopropyle est un des composés les plus affins. Le parallélisme entre les relations structure-affinité de ces dérivés et celles autour de l'acide aminé terminal de [Sar¹, Ile⁸]Ang II ont amené les chercheurs de Ciba-Geigy à reconsidérer la superposition entre ces deux dérivés (cf fig 11). La partie amide du Valsartan mime la partie C-terminale du peptide et la structure biphenyltétrazole est dirigée vers la Tyr⁴, avec superposition du tétrazole et de l'hydroxyle phénolique. Dans cette hypothèse, la chaîne butyle se situe dans la région de Pro⁷ et non dans celle de Ile⁵ (Bühlmayer et al., 1994).

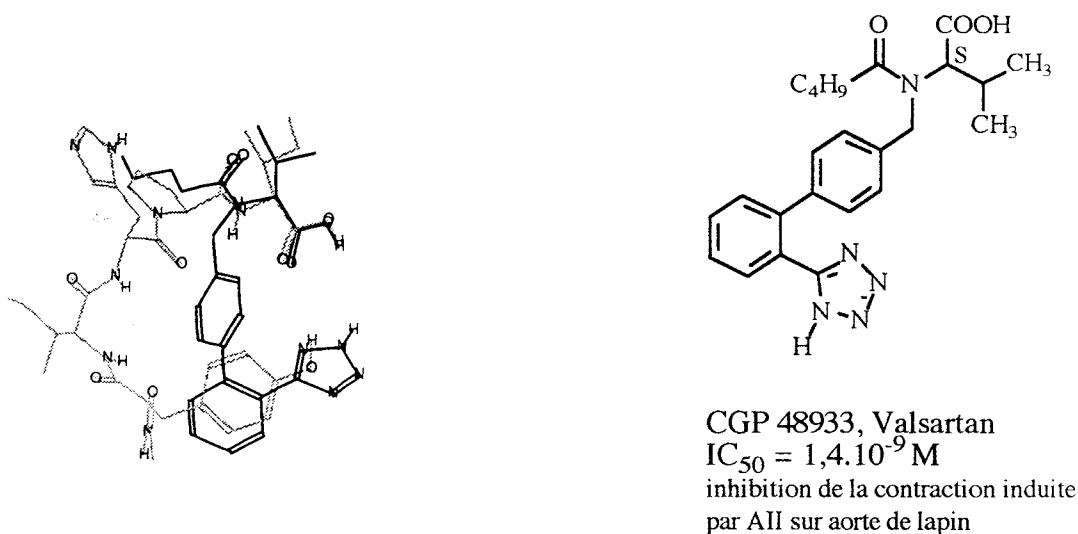
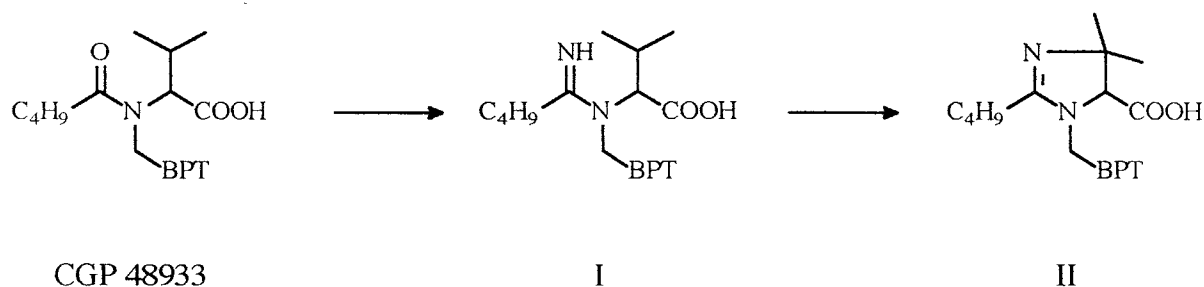


Figure 11 : Superposition du CGP 48933 et de [Sar¹, Ile⁸]Ang II

Bien que paraissant éloigné de la structure du DuP 753, un cheminement logique permet de considérer le Valsartan comme un analogue ouvert de ce dernier. Par bioisostérie $C=O \Leftrightarrow C=NH$, on peut passer du CGP 48933 au dérivé I, puis par application de la théorie des cycles potentiels, au dérivé cyclique II, dont la structure rappelle celle du métabolite du DuP 753, EXP 3174.



Le CGP 48933 est la preuve irréfutable de **la non nécessité du cycle imidazolique** du DuP 753. Par contre, on y retrouve **les quatre principaux éléments** du pharmacophore, convenablement situés dans l'espace :

- **une chaîne carbonée** (butyle),
- **un atome accepteur de protons** (l'oxygène du groupe amide),
- **la structure biphényltétrazole**,
- **un groupement carboxylique supplémentaire.**

2.3.1.2.2. Les antagonistes avec modification du biphényltétrazole

Pendant très longtemps, peu d'exemples de modifications de la partie biphényltétrazole du DuP 753 ont été décrits et encore moins d'exemples où ces modifications étaient satisfaisantes. Récemment, en revanche, des changements très intéressants ont été effectués et ont abouti en particulier à la découverte d'une famille très importante d'antagonistes non sélectifs des récepteurs AT₁ et AT₂. Ces modifications peuvent être classées en deux catégories :

- modification de la structure biphényle,
- modification de la fonction acide tétrazole.

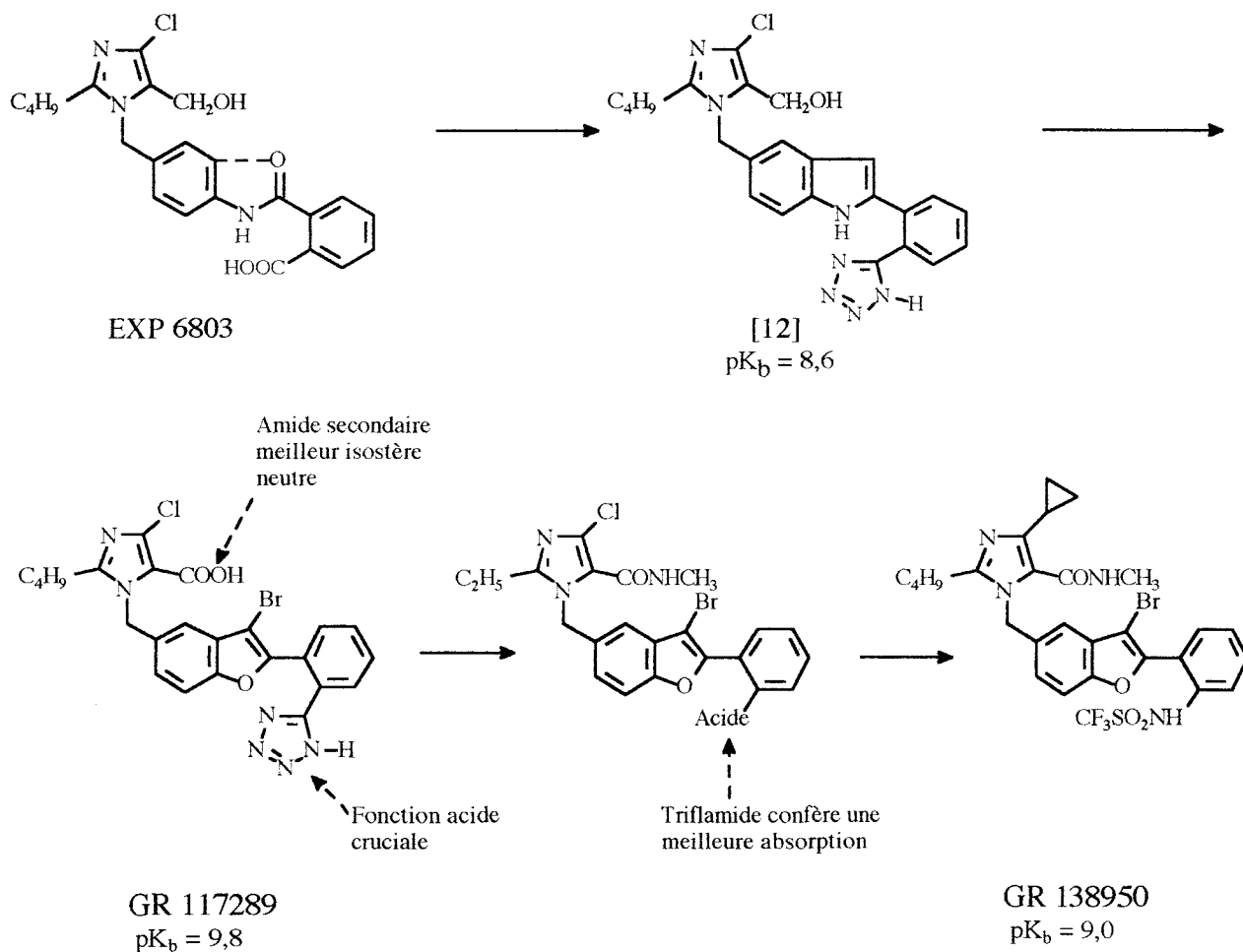
2.3.1.2.2.1. Modification de la structure biphényle

Découverte du GR 138950

De nombreuses tentatives de modifications du biphényle ont été vouées à l'échec (Lin et al., 1992; Sircar et al., 1993b; Bovy et al., 1993; Rivero et al., 1993; Estenne et al., 1995). Le biphényle a été remplacé notamment par un naphthalène, un phénylthiophène. Mais la plupart de ces composés sont moins actifs que le DuP 753 (Bühlmayer et al., 1991; Salimbeni et al., 1994).

Seul Glaxo, qui a remplacé le premier phényle par un indole, un furanne ou un thiophène a obtenu des résultats intéressants. Le dérivé avec la structure benzofuranne : GR 117289 présente des caractéristiques pharmacologiques intéressantes et est en évaluation clinique.

Toutes les réflexions ayant conduit à la synthèse du GR 117289, puis du GR 138950 sont résumées dans le schéma suivant (Middlemiss et al., 1994).



pK_b : aorte isolée de lapin

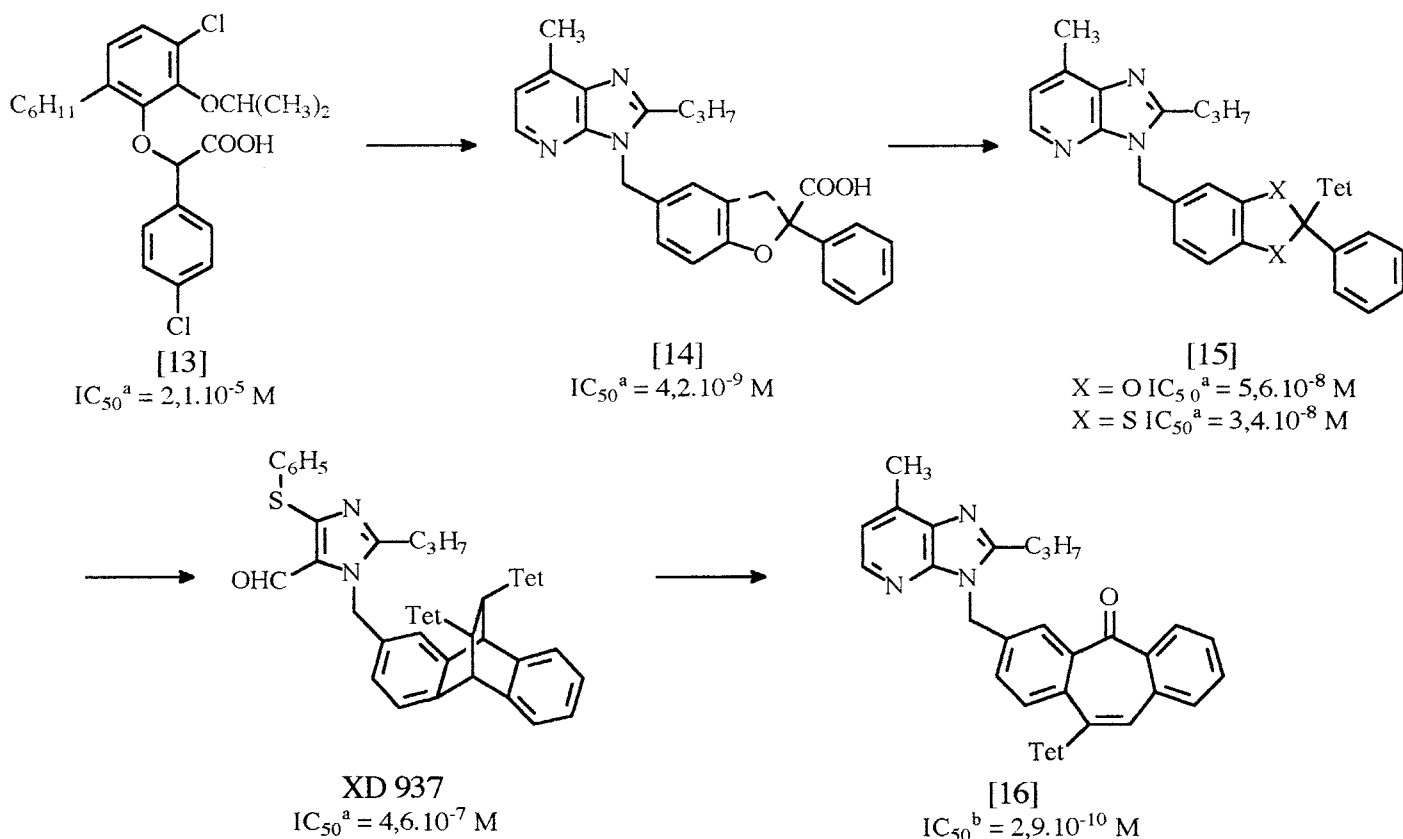
Conception de l'antagoniste GR 138950

Par analogie au EXP 6803 et par application de la théorie des cycles potentiels, la structure benzylbenzamide trans peut être mimée par un indole alkylé en position 2, [12]. Puis l'indole a été remplacé par son bioisostère benzofuranne et l'introduction du brome, résultat du hasard, s'est révélée très bénéfique (GR 117289).

Pour augmenter l'activité per os, diverses pharmacomodulations ont été réalisées, en particulier autour des deux fonctions acides qui seraient responsables de la faible biodisponibilité du GR 117289. L'acide carboxylique en 5 sur l'imidazole a été transformé en amide et le tétrazole en triflamide. Le dérivé GR 138950, monoacide possède une activité antihypertensive per os importante et de longue durée.

Les antagonistes tricycliques

Les structures précédentes conservent l'arrangement 2'-acide biaryle du biphényltétrazole. La découverte par Merck du dérivé acide phénoxyphénylacétique [13] qui possède une affinité pour les récepteurs AT₁ a conduit petit à petit à l'élaboration de bioisostères tricycliques de la structure biphényltétrazole.



a- aorte isolée de lapin

b- binding sur cellules COS transfectées avec cDNA de AT₁

Conception de structures tricycliques, bioisostères du biphényltétrazole

La fixation de l'acide phénoxyphénylacétique sur l'imidazopyridine a donné un dérivé avec une affinité de l'ordre du nanomolaire [14]. Puis des analogues rigides, 1,3 benzodithiole-2-carboxylates, 1,3 benzodioxole-2-carboxylates [15] ont été synthétisés. Ces composés possèdent des affinités voisines de celles des composés parents ouverts [14]. Cela suggère que la conformation bioactive des acides phénoxyphénylacétiques est bien reproduite par celle rigidifiée des benzodioxoles (Rivero et al., 1994; Fitch et al., 1995).

Les premières structures tricycliques sont alors apparues. Pour respecter la position relative du tétrazole et des phényles (géométrie twistée), un groupe dibenzobicyclo[2-2-2]octane a été envisagé (Duncia et al., 1995). Les dérivés obtenus, XD 937, présentent des affinités moyennes pour les récepteurs AT₁, l'encombrement stérique étant certainement trop important, et ils ne sont pas actifs per os. Enfin des squelettes dibenzo[a,a]cycloheptène et dibenzo[b,f]oxepine [16] conçus par superposition avec la partie C-terminale de l'Ang II ont été

introduits (Kiyama et al., 1995). Les antagonistes obtenus ont une très bonne affinité pour les récepteurs AT₁. Ces deux squelettes rigides sont d'excellents bioisostères de la structure biphényle.

Ces travaux complètent les relations structure-affinité sur la structure biphényltétrazole déduites des premières pharmacomodulations autour du DuP 753 :

- la présence de **deux cycles aromatiques** apparaît comme favorable,
- **la conformation non coplanaire des phényles** avec orientation du groupe acide (tétrazole ou isostères) au dessus du plan de l'imidazole est primordiale. Toute structure ne respectant pas cette géométrie est sanctionnée par une baisse d'affinité,
- **la poche hydrophobe** qui l'accueille est **étroite**. Une substitution sur l'un des phényles entraîne une diminution de l'affinité.

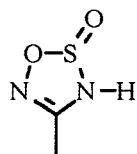
2.3.1.2.2.2. Bioisostères du tétrazole

Le tétrazole a été principalement remplacé par :

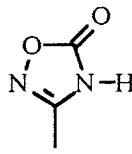
- d'autres hétérocycles acides,
- des acylsulfonamides, sulfamides, sulfonylcarbammates, sulfonylurées...

Hétérocycles acides

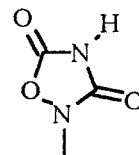
Parmi les hétérocycles testés, l'oxothiadiazole [17], la 1,2,4-oxadiazol-5-one [18] et la 1,2,4-oxadiazolidine-3,5-dione [19] qui présentent des acidités voisines du tétrazole ($pK_a = 5$) se sont révélés être des bioisostères satisfaisants (Kim et al., 1994; Ferrari et al., 1994).



[17]



[18]



[19]

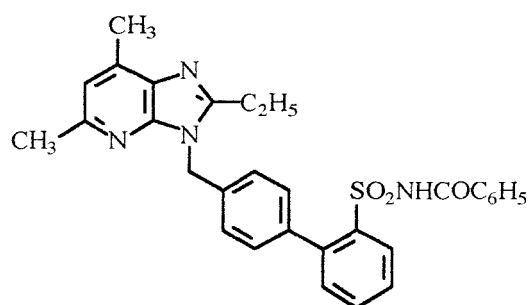
Acylsulfonamides, sulfamides, sulfonylcarbammates, sulfonylurées...

Des études chez les primates ont montré que le cycle tétrazole subit une glucuronidation au niveau du foie. Des structures acides résistantes au métabolisme sont donc intéressantes. Les fonctions acylsulfonamides ont alors été envisagées (Chakravarty et al., 1994a). Celles-ci présentent des acidités voisines de celle du tétrazole et offrent de nombreuses possibilités de pharmacomodulations.

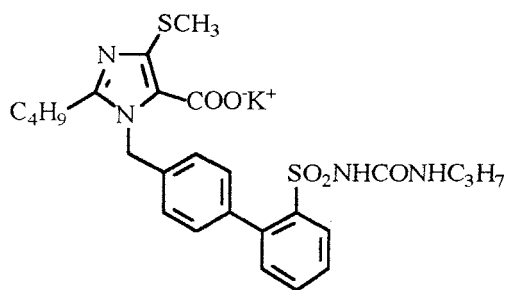
L'introduction de ces structures a donné naissance à une nouvelle et très importante famille d'antagonistes : les antagonistes non sélectifs AT₁/AT₂. En effet, suite à de nombreuses

modulations autour de ces fonctions acides, des interactions avec des régions des récepteurs, non explorées jusqu'alors avec les antagonistes tétrazoliques, ont pu être établies et des affinités pour les récepteurs AT₂ ont pu être développées.

Toutes les familles d'antagonistes sélectifs AT₁ décrits précédemment ont été transformées en leurs analogues sulfonamides avec succès dans la majorité des cas. Nous ne mentionnerons ici que quelques exemples d'antagonistes AT₁ sélectifs (Chakravarty et al., 1994a; Depez et al., 1995). Les relations structure-affinité seront plus amplement décrites dans le paragraphe consacré aux antagonistes non sélectifs AT₁/AT₂.



L 159282
 Analogue du L 158809
 $IC_{50} = 2.10^{-10}$ M (binding sur aorte
 de lapin)



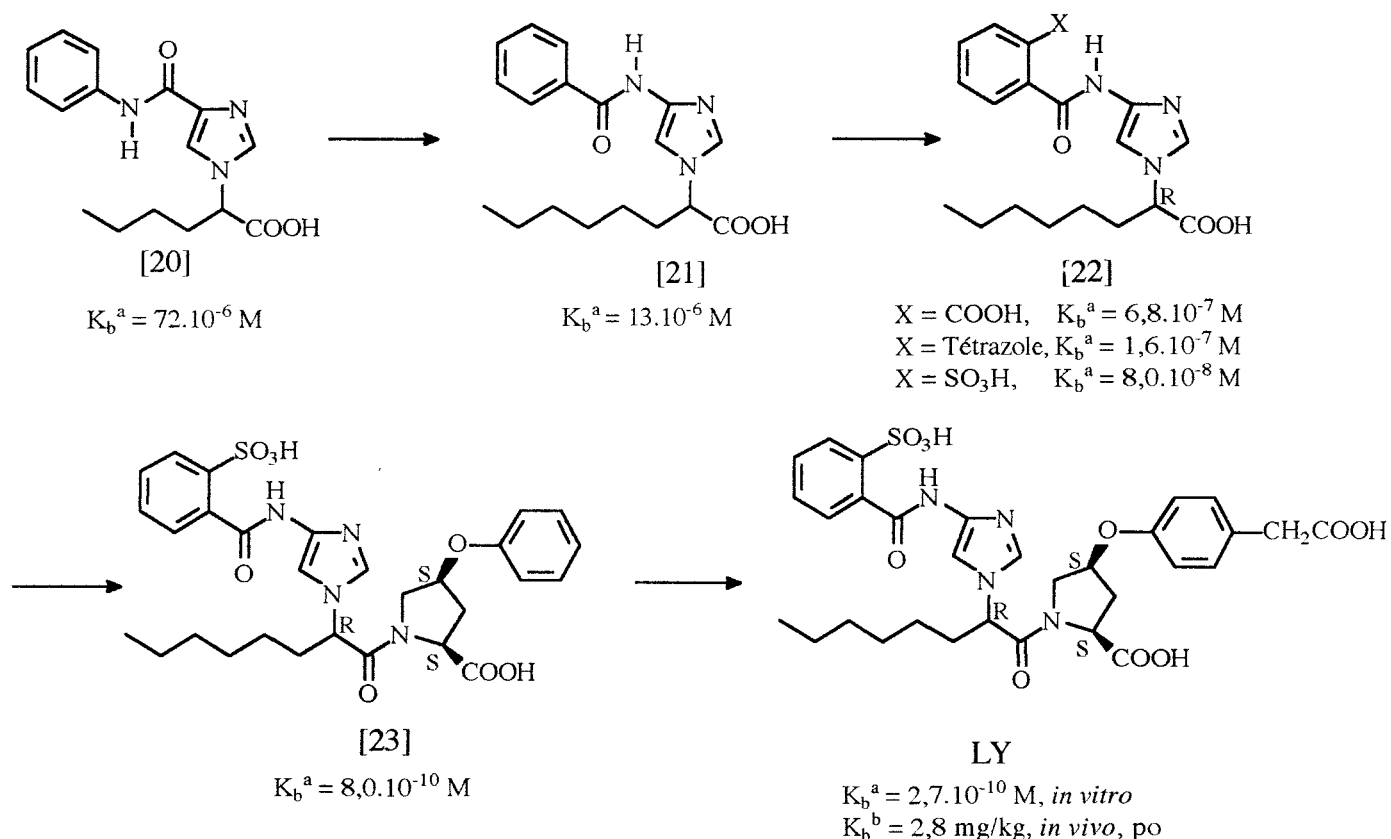
HR 720
 Analogue du EXP 3174
 $IC_{50} = 4,8.10^{-10}$ M (binding sur cellules
 hépatiques de rat)

2.3.1.3. Les antagonistes triacides

La firme Eli Lilly a récemment décrit une structure originale d'antagonistes des récepteurs AT₁ (Steinberg et al., 1994; Palkowitz et al., 1994).

La découverte, à la suite d'un screening systématique, de l'affinité pour les récepteurs AT₁ de l'acide 2-imidazolyl hexanoïque [20] est à l'origine de cette nouvelle famille.

Les différentes étapes ayant conduit à la synthèse du composé LY sont résumées dans le schéma suivant.



a - *in vitro*, K_b : inhibition de la contraction induite par Ang II de l'aorte de lapin

b - *in vivo*, K_b : inhibition de l'hypertension induite par Ang II chez le rat normotendu

Les trois premières modifications ont consisté à inverser la fonction amide, allonger la chaîne aliphatique [21] et introduire un groupe acide sur le phényle [22].

La modification qui a permis de dépasser la barre des 10^{-9}M en affinité est le remplacement de l'acide carboxylique par une phénoxyproline [23]. Cette structure possède trois carbones asymétriques dont la stéréochimie est importante, en particulier pour le carbone portant la chaîne hexaméthyle. Le stéréoisomère R, S, S ($\text{IC}_{50} = 0,8 \text{ nM}$) est quatre fois plus affiné que le S, S, S ($\text{IC}_{50} = 3,2 \text{ nM}$) et très largement plus affiné que les six autres énantiomères.

Enfin la substitution du phénoxy par une fonction acide a permis d'élaborer des antagonistes triacides, LY, avec une très bonne affinité pour les récepteurs AT_1 et une activité antihypertensive *per os*.

Remarque :

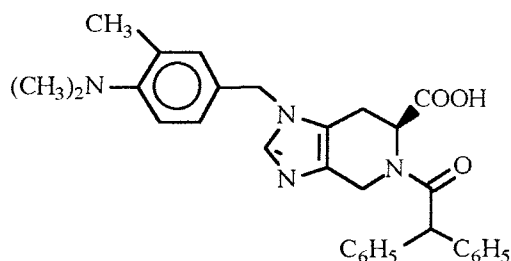
L'introduction de ce groupe phénoxyproline n'est pas justifiée par les auteurs, mais on peut raisonnablement penser que ce choix a été guidé par la volonté de copier le dipeptide terminal de l'Ang II : Pro-Phe.

2.3.2. Les ligands des récepteurs AT₂ de l'Ang II

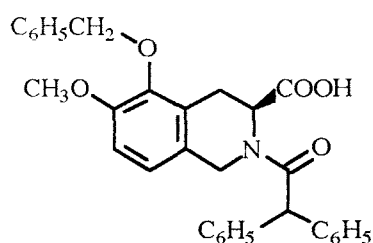
Remarque : Le rôle physiologique et le(s) système(s) de transduction des récepteurs AT₂ n'étant pas encore totalement élucidés, il est difficile de parler d'agonistes ou d'antagonistes, il est donc préférable de parler de ligands.

Le grande méconnaissance des récepteurs AT₂ a fait que pendant longtemps il n'a existé qu'une seule famille de ligands spécifiques des récepteurs AT₂, dont le chef de file est le PD 123319. Récemment, deux nouvelles classes de ligands spécifiques ont été élaborées :

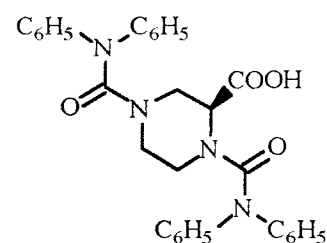
- des dérivés tétrahydroisoquinoléine dont le chef de file est le PD 126055,
- des dérivés de la pipérazine dont le chef de file est le L 159686.



PD 123319
 $IC_{50} AT_2 = 6,9 \text{ nM}$
 $AT_1/AT_2 > 100\ 000$



PD 126055
 $IC_{50} AT_2 = 0,58 \text{ nM}$
 $AT_1/AT_2 > 100\ 000$



L 159686
 $IC_{50} AT_2 = 0,89 \text{ nM}$
 $AT_1/AT_2 > 100\ 000$

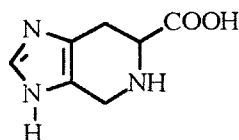
$IC_{50} AT_2$: binding sur membranes d'utérus de lapin

2.3.2.1. Conception du PD 123319

Le PD 123319, dérivé de l'acide 4,5,6,7-tétrahydroimidazo[4,5-c]pyridine-6-carboxylique, appelé plus communément spinacine, a été conçu par la firme Parke-Davis (Blankley et al., 1991).

Le choix de cette structure originale a été guidé :

- par la possibilité d'introduire sous une forme compacte, les différents éléments structuraux du pentapeptide terminal de l'Ang II : Tyr-Ile-His-Pro-Phe,
- par la découverte des antagonistes benzimidazoles et imidazopyrimidines des récepteurs AT₁.



Spinacine

Bien que les tests de binding montrent, sans aucune ambiguïté, que ces composés sont des inhibiteurs de liaison de l'Ang II, aucun effet antihypertenseur n'est observé chez le rat SHR (Spontaneously Hypertensive Rat). La constatation que le dithiotreitol n'a aucune influence sur

le binding de ces molécules confirme la spécificité de ces composés pour les récepteurs AT₂ de l'Ang II.

Une étude systématique des différents éléments de ces composés a permis de mettre en évidence certaines relations structure-affinité :

- **en position 6, la configuration S** est préférable à la configuration R,
- la présence **en 6 d'un acide carboxylique** donne des composés plus actifs que celle d'un alcool, d'un ester ou d'un amide,
- **un groupe acyle lipophile** est nécessaire **en position 5**,
- **en position 1**, la présence d'un **groupe benzyle substitué en 3 par un méthyle et en 4 par un groupe électrodonneur** (NH₂, N(CH₃)₂) augmente sensiblement l'affinité pour le récepteur AT₂.

2.3.2.2. Les nouveaux antagonistes des récepteurs AT₂

Ces antagonistes sont largement inspirés du PD 123319. Ils sont nés de la volonté de trouver des cycles bioisostères de la structure spinacine.

2.3.2.2.1. Les dérivés tétrahydroisoquinoléiques

Ici le noyau imidazolique des spinacines est remplacé par un benzène disubstitué. Le cycle tétrahydropyridine substitué par un acide carboxylique est conservé (Klutchko et al., 1994).

Les relations structure-affinité décrites avec ces dérivés sont proches de celles décrites avec les spinacines :

- importance de la **configuration du carbone portant l'acide carboxylique** (énantiomère S plus affin que le R),
- **l'acylation de l'azote N₂** par un groupe possédant **deux substituants lipophiles** (diphénylacétyle, cyclopentyle-phénylacétyle) donne les meilleures affinités,
- l'introduction d'un **substituant benzyloxy** sur le noyau benzénique semble très bien remplacer le groupe benzylique fixé sur l'azote imidazolique du PD 123319. Une des seules différences avec les spinacines est que la substitution de l'aromatique du groupe benzyloxy par un groupe électrodonneur (NH₂, OCH₃) n'améliore pas l'affinité.

2.3.2.2.2. Les dérivés pipéraziques

La structure bicyclique spinacine est remplacée par un cycle unique pipérazine, L 159686 (Wu et al., 1993). La structure du cycle tétrahydropyridine substitué par une fonction acide carboxylique est conservée et on retrouve toujours la supériorité de l'énantiomère S sur le R. De même, les meilleures affinités sont obtenues avec les composés N₁ (azote adjacent à l'acide) acylés par une structure diphénylcarbamoyle. Par contre ces dérivés ne possèdent pas d'équivalent direct des groupes benzyles ou benzyloxy rencontrés dans les deux familles précédentes. Ici l'azote N₄ est acylé par un dialkyl- ou diaryl-carbamoyle.

2.3.3. Les antagonistes non sélectifs des récepteurs de l'Ang II

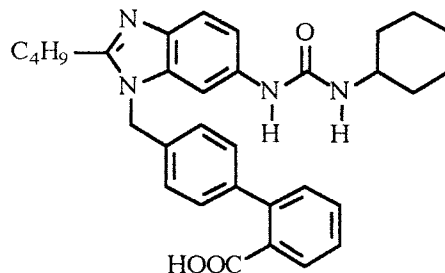
Remarque : dans la suite de la remarque précédente, il est abusif de parler d'antagonistes non sélectifs ou mixtes AT₁/AT₂. Dans la majorité des études, il est montré que ces molécules se lient bien au deux récepteurs, qu'elles bloquent les réponses liées à l'activation des récepteurs AT₁, mais le caractère antagoniste des récepteurs AT₂ n'est jamais prouvé. Il serait donc plus juste de parler d'antagonistes AT₁ - ligands AT₂. Mais pour plus de clarté, nous garderons les termes génériques d'antagonistes mixtes ou non sélectifs, tout en gardant à l'esprit cette remarque.

La découverte d'antagonistes non sélectifs AT₁/AT₂ a très vite suscité de nombreuses recherches. De tels dérivés peuvent en théorie présenter plusieurs avantages :

- ils peuvent mimer l'action des IEC plus parfaitement que les antagonistes AT₁ sélectifs car ils bloquent tous les sites de fixation de l'Ang II tout en s'affranchissant des effets secondaires dus à l'action des IEC sur les kinines,
- ils peuvent éviter le risque d'une "surstimulation" des récepteurs AT₂ suite à l'augmentation du taux plasmatique d'Ang II observée après inhibition des récepteurs AT₁,
- ils peuvent voir leur champ d'applications thérapeutiques élargi à des pathologies comme la resténose, l'athérosclérose, si l'implication des récepteurs AT₂ dans ces pathologies, encore hypothétique aujourd'hui, est confirmée.

2.3.3.1. Elaboration des premiers antagonistes non sélectifs AT₁/AT₂ (Chang et al., 1995)

La première molécule possédant une affinité pour les deux récepteurs de l'Ang II est un benzimidazole, substitué par une urée en position 6 : BIBS 39 (Ries et al., 1993). Ce composé reste néanmoins dix sept fois plus affin pour les récepteurs AT₁ que pour les AT₂, pour lesquels l'affinité reste faible (IC₅₀ AT₁ = 29nM, IC₅₀ AT₂ = 493 nM).



BIBS 39

Le premier dérivé digne d'être qualifié d'antagoniste mixte AT₁/AT₂ a été élaboré par Merck après pharmacomodulation autour des antagonistes quinoxalines AT₁ sélectifs (cf fig 12).

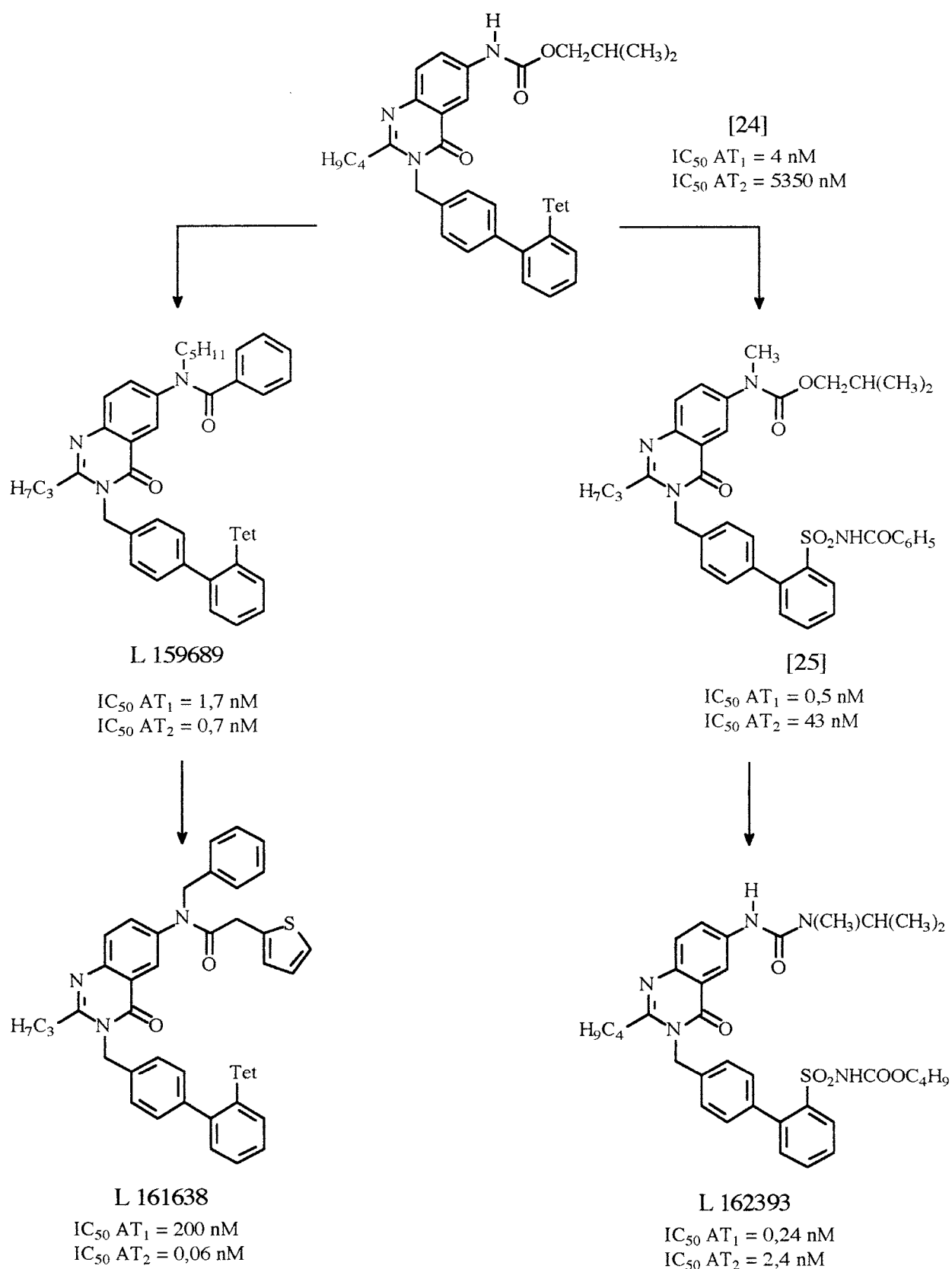


Figure 12 : Elaboration des premiers antagonistes non sélectifs AT₁/AT₂

L'introduction d'un amide tertiaire encombrant et lipophile en 6 sur le noyau quinazolinique d'antagonistes biphényltétrazoles sélectifs AT₁ a permis de développer une affinité pour les récepteurs AT₂, L 159689, L 161638 (de Laszlo et al., 1993; Glinka et al., 1994b; Levin et al., 1995). Cet amide rappelle la fonction urée du BIBS 39 et l'azote diphénylacétyle du PD 123319.

Puis une seconde génération de dérivés a été développée par le remplacement du tétrazole par des acylsulfonamides. Les dérivés avec un benzoylsulfonamide, dont l'acidité est voisine du tétrazole, conservent une bonne affinité pour les récepteurs AT₁ et voient celle pour AT₂ multipliée par cent. Une optimisation de la structure de ces dérivés a permis la découverte de sulfonylecarbammates, comme le L 162393 qui possède une affinité pour les deux récepteurs de l'ordre du nanomolaire avec une sélectivité AT₁/AT₂ de dix (Chakravarty et al., 1994b; Glinka et al., 1994a).

Remarques :

- La combinaison des deux pharmacomodulations précédentes, l'introduction en 6 d'un amide tertiaire et d'un sulfonylecarbamate n'augmente pas les affinités. Au contraire, le remplacement du tétrazole du L 159689 par un benzoylsulfonamide diminue de cinq cent fois son affinité pour AT₂. Cela suggère une interaction stérique entre les substituants lipophiles et encombrants fixés sur l'amide et le sulfonamide.
- En jouant sur la nature de l'amide tertiaire fixé en 6, la balance AT₁/AT₂ a pu être inversée en faveur des récepteurs AT₂ pour donner des ligands sélectifs de ces récepteurs (cf L 161638).

Les premiers fondements pour développer une affinité pour les récepteurs AT₂ tout en conservant celle pour les récepteurs AT₁ étaient posés :

- la présence d'**un groupe acide** (tétrazole, NH du benzoylsulfonamide) est nécessaire pour interagir par **une liaison ionique avec les deux récepteurs**,
- **un groupe lipophile encombrant**, susceptible de se glisser dans **une poche hydrophobe** est nécessaire pour développer une affinité avec **les récepteurs AT₂**. Pour la fixation **aux récepteurs AT₁**, ce groupe ne semble pas jouer un rôle important; il est **neutre**.

Remarque : on retrouve ici les deux principales relations structure-affinité décrites avec les ligands sélectifs AT₂ (cf page 65).

L'application de ces principes à d'autres structures d'antagonistes AT₁ sélectifs a permis d'élaborer de nouveaux antagonistes mixtes et de confirmer et même d'étayer les premières relations structure-affinité décrites avec ces dérivés quinazolinones.

2.3.3.2. Les triazolinones

Cette famille est très intéressante car elle illustre parfaitement les trois principales étapes ayant conduit à la découverte d'antagonistes avec des affinités de l'ordre de 10⁻⁹M pour les deux récepteurs et d'excellentes propriétés in vivo (longue durée d'action, activité per os) (cf fig 13).

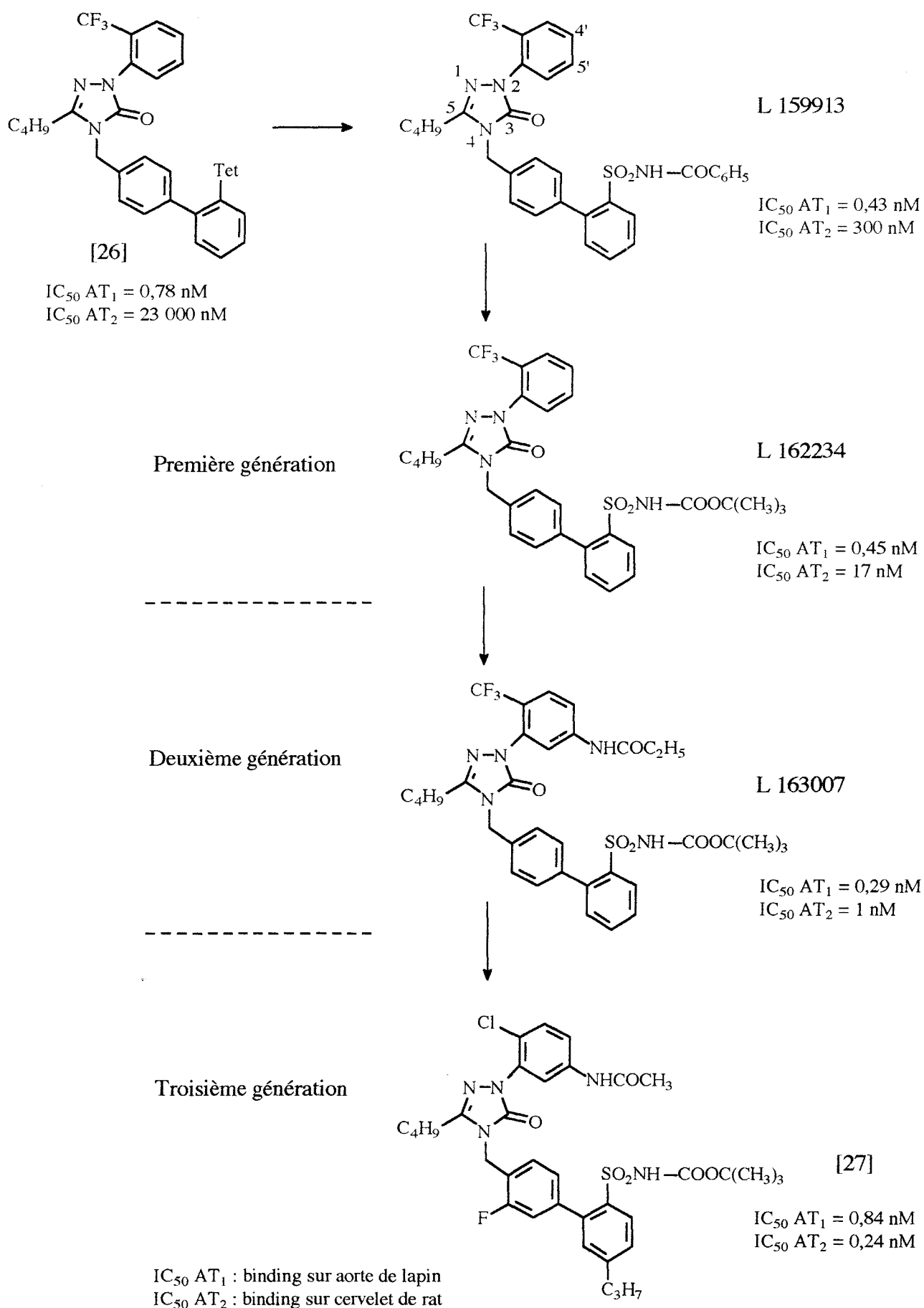


Figure 13 : Conception des antagonistes triazolines non sélectifs AT₁/AT₂

Les antagonistes de première génération (Ashton et al., 1994)

Ces antagonistes sont nés du remplacement du tétrazole par un sulfonamide. Comme pour les dérivés quinazolinones, un groupe benzoylsulfonamide a été introduit avec succès, puis un tertibutylsulfonylcarbamate s'est révélé être une des meilleures solutions.

Diverses pharmacomodulations ont confirmé **l'étroitesse de la poche hydrophobe des récepteurs AT₂** dans laquelle vient se glisser le substituant lipophile du sulfonamide ou du sulfonylcarbamate. En revanche, au niveau **des récepteurs AT₁**, il n'apparaît **aucune réelle contrainte stérique**.

Les antagonistes de deuxième génération (Chang et al., 1994a)

Par analogie au BIBS 39 et aux dérivés quinazolinones, l'idée d'introduire une fonction amide ou urée est apparue. Après superposition des antagonistes précédents et du L 162234, les positions 4' ou 5' du benzène fixé sur l'azote N₂ triazolique ont été envisagées comme points de fixation. Alors que toute substitution en 4' entraîne une forte diminution de l'affinité pour AT₂, l'introduction en 5' d'un groupe acylamino ou carbamoyle permet de développer une affinité pour ces récepteurs. Le meilleur représentant de cette famille est le composé L 163007.

Des informations intéressantes sur la région occupée par le substituant en 2 sur le triazole sont apportées par ces dérivés :

- **la fonction carbonyle de l'amide** est particulièrement importante pour la liaison aux **récepteurs AT₂**. Elle interagit certainement avec un résidu donneur de protons du récepteur.
- la forte baisse d'affinité observée par substitution de l'amide secondaire montre **le rôle de donneur de proton du groupe NH amide**.
- **la poche hydrophobe** occupée par le substituant lipophile de l'amide est **étroite**.
- le substituant en ortho du benzène impose **aux deux cycles aromatiques d'être non coplanaires**. Cette géométrie, **importante** pour la liaison **aux récepteurs AT₁**, paraît également **favorable** pour l'interaction avec **AT₂**.

Remarque : au niveau **des récepteurs AT₁**, la région occupée par ce substituant admet un grand nombre de modulations, ce qui confirme **la présence d'une zone de large tolérance**, déjà mise en évidence précédemment (cf page 49).

Les antagonistes de troisième génération (Chang et al., 1994b)

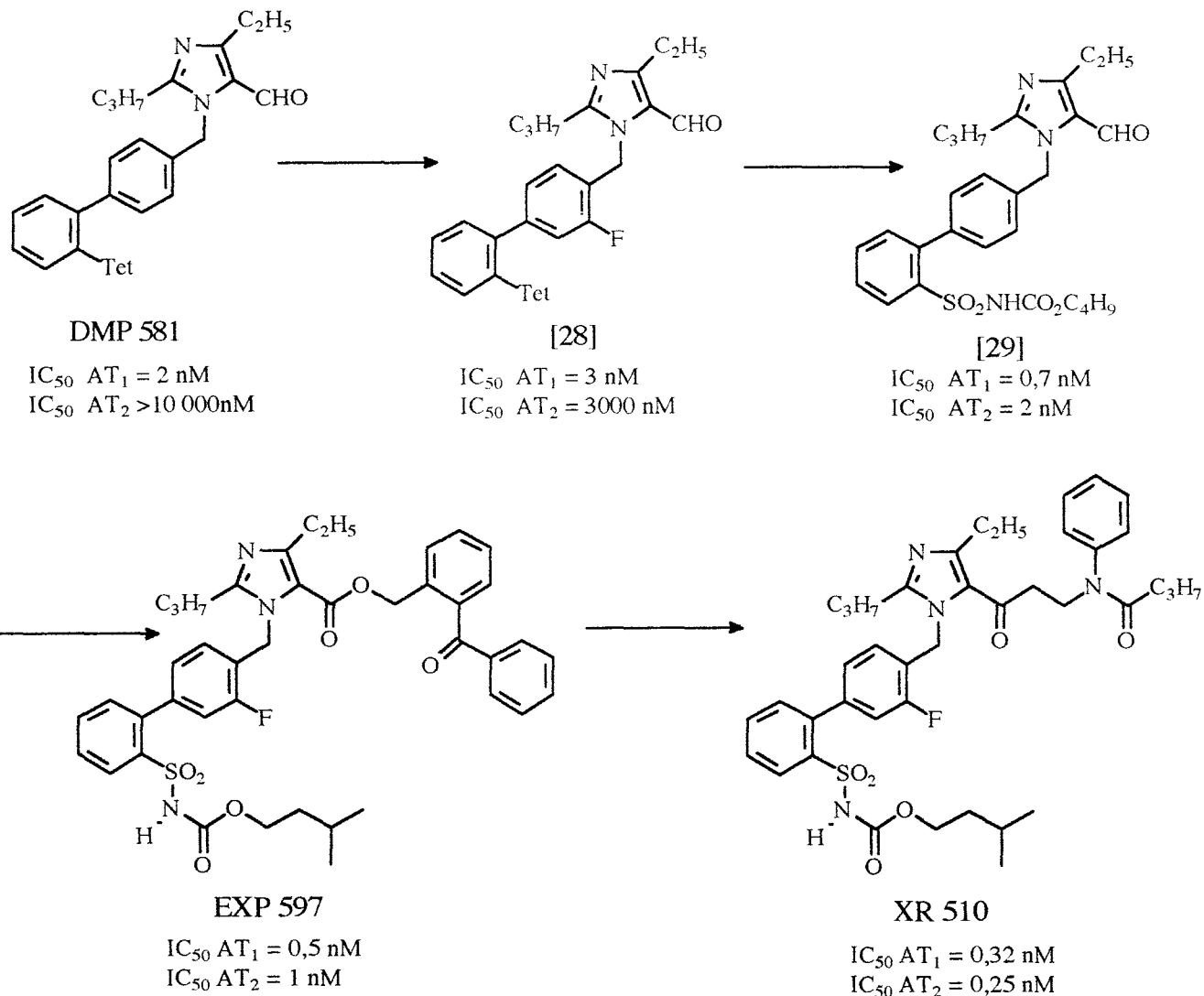
La troisième amélioration a été obtenue par substitution du premier phényle du biphényle par un halogène et du phényle terminal par un chaîne carbonée en position 5, [27].

Une dernière relation structure-affinité est révélée par cette famille :

- **la poche occupée par la structure biphényle est plus large que prévue initialement**. L'addition d'une chaîne carbonée est même profitable pour la liaison aux récepteurs AT₂.

2.3.3.3. Les imidazoles

Le DuP 753 n'a pas échappé aux transformations et des antagonistes mixtes en sont nés.



$IC_{50} AT_1$ et AT_2 : binding sur surrénales de rat
 Tet : tétrazole

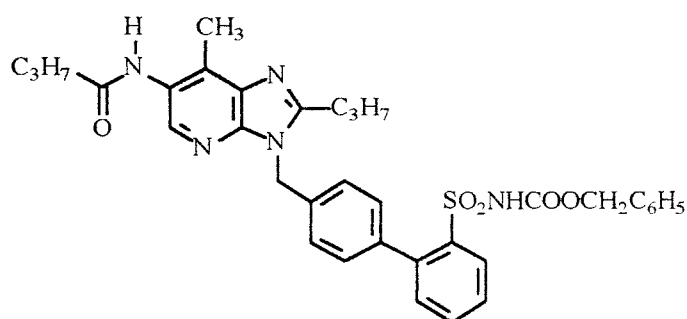
Les deux premières transformations ont été la substitution en ortho du premier aromatique du biphenyle par un halogène qui a permis d'obtenir des dérivés [28] avec des affinités de l'ordre du micromolaire pour les récepteurs AT_2 (Quan et al., 1994), puis le remplacement du tétrazole par des isostères sulfonamides [29] qui a permis de multiplier l'affinité pour les récepteurs AT_2 par un facteur mille, tout en conservant une bonne affinité pour les récepteurs AT_1 (Naylor et al., 1994). La troisième transformation a été inspirée par les ligands AT_2 sélectifs où la présence d'un groupe encombrant et lipophile est nécessaire (substituant diphenylacétyle du PD 123319 par exemple). Les chercheurs de Merck ont choisi comme point de fixation la position 5 de l'imidazole et ont introduit ce groupe en remplaçant la fonction aldéhyde par un ester très encombré, EXP 597 (Santella et al., 1994). Cependant, per os, cet ester est hydrolysé, le

composé XR 510, où l'ester est remplacé par un groupe 3-amidopropanoyle résistant à l'hydrolyse, est un des antagonistes mixtes les plus puissants par voie orale (Quan et al., 1995).

Les représentants de cette famille, qui ont été conçus sur le même schéma que les dérivés triazolines illustrent et confirment très bien toutes les relations structure-affinité décrites précédemment.

2.3.3.4. Les imidazopyridines

Cette famille importante chez les antagonistes sélectifs AT₁ a également servi à la conception d'antagonistes non sélectifs. Par le même cheminement que pour les dérivés précédents, des dérivés acylsulfonamides substitués en 5 par des amides ont été synthétisés (Mantlo et al., 1994).



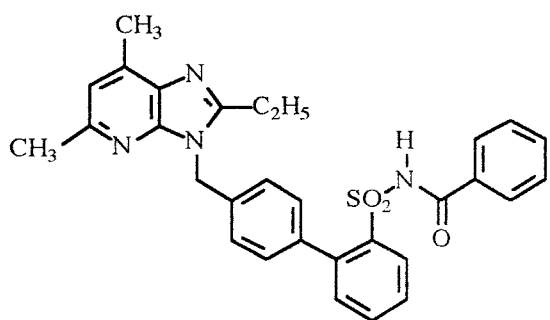
L 162620

IC₅₀ AT₁ = 0,33 nM (aorte de lapin)
IC₅₀ AT₂ = 0,94 nM (cervelet de rat)

2.3.4. Les agonistes non peptidiques des récepteurs de l'Ang II

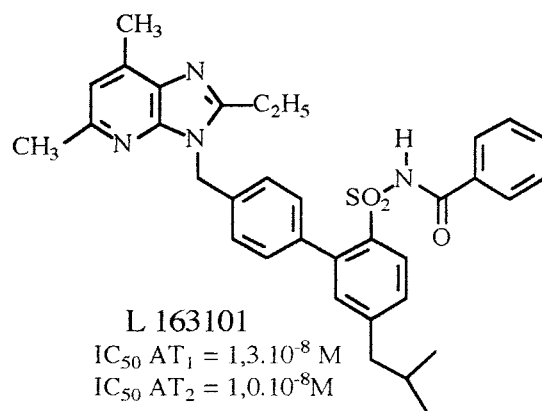
Tout récemment et suite aux multiples pharmacomodulations effectuées sur les antagonistes, des agonistes non peptidiques ont été découverts. Ils appartiennent à la famille des imidazopyridines. L'activité agoniste est obtenue par l'introduction d'une chaîne carbonée en 5 sur le noyau aromatique final de la structure biaromatique (Kevin et al., 1994; Underwood et al., 1995).

Ces molécules sont des ligands mixtes AT₁ / AT₂. L'activité agoniste s'exerce vis-à-vis des récepteurs AT₁ et a été caractérisée par une augmentation de la pression artérielle après administration chez le rat normotendu (Kivlighn et al., 1995).



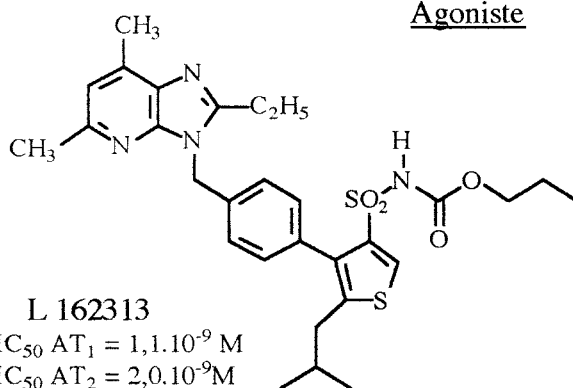
L 159282
 $IC_{50} AT_1 = 3 \cdot 10^{-9} M$
 $IC_{50} AT_2 = 4,5 \cdot 10^{-6} M$

Antagoniste



L 163101
 $IC_{50} AT_1 = 1,3 \cdot 10^{-8} M$
 $IC_{50} AT_2 = 1,0 \cdot 10^{-8} M$

Agoniste



L 162313
 $IC_{50} AT_1 = 1,1 \cdot 10^{-9} M$
 $IC_{50} AT_2 = 2,0 \cdot 10^{-9} M$

Agoniste

2.4. PHARMACOPHORE ET SITES DE LIAISON DES LIGANDS DES RECEPTEURS DE L'ANG II

2.4.1. Modèle hypothétique du pharmacophore des ligands des récepteurs de l'Ang II

Dans la partie précédente consacrée aux ligands des récepteurs de l'Ang II, nous avons essayé d'exposer pour chacune des familles comment les molécules ont été conçues et quels renseignements elles apportaient pour la connaissance des éléments importants pour la liaison aux récepteurs. La synthèse de toutes ces relations structure-affinité nous amène à proposer un modèle hypothétique du pharmacophore des ligands des récepteurs de l'Ang II.

La découverte d'antagonistes non sélectifs AT₁/AT₂ avec de très bonnes affinités pour les deux récepteurs montre que les éléments pour se lier aux récepteurs AT₁ et AT₂ ont de nombreux points communs et qu'un pharmacophore commun peut être décrit (cf fig 14).

Ce dernier se compose :

- 1- d'une première fonction capable de former une liaison hydrogène (azote pyridinique des composés imidazopyridines, hydroxyméthyle en 5 du DuP 753), qui n'est pas primordiale pour la liaison au récepteur mais qui permet de l'améliorer. Dans le cas où cette fonction est un carboxyle, l'établissement d'une liaison ionique avec le récepteur AT₁ semble induire un changement de conformation qui stabilise le complexe ligand-récepteur. L'activité orale est alors sensiblement augmentée.
- 2- d'un substituant volumineux (halogène, alkyle, arylalkyle...) susceptible d'occuper une poche hydrophobe large, profonde et assez distante du site de fixation de l'hétérocycle. Cet élément est intéressant car il permet de jouer sur la balance AT₁/AT₂. Pour la liaison aux récepteurs AT₁, il n'est pas indispensable, mais il améliore l'affinité et l'activité orale. La poche est large et peut accueillir une grande diversité de groupements. En revanche, il est un des éléments clé qui ont permis de développer une affinité pour les récepteurs AT₂ à partir d'antagonistes AT₁ sélectifs. La poche dans ce récepteur paraît plus étroite. Il existe en plus dans cette région des sites d'interaction par liaisons hydrogène ou ioniques aussi bien pour AT₁ que pour AT₂.
- 3- d'un atome (azote basique non protoné des hétérocycles: N₃ des imidazoles, N₁ des triazoles...) capable d'établir une liaison hydrogène avec un groupe donneur de protons du récepteur. Cet atome apparaît comme très important pour la liaison aux récepteurs AT₁, mais pour les récepteurs AT₂ sa nécessité n'est pas évidente.

- 4- d'une chaîne alkyle, souvent non ramifiée, de longueur variant de deux à cinq atomes, indispensable pour la liaison aux récepteurs AT₁. Pour les récepteurs AT₂, sa nécessité n'est pas prouvée et l'on peut noter que les ligands AT₂ sélectifs n'en possèdent pas. Elle occupe une poche hydrophobe assez étroite des récepteurs supposée accueillir la chaîne latérale de l'isoleucine de l'Ang II.
- 5- d'un groupe acide (COOH, tétrazole, NH d'un acylsulfonamide) capable d'interagir avec un résidu basique du récepteur. Il est indispensable pour la liaison aux deux récepteurs. Il est supposé occuper la région du COOH-terminal de l'Ang II.
- 6- d'une structure biaromatique (biphényle, phénoxyphényle...) capable de se glisser dans une troisième poche hydrophobe. Cet ensemble est important à deux titres : les deux noyaux aromatiques interagissent avec les récepteurs par des forces de stacking et ils positionnent la fonction acide dans une région précise pour interagir avec un résidu basique des récepteurs. Dans un premier temps, cette poche est apparue comme étroite, puis les multiples pharmacomodulations ont montré que des substituants plus ou au moins encombrants peuvent être fixés sur les aromatiques ou sur la fonction acide.
- 7- au fond de la poche accueillant le groupe biaromatique et la fonction acide existent deux zones hydrophobes supplémentaires capables d'accueillir des substituants lipophiles de tailles moyennes (pentyle, benzoyle...). L'occupation de ces deux zones a permis de développer une affinité pour les récepteurs AT₂ et constitue le deuxième point permettant de jouer sur la balance AT₁/AT₂.

Remarque : un résultat très intéressant est l'obtention d'un agoniste imidazopyridine par addition d'un isobutyle sur l'aromatique final portant un acylsulfonamide (cf L 163101, fig 16). Cette molécule développe donc le minimum d'interactions pour induire une réponse. Les résidus avec lesquels l'isobutyle interagit sont donc cruciaux pour l'activation du récepteur.

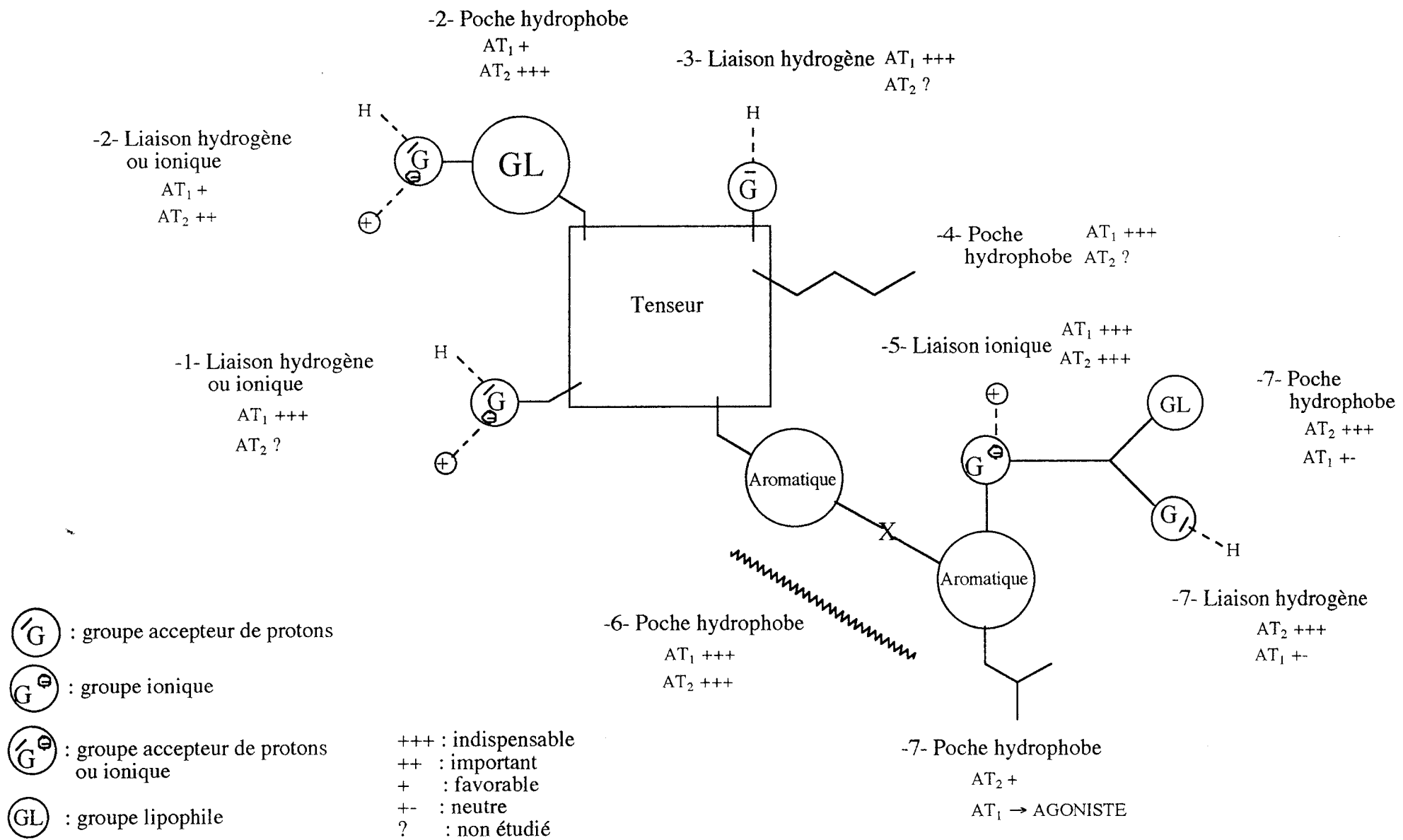


Figure 14 : Pharmacophore des ligands non peptidiques des récepteurs de l'Ang II

Les exemples suivants, avec des représentants des principales familles de ligands existantes répondent à ce pharmacophore des ligands des récepteurs AT₁ et AT₂ (fig 15, 16, 17). Il est intéressant de noter les évolutions dans les structures des antagonistes qui ont permis de passer des antagonistes AT₁ ou AT₂ sélectifs aux antagonistes non sélectifs et enfin aux premiers agonistes non peptidiques.

Avec les trois antagonistes : antagoniste triazolinone, L 158809 et DuP 753 que l'on peut qualifier de première génération, on retrouve les six éléments "de base" pour la liaison aux récepteurs AT₁ :

- trois groupes lipophiles :
 - antagoniste triazolinone: butyle, biphenyle, trifluorométhylphényle
 - L 158809 : propyle, biphenyle, cycle benzénique de l'imidazopyridine
 - DuP 753 : butyle, biphenyle, chlore
- un groupe acide :
 - tétrazole pour les trois
- deux groupes accepteurs de protons :
 - antagoniste triazolinone: azote N₃ et carbonyle de l'imidazolinone,
 - L 158809 : azote basique N₃ de l'imidazole et azote pyridinique
 - DuP 753 : azote basique N₃ et hydroxyméthyle en 5 sur l'imidazole

Avec les trois composés L 163958, L 162620 et EXP 597, antagonistes non sélectifs AT₁/AT₂, qui conservent les six éléments précédents apparaissent les zones d'interaction plus spécifiques aux récepteurs AT₂ :

- deux zones d'interactions hydrophobes supplémentaires :
 - l'une occupée par le substituant fixé sur le sulfonamide (benzoyl, tertibutylcarbonyl)
 - l'autre, à l'opposé, occupée par le substituant d'une fonction amide fixée en 5 sur le noyau imidazopyridine. Dans cette poche, des liaisons hydrogène peuvent être établies entre le ligand et le récepteur, en particulier avec AT₂
- la poche qui accueille la structure biphenyle tolère la présence de substituants fixés sur les noyaux aromatiques. Pour les récepteurs AT₂, la présence d'un halogène sur le premier aromatique et d'une chaîne carbonée sur le second est même favorable.

L'activité agoniste a été obtenue par simple addition d'un isobutyle sur le phényle terminal (cf L 163101, fig 16). Il faut noter que cette substitution ne s'accompagne pas systématiquement de l'apparition d'une action agoniste, le dérivé L 163958 en est un exemple (cf fig 15). Le dérivé L 163101, à la différence des antagonistes découverts jusqu'alors, présente également une affinité pour les récepteurs de l'Ang II de *X. Laevis*. Il est donc capable de copier l'Ang II assez fidèlement. Les études de ses différentes conformations et de son mode d'interaction avec les récepteurs de l'Ang II peuvent apporter des renseignements très intéressants pour comprendre l'interaction de l'Ang II elle-même.

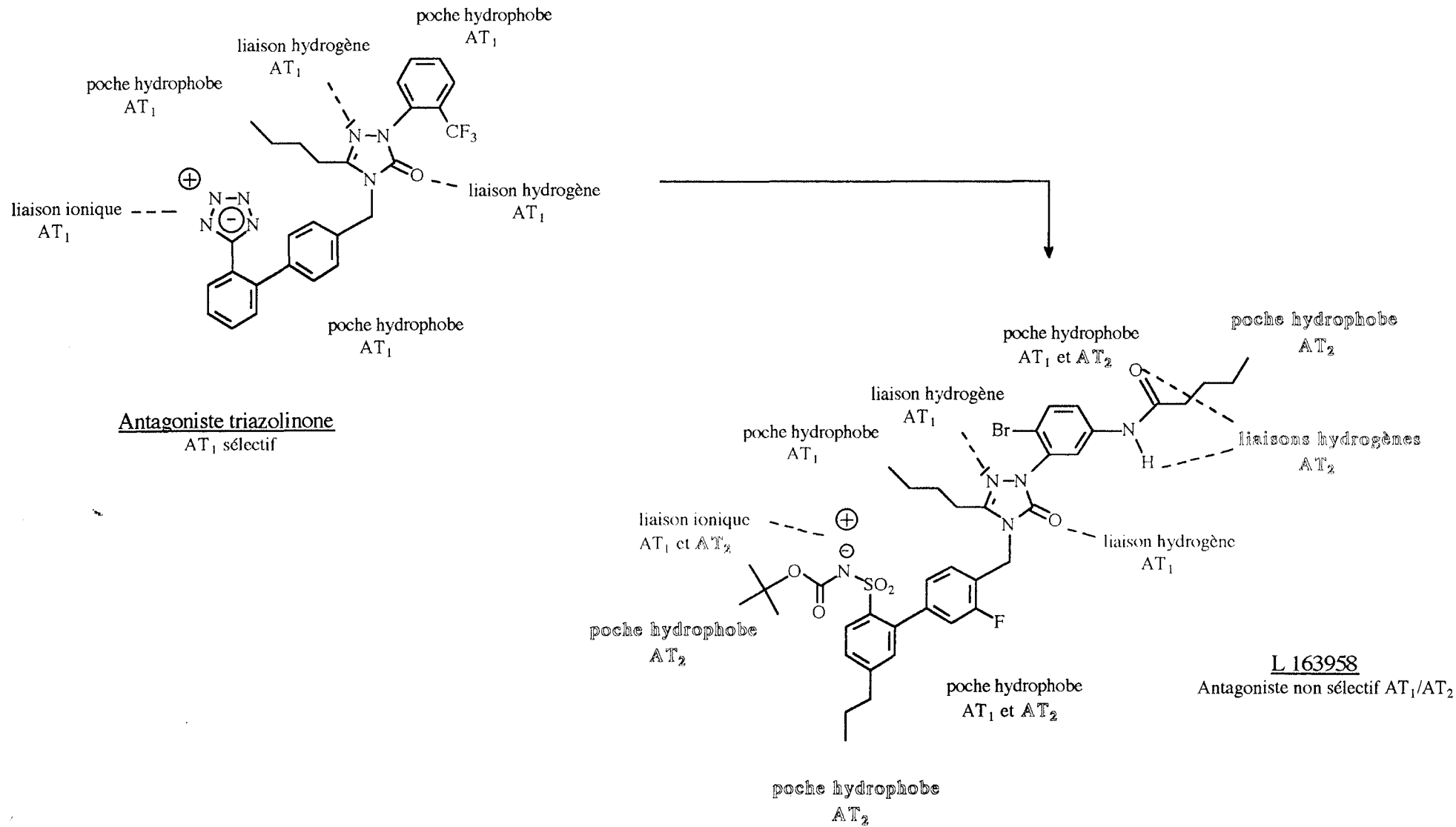


Figure 15

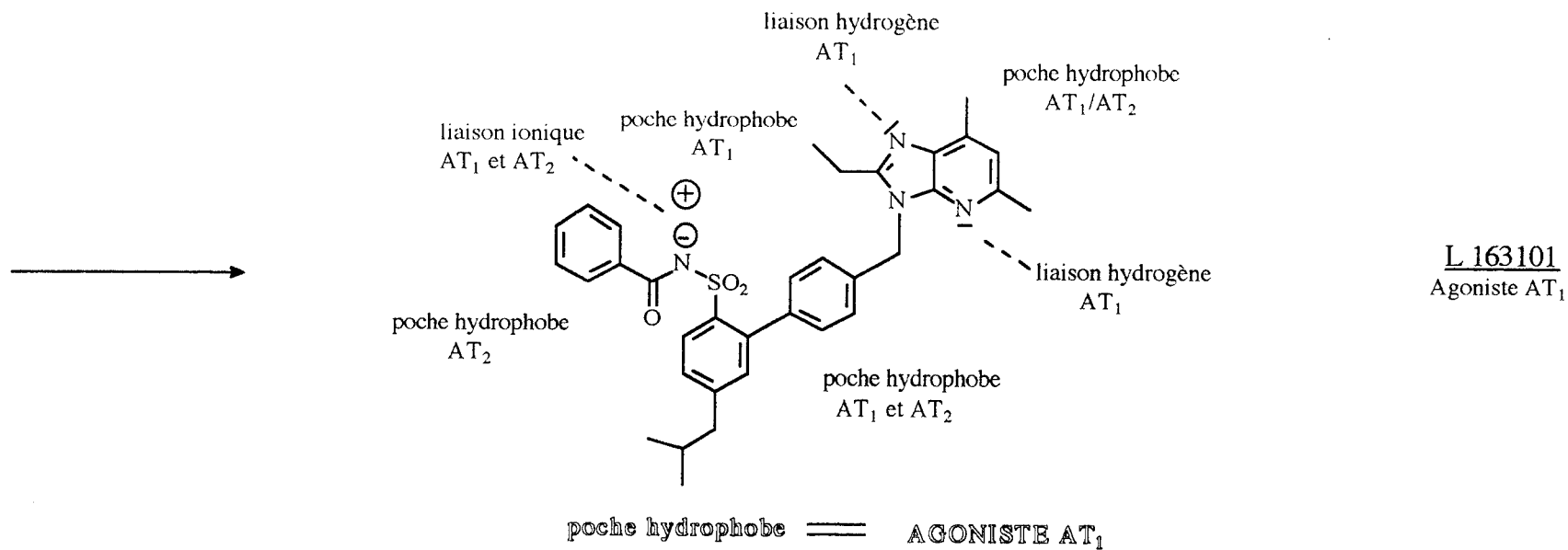
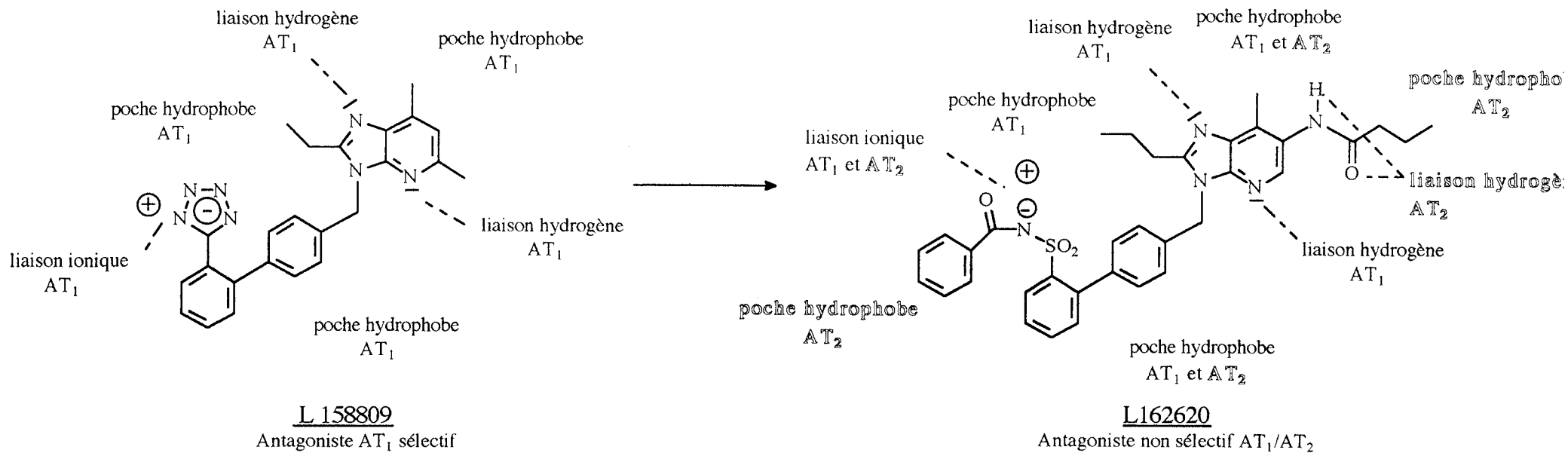
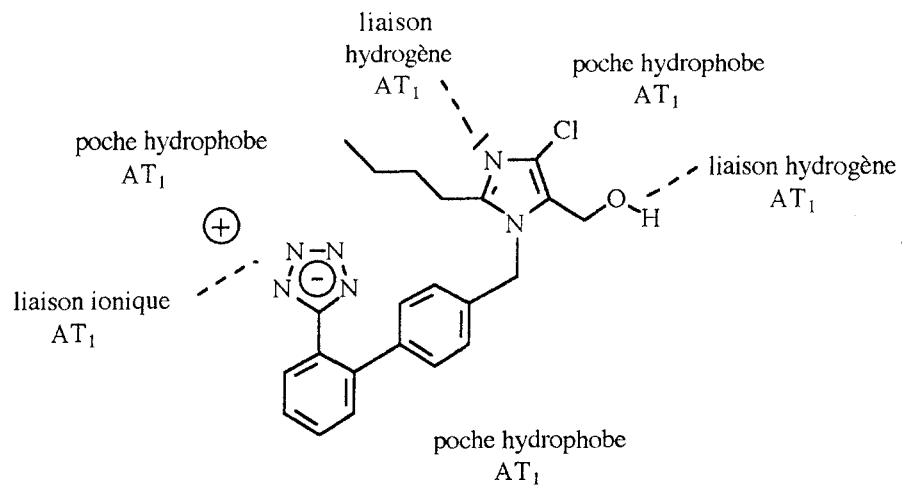
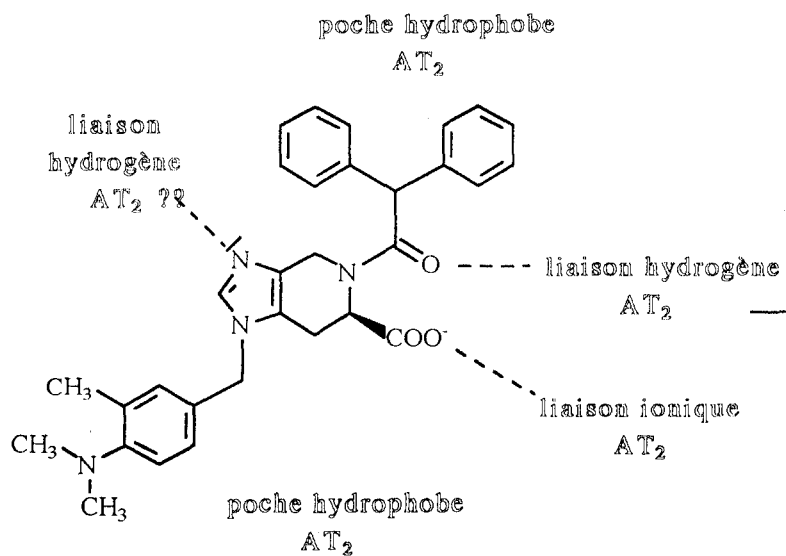


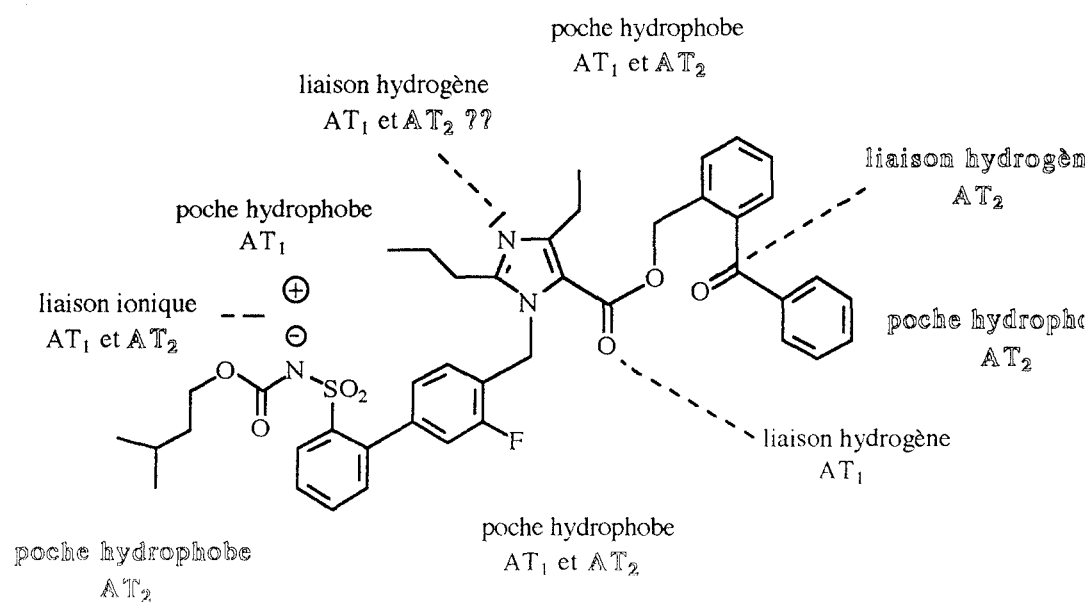
Figure 16



DuP 753
Antagoniste sélectif AT₁



PD 123319
Antagoniste sélectif AT₂



EXP 597
Antagoniste non sélectif AT₁/AT₂

** AT₂ et peut être AT₁

Figure 17

2.4.2. Etudes de mutagenèse dirigée des récepteurs AT₁

Depuis le clonage des récepteurs AT₁ de l'Ang II en 1991, de nombreuses études de mutagenèse dirigée ont été réalisées. Leur objectif est de déterminer le ou les sites de fixation des ligands pour pouvoir aller encore plus loin dans la conception de nouveaux antagonistes.

La structure des récepteurs de l'Ang II, récepteurs à sept hélices transmembranaires peut être divisée en trois domaines :

- les boucles extracellulaires (BE) : elles jouent un rôle important pour la conformation, la structure tridimensionnelle du récepteur. Par exemple en établissant des ponts disulfure entre elles, elles vont influencer l'arrangement des hélices transmembranaires. Elles constituent également le premier point de contact entre récepteur et ligand. Ces interactions sont particulièrement importantes dans le cas des ligands peptidiques comme l'Ang II ou la SP qui sont d'assez grande taille et dont une partie se fixe à la surface du récepteur.
- les boucles intracellulaires (BI) : cette région intracellulaire du récepteur ne peut pas être impliquée dans la liaison des ligands. En revanche, elle participe à la transduction du message en assurant le lien entre le récepteur et ses protéines-relais dans la cellule comme les protéines G.
- les domaines transmembranaires (TM) : ils constituent le coeur du récepteur. Les petites molécules comme les catécholamines pénètrent entièrement dans cet espace pour se fixer aux récepteurs. Pour les peptides, on suppose que seule une partie entre dans ce domaine pour interagir avec des résidus particuliers et ainsi induire l'activation du récepteur.

Pour déterminer les sites de fixation des ligands, les études de mutagenèse réalisées sur les récepteurs AT₁ visant les résidus des boucles extracellulaires et des domaines transmembranaires sont les plus intéressantes. Ces mutations concernent, soit toute une partie du récepteur avec la construction de récepteurs chimères, soit un seul acide aminé.

Les études avec mutations de segments des récepteurs AT₁ ont permis de montrer l'importance :

- de la partie N-terminale, de la première et troisième boucle extracellulaire pour la liaison de l'Ang II. Ceci a été montré par mutations conservatives de segments du récepteur AT₁ de rat (Hjorth et al., 1994)
- des hélices transmembranaires III, IV, V, VI et VII pour la liaison d'antagonistes non peptidiques. Ici la technique utilisée est la construction de récepteurs chimères où des segments du récepteur AT₁ humains sont remplacés par les segments correspondants du récepteur de *X. Laevis* qui ne lie pas ces molécules (Schambye et al., 1994a).

Après cette vue d'ensemble, les mutations ponctuelles ont permis d'étudier les acides aminés essentiels à la reconnaissance des ligands.

Remarque : Pour illustrer certains résultats, nous mentionnerons des valeurs de facteur multiplicatif (F(mut)) qui correspond au rapport de l'affinité du ligand pour le récepteur muté sur celle pour le récepteur naturel.

Mutations des domaines extracellulaires

Extension N-terminale

N4, N176 et N188 : ces résidus constituent les sites de glycosylation, leur mutation en aspartique n'influence pas la liaison des ligands (Yamano et al., 1992).

C18, C101, C180 et C274 : ces quatre cystéines sont primordiales. La création de deux ponts disulfure entre C18-C274 et C101-C180 maintient le récepteur dans une conformation fonctionnelle susceptible d'interagir avec l'Ang II. La détérioration de ces liens par exemple par des agents réducteurs comme le dithiothréitol annule toute liaison de l'Ang II au récepteur. En revanche, la liaison du DuP 753 ne semble pas affectée (Yamano et al., 1992).

H24.Y26.I27 : la substitution de ces trois acides aminés situés à la frontière du domaine transmembranaire I par des alanines diminue de trois mille fois l'affinité de l'Ang II. I²⁷ semble être le plus important. Les liaisons de [Sar¹-Leu⁸] Ang II, antagoniste peptique et de L 158809, antagoniste non peptidique sont peu ou pas influencées par cette mutation (Hjorth et al., 1994).

BE 1

Y92 : son remplacement par une alanine diminue l'affinité de l'Ang II par trois mille. Celle de L 158809 n'est pas influencée (Hjorth et al., 1994).

W94p95XG97 : ce motif est très conservé au sein des récepteurs à sept hélices transmembranaires.

Son altération est catastrophique pour la fixation de tous les ligands des récepteurs de l'Ang II. Il joue certainement un rôle primordial dans la structure en sept hélices du récepteur (Hjorth et al., 1994).

K¹⁰² : le remplacement de cet acide aminé, situé à la frontière avec le domaine membranaire, par une alanine ou une méthionine affecte la liaison de l'Ang II, des antagonistes peptidiques et non peptidiques (Hjorth et al., 1994; Groblewski et al., 1995).

Deux hypothèses sur sa fonction peuvent être proposées :

- K¹⁰² constitue le point central de fixation des ligands en interagissant par une liaison ionique avec le groupe acide présent dans chacun d'eux (COOH-terminal des ligands peptidiques, COOH, tétrazole, acylsulfonamides... des antagonistes non peptidiques),
- ou de par sa position à la frontière du domaine transmembranaire et à proximité de C¹⁰¹ impliquée dans un des ponts disulfure, elle participe à la conformation du récepteur.

BE 2

H¹⁸³ : ce résidu basique serait impliqué dans l'interaction de l'acide carboxylique β de l'aspartique de l'Ang II. Son remplacement par un acide glutamique diminue l'affinité pour l'Ang II, mais n'affecte pas celle de [Sar¹] Ang II, la sarcosine ne possédant pas d'acide carboxylique sur sa chaîne latérale. Cette interaction entre H¹⁸³ et l'aspartique contribue probablement à la stabilisation de la conformation active de l'Ang II, mais n'est pas primordiale (Noda et al., 1995; Feng et al., 1995). Aucune influence sur la liaison d'autres ligands n'a été constatée.

BE 3

D²⁷⁸ et D²⁸¹ : ces deux résidus acides, à la limite des domaines transmembranaires, sont importants pour la liaison des ligands peptidiques. D²⁷⁸ semble plus particulièrement impliqué dans la liaison de l'Ang II (D278A, F(mut) = 813, D281A, F(mut) = 17) et D²⁸¹ dans celle des antagonistes comme [Sar¹, Leu⁸] Ang II (D278A, F(mut) = 71, D281A, F(mut) = 154) (Hjorth et al., 1994). Des études plus approfondies ont montré une interaction ionique entre le guanidinium de l'arginine de [Sar¹, Ile⁸] Ang II et l'acide carboxylique de la chaîne latérale de D²⁸¹ (Feng et al., 1995). Ces mutations n'ont aucune influence sur la liaison des antagonistes non peptidiques (L 158809, DuP 753).

Les domaines transmembranaires

TM II

D⁷⁴ : ce résidu aspartate est présent dans tous les récepteurs de peptides (vasopressine, bradykinines, tachykinines...) à l'exception de la Substance P, peptide amide où l'on trouve un glutamate. Il ne paraît pas impliqué dans la liaison de l'Ang II. En revanche, sa mutation en asparagine diminue l'affinité du DuP 753 (Bihoreau et al., 1993).

Mais sa principale fonction semble liée à l'activation et au phénomène d'endocytose du récepteur AT₁ (Hunyady et al., 1994).

TMIII

S105 : son remplacement par une alanine supprime totalement la capacité du récepteur à lier l'agoniste [Sar¹] Ang II. Deux antagonistes non peptidiques (LF 70156, LF 80129) ont été testés, la diminution des affinités est plus faible ($F(\text{mut}) < 40$) (Grobowski et al., 1995).

S107 et S109 : ces deux sérines ne sont impliquées ni dans la liaison des agonistes peptidiques, ni dans celle des antagonistes (peptidiques ou non) (Ji et al., 1994; Groblewski et al., 1995).

V108 : son remplacement par une isoleucine entraîne une diminution de l'affinité du Dup 753 de quarante fois. Celle de [Sar¹, Val⁵, Ala⁸] Ang II (Saralazine) est inchangée (Ji et al., 1994).

N111 : l'affinité des antagonistes non peptidiques comme le DuP 753 est fortement diminuée par le remplacement de N¹¹¹ par une alanine ($F(\text{mut}) > 100$), alors que celles des ligands peptidiques (agonistes et antagonistes) ne sont pas influencées (Grobowski et al., 1995).

Remarque : cette mutation permet en revanche d'améliorer de trente fois l'affinité pour les récepteurs AT₁ du CGP 42112, ligand peptidique "sélectif" AT₂. Dans le récepteur AT₂, une asparagine est pourtant présente dans cette position (Grobowski et al., 1995).

TMIV

A163 : ce résidu semble jouer un rôle dans la liaison du DuP 753 (A163S, $F(\text{mut}) = 10$). En revanche, sa mutation en sérine n'influence pas l'affinité de [Sar¹, Ile⁸] Ang II (Sarile) (Ji et al., 1994).

R167 : son remplacement par une glutamine ou une alanine entraîne la perte de toute affinité du récepteur pour tous les ligands, agonistes ou antagonistes, peptidiques ou non (Noda et al., 1995; Yamano et al., 1995).

Son rôle n'est pas encore élucidé. Yamano propose une interaction avec le phénol de la tyrosine de l'Ang II. Il suppose également que R¹⁶⁷ est impliquée dans une liaison ionique avec l'anion tétrazolium des antagonistes non peptidiques comme le DuP 753 (Yamano et al., 1995).

Mais face à cette perte d'affinité pour tous les ligands, on peut se demander si l'intégrité du récepteur est bien conservée...

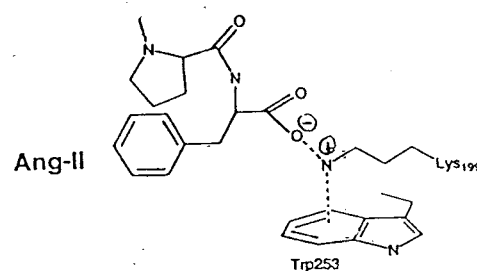
TMV

K199 : ce résidu basique est supposé être au centre de la liaison de tous les ligands des récepteurs AT₁. Il interagirait avec les groupes acides de ces derniers : COOH-terminal des ligands peptidiques, COOH, tétrazole... des antagonistes non peptidiques. Mais certaines particularités sont à noter :

	F (mut)		
	Ang II	[Sar ¹ , Ile ⁸] Ang II	DuP 753
K199Q	48	10,4	2,3
K199R	4	3,0	11,3
K199A	63	33,8	13,4
H256Q	-	1,5	1,9
H256R	-	2,1	28,3
H256A	-	3,2	2,0
K199A/H256A	-	64,6	25,1
K199A/H256R	-	3,0	8,1

Tableau 6

- son remplacement par une glutamine ou une alanine réduit significativement la liaison de l'Ang II et de l'antagoniste peptidique. En revanche, avec le récepteur muté par une arginine, les affinités sont assez bien conservées (cf tableau 6) (Yamano et al., 1992). K¹⁹⁹ et le COOH-terminal des peptides interagiraient donc par une liaison ionique "classique" (des études ont montré que l'amine de K¹⁹⁹ était sous forme protonée). Par analogie aux récepteurs adrénergiques, Yamano suppose que cette liaison est entourée de résidus aromatiques qui la stabiliseraient (Yamano et al., 1995). Divers acides aminés aromatiques sont d'ailleurs présents dans cette région : W¹⁵³, W²⁵³, H²⁵⁶, F²⁵⁹. L'auteur opte pour le tryptophane 253 (W^{253A}, F(mut) = 7).



Interaction entre le COOH-terminal de l'Ang II et
le résidu K¹⁹⁹ du récepteur AT₁

- avec les antagonistes non peptidiques, en particulier ceux possédant un tétrazole, la situation est un peu différente. La mutation par une glutamine n'influence pas leur affinité, alors que celle par une arginine, qui conserve pourtant la charge positive, s'accompagne d'une diminution de celle-ci (cf tableau 6). Il ne s'agirait donc pas d'une liaison ionique comme précédemment.

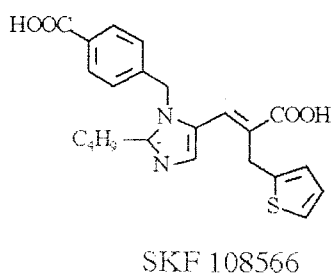
Deux hypothèses sont alors proposées (Noda et al., 1995) :

- l'interaction entre le tétrazole et l'amine de K¹⁹⁹ se ferait par une liaison hydrogène
- l'interaction du tétrazole serait multiple, elle impliquerait plusieurs résidus du récepteur. H²⁵⁶ semble notamment jouer un rôle (cf tableau 6). La diminution d'affinité du DuP 753 après mutation de H²⁵⁶ par une arginine montre que ce résidu n'est pas neutre. Son rôle apparaît dans les récepteurs avec une double mutation. Le remplacement de K¹⁹⁹ et de H²⁵⁶ par une alanine entraîne une diminution de l'affinité du DuP 753 plus importante que ne le laissent prévoir les résultats obtenus par substitution séparée de chacun de ces résidus. D'autre part, si H²⁵⁶ est remplacée par une arginine, l'affinité est restaurée partiellement. La perte de l'amine de K¹⁹⁹ peut donc être compensée par le noyau imidazolique, qui est capable de jouer le rôle de donneur de protons, voire même de cation pour interagir avec le groupe tétrazole du DuP 753.

TM VI

S²⁵² : cet acide aminé serait impliqué dans la liaison avec le DuP 753 (S252C, F(mut) = 9), mais pas avec la Saralaline (Ji et al., 1994).

H²⁵⁶ : nous avons vu précédemment que le cycle imidazolique de la chaîne latérale serait impliqué dans l'interaction avec le tétrazole de certains antagonistes non peptidiques (cf K¹⁹⁹). Une étude du site de fixation du SKF 108566, antagoniste avec une structure différente du DuP 753, montre que H²⁵⁶ serait impliquée dans une interaction avec l'acide carboxylique benzylique du SKF 108566 (cf tableau 7) (Schambye et al., 1995).



	F (mut)	
	DuP 753 ^a	SKF 108566 ^b
H256A	2,0	15
H256Q	1,9	1

a Noda et al., 1995
b Schambye et al., 1995

Tableau 7

H²⁵⁶ peut être remplacée par un résidu glutamique sans perte d'affinité, comme avec le Dup 753. Cela suggère que l'interaction met en jeu l'azote ε de l'imidazole de la chaîne latérale de l'histidine (cf fig 18).



Figure 18

Son remplacement par une alanine diminue de manière plus importante l'affinité du SKF 108566 que celle du DuP 753. Le groupe tétrazole en comparaison avec l'acide carboxylique est plus grand, il peut établir plusieurs liaisons hydrogène (trois azotes basiques), des interactions par "stacking" (structure aromatique). Il est donc susceptible de multiplier les points d'interaction avec le récepteur (cf § précédent, K¹⁹⁹). On peut donc imaginer que la rupture d'un seul point d'interaction n'influence pas trop la liaison du DuP 753. En revanche, pour le SKF 108566, l'acide carboxylique interagit peut être exclusivement avec H²⁵⁶ et la rupture de cette liaison influence de manière plus importante l'affinité.

TM VII

Y²⁹² : sa mutation en phénylalanine supprime toute réponse suite à la stimulation du récepteur par l'Ang II. Une certaine similitude dans les résultats observés avec Y²⁹² et D⁷⁴ laisse supposer que ces deux résidus sont impliqués dans l'activation du récepteur et qu'ils puissent même interagir entre eux (Marie et al., 1994).

Remarque : dans les récepteurs AT₂, la tyrosine est remplacée par une phénylalanine. Or ces récepteurs ne semblent pas utiliser un système de transduction classique. Il serait intéressant de savoir s'il existe un lien entre ces deux faits.

N²⁹⁵ : la liaison de nombreux antagonistes non peptidiques est influencée par la mutation de ce résidu. L'affinité des ligands peptidiques n'est pas changée (Perlman et al., 1995; Schambye et al., 1995). Un fait surprenant est que le remplacement par une sérine a un effet plus important sur les antagonistes compétitifs que sur les non compétitifs (Schambye et al., 1994a, 1994b). Les différences structurales entre ces deux types d'antagonistes sont très diverses (cf page 46). Il est donc difficile de déterminer quel élément est impliqué directement dans l'interaction avec N²⁹⁵. Mais cela prouve que la différence entre antagonistes compétitifs et non compétitifs peut trouver une explication dans le mode d'interaction avec le récepteur.

2.4.3. Modèles hypothétiques des sites de liaison des ligands des récepteurs de l'Ang II

Le premier fait important qui résulte de ces études de mutagenèse est qu'il existe plusieurs sites de fixation sur les récepteurs AT₁ de l'Ang II. Plus précisément, il apparaît que les sites de fixation de l'Ang II et des antagonistes non peptidiques sont différents. Ils se recoupent mais ne sont pas entièrement superposables. En effet, pour plusieurs résidus, les mutations influencent la liaison de l'Ang II mais pas celle des antagonistes non peptidiques et vice versa.

Ce phénomène n'est pas exceptionnel, on le retrouve dans la majorité des récepteurs de peptides (cf Substance P). Il peut s'expliquer par le fait que les peptides, molécules d'assez grande taille établissent plusieurs points d'interaction (épitopes) avec le récepteur. Il suffit donc en théorie pour une molécule de perturber l'un de ces sites d'interaction pour empêcher la fixation du peptide. Dans le cas extrême d'antagonistes allostériques, on peut même concevoir un site de fixation totalement différent de celui du peptide et imaginer que par induction d'un changement de conformation du récepteur le peptide ne puisse plus se fixer.

2.4.3.1. Site de fixation de l'Ang II

A quelques exceptions près, toutes les mutations effectuées dans la zone extracellulaire du récepteur affectent la liaison de l'Ang II sans perturber celle des antagonistes non peptidiques. Cela confirme que la liaison de l'Ang II s'effectue principalement en surface, sur les boucles extracellulaires du récepteur. Les études de mutagenèse ont montré que certains résidus sont impliqués dans cette liaison, mais leur rôle n'est pas encore connu. Pour D²⁸¹ et H¹⁸³, on en sait un peu plus; ils interagiraient avec la partie N-terminale de l'Ang II, D²⁸¹ par liaison ionique avec l'arginine et H¹⁸³ avec l'aspartique (Feng et al., 1995).

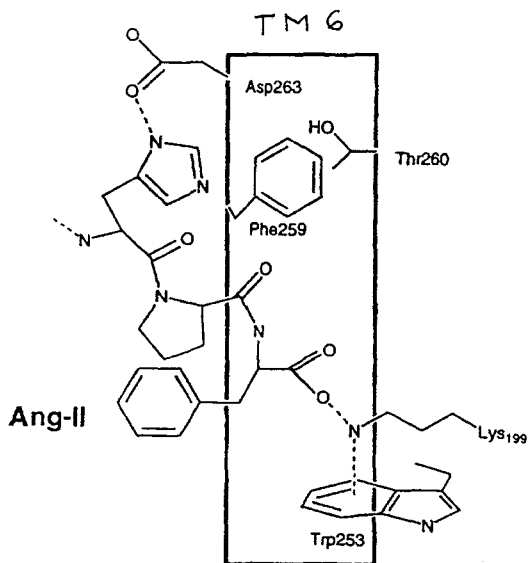
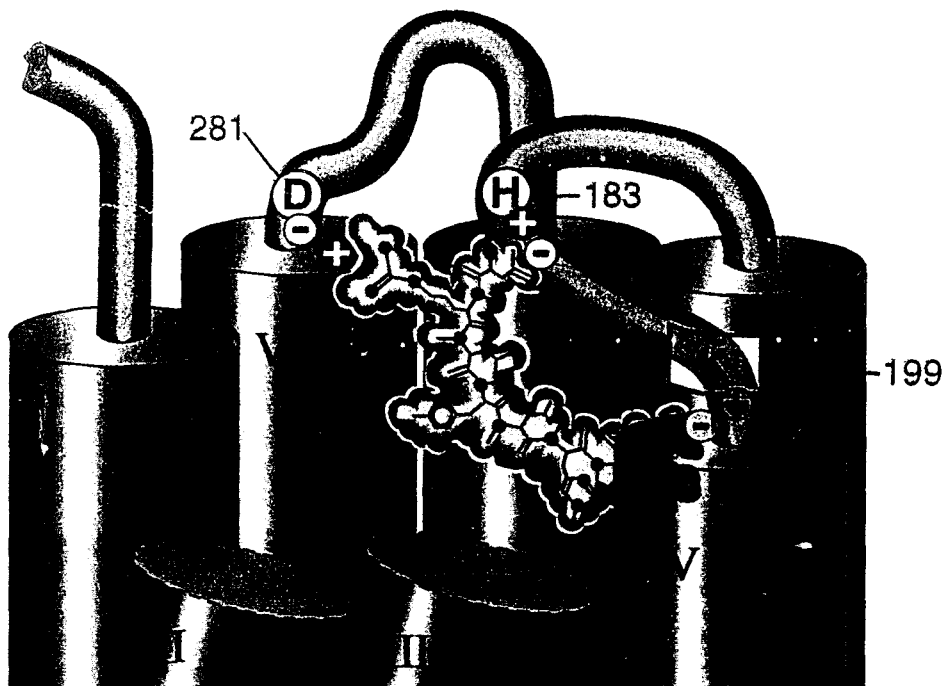
Les différents points d'interaction à la surface du récepteur doivent permettre de positionner l'Ang II dans la conformation adéquate pour pouvoir interagir ensuite avec les résidus impliqués dans l'activation du récepteur. A ce titre, trois acides aminés des hélices transmembranaires interagissent avec l'Ang II : S¹⁰⁵, R¹⁶⁷ et K¹⁹⁹. Il est à noter que ces trois résidus sont situés à la frontière entre les domaines extracellulaires et transmembranaires et sont donc facilement accessibles.

Le COOH-terminal de l'Ang II est primordial pour l'affinité et le phényle de la phénylalanine pour l'activation. On peut donc penser que cette partie de l'Ang II se fixe dans une région du récepteur impliquée dans l'activation et donc transmembranaire. Or dans les trois acides aminés précédents, on trouve deux résidus basiques (K¹⁹⁹ et R¹⁶⁷) susceptibles d'établir un lien avec le COOH-terminal. Dans l'hypothèse de Yamano, le COOH-terminal et K¹⁹⁹ interagissent par une liaison ionique stabilisée par un environnement aromatique (W¹⁵³, W²⁵³...) (Yamano et al, 1995). Dans cet environnement, il est tout à fait concevable que le phényle de la phénylalanine interagissent avec un ou plusieurs de ces résidus aromatiques pour induire une réponse.

Toujours selon Yamano, le deuxième acide aminé R¹⁶⁷ serait impliqué dans l'interaction avec le phénol de la tyrosine qui est indispensable pour l'activation du récepteur.

Dans les récepteurs histaminergiques, l'imidazole de l'histamine est au centre d'un transfert de protons entre deux résidus capables d'établir des liaisons hydrogène. Ce transfert est stabilisé par un aromatique. Par analogie, Yamano propose une interaction entre l'imidazole de l'histidine et les résidus F²⁵⁹, T²⁶⁰ et D²⁶³ (Yamano et al., 1995).

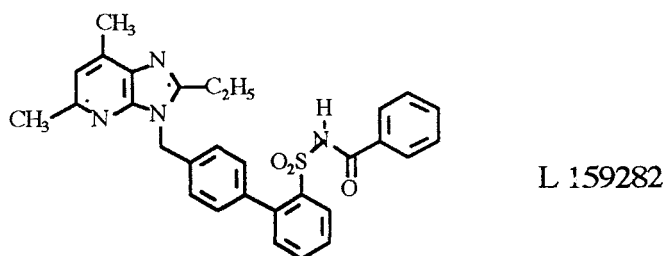
A partir des travaux de Feng et de Yamano, le site de liaison de l'Ang II sur le récepteur AT₁ commence à se dessiner.



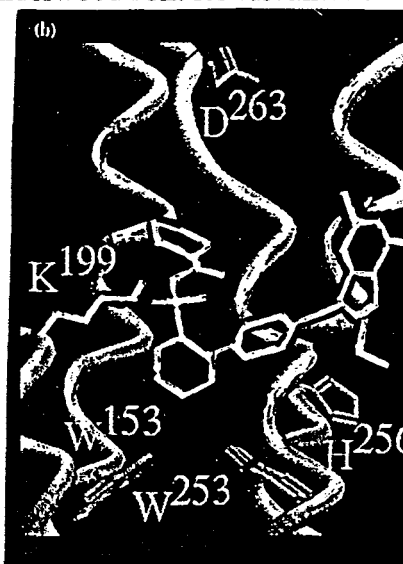
2.4.3.2. Site de fixation des ligands non peptidiques de l'Ang II

Le site de fixation de ces ligands est membranaire et plus précisément il se répartit sur les cinq hélices transmembranaires TM III, TM IV, TM V, TM VI et TM VII. Aucun acide aminé des deux premières hélices ne semble impliqué.

Comme pour l'Ang II, le site de fixation n'est pas encore parfaitement connu. Mais à partir des premiers indices apportés par les études de mutagenèse et les relations structure-affinité, Underwood a proposé un premier modèle d'interaction pour le L 159282, antagoniste des récepteurs AT₁ (Underwood et al., 1994).



Les hypothèses faites par Underwood sont les suivantes :



1- Le point de fixation central serait une liaison ionique entre le NH acide de l'acylsulfonamide et K¹⁹⁹. Comme pour l'Ang II, cette liaison ionique est stabilisée par des résidus aromatiques. Les possibilités sont nombreuses : Y¹¹³, F¹¹⁷, W¹⁵³, F²⁰⁴, W²⁵³, Y²⁹² et F²⁹³. Cet environnement aromatique pourrait justifier la nécessité de la structure biaromatique pour fixer cette fonction acide chez les antagonistes.

2- Des substituants encombrants peuvent être fixés sur le sulfonamide. Ce groupe serait orienté vers la partie extracellulaire du récepteur. Underwood suppose que cette région serait occupée normalement par la tyrosine de l'Ang II qui interagirait avec S¹⁶⁰. Vu l'importance de la tyrosine pour déclencher une réponse, ce résidu serait particulièrement important pour

l'activation du récepteur. Underwood suppose que le carbonyle de l'acylsulfonamide de l'antagoniste jouerait le rôle de l'hydroxyle phénolique.

3- Les relations structure-affinité montrent la nécessité d'un groupe accepteur de protons, hydroxyméthyle du DuP 753, acide carboxylique du EXP 3174 ou azote pyridinique du L 159282. Underwood propose S¹⁰⁷, pour remplir le rôle de donneur de protons.

4- La chaîne carbonée, indispensable dans tous les antagonistes non peptidiques, pourrait se glisser entre TM₂ et TM₇, espace réduit qui peut expliquer les contraintes stériques observées avec ce substituant.

5- L'imidazopyridine peut être fonctionnalisée en 5 par une grande variété de substituants larges, hydrophobes et pouvant comprendre des fonctions acides ou basiques. Dans le modèle, ce groupe est dirigé vers les boucles extracellulaires où se trouvent des résidus acides : D²⁸¹, D²⁶³ et basiques R¹⁶⁷, K¹⁰² capables d'établir des liaisons avec ces substituants.

Cette région est suspectée interagir avec la partie N-terminale de l'Ang II. Le substituant en 5 de l'imidazopyridine serait donc l'équivalent de cette partie de l'Ang II alors que la structure biphenylacylsulfonamide serait orientée vers la partie C-terminale.

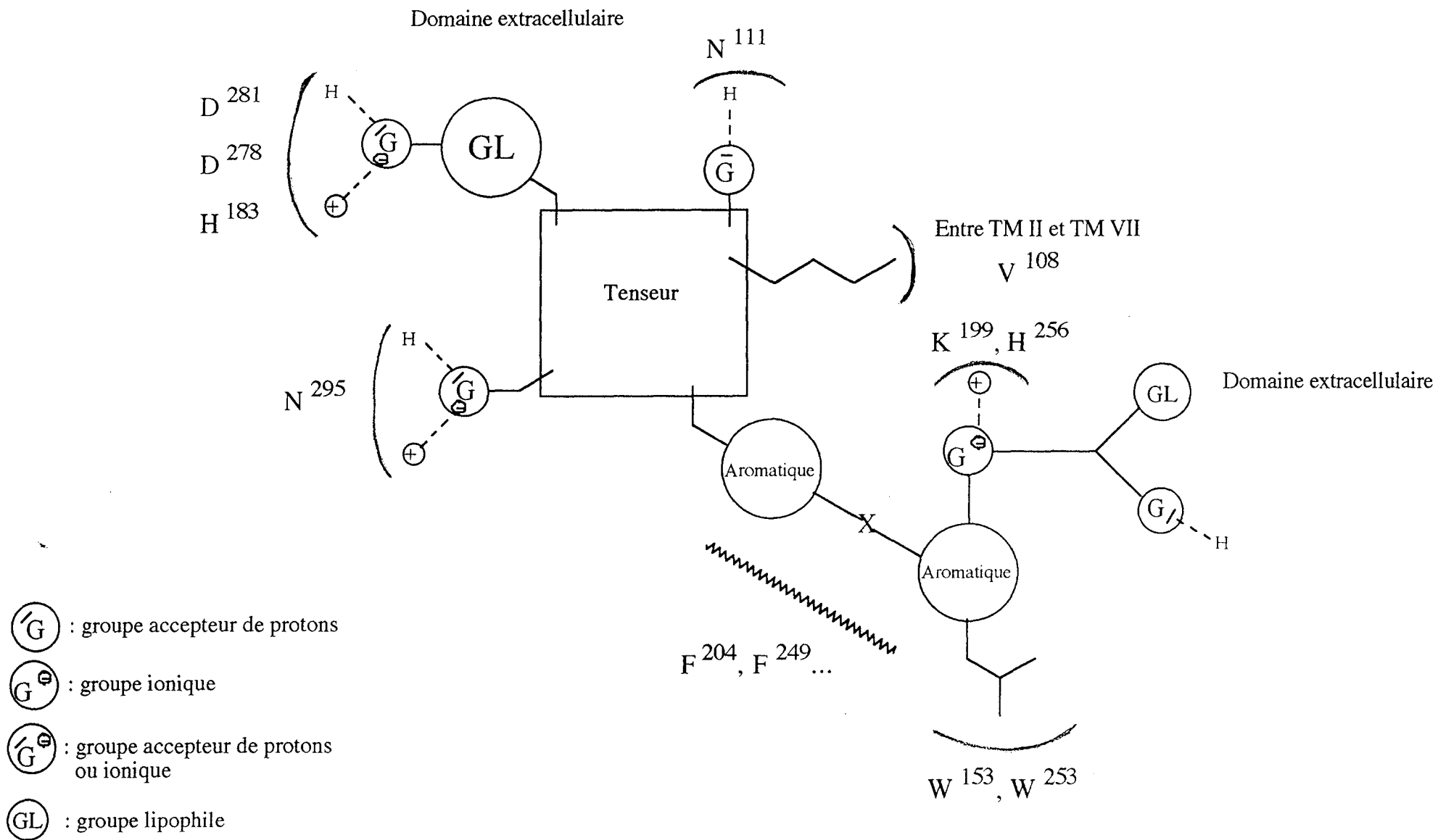
6- Enfin Underwood justifie le passage d'antagoniste à agoniste par addition d'un isobutyle sur l'aromatique final en supposant que ce groupe se glisse dans l'espace occupé par le noyau phényle de la phénylalanine, élément crucial pour activer le récepteur. Il suppose que les résidus interagissant avec ce phényle sont W¹⁵³ et W²⁵³.

Underwood pose ici les premières pierres pour essayer d'aller plus loin dans la connaissance de l'interaction ligands non peptidiques-récepteur. Certaines de ses hypothèses peuvent être contestées et d'autres paraissent très intéressantes :

- la liaison entre K¹⁹⁹ et la fonction acide des antagonistes semble justifiée. A part les résultats obtenus par Yamano qui suggèrent une interaction entre le tétrazole du DuP 753 et R¹⁶⁷ (Yamano et al., 1995), tous concordent en ce sens. On peut toutefois compléter cette hypothèse en ajoutant le rôle de H²⁵⁶ comme point supplémentaire d'interaction pour les fonctions acides comme le tétrazole ou le COOH benzoïque du SKF 108566.
- la formation d'une poche hydrophobe par des aromatiques pour stabiliser la liaison entre K¹⁹⁹ et la fonction acide est également tout à fait probable. Ce phénomène est rencontré avec d'autres récepteurs comme les récepteurs adrénergiques...

- l'interaction entre un des groupes accepteurs de protons des antagonistes et S¹⁰⁷ est plus contestable. Les mutations n'ont démontré aucun rôle de cet acide aminé dans la liaison des ligands sur le récepteur AT₁. En revanche un rôle de N²⁹⁵ a été démontré dans la liaison des antagonistes, en particulier des antagonistes compétitifs.
- l'idée d'orienter le substituant en 5 sur l'imidazopyridine et donc par extrapolation tout groupe fixé sur une position équivalente sur d'autres hétérocycles (en 4 sur l'imidazole, sur l'azote N₂ des triazolinones...) vers la région occupée par la partie N-terminale de l'Ang II est très séduisante. Elle peut se justifier par le fait que ces groupes ne sont pas indispensables pour la liaison des antagonistes AT₁, ils ne font qu'améliorer leur affinité en créant des points d'interaction supplémentaires.
Elle ouvre également la voie à de nouvelles pharmacomodulations pour créer de nouveaux points d'interaction, comme par exemple avec D²⁸¹, D²⁷⁸... susceptibles d'améliorer l'affinité des antagonistes.
- l'interaction entre S¹⁶⁰ et l'hydroxyle phénolique de la tyrosine de l'Ang II est à confirmer par mutagénèse.
- l'orientation de la chaîne carbonée entre les deux hélices transmembranaires est tout à fait possible. Cependant les mutations de V¹⁰⁸ ont montré son importance dans la liaison du Dup 753 et l'on peut supposer une interaction de la chaîne butyle avec ce résidu hydrophobe du récepteur.
- l'explication du passage de l'antagoniste à l'agoniste est séduisante, mais demande à être confirmée. Une première étude montre que certaines mutations qui affectent la liaison de l'antagoniste L 158809 n'influencent pas celle de l'agoniste L 162313. Ces deux ligands ne se fixent peut être pas au même endroit (Perlman et al., 1995)...
- aucune proposition n'est faite par Underwood pour le résidu impliqué dans l'interaction avec l'atome basique N₃ du L159282, élément pourtant important. N¹¹¹ dont un rôle dans la liaison du Dup 753 a été montré peut être un candidat.

Pour conclure, nous avons essayé à partir de ces remarques et hypothèses de compléter le pharmacophore des ligands de l'Ang II en indiquant les résidus du récepteur susceptibles d'interagir avec chacun de ses éléments.



Interactions possibles entre les antagonistes non peptidiques et le récepteur AT₁ de l'Ang II

Au cours de ce siècle, les exemples d'hormones ou de neurotransmetteurs non peptidiques utilisés comme modèles pour la conception d'"innovations thérapeutiques" sont nombreux. Les catécholamines, les hormones stéroïdes sexuelles en sont peut être les représentants les plus classiques. Mais dans cet univers, la structure peptidique domine et le potentiel thérapeutique de ces molécules est limité par leur faible biodisponibilité orale et leur courte durée d'action suite à leur dégradation enzymatique *in vivo*. Pour surmonter l'obstacle, les chercheurs ont essayé et essaient toujours d'élaborer des molécules non peptidiques capables de mimer (agonistes) ou au contraire de bloquer (antagonistes) le peptide endogène. Pour cela, deux attitudes peuvent être adoptées :

- soit on fait confiance au hasard, on "screen" des milliers de molécules dans l'espoir de "tomber sur la bonne",
- soit on essaie de réfléchir un peu... L'idée est d'utiliser le peptide endogène comme modèle pour concevoir, par une approche rationnelle (drug design), une structure peptidomimétique susceptible de se fixer sur le même site que le peptide lui-même.

L'idéal serait de partir du ligand endogène, d'identifier les éléments importants pour la reconnaissance et l'activation du récepteur, de déterminer leur arrangement dans l'espace et enfin de concevoir un squelette, un support (souvent hétérocyclique) sur lequel tous ces éléments pourront être convenablement fixés dans leur arrangement tridimensionnel optimal pour donner naissance à un peptidomimétique (cf fig 19). Les deux principaux avantages de ces peptidomimétiques non peptidiques sur le peptide endogène sont un gain en efficacité (résistance à la dégradation par les peptidases) et en sélectivité. En effet, le peptide endogène est souvent capable de se fixer sur différents récepteurs en adoptant diverses conformations. Si on arrive à copier sélectivement l'une d'entre elle, on pourra obtenir l'effet désiré sélectivement et s'affranchir de certains effets secondaires.

A l'heure actuelle, il n'existe pas encore, à notre connaissance, d'exemple de médicament qui ait été conçu de A à Z par une réflexion rationnelle. La découverte de la structure originale de départ est souvent due au hasard. Puis les chercheurs tentent d'améliorer ses caractéristiques : affinité, sélectivité, biodisponibilité... en s'inspirant du peptide endogène pour réaliser les transformations.

CONCEPTION

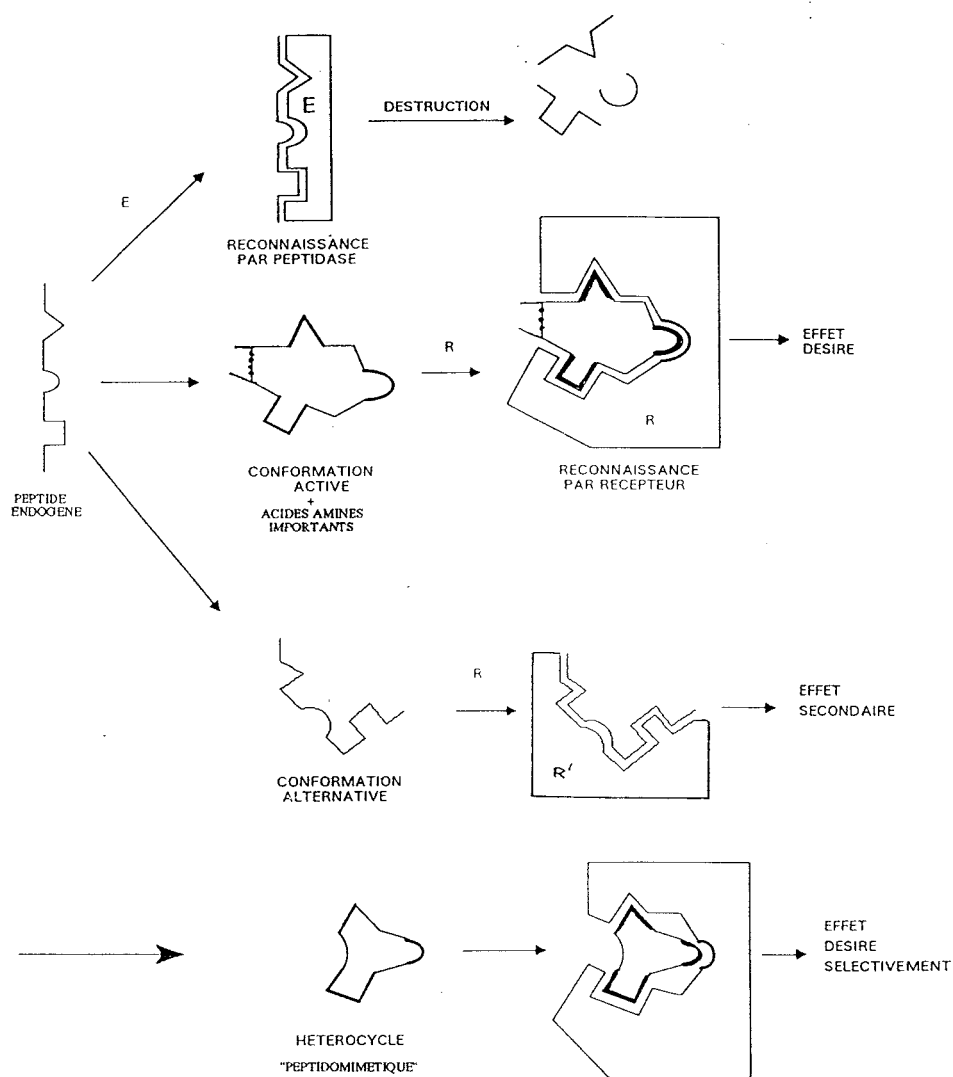


Figure 19 : Elaboration d'un peptidomimétique non peptidique

La découverte des antagonistes des récepteurs de l'Ang II est une parfaite illustration de cette approche qui allie le hasard au rationnel. Comme nous l'avons vu, tout est parti de la découverte de la structure N-benzyl imidazole par la firme Takeda. Les firmes Du Pont et SmithKline Beecham se sont emparées de cette structure et ont cherché à la superposer avec l'Ang II. Il apparaît ici la nécessité de connaître la conformation active du peptide. Or celle-ci est souvent inconnue. Les peptides pouvant adopter une multitude d'arrangements tridimensionnels, la conformation prise comme référence constitue souvent une hypothèse de travail. On peut d'ailleurs noter que les deux conformations choisies par les chercheurs de Du Pont et SmithKline Beecham sont différentes. Puis ils ont modifié la structure originale pour essayer de mimer encore plus parfaitement tel ou tel élément du peptide (cf fig 5 page 39). Ces réflexions ont été couronnées de succès avec la découverte du DuP 753 et du SKF 108566, les deux antagonistes chefs de file des récepteurs AT₁.

Pour notre travail, nous avons essayé de suivre une approche identique à celle décrite précédemment. Nous avons choisi une conformation de l'Ang II sur la base de résultats décrits dans la littérature, puis nous avons superposé la structure N-benzyl imidazole et regardé quelles améliorations nous pouvions apporter. Cette réflexion nous a conduit à proposer une structure originale : 1-benzyl-4-(2-hydroxybenzyl) imidazole.

Parallèlement, une deuxième famille de composés a été développée au sein du laboratoire. Elle est née d'une réflexion un peu différente de la première. Ici, les structures plus élaborées de deux antagonistes des récepteurs AT₁, le SKF 108566 et le CGP 48933 ont servi de base. Par application de principes du drug design : théorie des cycles potentiels, bioisostérie, ces structures ont été modifiées, en gardant tout de même cette volonté de copier au mieux l'Ang II. Compte tenu des objectifs qui nous étaient fixés (cf préface), nous n'avons pas participé directement à la synthèse de ces molécules, mais en revanche nous avons étudié les produits issus de ce concept sur le plan pharmacologique.

Le raisonnement, la structure générale, les différentes molécules synthétisées dans cette deuxième famille et les résultats pharmacologiques ne pourront être exposés en détail dans ce mémoire pour des raisons de confidentialité industrielle.

Nous allons donc exposer dans le détail la conception de la première famille de composés inspirée de la conformation "scorpion" de l'Ang II. Puis nous décrirons les travaux de synthèse chimique réalisés qui se divisent en deux parties : 1- synthèse de deux antagonistes de référence qui nous ont servi à valider les tests biologiques développés; 2- synthèse des molécules originales issues de la première réflexion. Nous aborderons ensuite le développement des modèles que nous avons mis en oeuvre pour l'évaluation pharmacologique des molécules synthétisées. Enfin nous exposerons et discuterons les résultats obtenus en respectant le caractère confidentiel pour les dérivés de la deuxième famille.

MOLECULES ORIGINALES INSPIREES DE LA CONFORMATION "SCORPION" DE L'ANG II

La recherche d'antagonistes non peptidiques de l'Ang II se prête bien à une approche rationnelle faisant appel au drug design. L'idée directrice qui a animé toutes les recherches effectuées dans ce domaine, consiste à mimer le pentapeptide essentiel de l'Ang II : Tyr-Ile-His-Pro-Phe. Les éléments importants de ce peptide sont (cf § 2.2. page 32) :

- le noyau phényle et l'hydroxyle phénolique de Tyr⁴,
- la chaîne carbonée de Ile⁵,
- le noyau imidazolique de His⁶,
- Pro⁷,
- le noyau phényle et le COOH-terminal de Phe⁸.



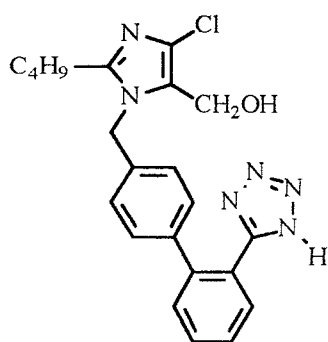
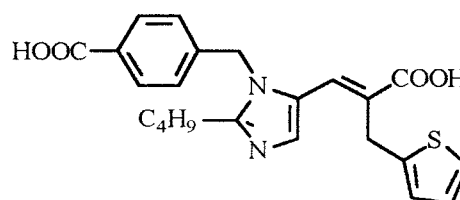
Ces éléments n'ont pas tous la même importance. Ils interviennent plus particulièrement dans la reconnaissance ou dans l'activation du récepteur. Par exemple, l'hydroxyle phénolique de Tyr⁴ semble impliqué dans une liaison ionique avec le récepteur primordiale pour son activation. En revanche, Pro⁷ et His⁶ par induction d'un γ turn assurent à l'Ang II une conformation adéquate pour interagir avec le récepteur.

Un antagoniste est une substance possédant une affinité pour le récepteur mais pas d'activité intrinsèque : la fixation au récepteur n'entraîne aucune modification des fonctions cellulaires. Les critères à suivre pour concevoir un antagoniste découlent naturellement de cette définition :

- la molécule doit se fixer sur le récepteur : elle doit donc posséder les éléments indispensables à l'affinité,
- la molécule ne doit pas déclencher de réponse cellulaire : au moins un des éléments importants pour l'activité doit être modifié ou omis.

Les antagonistes élaborés jusqu'alors respectent plus ou moins bien ces exigences. Prenons l'exemple des chefs de file des deux familles d'antagonistes non peptidiques des récepteurs AT₁ de l'Ang II :

- le DuP753, 2-butyl-4-chloro-5-hydroxyméthyl-1-[[2-tétrazolyl)biphényl]méthyl]imidazole
- le SKF108566, acide (E)-3-[2-butyl-1-[(4-carboxyphényl)méthyl]imidazol-5-yl]-2-[(2-thiényl)méthyl]-2-propénoïque

**DuP 753****SKF 108566**

Ces deux molécules possèdent :

- une chaîne carbonée butyle pouvant se glisser dans la poche hydrophobe occupée par la chaîne latérale de Ile⁵
- un groupe acide (DuP 753 : tétrazole, SKF 108566 : COOH) mimant le COOH-terminal
- un noyau aromatique (DuP 753 : phényle terminal de la structure biphenyle, SKF 108566 : thiényle) copiant celui de la chaîne latérale de Phe⁸
- un noyau imidazolique équivalent de celui de la chaîne latérale de His⁶

Seul le SKF 108566 présente un élément (acide benzoïque) susceptible de jouer le rôle du phénol de Tyr⁴.

Le second point important est l'arrangement dans l'espace de ces éléments. De nombreux efforts ont été réalisés pour déterminer "la conformation" de l'Ang II dans son interaction avec le récepteur. Cependant comme celle de la plupart des hormones peptidiques, la structure de l'Ang II est extrêmement flexible et possède certainement plusieurs conformations de basse énergie susceptibles d'interagir avec les récepteurs.

Des études de RMN de l'Ang II en solution ont tout de même permis d'étayer et de compléter les résultats obtenus par les études systématiques de la séquence peptidique.

Elles ont notamment confirmé la présence d'un γ turn du tripeptide C-terminal : His-Pro-Phe et d'une liaison amide trans entre His⁶ et Pro⁷ (Cushman et al., 1992; Garcia et al., 1992a, 1992b; Nikiforovich et al., 1993)

Une information supplémentaire et importante apportée par ces études est la mise en évidence d'un arrangement en "cluster" des trois résidus aromatiques de Tyr⁴, His⁶, Phe⁸ et d'une interaction entre l'hydroxyle phénolique de Tyr⁴, l'imidazole de His⁶ et le COOH-terminal de Phe⁸ (Moore, 1985a, 1985b; Rauk et al., 1987; Matsoukas et al., 1990, 1991).

Cette interaction a été décrite dans un premier temps par Moore comme un transfert de protons rappelant celui rencontré dans les protéases à sérine (cf fig 20a). La charge négative a la possibilité de se délocaliser sur le cycle imidazolique et sur le cycle aromatique phénolique, d'où une grande stabilisation du transfert, renforcée par une interaction par "stacking" entre l'imidazole et le phényle de Phe⁸.

Suite aux résultats obtenus avec la [Sar¹His(3-Me)⁶] Ang II qui ne possède pas de proton imidazolique ionisable et qui pourtant conserve une activité, Moore a proposé un mécanisme un peu différent basé sur une interaction ion-dipôle entre l'imidazole et le COOH-terminal, complétée par une liaison hydrogène entre l'hydroxyle phénolique de la tyrosine et l'azote basique imidazolique de l'histidine (cf fig 20b) (Moore et al., 1993).

Le γ turn induit par Pro⁷ permet de positionner les trois résidus aromatiques (phénol, imidazole et phényle) dans un environnement proche pour pouvoir établir l'interaction à trois centres décrite précédemment.

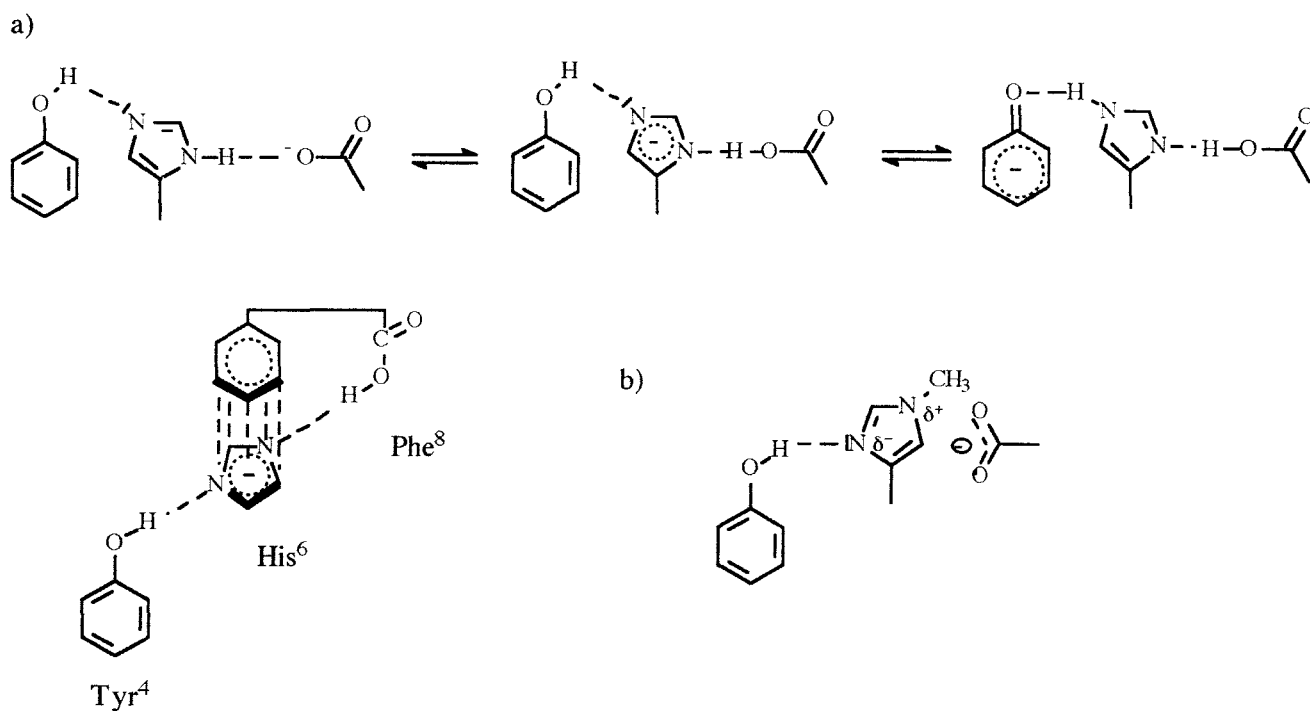
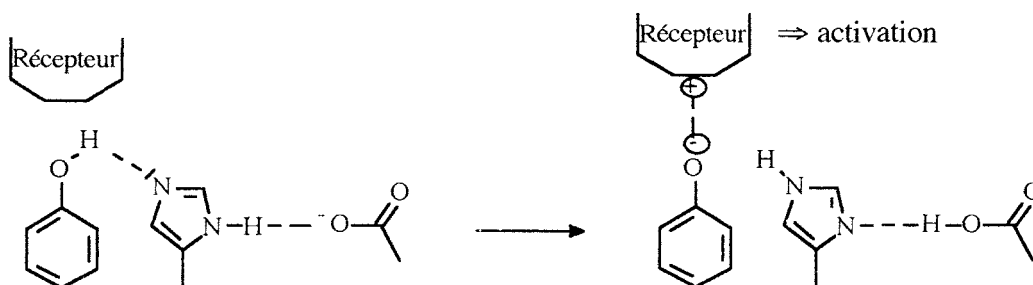


Figure 20: a) Transfert de protons entre l'hydroxyle phénolique de la tyrosine, l'imidazole de l'histidine et le COOH-terminal de l'Ang II et stabilisation par stacking (Moore et al., 1985b)

b) Interaction ion-dipôle entre l'imidazole N-méthylé de l'histidine et le COOH-terminal complétée par une liaison hydrogène entre l'hydroxyle phénolique de la tyrosine et l'azote basique imidazolique de l'histidine (Moore et al., 1993)

Dans les deux cas, l'activité biologique du ligand semble dépendre du degré de transfert de proton entre l'hydroxyle phénolique de la tyrosine et le noyau imidazolique, l'hydroxyle devant se trouver sous une forme ionisée pour induire une réponse.



Les relations structure-activité établies pour les antagonistes peptidiques appuient ces résultats. Les peptides [Sar¹, Ile⁸] Ang II et [Sar¹, Tyr(OMe)⁴] Ang II sont des antagonistes car, pour le premier, l'arrangement en "cluster" est impossible; pour le second la forme phénolate ne peut exister.

Des résultats montrent également que l'Ang II adopterait une structure compacte lors de son interaction avec le récepteur : le N-terminal, en particulier l'arginine serait proche du noyau phénolique de Tyr⁴ et stabiliserait ainsi par sa charge positive la forme phénolate (Matsoukas et al., 1990, 1991, 1994; Garcia et al., 1992a, 1992b,).

Dans la conception du DuP 753 et du SKF 108566, ni l'arrangement en cluster des trois résidus aromatiques, ni l'interaction entre la Tyr⁴, His⁶ et Phe⁸ ne sont pris en compte. Dans les deux conformations prises en référence pour concevoir ces deux antagonistes, les noyaux aromatiques sont d'ailleurs assez éloignés les uns des autres (cf fig 5 page 39) (Duncia et al., 1990; Weinstock et al., 1991).

Il nous est donc apparu intéressant de concevoir des molécules en tenant compte de ces deux particularités de la structure de l'Ang II. Pour cela, nous avons pris comme référence une conformation (cf fig 21) inspirée de la conformation "scorpion" proposée par Moore et complétée par Matsoukas (Moore et al., 1985b; Matsoukas et al., 1990).

Les principales caractéristiques de cette conformation sont :

- la conformation en "crosse" adoptée par les trois premiers acides aminés de l'Ang II. Nous avons choisi au début de nos travaux de positionner cette partie du peptide à l'opposé du transfert de protons pour des raisons d'encombrement stérique. Mais des études récentes montrent que le tripeptide N-terminal se situerait plutôt dans une région voisine du cluster. La charge positive du guanidinium de Arg² participerait à la stabilisation du transfert de charge (Matsoukas et al., 1994). Cependant cela n'influence pas la conformation du pentapeptide C-terminal qui est celui qui nous intéresse tout particulièrement.
- la présence du phénol de Tyr⁴, de l'imidazole de His⁶ et du COOH-terminal dans la même région, grâce notamment au γ turn induit par Pro⁷. Ces trois résidus peuvent alors interagir suivant un des schémas présentés précédemment : présence d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle phénolique de Tyr⁴ et l'azote basique N₁ de l'imidazole de His⁶ et d'une interaction ion-dipôle entre le COO⁻-terminal et le noyau imidazolique.
- la chaîne benzyle de Phe⁸ est positionnée assez loin du cycle imidazolique et donc de l'interaction à trois centres. L'orientation de cette chaîne latérale est importante pour l'activation du récepteur et on peut penser que dans la conformation active de l'Ang II, le cycle phényle se trouve dans la même région que les autres résidus impliqués dans le transfert de charges car il participe à la stabilisation de ce dernier en interagissant avec le noyau imidazolique. En revanche, pour la liaison au récepteur, elle ne joue pas un rôle prépondérant. Les études sur les peptides ont montré par exemple que le remplacement de L-Phe⁸ par D-Phe⁸ permet de passer d'un agoniste à un antagoniste, mais sans affecter l'affinité. De même d'autres chaînes latérales lipophiles assez encombrantes (biphényle...) peuvent être fixées sans diminution de l'affinité (Hsieh et al., 1989). La région occupée par ce groupe est donc assez large.

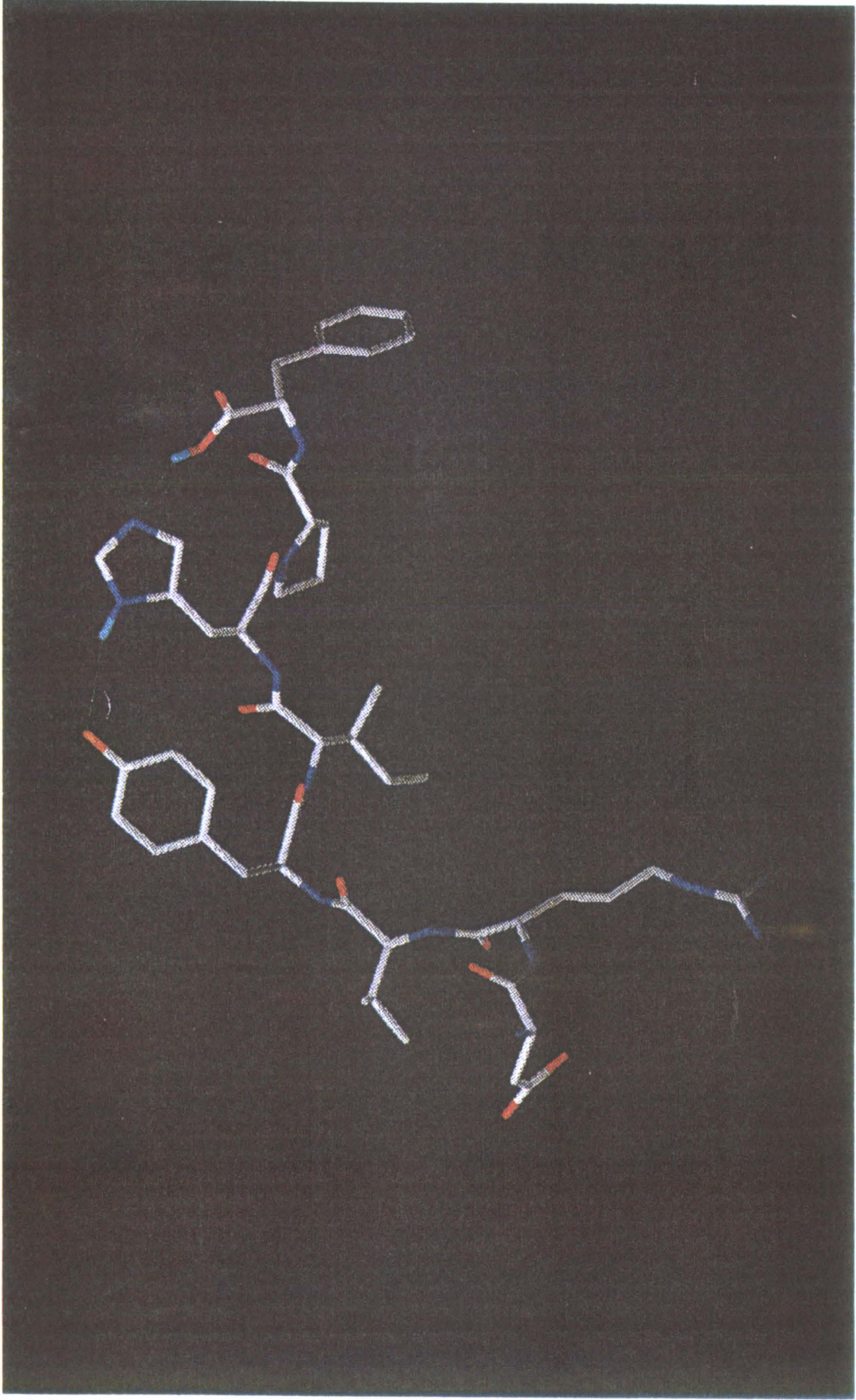


Figure 24: Conformation de l'ANG II prise comme modèle

Un squelette original d'antagonistes potentiels de l'Ang II nous est alors apparu intéressant. La structure de base est constituée par un 1-benzyl-4-(2-hydroxybenzyl) imidazole.



Superposition du squelette 1-benzyl-4-(2-hydroxybenzyl) imidazole sur l'Ang II dans la conformation prise comme modèle

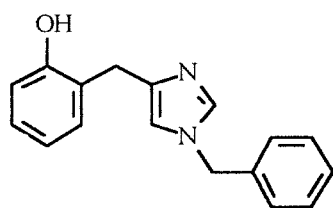
Nous retrouvons :

- les trois noyaux aromatiques, phénol, imidazole et phényle.
Le phénol est lié au noyau imidazolique par un méthylène en position 4. Cette charnière méthylénique offre suffisamment de liberté à ces deux cycles pour se positionner dans une conformation proche de celle adoptée par le phénol de Tyr⁴ et l'imidazole de His⁶. Le substituant benzylique fixé sur l'azote N₁ est dirigé vers la partie C-terminale de l'Ang II. Le noyau phényle pourrait occuper un site reconnu par Phe⁸. Il peut servir également de point d'ancrage pour étendre la molécule vers cette partie du peptide.
- la fonction hydroxyle phénolique qui peut former une liaison hydrogène avec l'azote basique N₃ de l'imidazole, similaire à celle qui peut exister entre l'hydroxyle phénolique de Tyr⁴ et l'imidazole de His⁶.

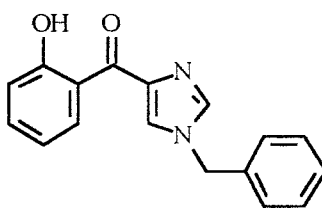
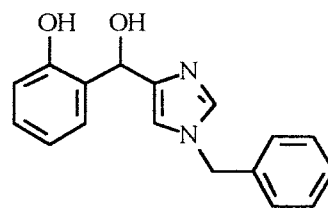
Les études précédentes, en particulier sur les agonistes et antagonistes peptidiques, montrent que la méthylation ou le remplacement de l'hydroxyle phénolique par un groupe incapable de former une liaison hydrogène permet d'obtenir des antagonistes (Hsieh et al., 1979; Scanlon et al., 1984). Pour cette raison, il nous est apparu intéressant de synthétiser deux séries de molécules, l'une avec l'hydroxyle "libre", l'autre avec l'hydroxyle "bloqué" (OR, R pouvant être une chaîne carbonée, un benzyle..).

Pour étudier l'importance de la géométrie entre le phénol et l'imidazole, nous avons pensé remplacer le lien méthylénique par un lien cétonique, la fonction carbonyle imposant une structure coplanaire des deux noyaux. Elle peut également en tant qu'accepteur de protons établir un point d'interaction supplémentaire avec le récepteur. Parallèlement, des structures

(2-hydroxyphényl)-(4-imidazolyl)méthanols ont été envisagées. Ici la géométrie tétraédrique des dérivés méthyléniques est conservée, mais l'hydroxyle peut jouer le rôle de donneur de proton.



Tétraédrique

Plan
Accepteur de protonTétraédrique
Donneur de proton

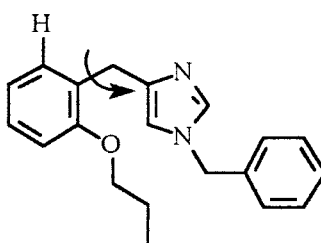
Ces trois structures doivent être complétées par deux groupes indispensables pour l'affinité :

- une chaîne carbonée,
- un groupe acide.

Introduction d'une chaîne carbonée

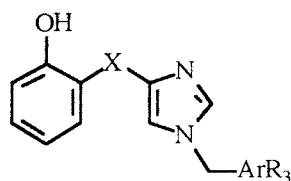
Divers points de fixation sont envisageables :

- la position 5 du noyau imidazolique,
- les positions 5 ou 6 du noyau phénolique,
- l'hydroxyle phénolique. En effet si l'on applique une rotation de 180° au noyau phénolique autour de sa liaison avec le méthylène voisin, il est tout à fait concevable qu'une chaîne carbonée fixée sur l'atome d'oxygène puisse jouer le rôle de celle de Ile⁵. Dans ce cas, l'hydroxyle phénolique de Tyr⁴ est remplacé par un atome d'hydrogène, substitution qui, comme le démontre le peptide [Sar¹,Phe⁴] Ang II, permet d'obtenir un antagoniste (Samanen et al., 1989a).



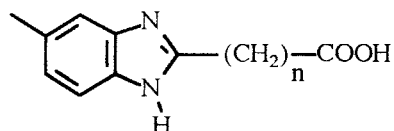
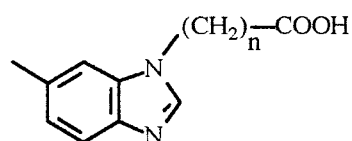
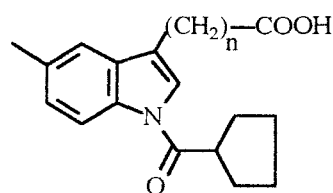
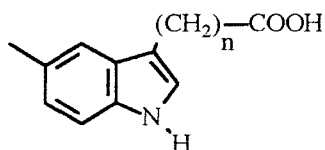
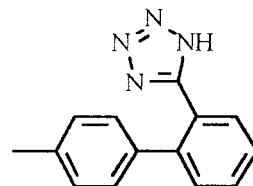
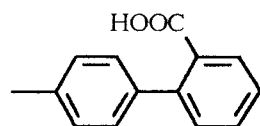
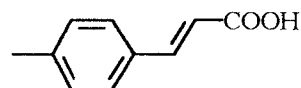
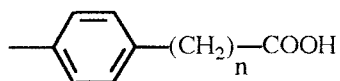
Introduction d'un groupe acide

Par analogie avec le DuP 753, le groupe acide COOH ou tétrazole sera porté par la structure benzylque fixée sur l'azote N₁ imidazolique. Nous avons alors envisagé toute une série de substituants en partant du plus "simple" : l'acide benzoïque pour arriver à des structures plus complexes, en passant par l'ensemble biphényle présent dans la majorité des antagonistes inspirés du DuP 753.



X = CH₂, CHOH, CO

ArR₃ :

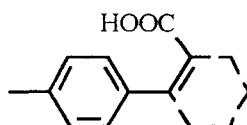


n = 0, 1, 2

Substituents aromatiques-acides envisagés

Remarques :

- l'acide cinnamique rappelle la chaîne trans acrylique du SKF 108566 et peut être également considéré comme l'analogue ouvert de la structure biphenyle.



- la fusion du noyau phényle avec un hétérocycle (indole, benzimidazole) permet d'introduire au moins un atome d'azote susceptible de mimer celui de Phe⁸. Le substituant indolique N-acylé doit même permettre de reproduire la liaison amide Pro⁷-Phe⁸.

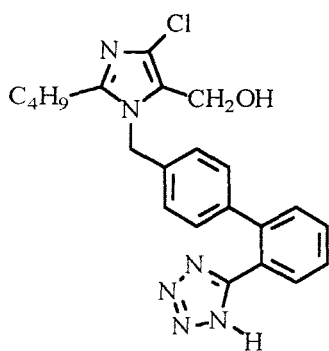
SYNTHESES CHIMIQUES

4.1. SYNTHÈSE DE DEUX LIGANDS DE RÉFÉRENCE : LE DUP 753 ET LE PD 123177

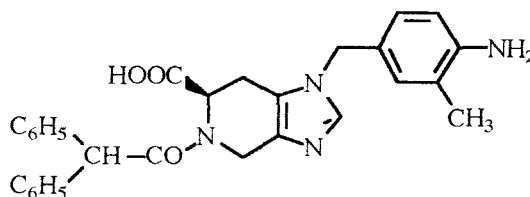
Comme nous l'avons dit en préface, ce travail comporte deux phases :

- un travail de synthèse chimique, avec la synthèse de molécules originales, antagonistes non peptidiques potentiels des récepteurs de l'Ang II;
- un travail de pharmacologie pour évaluer les effets potentiels de ces molécules.

Pour ce deuxième volet, divers tests pharmacologiques ont dû être développés. Pour les valider, nous avons besoin de substances de référence. Nous avons alors entrepris la synthèse de deux ligands non peptidiques, l'un sélectif et antagoniste des récepteurs AT₁ : le DuP 753 (ou Losartan) et l'autre sélectif des récepteurs AT₂ : le PD 123177.



DuP 753



PD123177

Pour commencer, nous allons nous intéresser à la synthèse du DuP 753 qui a été décrite pour la première fois en 1991 par Carini (Carini et al., 1991).

Nous allons nous intéresser dans un premier temps à la préparation des matières premières : 2-butyl-5(4)-chloro-4(5)-hydroxyméthyl imidazole **4**, 4'-(bromométhyl)-2-cyanobiphényle **24** et 5-[4'-(bromométhyl)biphényl-2-yl]-1-triphénylméthyl tétrazole **23**. Puis nous décrivons la synthèse du composé final **8** ou DuP 753 à partir de ces matières (cf schéma 1).

4.1.1 Synthèse du DuP 753

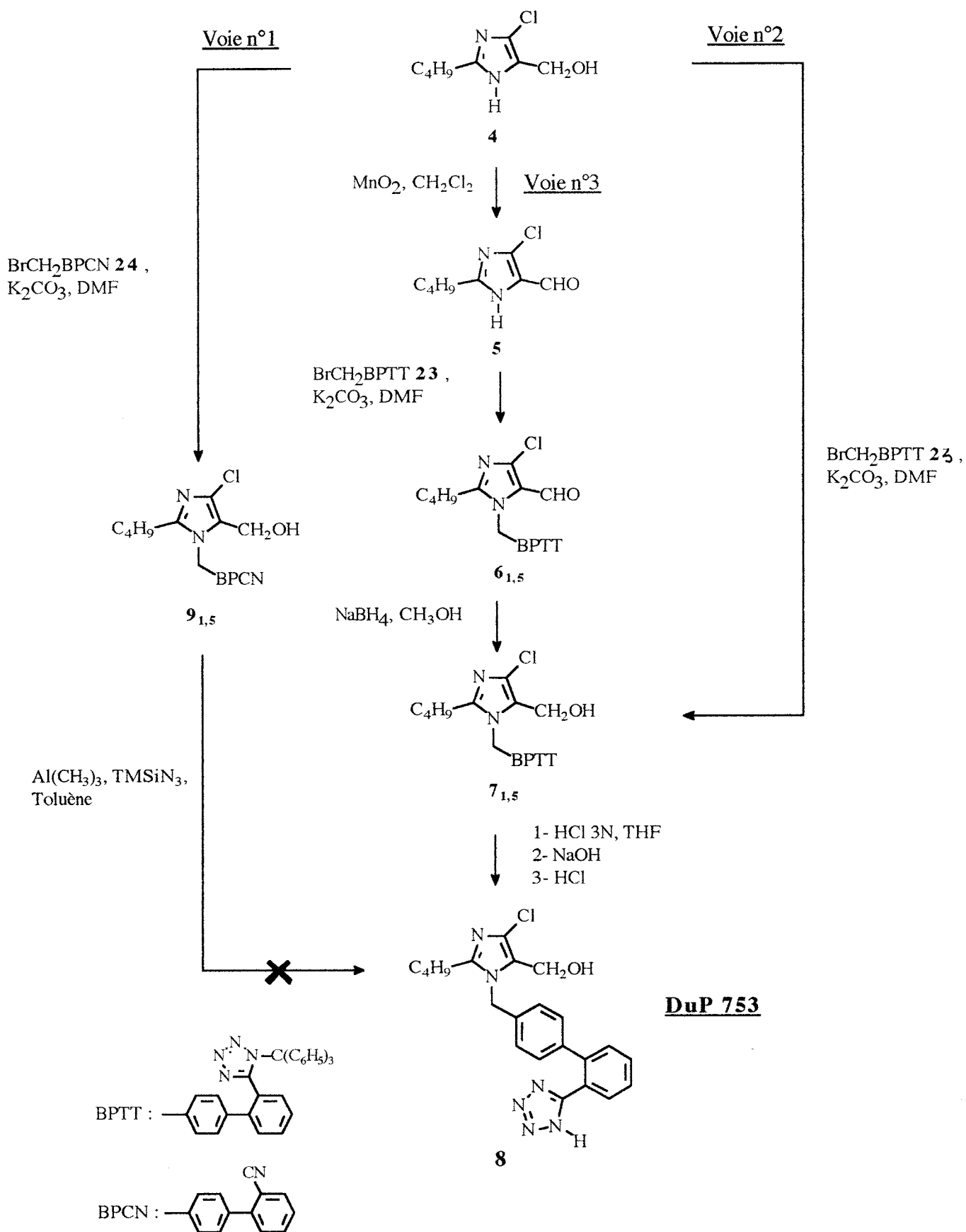
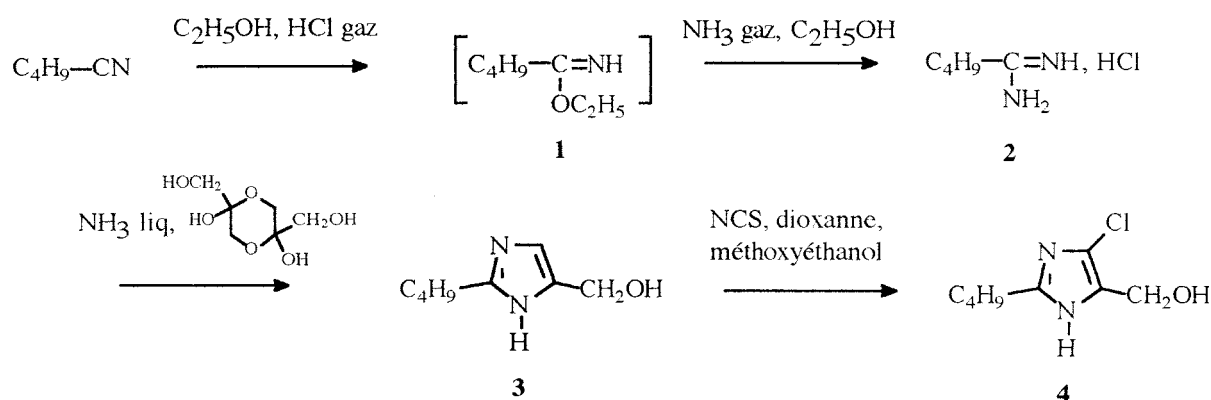


Schéma 1 : Synthèse du DuP 753

4.1.1.1 Synthèse des matières premières

4.1.1.1.1. Préparation du 2-butyl-5(4)-chloro-4(5)-hydroxyméthyl imidazole 4



Une des méthodes les plus simples pour l'obtention de dérivés 4-hydroxyméthylimidazoles substitués en position 2 est celle décrite par Dzurion et Schunack (Dzurion et al., 1974). Elle s'effectue en une seule étape et met en jeu la réaction entre une amidine ou un iminoester adéquat et la dihydroxyacétone dans l'ammoniac liquide. Nous avons donc appliqué cette méthode pour la synthèse du composé **3** : 2-butyl-4-hydroxyméthylimidazole.

Synthèse du composé 2

Le chlorhydrate de valéroamidine **2** est obtenu en deux étapes avec un rendement de 96% (Dox et al., 1941) :

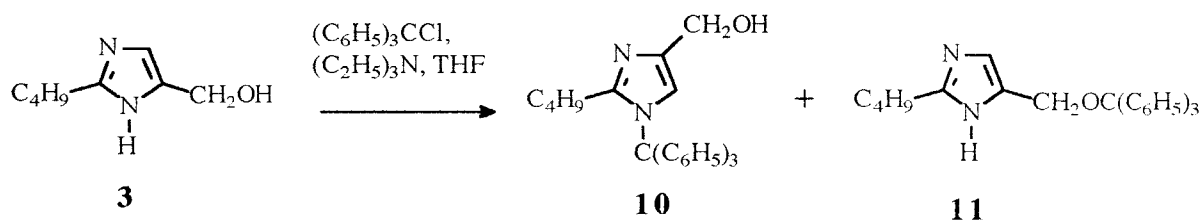
- formation de l'iminoester **1** (non isolé) selon la réaction de Pinner : alcoolyse du valéronitrile dans l'éthanol en présence d'acide chlorhydrique gaz, en milieu anhydre pour éviter la formation de valérate d'éthyle par hydrolyse de la fonction imine
- puis réaction de l'iminoester avec l'ammoniac gaz pour donner l'amidine sous forme chlorhydrate.

Synthèse du composé 3

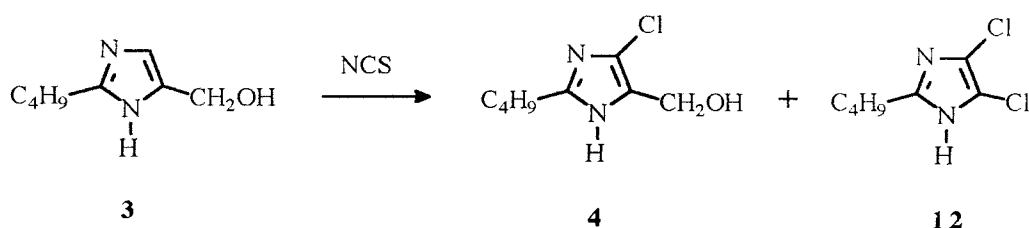
La réaction de l'amidine **2** et de la dihydroxyacétone (commercialisée sous forme du dimère) dans l'ammoniac liquide à 60°C dans un autoclave donne le composé **3** avec un rendement de 57%.

Ce composé **3** constituant un intermédiaire important pour la synthèse de la matière première, nous avons essayé d'optimiser le rendement de cette étape. Nous avons remarqué qu'une partie du composé **3** était perdue au cours du traitement, ce produit présentant une solubilité non négligeable dans l'eau. Pour surmonter ce problème, nous avons essayé de passer par le dérivé tritylé **10**, produit insoluble dans l'eau en milieu basique. Pour réaliser la tritylation, le milieu

réactionnel de la cyclisation est repris dans le tétrahydrofurane (THF) et le chlorure de trityle est ajouté. Nous avons alors observé la formation de deux composés : le dérivé N-tritylé attendu **10** plus le dérivé O-tritylé **11**. Cette méthode a été abandonnée, le rendement en composé **10** n'étant que de 40%.



Synthèse du composé **4**

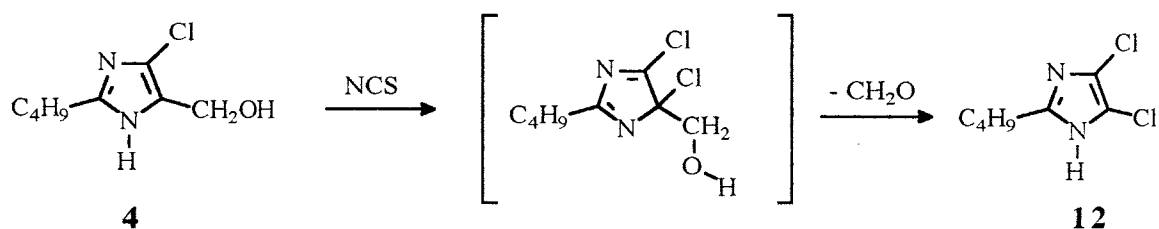


La chloration de l'imidazole **3** s'effectue par le N-chlorosuccinimide (NCS) dans un mélange dioxanne-méthoxyéthanol selon une réaction de substitution électrophile (Furukawa et al., 1982a).

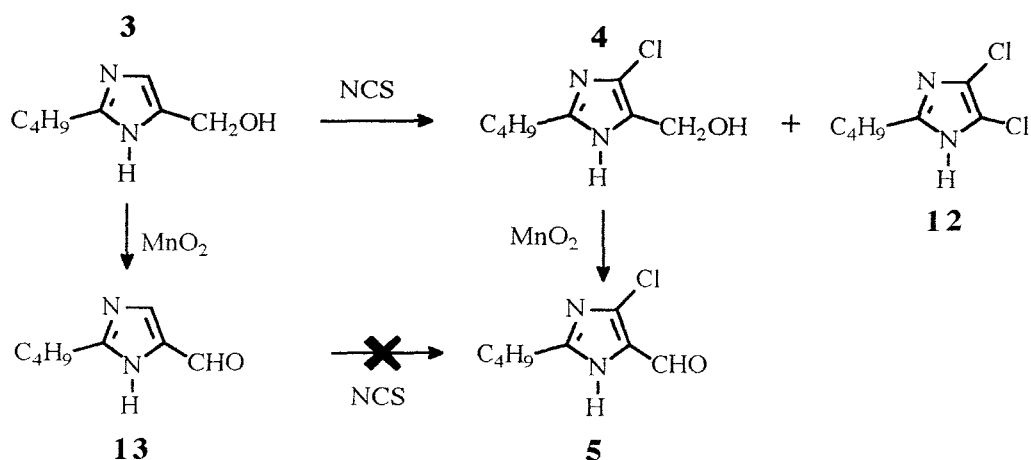
Le dérivé dichloré 2-butyl-4,5-dichloroimidazole **12** a été caractérisé comme produit secondaire de cette réaction. Dans les conditions décrites par Furukawa (addition du NCS sous forme poudre au milieu réactionnel) les dérivés mono et dichloré se forment dans les mêmes proportions, le rendement de la réaction en dérivé monochloré **4** est alors de 44%.

Nous avons remarqué que la formation du dérivé dichloré dépendait des conditions d'addition du NCS. Si celui-ci est dissous dans le mélange dioxanne-méthoxyéthanol et ajouté très lentement, goutte à goutte, au milieu réactionnel, le rendement en composé **4** atteint alors 67%.

Un mécanisme possible pour expliquer la formation du dérivé dichloré est le suivant :



Si cela est le cas, cette réaction secondaire ne peut théoriquement pas avoir lieu avec le dérivé **13**, où une fonction carbonyle remplace l'hydroxyméthyle. Nous avons alors envisagé de réaliser la chloration sur l'aldéhyde **13**, d'autant que le composé **5** est un intermédiaire clé dans la synthèse du DuP 753.

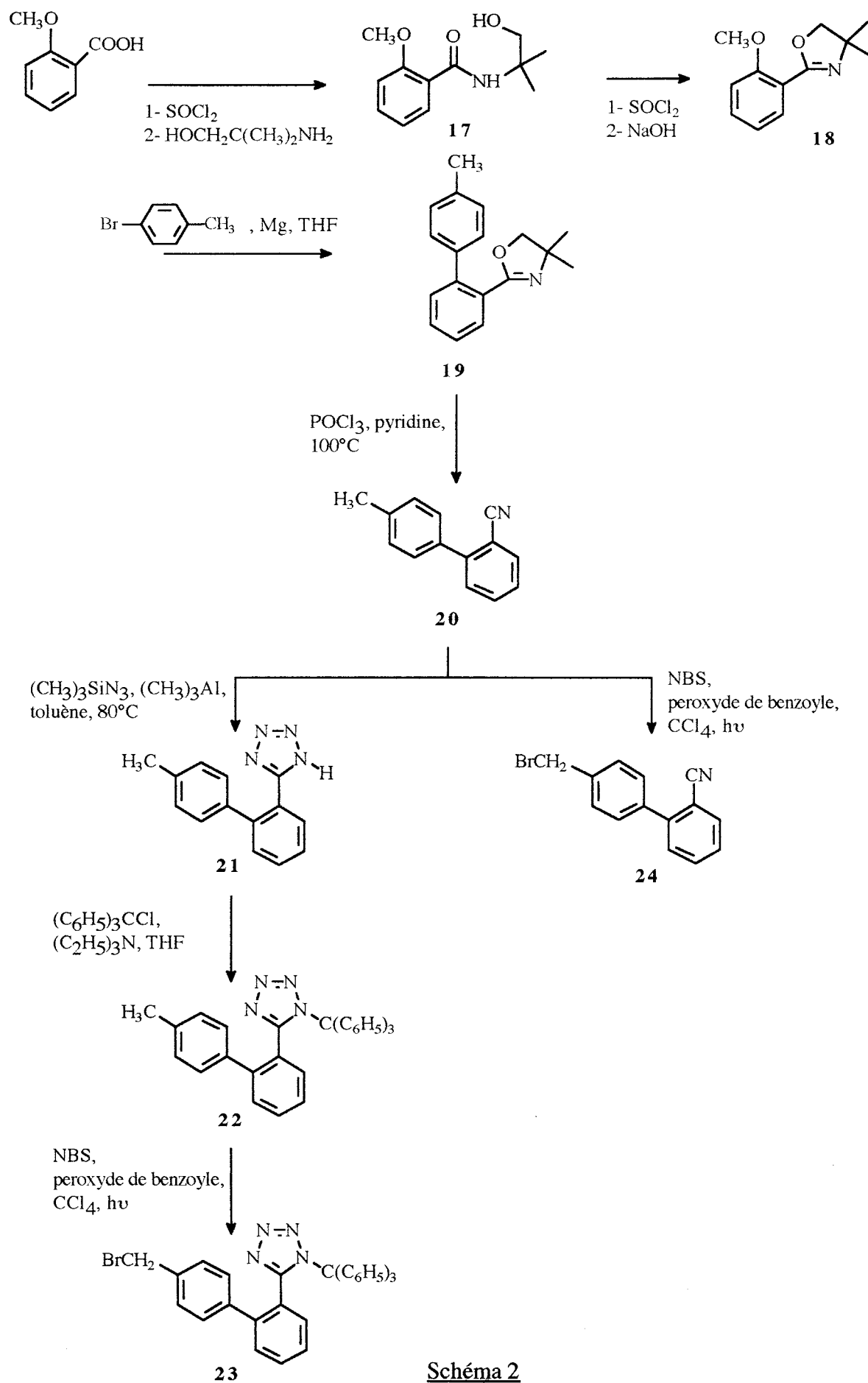


L'oxydation du composé **3** est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment (MnO_2 , CH_2Cl_2) avec un rendement de 90%.

En revanche, les essais de chloration de ce dérivé n'ont pas été satisfaisants. De nombreux produits secondaires se forment et le composé **5** n'a pu être isolé.

4.1.1.1.2. Synthèse des substituants biphényles **23** et **24**

Les dérivés biphényltétrazole **23** et cyanobiphényle **24** que nous avons utilisés dans la synthèse du DuP 753 sont obtenus à partir de l'acide 2-méthoxybenzoïque suivant une synthèse décrite par Carini (Carini et al., 1991).



Synthèse du composé 18 à partir de l'acide 2-méthoxybenzoïque

La formation du cycle oxazoline s'effectue en deux étapes :

- synthèse du composé **17** par réaction du chlorure de 2-méthoxybenzoyle, obtenu par action du chlorure de thionyle sur l'acide 2-méthoxybenzoïque, avec le 2-amino-2-méthylpropan-2-ol
- cyclisation en oxazolinone par déshydratation du composé **17** en présence de chlorure de thionyle.

Le composé **18** est obtenu avec un rendement de 73%.

Le cycle oxazoline est formé comme protection de la fonction acide carboxylique de l'acide 2-méthoxybenzoïque en vue de la réaction de Grignard à venir, réalisée pour obtenir la structure biphényle. La formation de l'oxazoline est particulièrement intéressante car ce cycle peut être transformée en nitrile, voie que nous avons exploitée, mais aussi en acide carboxylique par hydrolyse en milieu acide, en alcool en présence d'hydrure d'aluminium lithium (AlLiH_4) ou en aldéhyde par hydrolyse acide d'une oxazolidine obtenue à partir de l'oxazoline (Carini et al., 1991).

Synthèse du composé 19

Le composé **19** est obtenu par condensation du composé **18** sur le bromure de 4-tolylmagnésium. Le rendement de cette réaction est de 90%.

Synthèse du composé 20

L'oxazoline est transformée en nitrile par l'oxychlorure de phosphore (POCl_3) dans la pyridine à 100°C avec un rendement de 75%.

Synthèse du composé 21

Pour éviter l'utilisation du triméthylazide stanneux toxique, nous avons choisi de former le cycle tétrazole par réaction du nitrile avec le triméthylsilylazide (TMSiN_3) et le triméthylaluminium ($\text{Al}(\text{CH}_3)_3$) dans le toluène à 80°C pendant cinq jours (Huff et al., 1993). Le dérivé **21** est obtenu avec un rendement de 90%.

Synthèse du composé 22

Le groupe tétrazole du composé **21** est tritylé par réaction avec le chlorure de triphénylméthane dans le THF en présence de triéthylamine avec un rendement de 90%.

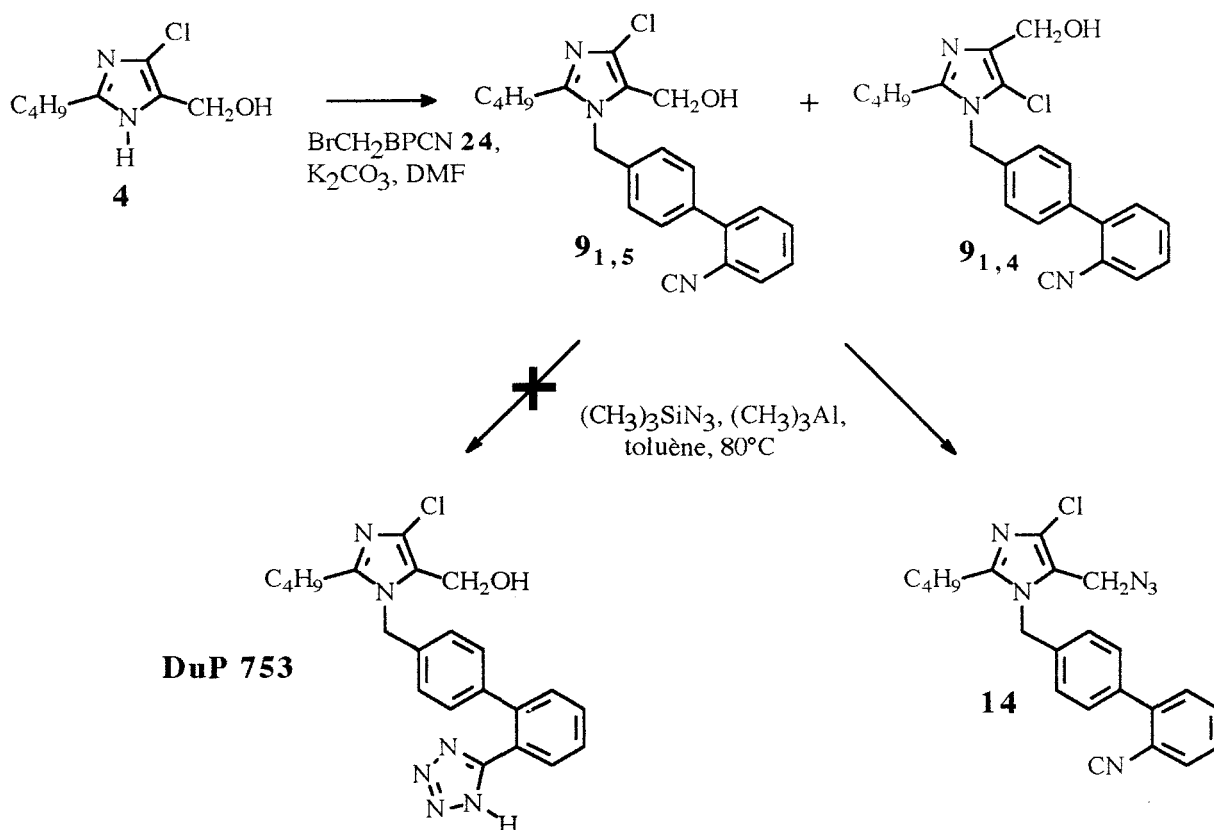
Synthèse des composés 23 et 24

Les dérivés bromométhyles **23** et **24** sont obtenus par bromation radicalaire des dérivés méthyliques correspondants par le N-bromosuccinimide (NBS) en présence de peroxyde de benzoyle, initiateur de la réaction radicalaire.

4.1.1.2. Synthèse du composé **8** ou DuP 753

Trois voies d'accès au composé **8** à partir du dérivé **4** ont été explorées (cf schéma 1). La première voie permettait en théorie d'obtenir le composé final en deux étapes à partir du composé **4**. Les deux suivantes comprennent un plus grand nombre d'étapes et passent par le même intermédiaire **7_{1,5}**.

Voie n°1



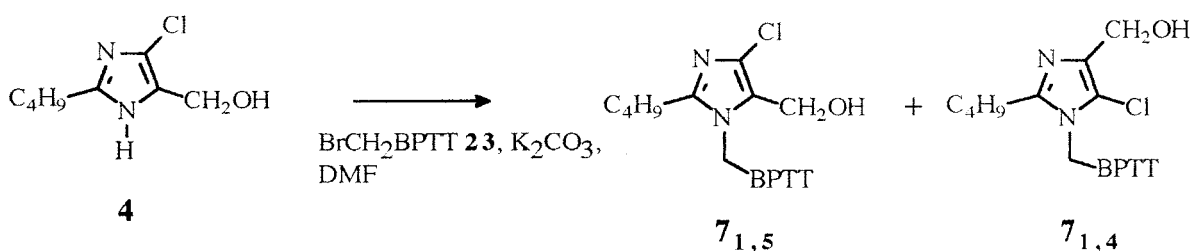
Synthèse du composé **9_{1,5}**

L'alkylation du composé **4** en milieu basique (K₂CO₃) dans le diméthylformamide (DMF) par le 4'-(bromométhyl)-2-cyanobiphényle **24** donne le mélange des deux isomères de position **9_{1,5}** et **9_{1,4}**, séparés par chromatographie sur colonne de silice à pression ordinaire. Chacun des isomères est obtenu avec un rendement de 20%.

Synthèse du composé 14

Pour éviter l'utilisation du triméthylazide stanneux toxique (réactif employé par Carini), nous avons essayé d'obtenir le cycle tétrazole par la méthode utilisée pour la synthèse du dérivé biphenyltétrazole **23** : TMSiN_3 , $(\text{CH}_3)_3\text{Al}$, toluène (Huff et al., 1993). Dans ces conditions, seul l'azide **14** a été isolé, avec un rendement de 70%.

Voie n°2

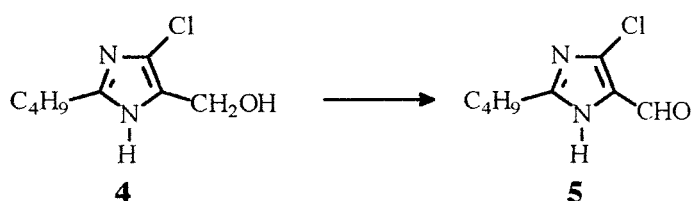


Synthèse du composé 7_{1,5}

Pour surmonter le problème rencontré précédemment, nous avons alkylé le composé **4** avec le dérivé bromé **23** qui possède le groupe tétrazole déjà formé et protégé par un trityle. Les conditions d'alkylation sont les mêmes que précédemment (K_2CO_3 , DMF). Les deux isomères **7_{1,5}** et **7_{1,4}** sont séparés par chromatographie. Ils sont obtenus en mêmes proportions avec un rendement de 20% pour chacun d'eux.

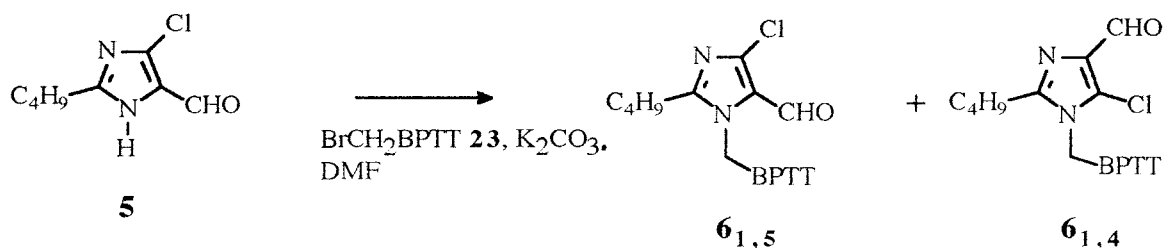
Voie n°3

Synthèse du composé 5



L'oxydation de l'alcool **4** par le dioxyde de manganèse activé, agent d'oxydation qui permet de s'arrêter au stade de l'aldéhyde, dans le dichlorométhane à reflux, donne le composé **5** avec un rendement de 93%.

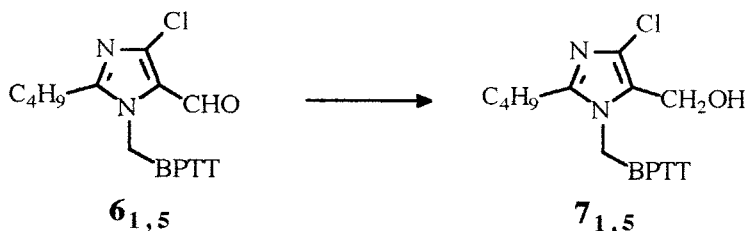
Synthèse du composé 6_{1,5}



Comme précédemment, l'alkylation est réalisée dans le DMF en présence de K_2CO_3 . Le passage par l'aldéhyde **5** permet d'orienter sélectivement la N-substitution du noyau imidazole. En effet l'alkylation donne majoritairement le dérivé N-alkyl-2-butyl-4-chloroimidazole 5-carboxaldéhyde (**6_{1,5}** / **6_{1,4}** = 90 / 10). L'isomère 1,5 est obtenu par recristallisations fractionnées dans l'éther éthylique avec un rendement de 56%.

Cet effet sur l'orientation de la substitution serait dû à la stabilisation de l'anion imidazolique formé par un effet inducteur de l'atome de chlore et par l'augmentation de l'acidité de l'imidazole par la fonction carbonyle. L'effet inducteur de l'halogène semble l'emporter sur l'effet stérique, la régiosélectivité étant plus grande avec un atome de chlore qu'avec un iode (Pierce et al., 1993).

Synthèse du composé 7_{1,5}



La fonction aldéhyde est réduite en alcool par $NaBH_4$ dans le méthanol avec un rendement de 84%.

Synthèse du composé 8 (Voies n°2 et n°3)

Deux méthodes de détritulation du tétrazole par hydrolyse acide (CH_3COOH 0,5N ou HCl 3N, THF) ont été utilisées. Elles donnent des rendements comparables de 85%.

Entre les voies n°2 et n°3 qui permettent d'obtenir le DuP 753, la voie n°3 s'avère être la meilleure. Le rendement global à partir du composé **4** est de 37%. Pour la voie n°2, il n'est que de 17%.

Détermination de la structure du composé 8

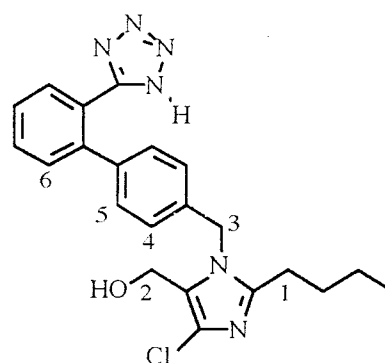
La structure du composé **8** a été confirmée par une étude RMN (expérience NOESY). Le spectre 2D montre des interactions dipolaires entre les protons :

H₁ et H₃

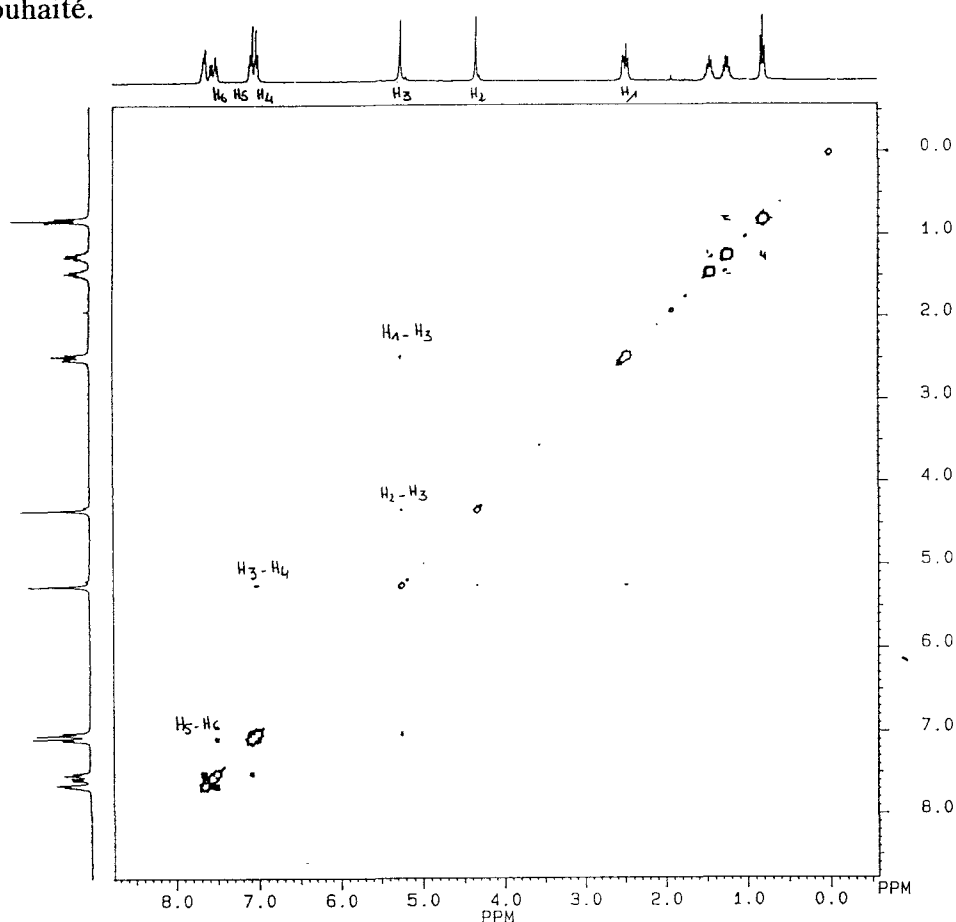
H₂ et H₃

H₃ et H₄

H₅ et H₆

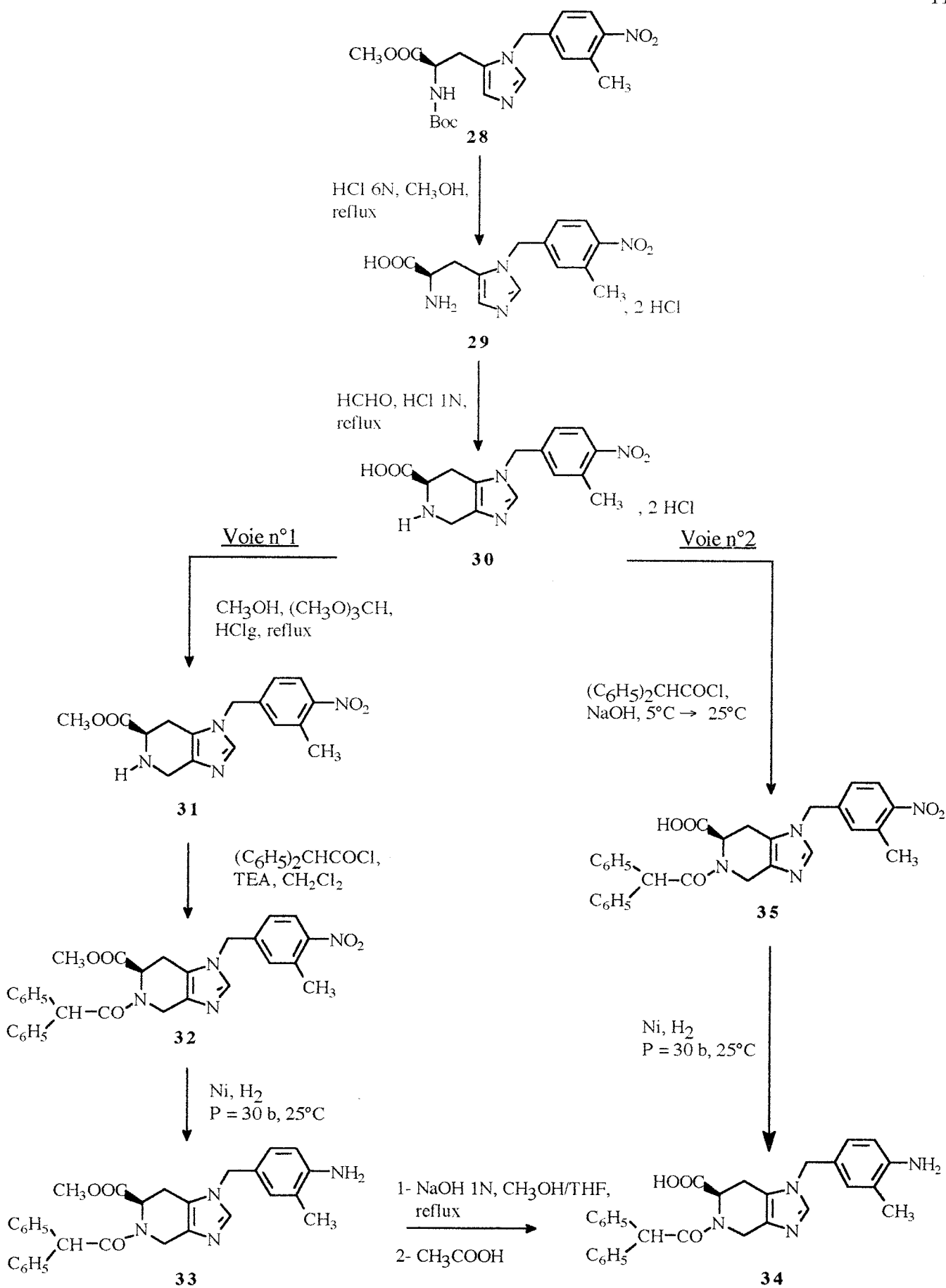


La présence d'une interaction dipolaire entre les protons H₂ et H₃ prouvent qu'il s'agit bien de l'isomère souhaité.



Spectre NOESY du composé **8** ou DuP 753

Nous allons à présent nous intéresser à la synthèse de la seconde molécule de référence : le PD 123177, ligand sélectif AT₂. Cette synthèse a été décrite par Blankley (Blankley et al., 1991) et la synthèse des dérivés spinacines, squelette de base du PD 123177 a été exposée plus précisément dans une publication de Klutchko (Klutchko et al., 1991)



Cette synthèse se décompose en trois parties :

- synthèse de la matière première, le composé **28** à partir de l'ester méthylique de la L-histidine (cf schéma 4)
- cyclisation en spinacine avec la synthèse du composé **30** (cf schéma 3)
- synthèse du composé final **34** à partir du composé **30** par deux voies différentes (cf schéma 3)

4.1.2.1. Synthèse du composé **28**

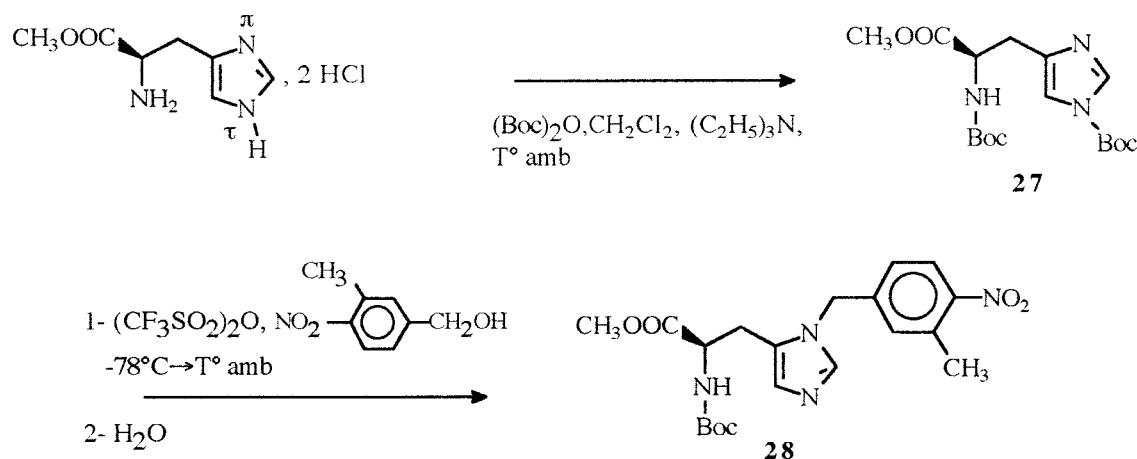


Schéma 4

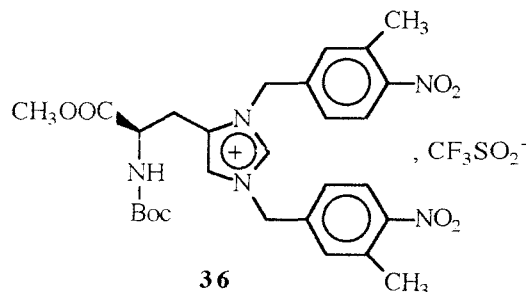
Pour réaliser l'alkylation du noyau imidazolique de l'ester méthylique de L-histidine, deux difficultés apparaissent : la nécessité de protéger l'amine et la régiosélectivité de l'alkylation sur l'azote imidazolique π .

Plusieurs méthodes pour réaliser une alkylation régiospécifique de dérivés de l'histidine et de l'imidazole sont rapportées dans la littérature (Hodges, 1987; Jones et al., 1987). Parmi ces méthodes, la synthèse de l'ester de N(α), N(τ)-bis-tertiobutoxycarbonyl-histidine **27** est particulièrement intéressante car elle permet à la fois de :

- protéger l'amine primaire sous forme de carbamate
- d'orienter l'alkylation du noyau imidazolique sur l'azote π , l'azote τ étant protégé par le groupe tertibutoxycarbonyl (Boc).

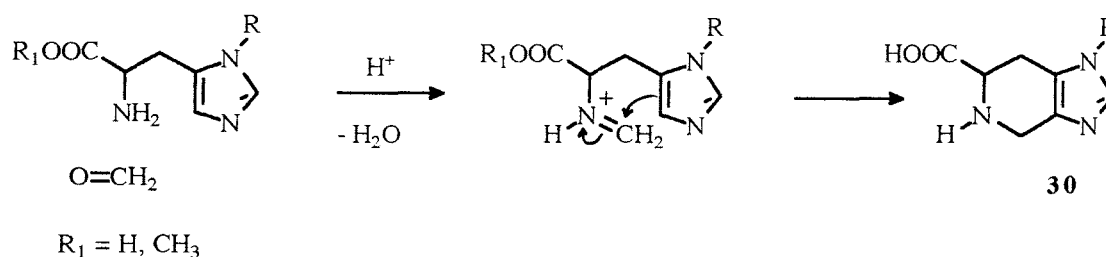
L'alkylation du noyau imidazole se fait difficilement dans des conditions traditionnelles (base, dérivé halogéné, acétone ou DMF...) (Hodges, 1987). En effet la fixation du groupe Boc diminue considérablement la basicité de l'atome d'azote π qui est alors peu réactif. Pour remédier à ce problème, un dérivé triflate, beaucoup plus réactif que le dérivé halogéné correspondant, est utilisé. Ce dernier est formé in situ par condensation du dérivé alcoolique et de l'anhydride triflique à basse température (-78°C). Le composé **27** est ensuite ajouté petit à petit au milieu réactionnel.

Cette alkylation constitue l'étape limitante dans la synthèse du PD 123177 car elle procède avec un rendement moyen de 41%. Les essais d'optimisation ont montré qu'un faible excès (1,1 eq) de dérivé triflate par rapport au composé **27** est préférable. Une augmentation de ce ratio entraîne la formation en plus grande quantité d'un produit secondaire de disubstitution **36**, au dépend du composé voulu **28**.



4.1.2.2. Synthèse du composé **30** (cf schéma 3)

L'étape clé est la cyclisation en spinacine. Celle-ci est réalisée selon la méthode de Pictet-Spengler par réaction entre la fonction amine de l'histidine et le formaldéhyde en milieu acide (HCl 1N). Cette réaction passe par la formation intermédiaire d'un ion immonium qui par condensation avec la position 4 du noyau imidazolique donne le produit cyclisé **30**.



Dans un premier temps, nous avons envisagé un schéma de synthèse différent de celui décrit par Blankley. L'ester **31** étant un intermédiaire pour la synthèse du PD 123177 (cf schéma 3), nous avons tenté de conserver la fonction ester du composé **28**, pour gagner une étape (cf schéma 5).

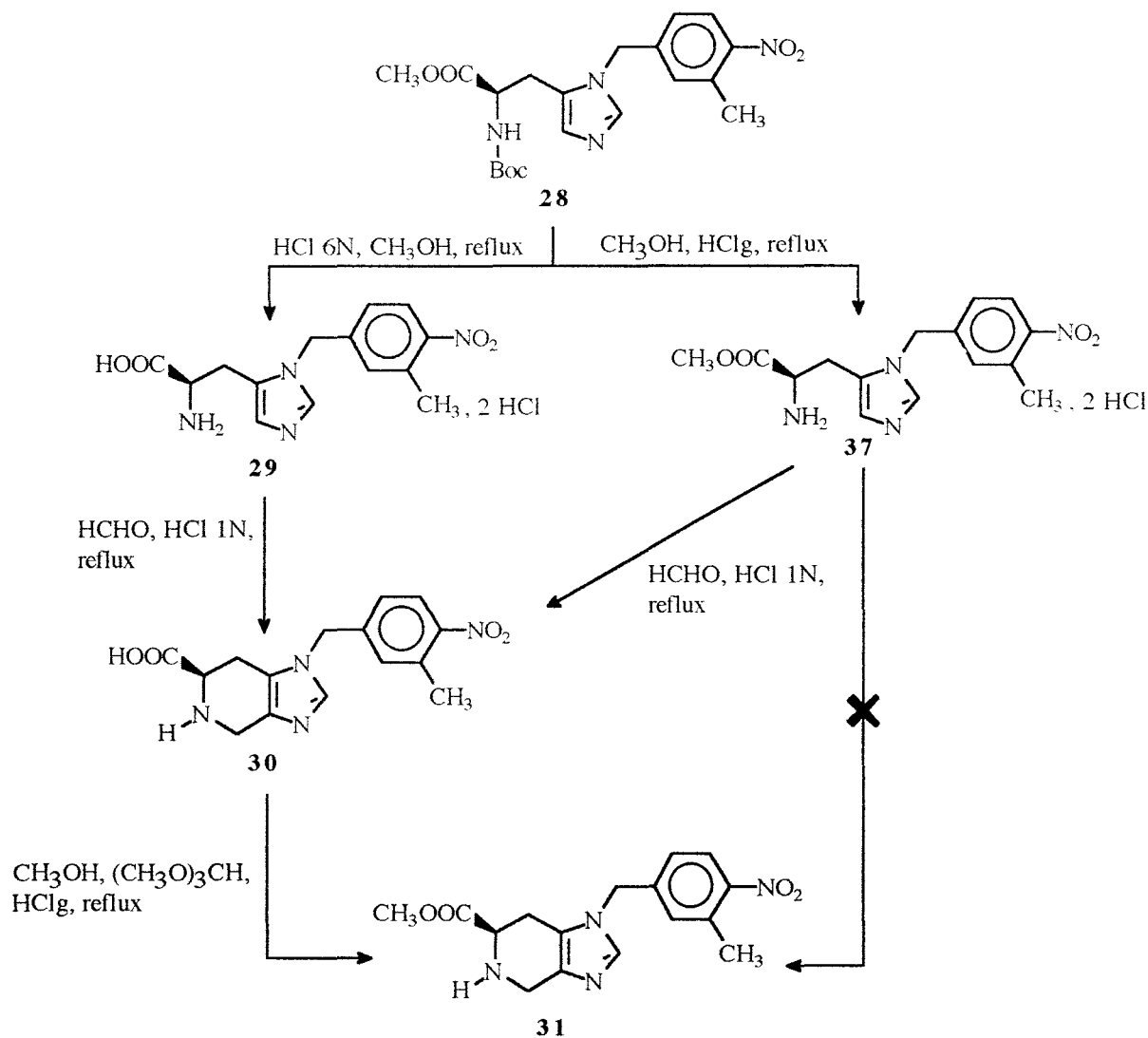


Schéma 5

Nous avons alors déprotégé sélectivement l'amine du composé **28** en milieu acide anhydre (HCl gaz, méthanol). Le composé **37** est obtenu avec un rendement de 77%.

Cependant, au cours de la cyclisation en spinacine, l'hydrolyse de la fonction ester n'a pu être évitée et le composé **30** est obtenu avec un rendement de 90%.

L'autre voie commence par l'hydrolyse en milieu acide du composé **28** qui donne l'acide **29** avec un rendement de 92%.

La cyclisation en spinacine procède avec un rendement de 82%, légèrement inférieur à celui obtenu à partir de l'ester **37**.

L'ester **31** est obtenu par estérification en milieu alcoolique acide du dérivé **30** avec un rendement de 91%.

4.1.2.3. Synthèse du composé final PD 123177 ou 34

A ce niveau, deux voies ont été utilisées pour arriver au composé final : PD 123177 à partir du composé **30** (cf schéma 3).

Voie n°1

Cette synthèse est calquée sur celle décrite par Blankley (Blankley et al., 1991). L'unique modification apportée se situe au niveau de l'acylation du composé **31**. Nous avons utilisé le chlorure de l'acide diphénylacétique à la place de la méthode de couplage entre l'acide et le composé **31** en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC); la dicyclohexylurée (DCU) formée au cours de cette réaction étant difficilement éliminable.

1- L'estérification du composé **30** est réalisée dans le méthanol, par barbotage de HCl gazeux avec un rendement de 91%.

2- L'acylation du composé **31** est effectuée par le chlorure d'acide dans le CH₂Cl₂ en présence de triéthylamine avec un rendement de 88%.

Remarque : par la méthode d'amidification en présence de DCC, le rendement est décrit égal à 79%.

3- La fonction nitrée du composé **32** est transformée en amine par hydrogénation catalytique en présence de nickel de Raney. Le rendement de cette réaction est de 81%.

4- Enfin, la molécule finale : PD 123177 est obtenue par saponification du composé **33** avec un rendement de 70%. Le composé final **34** est purifié par cristallisation fractionnée dans l'isopropanol et non par chromatographie préparative comme décrit dans la publication.

Voie n°2

1- L'acylation de l'amine est effectuée directement sur le composé **30** sans estérification préalable, à l'aide du chlorure d'acide en milieu basique (NaOH) dans le dioxane. Le rendement de cette réaction est de 71%.

2- La fonction nitrée du composé **35** est réduite par hydrogénation catalytique pour obtenir le dérivé final **34** avec un rendement de 80%.

A partir de la matière première commune **30** aux deux voies, un rendement global de 57% est obtenu avec la voie n°2. Avec la voie n°1, le rendement est légèrement inférieur et égal à 45%.

4.1.2.4. Stéréospécificité de la synthèse

La caractéristique principale de cette synthèse est sa stéréospécificité. Elle permet en théorie à partir de l'ester de L-histidine d'obtenir l'énantiomère S.

Nous avons pu constater par la mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D$) de certains intermédiaires, composés **30**, **31**, **32** et du produit final **34** que ces produits sont optiquement actifs.

Composés	$[\alpha]_D$
30	-52,47 °
31	-35,16 °
32	+15,77 °
34	+25,5°

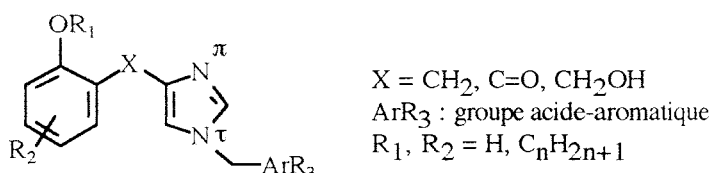
Cependant lors de la saponification de l'ester **33**, les risques de racémisation sont importants. Dans un cas, nous avons constaté une racémisation partielle, le mélange a été purifié par cristallisation fractionnée dans l'isopropanol. L'insoluble présente un pouvoir rotatoire de +25,5°. Le précipité recueilli après refroidissement du filtrat isopropanolique présente un $[\alpha]_D = 0^\circ$.

Dans un second cas, une racémisation presque totale a été observée. Après recristallisation, le produit obtenu présente un pouvoir rotatoire proche de zéro, $[\alpha]_D = +0,987$.

D'où l'avantage principal de la voie n°2, qui compte deux étapes de moins que l'autre, mais surtout qui évite la formation d'un ester, donc l'étape de saponification et le risque de racémisation.

4.2. SYNTHÈSE DES MOLECULES ORIGINALES INSPIREES DE LA CONFORMATION "SCORPION" DE L'ANG II

Les molécules issues de la conception à partir de la conformation "scorpion" de l'Ang II se composent d'un imidazole N-substitué par un ensemble aromatique-acide (ArR_3) et d'un noyau phénolique relié à l'imidazole par un lien soit méthylénique, soit cétonique, soit hydroxyméthylé.



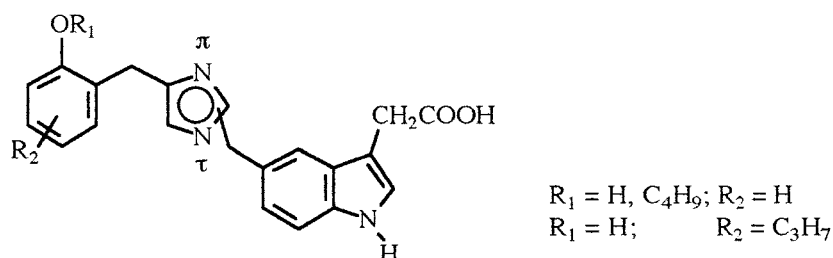
Nous allons nous intéresser tout d'abord à la synthèse des dérivés méthyléniques.

4.2.1. Synthèse des 4-(2-alkoxybenzyl)-1-benzyl imidazoles

Dans un premier temps, nous avons choisi de réaliser l'alkylation directe du noyau imidazolique, réaction qui conduit à la formation des deux isomères de position τ et π . Il nous apparaissait intéressant, pour vérifier nos hypothèses de travail, d'évaluer ces deux isomères, le τ devant posséder en théorie une affinité supérieure. Puis si l'un des deux isomères se révélait plus affin, nous élaborerions alors une synthèse régiosélective de cet isomère.

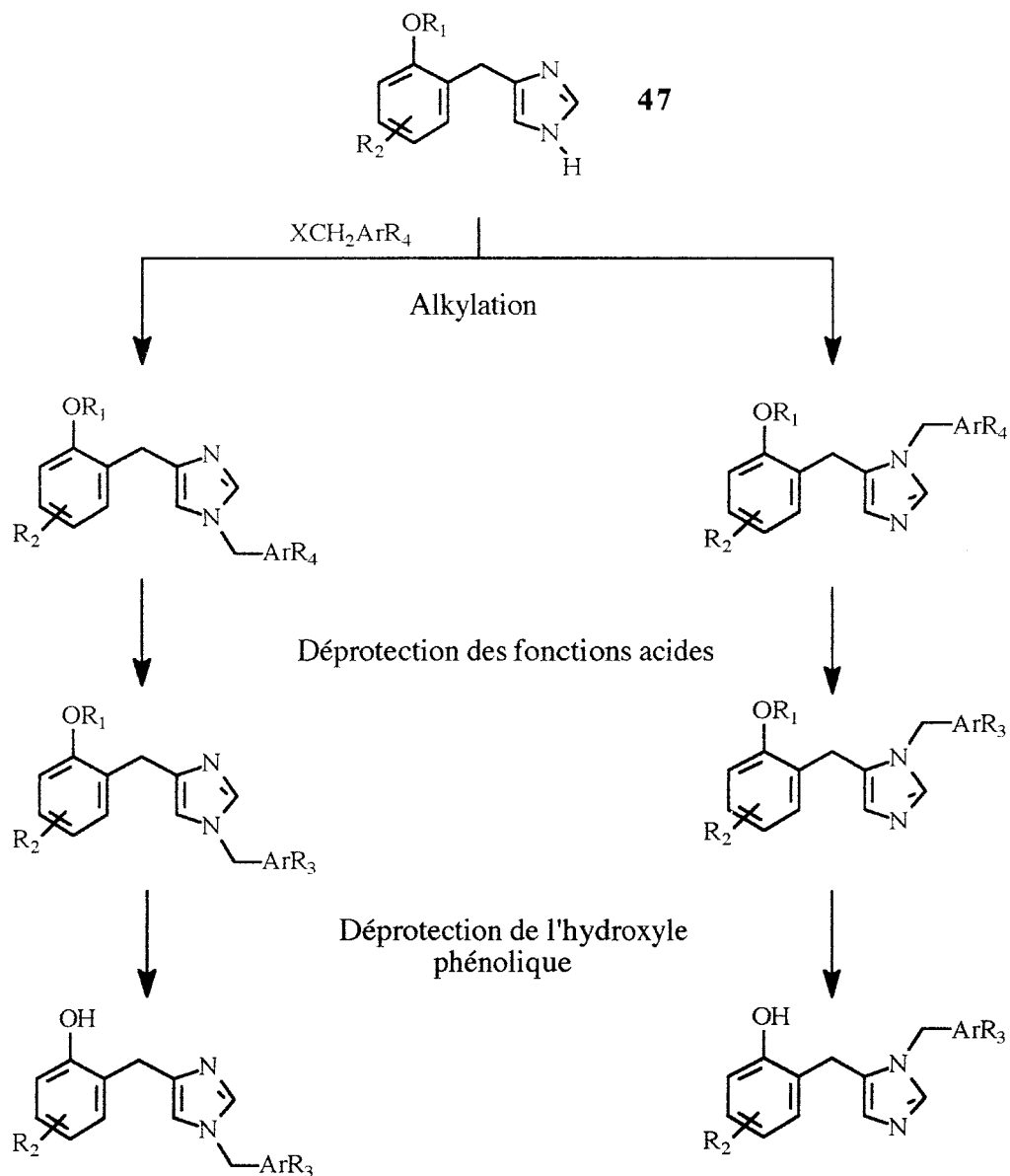
Le schéma de synthèse proposé (schéma 6) passe par l'obtention des synthons 4-(2-alkoxybenzyl) imidazoles **47**, intermédiaires clés, qui sont ensuite substitués sur l'azote par les divers groupes aromatique-acide (ArR_3) envisagés.

Nous nous sommes intéressée pour commencer à la synthèse des dérivés substitués par une structure indolique, qui présente une certaine originalité par rapport au biphenyltétrazole.



Cette synthèse se compose de trois parties :

- 1- synthèse des intermédiaires clés 4-(2-alkoxybenzyl) imidazoles **47**,
- 2- synthèse du substituant indolique : 3-cyanométhyl-5-bromométhylindole (XCH_2ArR_4)
- 3- alkylation des synthons 4-(2-alkoxybenzyl) imidazoles **47**



ArR₄ : groupement aromatique-acide ArR₃ dont le groupe acide R₃ est protégé (esters, 1-triphénylméthyltétrazole)

X = Cl, Br

Schéma 6 : Synthèse non régiosélective des dérivés 4-(2-alkoxybenzyl) imidazoles N-alkylés

4.2.1.1. Synthèse des 4-(2-alkoxybenzyl)imidazoles 47

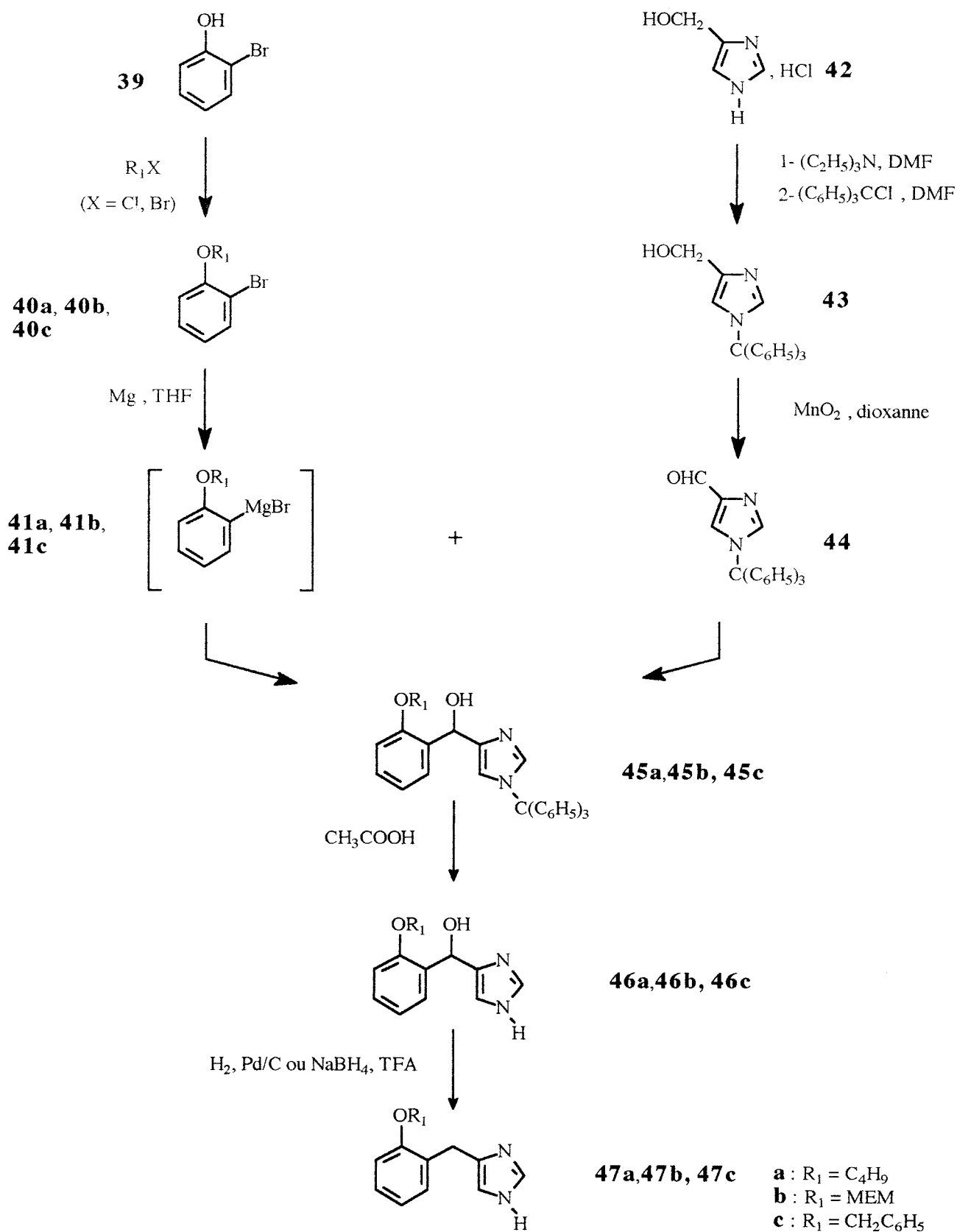


Schéma 7

MEM : $CH_3OCH_2CH_2OCH_2$

Les composés **45**, précurseurs des composés **47**, sont obtenus par condensation de l'organomagnésien des orthobromophénols **40** et de l'aldéhyde **44**. Pour réaliser cette réaction de Grignard, la fonction hydroxyle des orthobromophénols **40** et l'azote N₁ imidazolique (H mobiles) doivent être protégés.

Synthèse des composés 40

Protection des orthobromophénols 39

Trois substituants différents ont été fixés sur l'hydroxyle phénolique du composé **39**. Suivant nos hypothèses de travail, nous avons envisagé de fixer une chaîne carbonée dans cette position, pour cela le dérivé 2-butoxybromophényle **40a** a été synthétisé. Des dérivés avec l'hydroxyle libre ont également été envisagés. Nous avons alors alkylé l'orthobromophénol par deux groupes labiles : un benzyle **40c** et un méthoxyéthoxyméthyle ou MEM **40b**.

Les éthers phénoliques sont obtenus dans tous les cas par attaque électrophile du phénate par l'halogénure d'alkyle. Deux modes opératoires ont été utilisés :

- R₁ = C₄H₉, C₆H₅CH₂ :
 - obtention du phénate grâce à l'éthylate de sodium
 - substitution par l'halogénure d'alkyle dans le DMF
- R₁ = MEM (Corey et al., 1976) :
 - obtention du phénate par action de l'hydrure de sodium en suspension dans le THF
 - éthérisation par MEMCl

Synthèse du composé 43

Nous avons choisi comme protection de l'azote imidazolique du composé **42** le groupe triphénylméthyle (ou trityle) pour deux raisons essentielles :

- bons rendements de la protection et de la déprotection dans des conditions douces,
- régiosélectivité de la protection de l'azote N₁. Cela n'est pas le cas lorsque la protection est réalisée avec un groupe benzyle : un mélange de 4- et 5-hydroxyméthyl imidazoles N-protégés est obtenu (Kelley et al., 1977). L'azote peut être également protégé par acylation par un groupe acétyle ou tertibutoxycarbonyle (Boc), mais ces protections sont moins régiosélectives (Jones et al., 1987).

Synthèse du composé 44

L'oxydation de la fonction hydroxyméthyle du composé **43** est réalisée par le dioxyde de manganèse (MnO₂) activé, agent oxydant surtout employé avec les alcools allyliques et benzyliques et qui permet de s'arrêter au stade de l'aldéhyde (Papadopoulos et al., 1966). Cette réaction peut être réalisée indifféremment dans le dioxanne ou dans le dichlorométhane à reflux.

Synthèse des composés 45

Les (2-alkoxyphényl)-[(1-triphénylméthyl)imidazol-4-yl] méthanols sont obtenus par réaction de Grignard entre le 4-formyl-1-triphénylméthyl imidazole **44** et l'organomagnésien des orthobromophénols O-alkylés **41** (Geerts et al., 1992).

Le THF a été choisi comme solvant car l'aldéhyde **44** n'est pas soluble dans l'éther éthylique. Dans un premier temps, nous avons travaillé dans des conditions stoechiométriques. Deux produits secondaires se forment alors à côté de l'alcool souhaité **45**. Ils ont été isolés et caractérisés dans la série des dérivés protégés par un benzyle. Il s'agit de la cétone **49** et de l'alcool **43** (cf schéma 8). Le rendement en alcool **45c** est alors de 46%

La formation simultanée d'une cétone et d'un alcool est le résultat d'une réaction de dismutation. Le mécanisme proposé fait intervenir une deuxième molécule d'aldéhyde **44** qui réagit avec l'alcoolate **48** formé intermédiairement au cours de la synthèse magnésienne (Geerts, 1992).

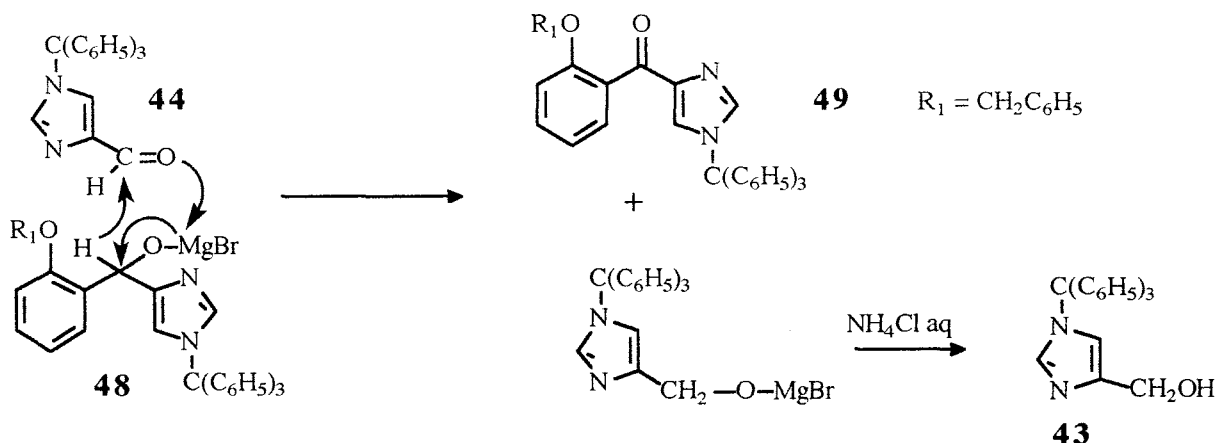
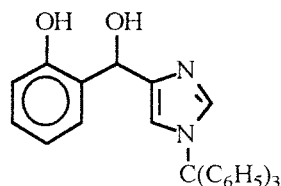


Schéma 8

Pour résoudre le problème, nous avons utilisé 2 eq de dérivé bromé **40** et de magnésium pour 1 eq d'aldéhyde **44**, ajouté lentement, dissous dans le THF au réactif de Grignard. Ainsi les risques d'avoir en présence une molécule d'aldéhyde **44** et d'alcoolate **48** sont faibles, l'aldéhyde étant consommé immédiatement par l'organomagnésien en excès. Les rendements obtenus dans ces conditions sont compris entre 60% et 74% suivant la nature du substituant R₁.

Pour éviter la détritulation en milieu acide, la décomposition de l'alcoolate **48** est effectuée par addition d'une solution saturée de NH₄Cl et non pas par une solution d'acide chlorhydrique.

Remarque : Le rendement de 60% est obtenu dans le cas où l'hydroxyle phénolique est protégé par le MEM. On observe dans les conditions précédentes (2 eq de **40b** et de Mg, 1 eq de **44**) la formation du dérivé **50** avec un rendement de l'ordre de 25%, réaction secondaire résultant du clivage du groupe protecteur MEM. Le MEM est sensible aux acides de Lewis (cf page 145). On peut émettre l'hypothèse que le dihydroxyde de magnésium (Mg(OH)₂) formé après hydrolyse du magnésien peut jouer ce rôle.

**50**

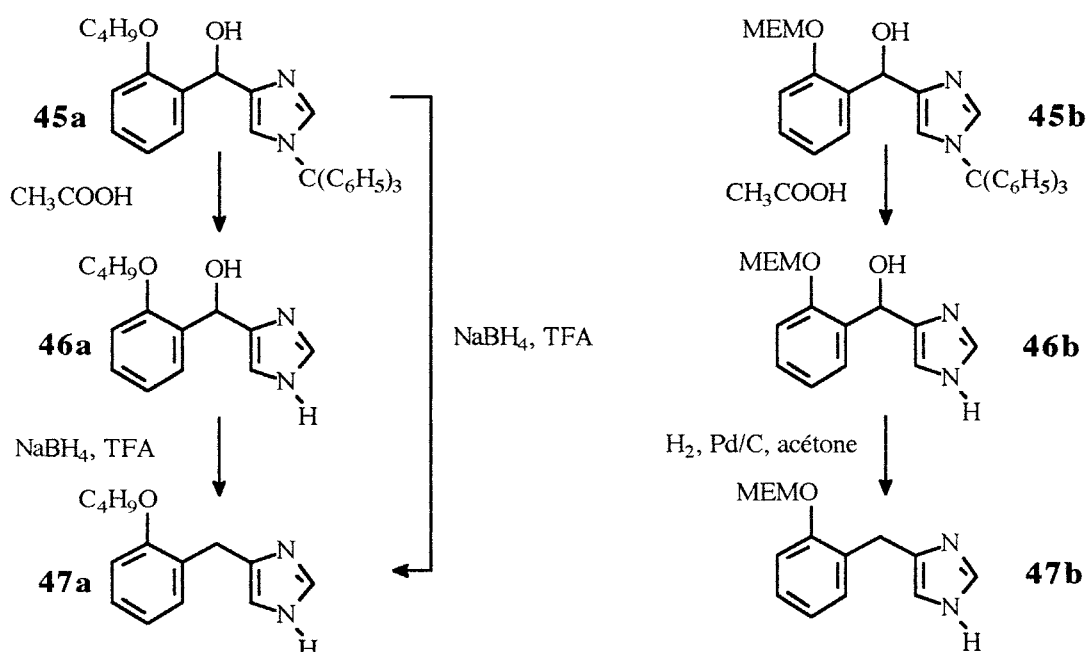
Synthèse des composés **46** et **47**

Cas des dérivés O-butylés **45a** et méthoxyéthoxyméthoxyéther **45b**

Dans un premier temps, nous avons choisi de procéder en deux étapes : 1- détritulation, 2- réduction, pour ne pas être gêné par la formation de triphénylméthanol ou de triphénylméthane au cours de la mise au point de la réduction. Le groupe trityle est hydrolysé en milieu acide (CH₃COOH, 0,5N) à chaud (Matsui et al.; 1992). La détritulation par hydrogénation catalytique est également possible.

Dans un deuxième temps pour les dérivés O-butylés, la détritulation est effectuée en même temps que la réduction (milieu acide).

Réduction de l'hydroxyméthyle des composés **45** ou **46**



Deux méthodes de réduction ont été utilisées :

- hydrogénation catalytique : Pd / C 10%, H₂ (Hudlicky et al., 1977)
- NaBH₄ dans l'acide trifluoroacétique (TFA) (Gribble et al., 1977).

R ₁	H ₂ , Pd / C	NaBH ₄ , TFA
C ₄ H ₉	réduction difficile et non totale	réduction, Rdt = 80%
MEM	réduction, Rdt = 60%	x
CH ₂ C ₆ H ₅	réduction + déprotection	NT

x : méthode non testée car MEM labile dans ces conditions (Corey et al., 1978; Quick et al., 1978)

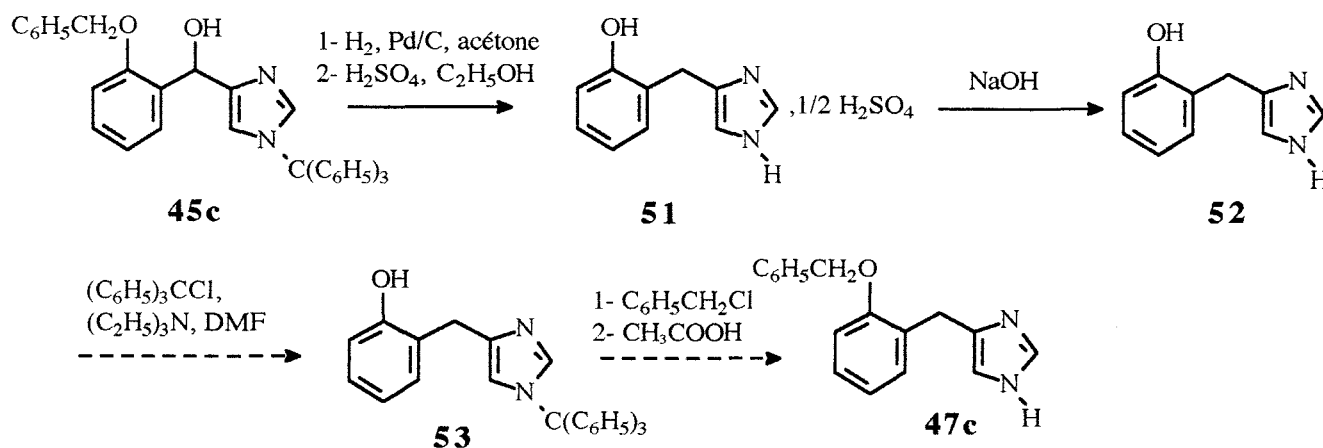
NT : non testée

Pour le dérivé **46a**, plusieurs conditions d'hydrogénation catalytique ont été testées :

- catalyseurs : Ni de Raney, Pd/C
- solvants : acétone, éthanol, acide acétique glacial
- P_{H2} : pression atmosphérique, 10 bars, 20 bars.

Mais aucune n'a permis d'obtenir le composé **47a** avec un rendement supérieur à 20%. En revanche, la réduction par NaBH₄ dans le TFA donne un bon rendement de 80%.

Cas du dérivé O-benzylé **45c**



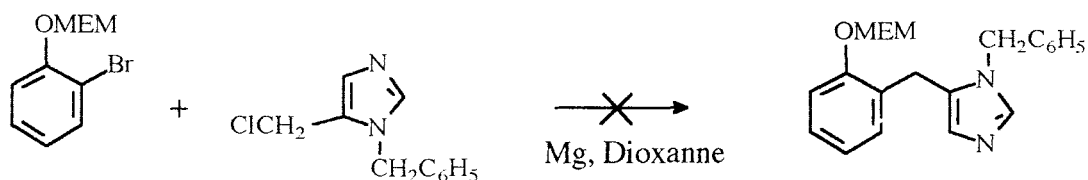
La réduction par hydrogénation catalytique du composé **45c** s'accompagne de la débenzylation de l'hydroxyle phénolique et de la détrytilation de l'imidazole. La purification du produit réduit **52** est délicate. Elle nécessite la formation intermédiaire d'un sel d'hémisulfate **51** (Geerts, 1992). Le rendement maximum obtenu pour passer du composé **45c** au composé **52** est de 35%.

Nous avons alors préféré nous orienter vers une protection qui résiste aux conditions réactionnelles de la réduction : le MEM. Il est stable en milieu basique et acide faibles, vis-à-vis de la plupart des agents réducteurs, oxydants, des réactifs organométalliques (Corey et al.,

1976). Il est clivable en milieu aprotique par des acides de Lewis doux (ZnBr_2 , TiCl_4) (Corey et al., 1976) ou en milieu acide fort (acide trifluoroacétique ou TFA, HCl 2N) (Corey et al., 1978; Quick et al., 1978).

Autres voies de synthèses envisagées

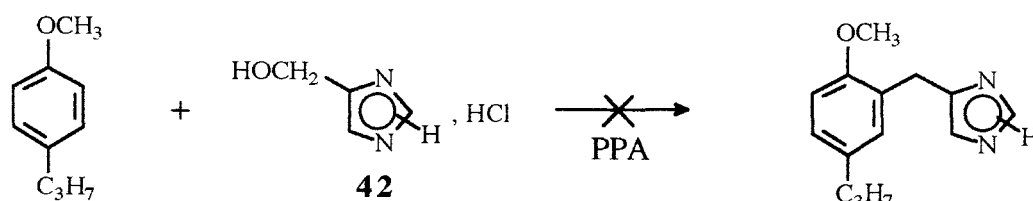
1- Réaction de Wurtz



Cette réaction est particulièrement intéressante car elle permet d'éviter l'étape de réduction. Nous l'avons essayée avec l'orthobromophénol protégé par un MEM et le 1-benzyl-5-chlorométhyl imidazole.

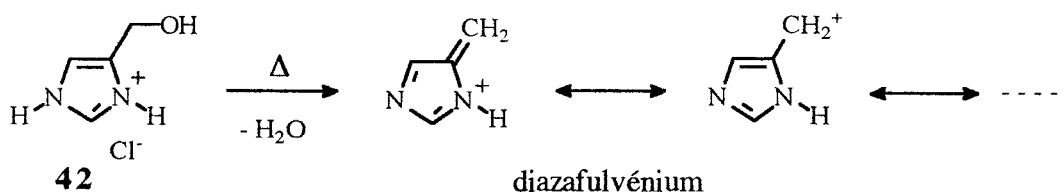
L'imidazole de départ n'étant ni soluble dans l'éther, ni dans le THF, nous avons choisi le dioxanne comme solvant de la réaction. Cependant les essais réalisés n'ont pas abouti.

2- Substitution électrophile aromatique



Cette voie a été envisagée pour la synthèse des dérivés avec une chaîne alkyle R_2 sur le noyau phénolique. La synthèse magnésienne n'est pas applicable pour ces molécules car il n'existe pas d'orthobromophénol avec une chaîne alkyle sur le cycle commercialisé. En revanche le 4-propyl méthoxybenzène est commercialisé. Nous avons alors tenté son alkylation par l'hydroxyméthylimidazole **42** dans l'acide polyphosphorique (PPA) (Geerst et al., 1992). Plusieurs essais ont été réalisés mais sans succès.

Le mécanisme réactionnel supposé pour cette réaction est intéressant à mentionner. Il passe par la formation d'un composé diazafulvénium, résultat d'une déshydratation de l'hydroxyméthylimidazole.



4.2.1.2. Synthèse du substituant indolique : 3-cyanométhyl-5-halogénométhyl indole

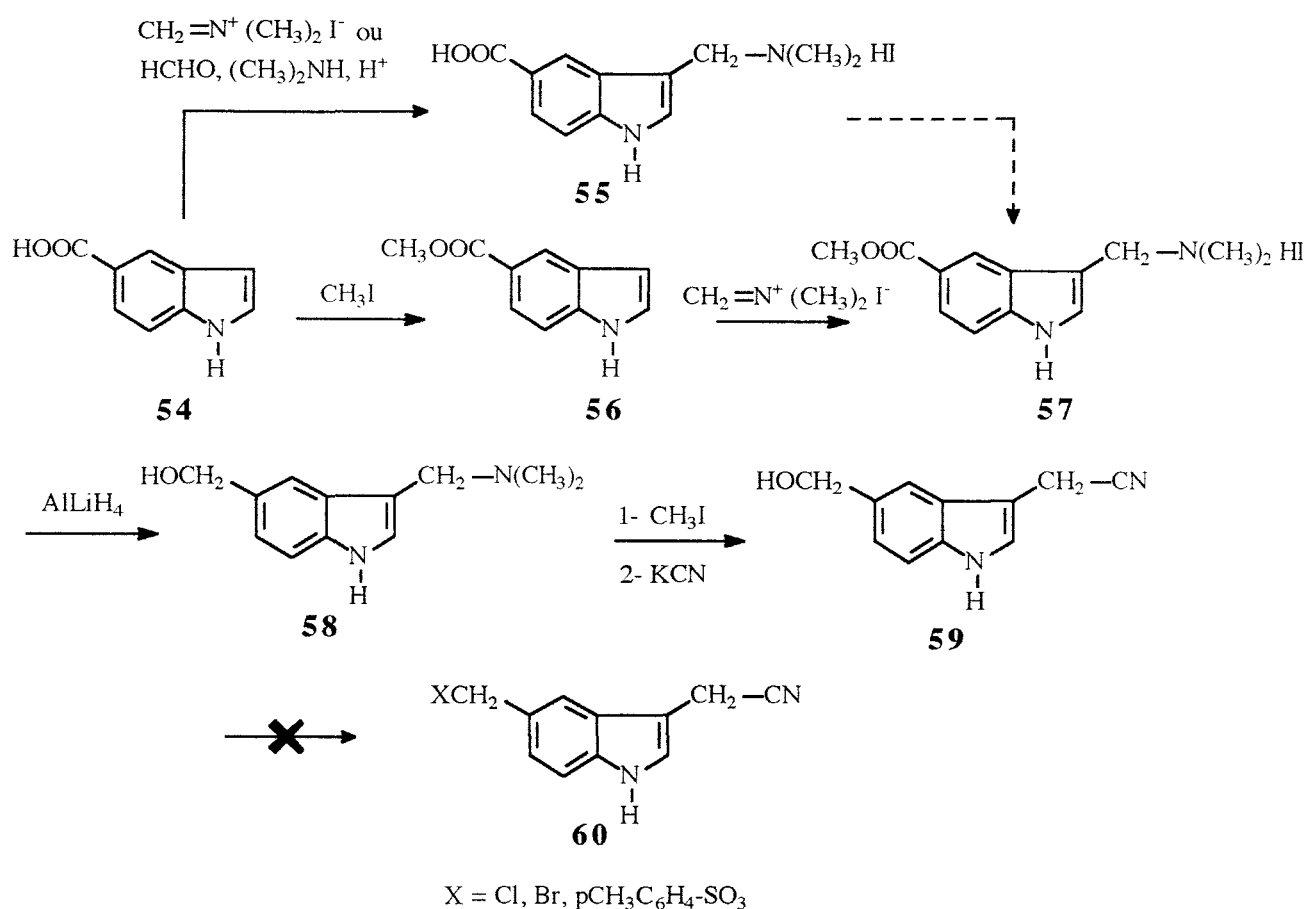
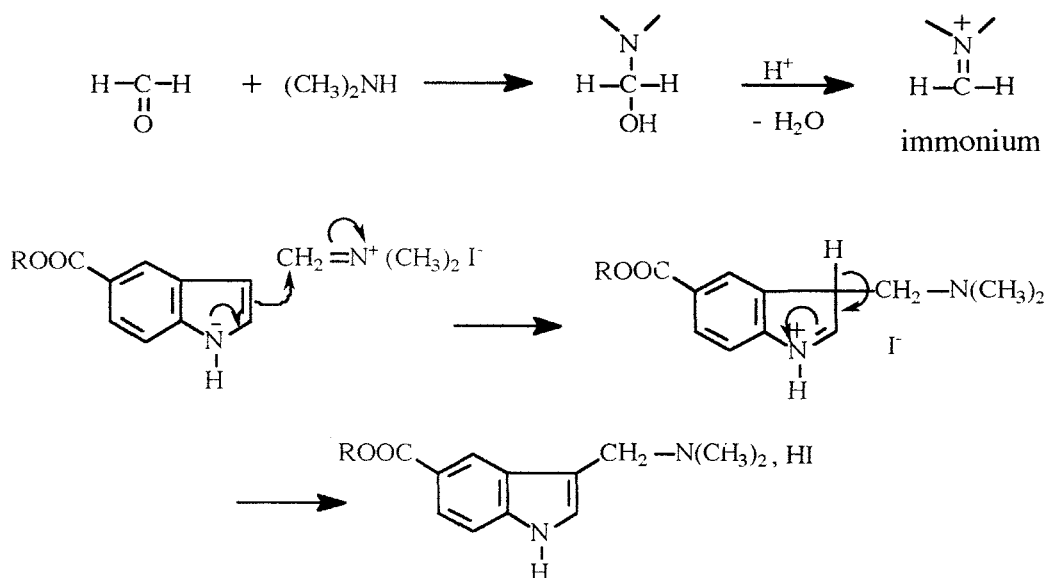


Schéma 9

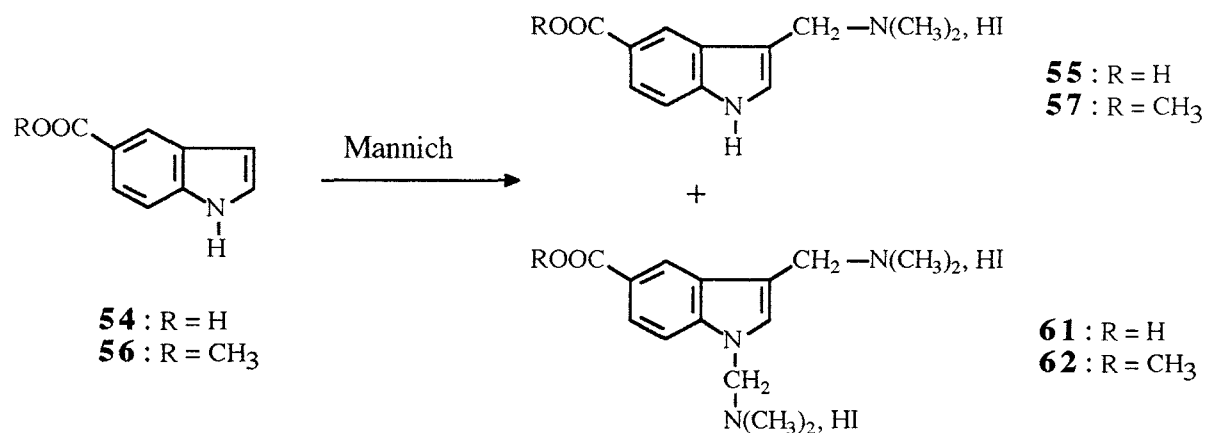
Synthèse du composé 57

La position 3 de l'indole est suffisamment nucléophile pour donner lieu à une réaction de Mannich. Deux mode opératoires ont été essayés :

- une méthode "classique" par réaction entre le formaldéhyde, la diméthylamine et le dérivé indolique en milieu acide acétique (Kline, 1985),
- une méthode utilisant comme réactif l'iodure de N, N-diméthylméthylène immonium (sel d'Eschenmoser) (Kozikowski et al., 1980). Ce sel d'immonium est l'intermédiaire réactionnel qui se forme au cours de la réaction de Mannich en milieu acide.



La substitution en position 3 de l'indole a été réalisée sur l'acide **54** et sur l'ester **56**. Les produits obtenus et les rendements sont rassemblés dans le tableau suivant.



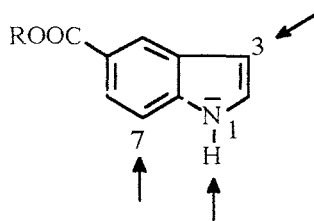
Substrat indolique	Mannich "classique"	Sel d'Eschenmoser
Acide 54	acide disubstitué 61 Rdt = 62%	acide disubstitué 61 Rdt = 65%
Ester 56	X	ester monosubstitué 57 Rdt = 80%

X : réaction non réalisée

Réactions de Mannich sur l'acide **54**

La première réaction que nous avons réalisée est une Mannich "classique". Nous avons eu la surprise d'isoler sous la forme d'un dichlorhydrate un produit de disubstitution. Théoriquement

trois positions sur cet indole sont susceptibles de réagir : l'azote, les positions 3 et 7. La RMN et le spectre IR ont montré qu'il s'agissait du produit **61** disubstitué sur l'azote et en position 3 (présence de quatre protons aromatiques en RMN, disparition de la bande d'absorption du NH indolique en IR).



Pensant que la méthode utilisée pour réaliser la réaction pouvait être en cause, nous avons alors utilisé le sel d'Eschenmoser. Le produit de disubstitution **61** est formé majoritairement. Le produit de monosubstitution a pu être isolé avec un rendement de 25%. Ces deux méthodes donnant des résultats comparables, nous avons alors mis en cause la fonction acide carboxylique.

Réaction de Mannich sur l'ester **56**

Nous nous sommes alors orientée vers l'ester, qui diminue la réactivité de l'azote indolique. La réaction avec le sel d'Eschenmoser nous a, dans ce cas, donné entière satisfaction, le dérivé monosubstitué **57** est obtenu avec un rendement de 80% et seules des traces de dérivé disubstitué **62** ont été révélées par étude RMN du précipité brut avant recristallisation.

Estérification

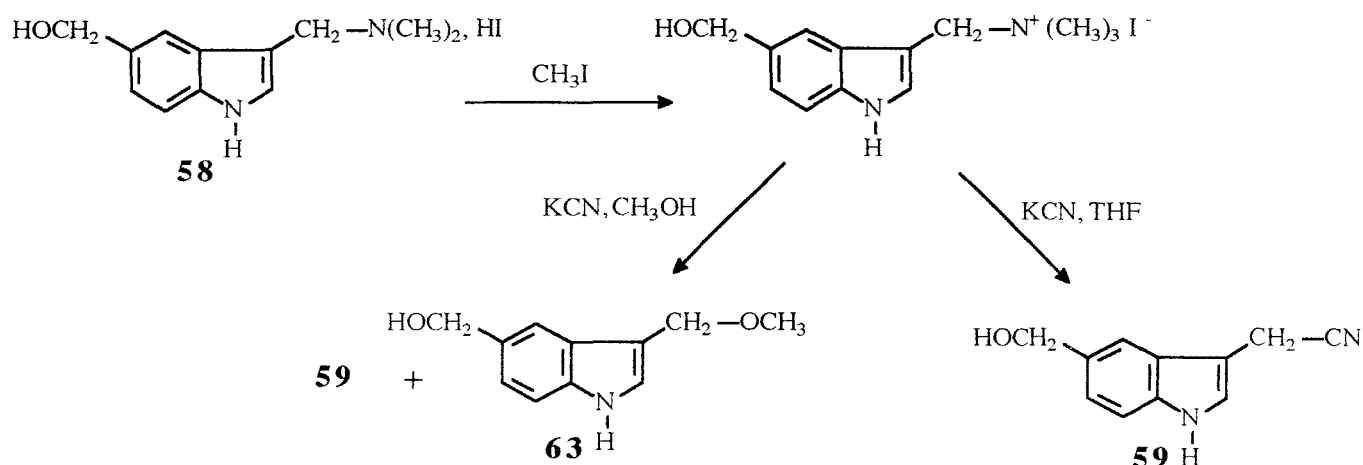
Deux méthodes d'estérification ont été testées :

- en milieu acide : SOCl_2 , CH_3OH , 60°C . La réaction n'étant pas totale à température ambiante, nous avons dû chauffer, mais des produits de dégradation apparaissent. Le rendement n'est alors que de 60%.
- en milieu basique : CH_3I , NaHCO_3 dans le DMF à température ambiante. Cette méthode donne un rendement de 92%.

*Synthèse du composé **58***

Dans l'éther, la réduction de l'ester **57** en alcool par AlLiH_4 est lente et donne un rendement de 35%. Dans le THF anhydre, solvant dans lequel la matière première est beaucoup plus soluble, le rendement atteint 81%.

Synthèse du composé 59



La transformation de l'amine tertiaire **58** en sel d'ammonium quaternaire, bon groupement partant, augmente la réactivité vis-à-vis de l'attaque d'un nucléophile dans une substitution d'Hofmann (Benghiat et al., 1982).

La substitution électrophile ou l'élimination d'Hofmann effectuée par l'anion cyanure conduit au dérivé cyanométhylé **59**. Cette réaction a été réalisée dans le méthanol dans un premier temps. On observe alors la formation d'un produit secondaire : 3-méthoxyméthyl-5-hydroxyméthyl indole **63**, produit de réaction de l'ammonium quaternaire avec le méthanol. Le rendement de la réaction est de 50%.

Pour éviter cette réaction parasite, le THF a été utilisé comme solvant de la réaction. Le rendement est alors de 67%.

Synthèse du composé 60

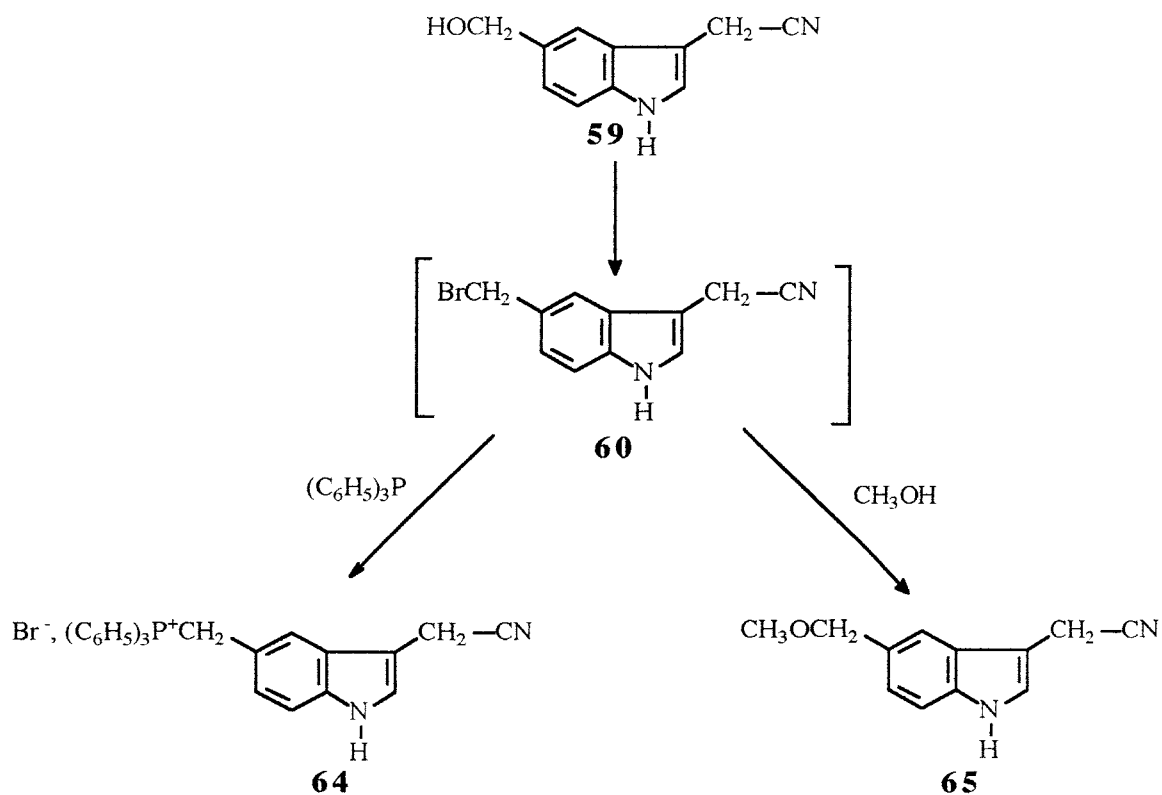
De nombreuses méthodes ont été testées pour la synthèse du dérivé **60**.

Nature de la réaction	Conditions réactionnelles	Produits isolés	Commentaires
<u>Chloration</u>	- SOCl ₂ , CHCl ₃ , 5°-25°C	-	- dégradation
<u>Tosylation</u>	- TsCl, pyridine, 5°-25°C*	59	- pas de réaction
	- TsCl, CH ₂ Cl ₂ , 25°C	59	- pas de réaction

Nature de la réaction	Conditions réactionnelles	Produits isolés	Commentaires
<u>Bromation</u>	- PPh ₃ , Br ₂ , pyridine, acétonitrile	59	- pas de réaction
	- PPh ₃ (2 eq), CBr ₄ (1 eq), acétonitrile,	64	- réaction du dérivé bromé formé avec PPh ₃ en excès
	- PPh ₃ (1 eq), CBr ₄ (1 eq), acétonitrile,	?	- produit de dégradation non caractérisé ^a (présence d'une fonction nitrile en IR)
	- HBr (15 eq), CH ₃ OH, 25°C	65 + ?	- produit de dégradation non caractérisé ^a (présence d'une fonction nitrile en IR)
	- HBr (4 eq), CH ₃ OH, 5°-25°C	65	- réaction entre le dérivé bromé formé et le méthanol

* (Bridges et al., 1991)

^a ce produit précipite dans le milieu réactionnel et sa quantité augmente au cours du temps



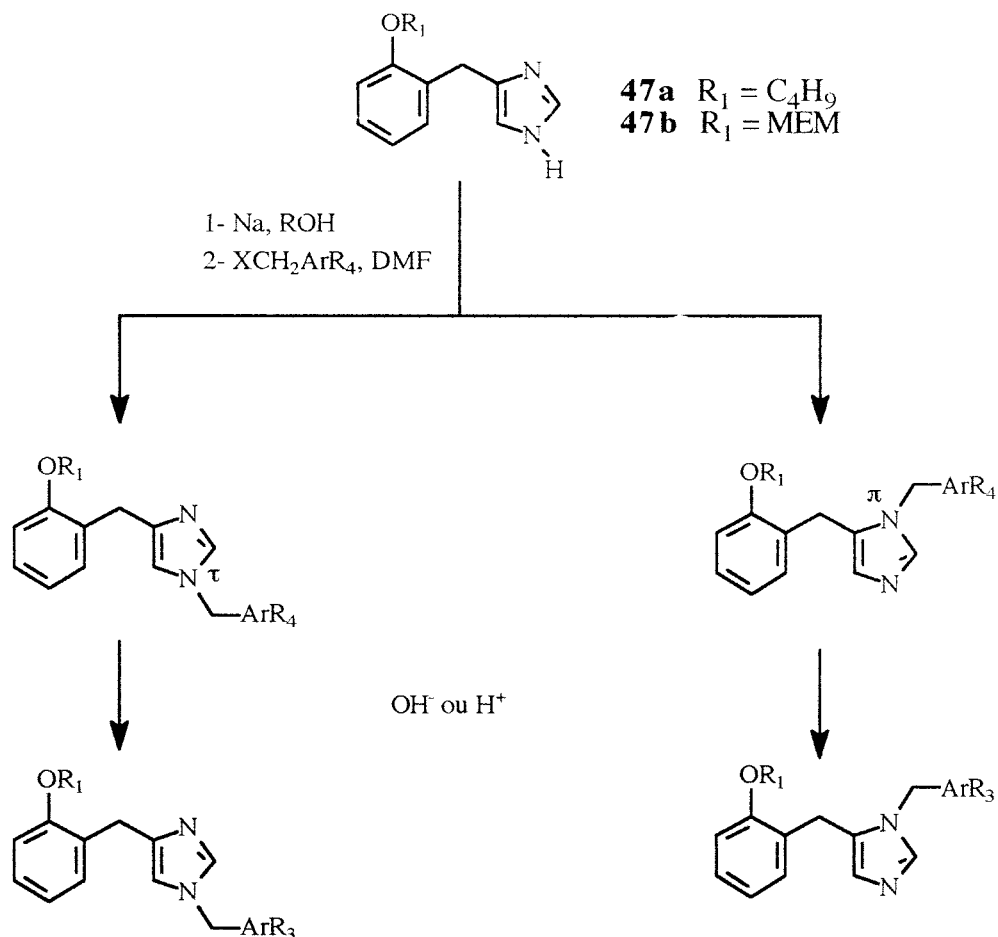
Les principales conclusions que nous pouvons tirer de tous ces essais sont résumées ci-dessous :

- le dérivé bromé se forme, mais il est très réactif : la formation des deux produits secondaires **64** et **65** en témoigne.
- la structure indolique n'est pas stable en milieu trop acide, comme le prouvent les dégradations observées avec SOCl_2 ou HBr en large excès.

Face à cette très grande réactivité du dérivé bromé, nous avons tenté de le "piéger" par addition au milieu réactionnel du synthon imidazolique **47**. Nous avons essayé avec deux méthodes : PPh_3 (1 eq), CBr_4 (1 eq) dans l'acétonitrile et HBr (4eq) dans l'acétone pour éviter la réaction avec le méthanol. Ces essais n'ont pas été concluants.

4.2.1.3. Alkylation des synthons 4-(2-alkoxybenzyl) imidazoles par les substituants aromatiques-acides

La synthèse du 3-cyanométhyl-5-bromométhyl indole **60** n'ayant pas abouti, nous avons opté pour deux autres substituants aromatiques-acides (ArR_3) proposés lors de la conception : l'acide benzoïque et la structure biphényltétrazole dont la synthèse est présentée page 113.

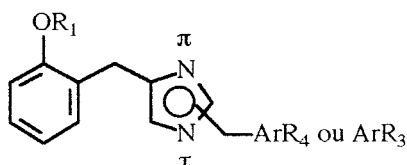


ArR_4 : groupement ArR_3 dont le groupe acide R_3 (COOH ou tétrazole) est protégé (sous forme d'ester ou de 1-triphénylméthyl tétrazole)

$\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$

Schéma 10

Le tableau suivant rassemble les différents dérivés synthétisés.



R ₁	-ArR ₄	Isomères τ - π	-ArR ₃	Isomères τ
C ₄ H ₉		66a _{1,4} - 66a _{1,5}		70a _{1,4}
C ₄ H ₉		67a _{1,4} - 67a _{1,5}	-	-
C ₄ H ₉		68a _{1,4} - 68a _{1,5}		71a _{1,4}
MEM		69b _{1,4} - 69b _{1,5}		72b _{1,4}

Remarque :

Pour obtenir les dérivés avec la structure biphenyltétrazole, nous avons envisagé dans un premier temps d'alkyler le dérivé **47a** par le 4'-(bromométhyl)-2-cyanobiphényle **24** puis de transformer le nitrile en tétrazole (cf schéma 11). Cependant les essais de formation du tétrazole par deux méthodes différentes, la première utilisant le triméthylsilane azide ((CH₃)₃SiN₃, (CH₃)₃Al), la seconde le triméthylazide stanneux ((CH₃)₃SnCl, NaN₃) ont échoué. Nous nous sommes alors tournée vers l'alkylation du dérivé **47a** directement par le N-(triphenylméthyl)-5-[4'-(bromométhyl)biphényl-2-yl] tétrazole **23**.

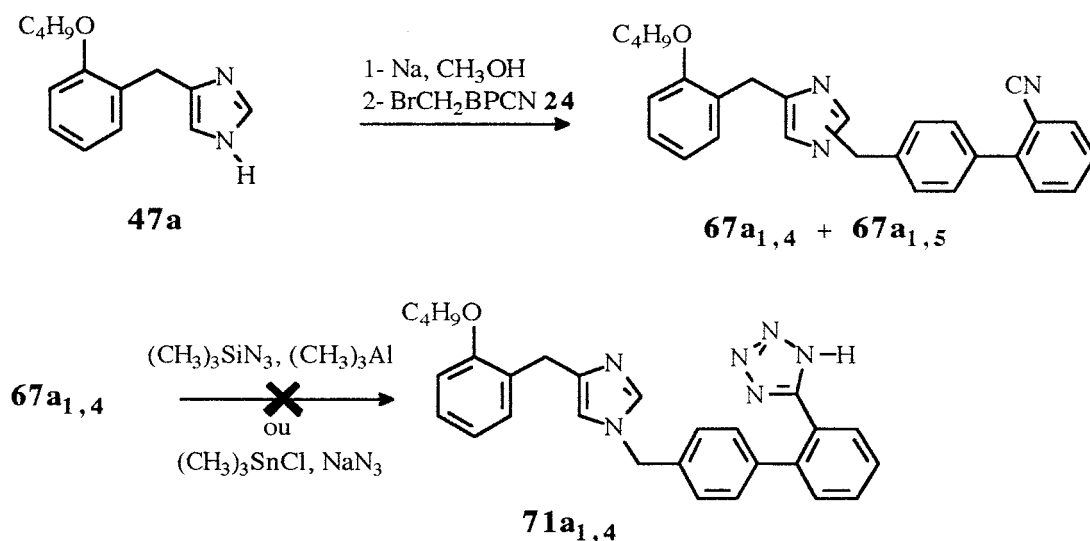


Schéma 11

Alkylation des synthons 47, synthèse des composés 66a, 67a, 68a et 69b

Nous avons employé ici la méthode avec les alcoolates (NaOR) pour former les sels sodiques des dérivés 47, suivie de l'alkylation par le dérivé halogéné (XCH₂ArR₄) dans le DMF.

La formation secondaire de sels d'imidazolium par disubstitution du noyau imidazolique oblige à réaliser la réaction avec des quantités d'agent alkylant proche de la stoechiométrie (1-1.2 eq).

Séparation des isomères de position

Dans cette famille des 4-alkoxybenzyl imidazoles, cette alkylation constitue l'étape délicate de la synthèse car la séparation des deux isomères de position τ et π est particulièrement délicate.

Dans tous les cas, celle-ci a été réalisée par chromatographie sur colonne de silice. Pour les composés substitués par le 2'-cyanobiphényle 67a ou le 2'-[(1-trityl) tétrazol-5-yl]biphényle 68a, la purification a dû être réalisée sous pression, les deux isomères présentant des coefficients de migration presque identiques. Pour les autres cas, une séparation à pression ordinaire est possible.

Les identifications des isomères de position ont été effectuées soit à ce niveau, soit sur les composés obtenus après déprotection des fonctions acides, étape suivante. Ce travail est décrit dans le chapitre 4.2.3, page.

Les rendements de ces alkylations sont moyens, voire même faibles, en particulier avec les composés 68a où le rendement global n'est que de 15%. Les deux isomères sont en général obtenus à peu près dans les mêmes proportions, avec une légère prépondérance pour l'isomère τ (R_f supérieur).

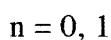
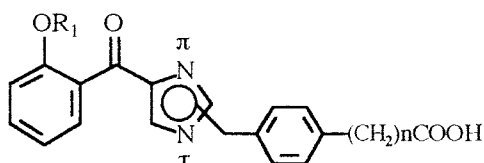
Déprotection des fonctions acides, synthèse des composés 70a_{1,4}, 71a_{1,4} et 72b_{1,4}

Cette étape consiste en la libération des groupes acides fixés sur le substituant aromatique-acide (R₄ArCH₂). Les acides carboxyliques sont obtenus par saponification des fonctions esters et les dérivés tétrazoliques par détritylation en milieu acide (HCl ou acide acétique).

4.2.2. Synthèse des (2-alkoxyphényl)-[(1-benzyl) imidazol-4-yl] cétones

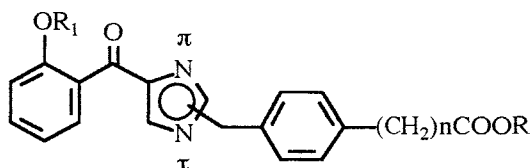
Nous allons nous intéresser maintenant à la synthèse de la deuxième série de molécules issue de la conception à partir de la conformation "scorpion" de l'Ang II : les dérivés cétoniques.

L'introduction du groupe carbonyle peut être utile sur un plan pharmacologique : il joue sur la structure de la molécule en imposant aux deux noyaux aromatiques phényle et imidazole une géométrie coplanaire et constitue un groupe accepteur de proton susceptible d'établir avec le récepteur une interaction supplémentaire.



Pour la synthèse de ces dérivés, nous avons utilisé comme matière première la (2-benzyloxyphényl)-(imidazol-4-yl) cétone **77** (cf schéma 12). Cette dernière est obtenue à partir de l'alcool **45c**, intermédiaire de synthèse pour l'obtention des dérivés méthyléniques (voir page 127).

Les dérivés synthétisés dans cette série sont rassemblés dans le tableau suivant.



R ₁	n	R	Isomères τ - π
CH ₂ C ₆ H ₅	0	CH ₃	78 _{1,4} - 78 _{1,5}
CH ₂ C ₆ H ₅	1	C ₂ H ₅	79 _{1,4} - 79 _{1,5}
CH ₂ C ₆ H ₅	0	H	80 _{1,4} - 80 _{1,5}
CH ₂ C ₆ H ₅	1	H	81 _{1,4} - 81 _{1,5}
H	1	H	82 _{1,4} - 82 _{1,5}

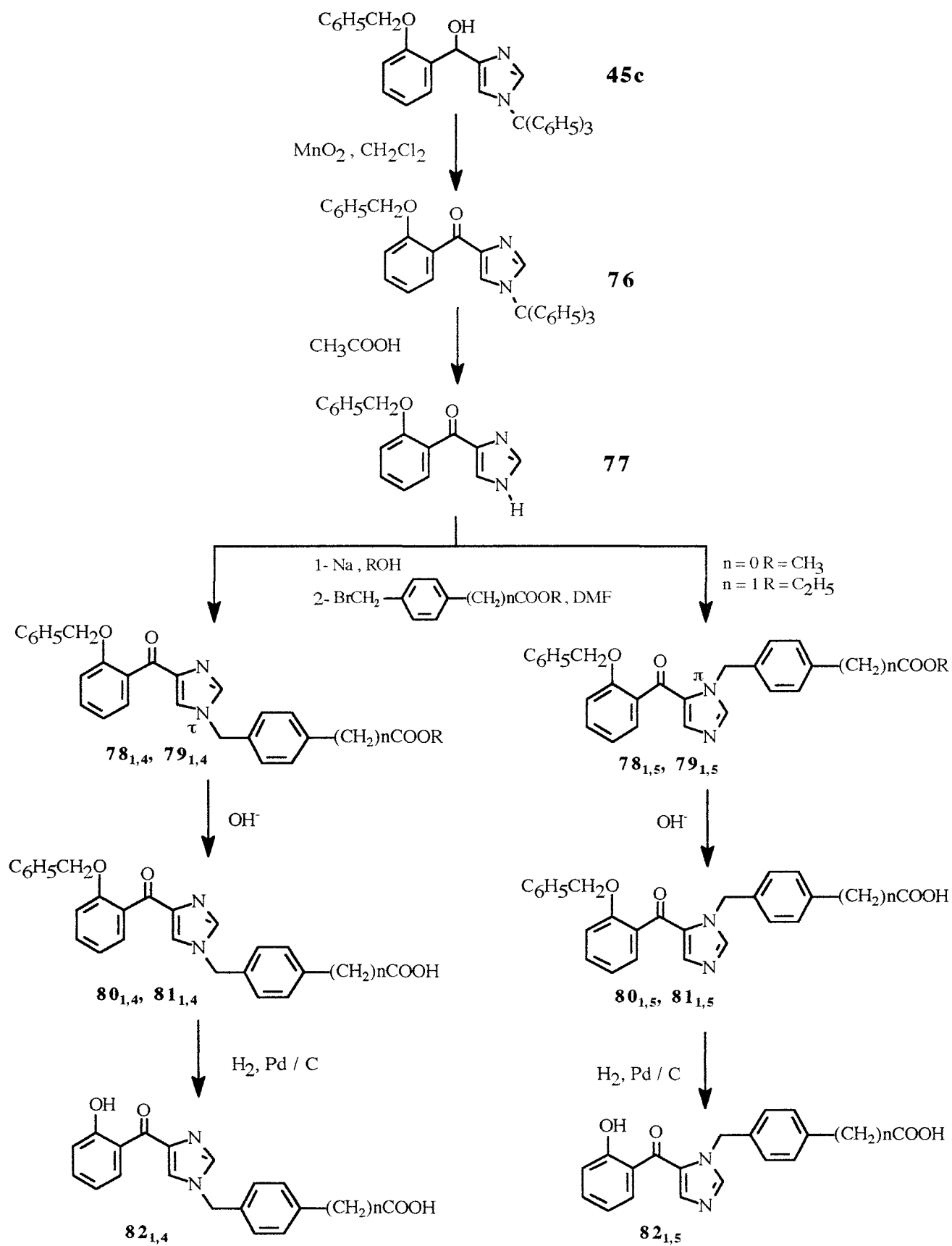


Schéma 12: Synthèse des dérivés cétoniques

Synthèse du composé 77

Le produit **77**, matière première de ce schéma réactionnel est obtenu par oxydation de l'alcool **45c** en cétone par le dioxyde de manganèse à reflux dans le dioxanne.

La détritylation est effectuée en milieu acide acétique à chaud. Ici la détritylation par hydrogénation catalytique n'est pas envisageable, le groupe protecteur benzyle étant labile dans ces conditions.

Le rendement global pour ces deux réactions est de 86%.

Alkylation du composé 77, synthèse des isomères 78 et 79

Nous avons utilisé les mêmes conditions réactionnelles que pour l'alkylation des synthons 4-(2-alkoxybenzyl)imidazoles **47**, c'est-à-dire formation du sel de l'imidazole par action d'un alcoolate, puis alkylation par le dérivé bromé adéquat dans le DMF. La formation des produits secondaires de disubstitution a également été observée, l'agent alkylant est alors utilisé avec un faible excès (1,2 eq).

Séparation des isomères de position

Cette alkylation n'est pas régiosélective, un mélange des deux isomères de position est obtenu. Cependant, leur séparation par chromatographie sur colonne de silice n'a pas présenté de difficulté particulière. Leur coefficient de migration étant assez différent, une purification sur colonne à pression ordinaire est satisfaisante.

Pour les deux alkylations réalisées, les rendements globaux sont de 68% et 74%. Les isomères τ (R_f inférieur) sont obtenus majoritairement ($\tau / \pi = 70 / 30$).

Comme pour les dérivés méthyléniques, une identification des isomères obtenus a été réalisée. Ce travail est présenté dans le chapitre 4.2.3., page 146.

Saponification des fonctions esters, synthèse des isomères 80 et 81

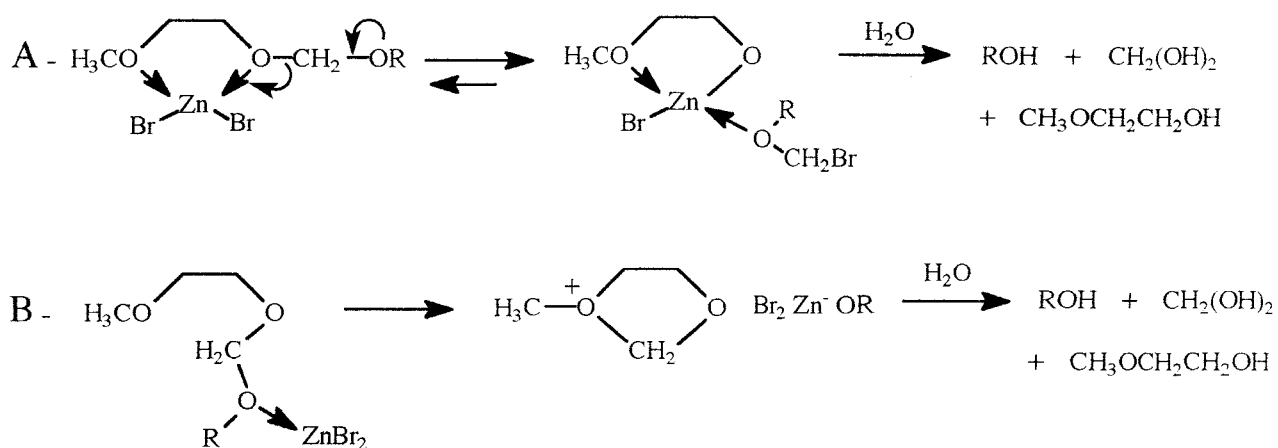
Les acides sont obtenus par saponification des esters correspondants. Les rendements des saponifications sont de 65% pour les dérivés **80** (substitués par l'acide benzoïque, $n = 0$) et de 75% pour les dérivés **81** (substitués par l'acide phényl acétique, $n = 1$).

Synthèse des isomères 82

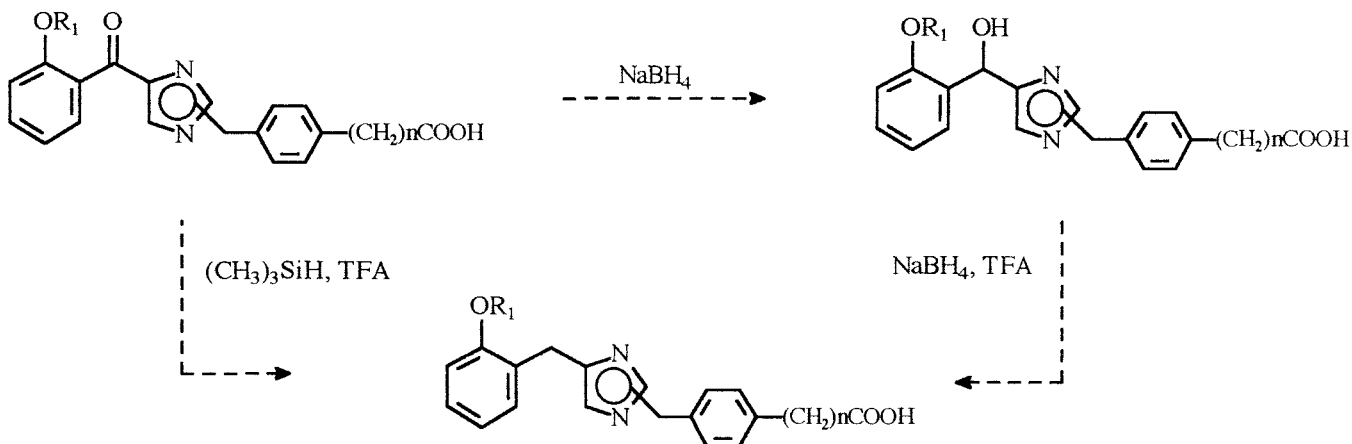
Ces dérivés avec l'hydroxyle phénolique libre ($R_1 = H$) sont obtenus par débenzylation des isomères **81** correspondants par hydrogénation catalytique avec un rendement de 70%.

Remarque :

Nous avons exploré cette voie de synthèse avec les dérivés O-benzylés car en théorie la réduction de la fonction carbonyle en alcool ou en méthylène intervient dans l'étape ultime du schéma réactionnel. Les dérivés protégés par un MEM auraient pu convenir également. Le MEM est en théorie clivé en milieu aprotique par des acides de Lewis ($ZnBr_2$ ou $TiCl_4$) et deux mécanismes A et B sont proposés pour cette réaction (Corey et al., 1976).



Note : la séparation des isomères étant plus aisée dans cette série, cette voie peut être préférable à la première avec substitution des synthons 4-(2-alkoxybenzyl)imidazole, d'autant qu'à partir des dérivés cétoniques les deux autres séries peuvent être théoriquement obtenues par réduction.



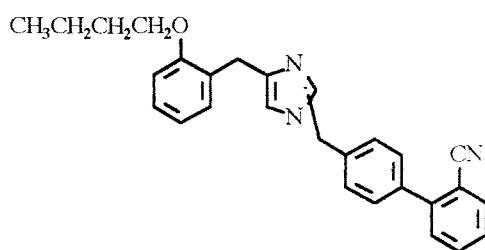
4.2.3. Identification des isomères de position

Les synthèses présentées précédemment se caractérisent par l'obtention des deux isomères de position τ et π après alkylation du noyau imidazolique. Nous avons donc été amenée à déterminer la position de la substitution grâce à des études RMN à deux dimensions (RMN 2D).

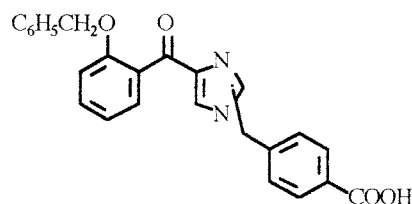
Les expériences 2D utilisées sont :

- la RMN COSY qui permet d'étudier les interactions scalaires qui ont lieu à travers les liaisons covalentes entre deux noyaux d'une molécule
- les RMN NOESY et ROESY qui permettent d'étudier les interactions dipolaires entre deux noyaux proches dans l'espace grâce à l'effet Overhauser nucléaire (NOE)

Plusieurs composés ont été étudiés et nous allons exposer pour exemple l'étude effectuée sur le couple d'isomères méthyléniques **67a_{1,4}**-**67a_{1,5}** et celle sur le couple d'isomères cétoniques **80a_{1,4}**-**80a_{1,5}**.



67a_{1,4}, **67a_{1,5}**



80a_{1,4}, **80a_{1,5}**

Dans les deux cas, la détermination exacte des structures de ces isomères se décompose en deux étapes :

- identification des isomères τ et π
- attribution des protons aromatiques

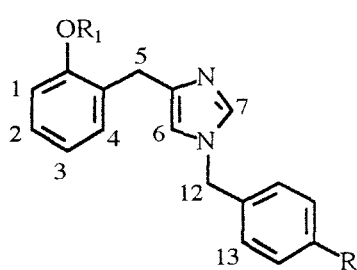
La première étape a été réalisée à partir des expériences ROESY ou NOESY, la seconde grâce aux études COSY, ROESY et NOESY.

4.2.3.1. Etude des isomères 4- et 5-(2-butoxybenzyl)-1-[(2'-cyanobiphényl-4-yl)méthyl]imidazoles **67a_{1,4}**-**67a_{1,5}**

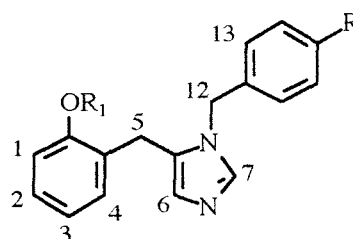
1- Identification des isomères

Expériences ROESY

La principale différence qui permet de différencier les deux isomères est la présence ou non de l'interaction dipolaire entre les protons H₁₂ et le proton imidazolique H₆. Dans l'isomère τ , cette interaction existe, alors que dans l'isomère π , elle ne peut s'établir de par l'éloignement de ces protons dans l'espace. En revanche, dans l'isomère π , les protons H₅ et H₁₂ peuvent interagir.



Isomère τ



Isomère π

Après étude des spectres ROESY, nous pouvons donc conclure que :

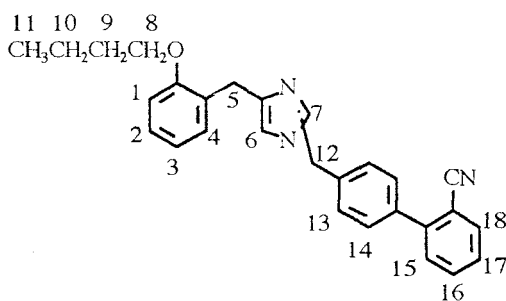
- le composé correspondant au spectre 2 (page 155) est l'isomère τ (présence de la tache de corrélation entre H₁₂ et H₆)
- le composé correspondant au spectre 5 (page 158) est l'isomère π (absence de la tache de corrélation entre H₁₂ et H₆ et présence de celle entre H₁₂ et H₅)

2- Identification des protons aromatiques

Expériences RMN H¹ 1D

Les études RMN 1D (cf spectres 1 et 4, pages 154 et 157), permettent d'attribuer les protons aliphatiques. En revanche, l'attribution des protons aromatiques est plus délicate. Les études COSY et ROESY ont permis de résoudre ce problème.

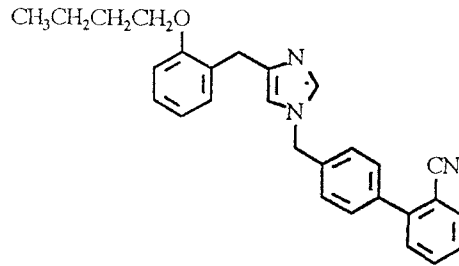
Expériences COSY



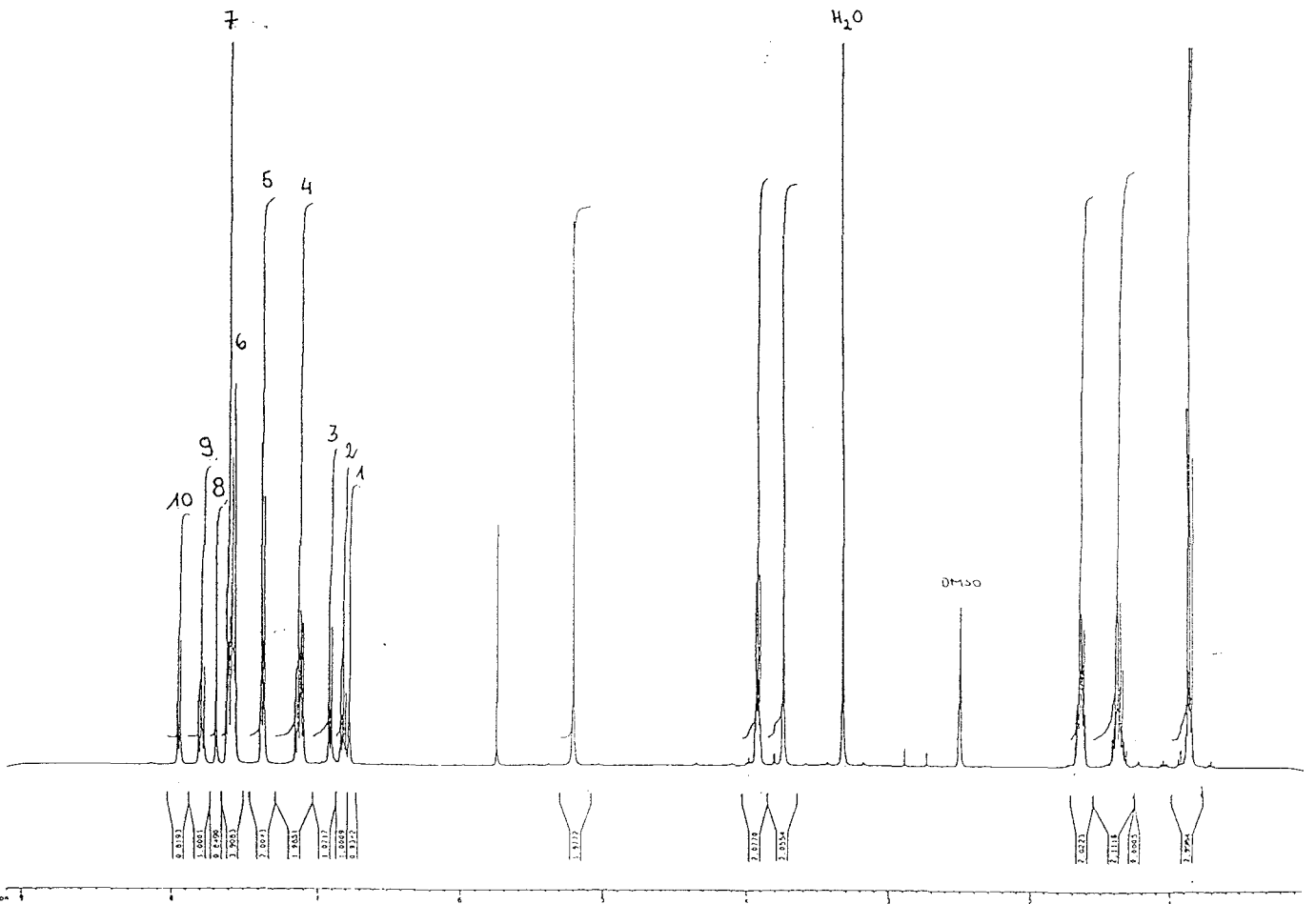
Pour les deux isomères, les signaux et interactions scalaires observables en théorie sont les suivants :

Protons	Signaux en RMN 1D et intégrations	Nombre de tâches de corrélation en COSY	Protons corrélés
H ₁	(d, 1H)	1	H ₂
H ₂	(t, 1H)	2	H ₁ , H ₃
H ₃	(t, 1H)	2	H ₂ , H ₄
H ₄	(d, 1H)	1	H ₃
H ₆	(s, 1H)	0	-
H ₇	(s, 1H)	0	-
H ₁₃	(d, 2H)	1	H ₁₄
H ₁₄	(d, 2H)	1	H ₁₃
H ₁₅	(d, 1H)	1	H ₁₆
H ₁₆	(t, 1H)	2	H ₁₅ , H ₁₇
H ₁₇	(t, 1H)	2	H ₁₆ , H ₁₈
H ₁₈	(d, 1H)	1	H ₁₇

Les résultats expérimentaux sont les suivants :

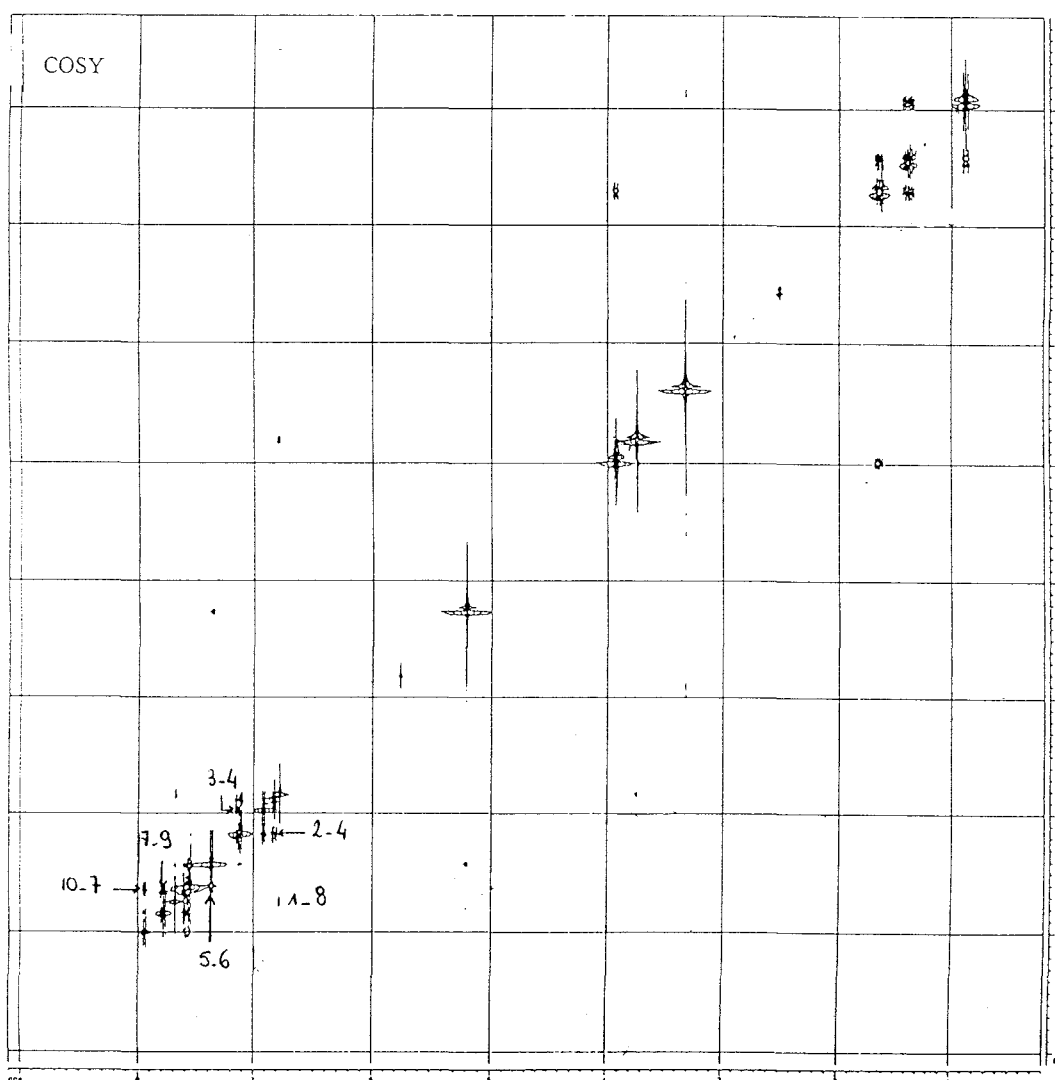


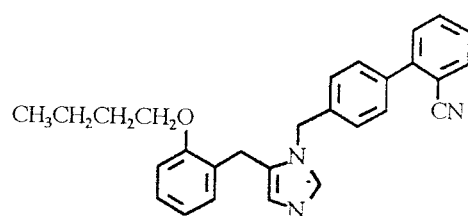
RMN H¹. DMSO-d₆



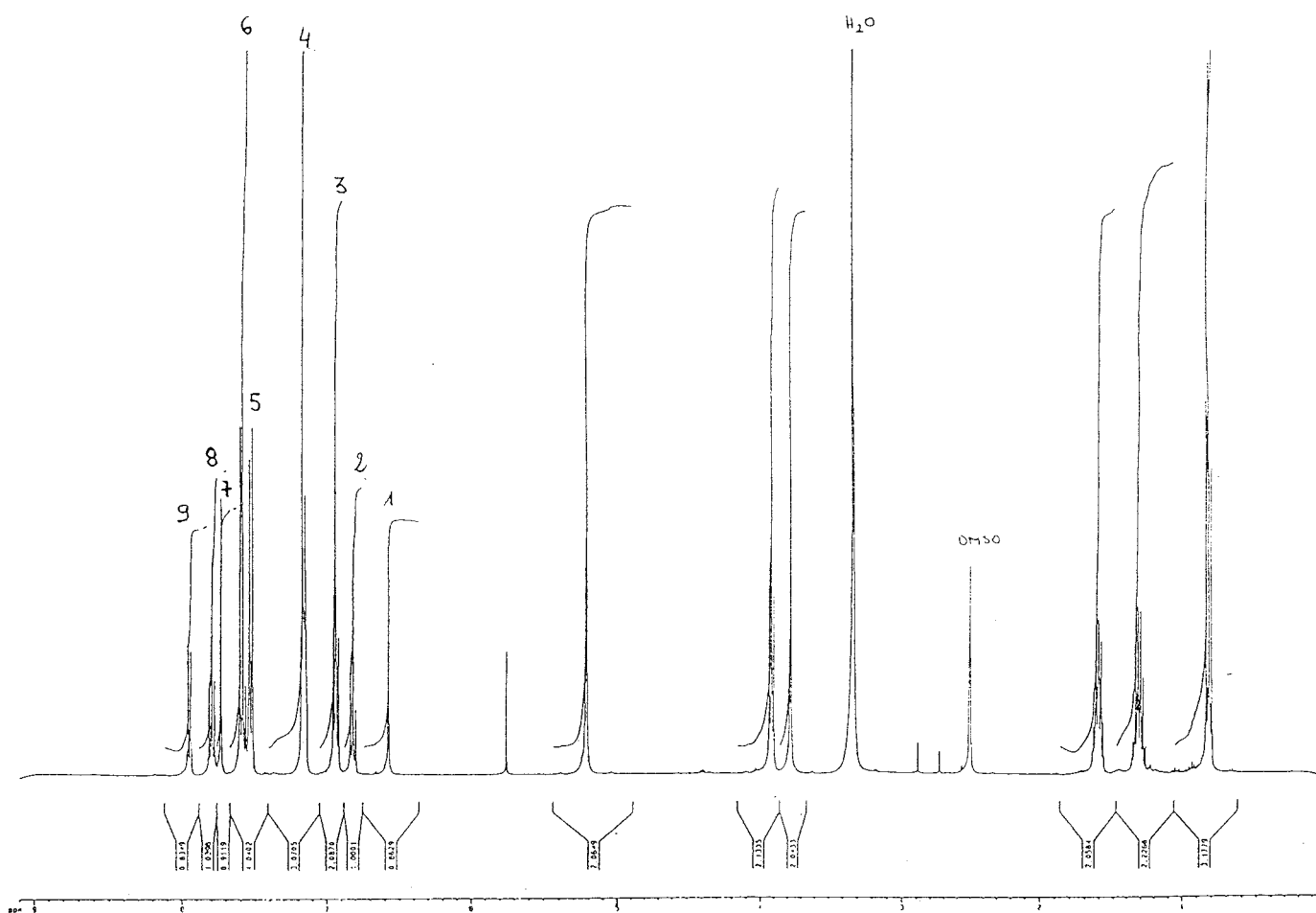
Isomère τ

Déplacements chimiques (ppm)	Signaux en RMN et intégrations	Nombre de tâches de corrélation en COSY	Massifs corrélés
6,78	n°1 (s, 1H)	1	n°8
6,87	n°2 (t, 1H)	1	n°4
6,97	n°3 (d, 1H)	1	n°4
7,11-7,13	n°4 (multiplet, 2H)	2	n°2, n°3
7,37	n°5 (d, 2H)	1	n°6
7,56	n°6 (d, 2H)	1	n°5
7,57	n°7 (multiplet, 2H)	2	n°9, n°10
7,68	n°8 (s, 1H)	1	n°1
7,79	n°9 (t, 1H)	1	n°7
7,94	n°10 (d, 1H)	1	n°7





RMN H^1 , DMSO- d_6



A ce niveau, les protons imidazoliques H₆ et H₇ et ceux de la structure biphényle H₁₃ à H₁₈ peuvent être attribués sans ambiguïté pour les deux isomères. En revanche pour les protons du noyau phénolique H₁ à H₄, il existe deux combinaisons possibles.

Isomère τ

Déplacements chimiques (ppm)	Signaux en RMN et intégrations	Protons	Commentaires
6,78	n°1 (s, 1H)	H ₆	une interaction méta avec le proton H ₇ est observée
6,87	n°2 (t, 1H)	H ₃ ou H ₂ ?	2 possibilités*
6,97	n°3 (d, 1H)	H ₁ ou H ₄ ?	2 possibilités*
7,11-7,13	n°4 (multiplet, 2H)	H ₂ , H ₄ ou H ₁ , H ₃ ?	2 possibilités*
7,37	n°5 (d, 2H)	H ₁₃	
7,56	n°6 (d, 2H)	H ₁₄	
7,57	n°7 (multiplet, 2H)	H ₁₅ , H ₁₇	
7,68	n°8 (s, 1H)	H ₇	une interaction méta avec le proton H ₆ est observée
7,79	n°9 (t, 1H)	H ₁₆	une seule tache de corrélation est observée car les protons H ₁₅ et H ₁₇ ont des glissements chimiques proches
7,94	n°10 (d, 1H)	H ₁₈	

* Les deux combinaisons possibles sont :

combinaison 1 : triplet n°2 : H₃

doublet n°3 : H₁ car il ne doit pas exister d'interaction scalaire avec H₃

multiplet n°4 : H₂ et H₄

combinaison 2 : triplet n°2 : H₂

doublet n°3 : H₄ car il ne doit pas exister d'interaction scalaire avec H₂

multiplet n°4 : H₁ et H₃

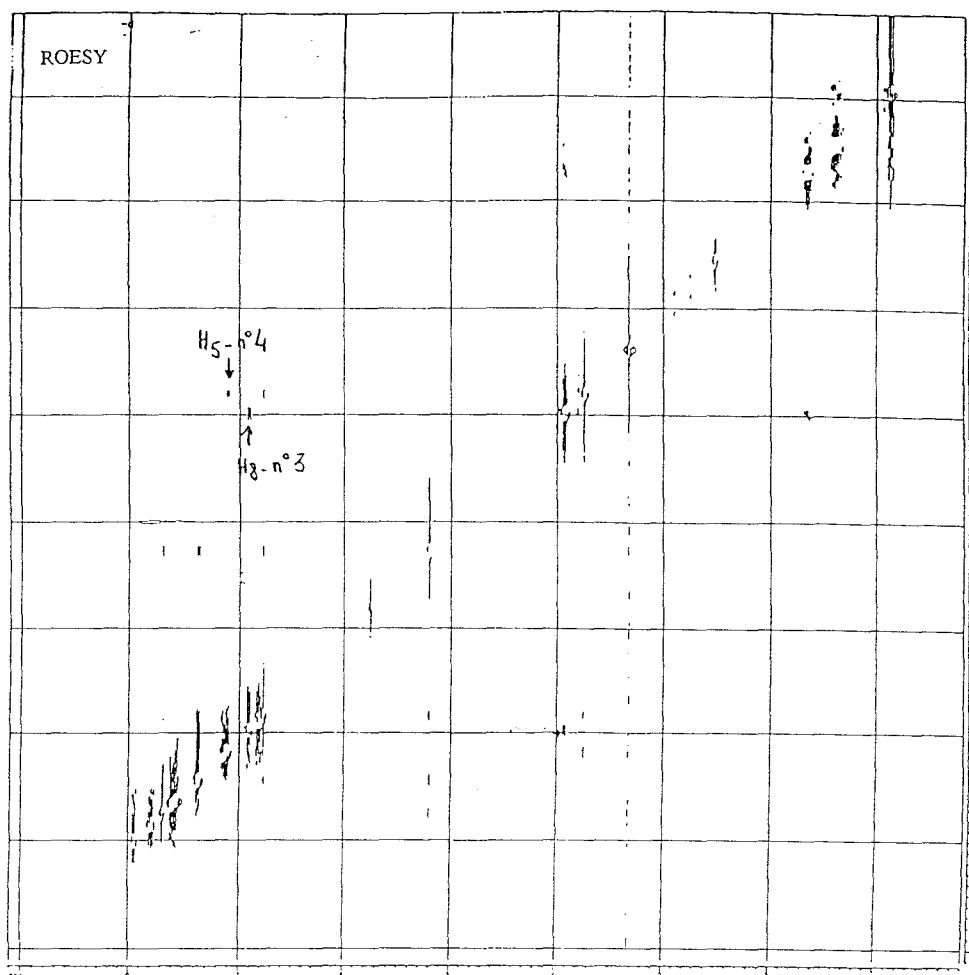
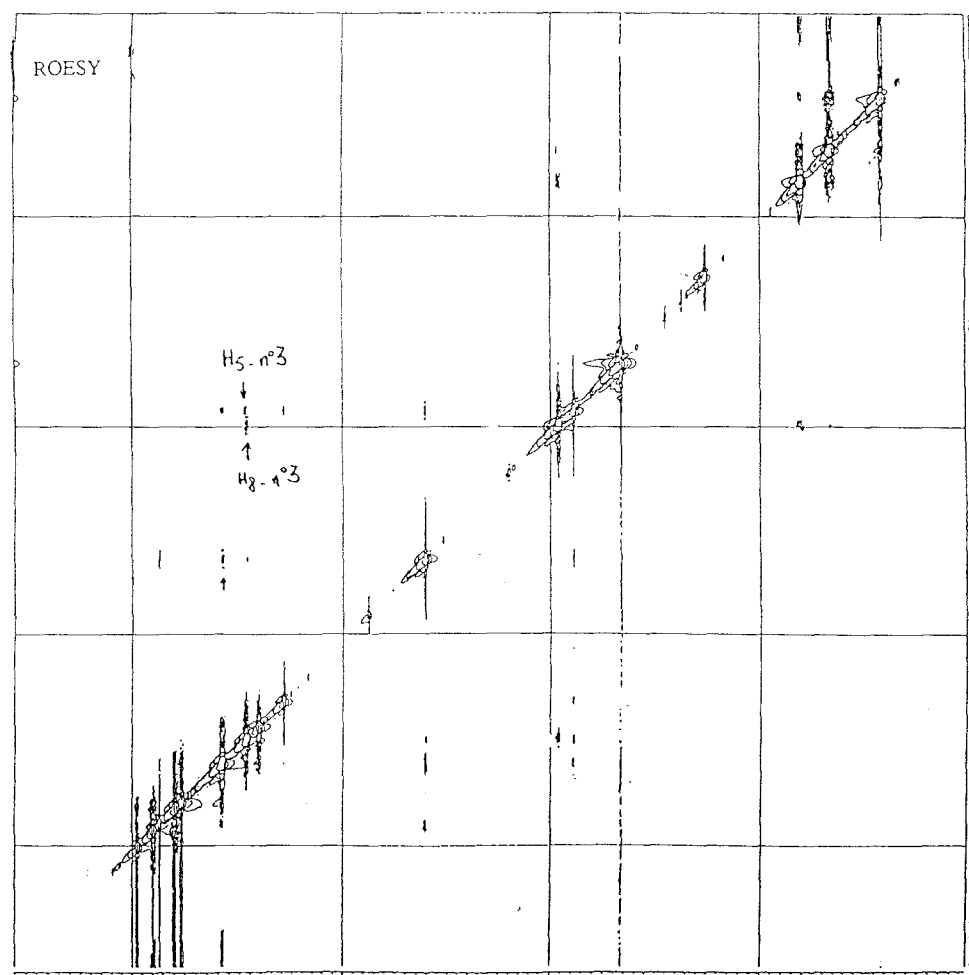
Isomère π

Déplacements chimiques (ppm)	Signaux en RMN et intégrations	Protons	Commentaires
6,58	n°1 (s, 1H)	H6	
6,82	n°2 (t, 1H)	H3 ou H2 ?	2 possibilités*
6,93-6,95	n°3 (multiplet, 2H)	H1, H4	
7,15-7,15	n°4 (multiplet, 3H)	H2 ou H3 ? + H13	2 possibilités*
7,53	n°5 (d, 2H)	H14	
7,56	n°6 (multiplet, 2H)	H15, H17	
7,73	n°7 (s, 1H)	H7	
7,79	n°8 (t, 1H)	H16	une seule tache de corrélation est observée car les protons H15 et H17 ont des glissements chimiques proches
7,95	n°10 (d, 1H)	H18	

* Les deux combinaisons possibles sont :

combinaison 1		combinaison 2	
triplet n°2	H3	triplet n°2	H2
multiplet n°3	H1 et H4	multiplet n°3	H1 et H4
multiplet n°4	H2	multiplet n°4	H3

Les expériences ROESY ont permis de résoudre ce problème.

Isomère τ Isomère π 

Expériences ROESY

Les interactions dipolaires observées qui permettent d'attribuer les protons H₁ à H₄ sont (cf page voisine) :

Isomère τ

H₅ - multiplet n°4 : soit H₄ ou H₂ si combinaison 1
soit H₃ ou H₁ si combinaison 2

H₈ - doublet n°3 : soit H₁ si combinaison 1
soit H₄ si combinaison 2

Isomère π

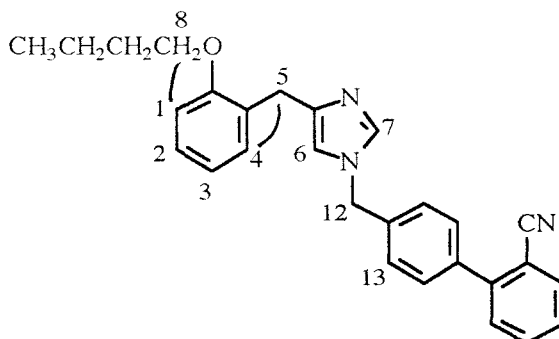
H₅ - multiplet n°3 : H₁ ou H₄ quelque soit la combinaison

H₈ - multiplet n°3 : H₁ ou H₄ quelque soit la combinaison

Isomère τ

D'après la structure :

- le proton H₈ peut interagir avec H₁, mais pas avec H₄
- les protons H₅ peuvent interagir avec H₄, mais pas avec H₃, ni H₁



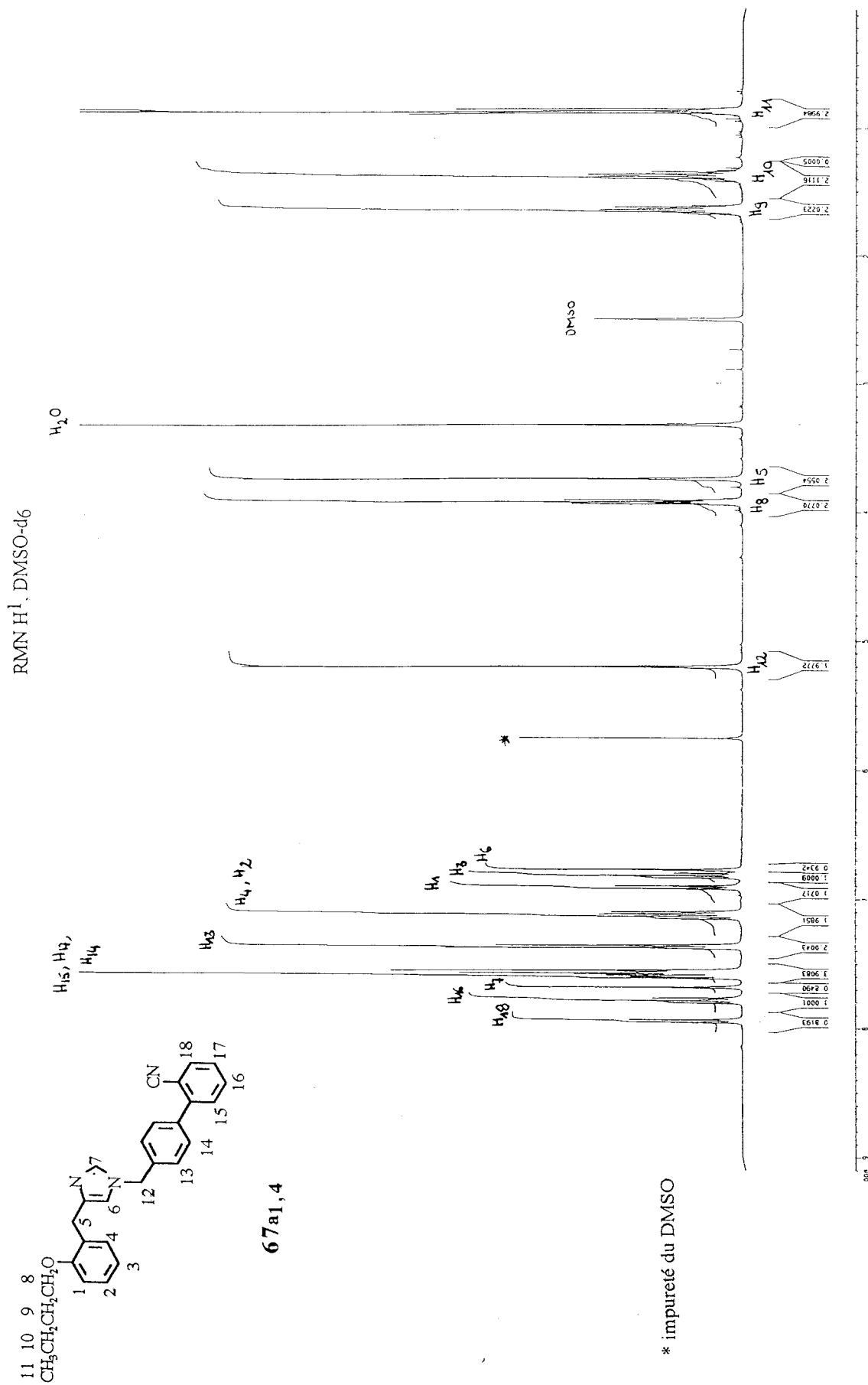
Il apparait donc sans ambiguïté que la bonne combinaison est la première, c'est à dire :

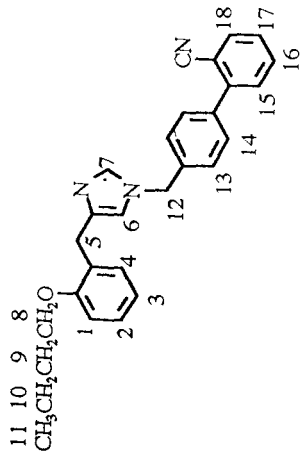
6,87	triplet n°2	H ₃
6,97	doublet n°3	H ₁
7,11-7,13	multiplet n°4	H ₂ et H ₄

Isomère π

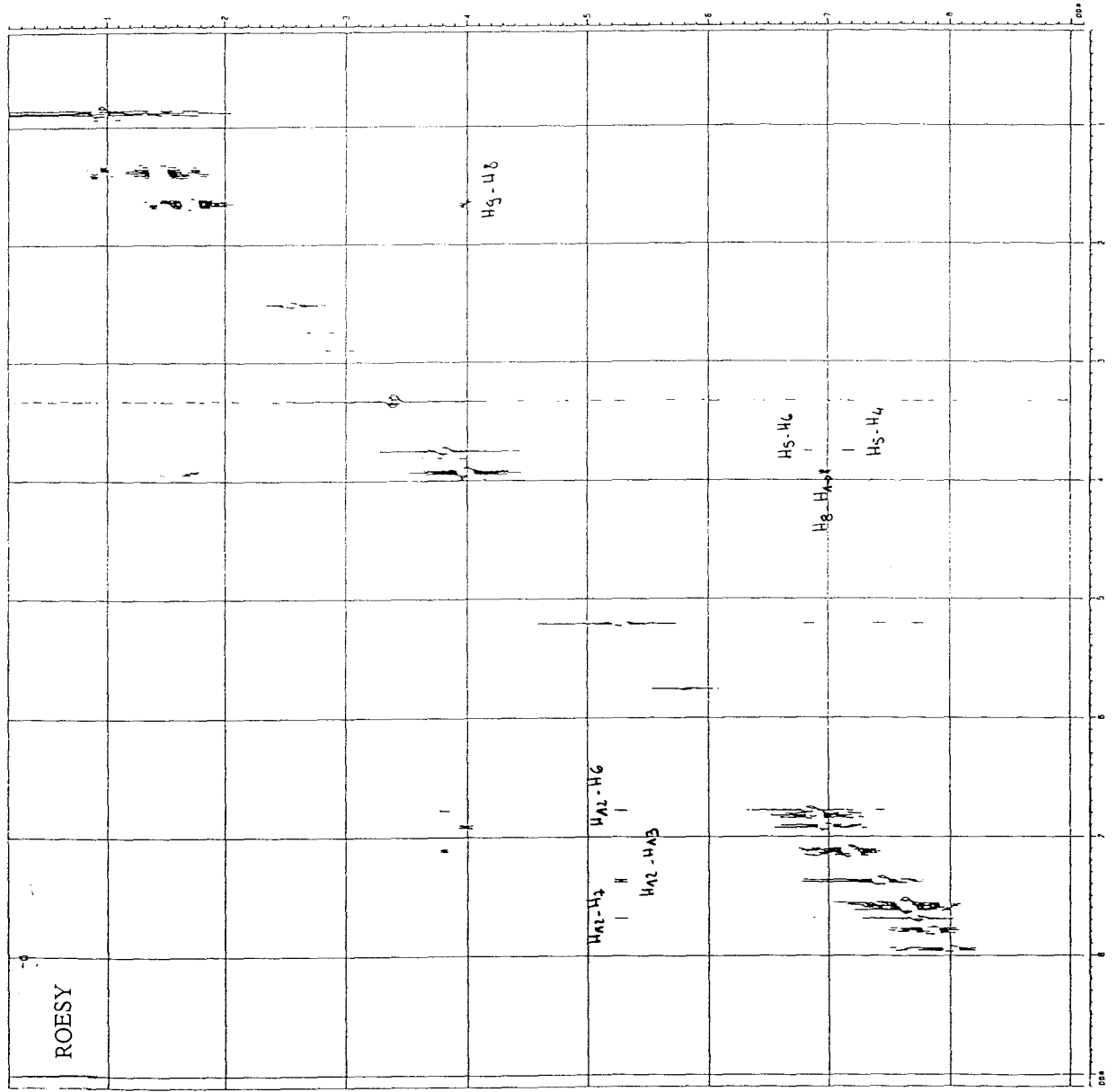
Pour cet isomère, les interactions dipolaires ne permettent pas vraiment de conclure car les protons H₁ et H₄ ont des déplacements chimiques presque identiques et ne peuvent pas être différenciés. Mais par analogie avec l'isomère I où le proton H₃ est moins déblindé que H₂, on peut avancer que la bonne combinaison est la première, c'est à dire :

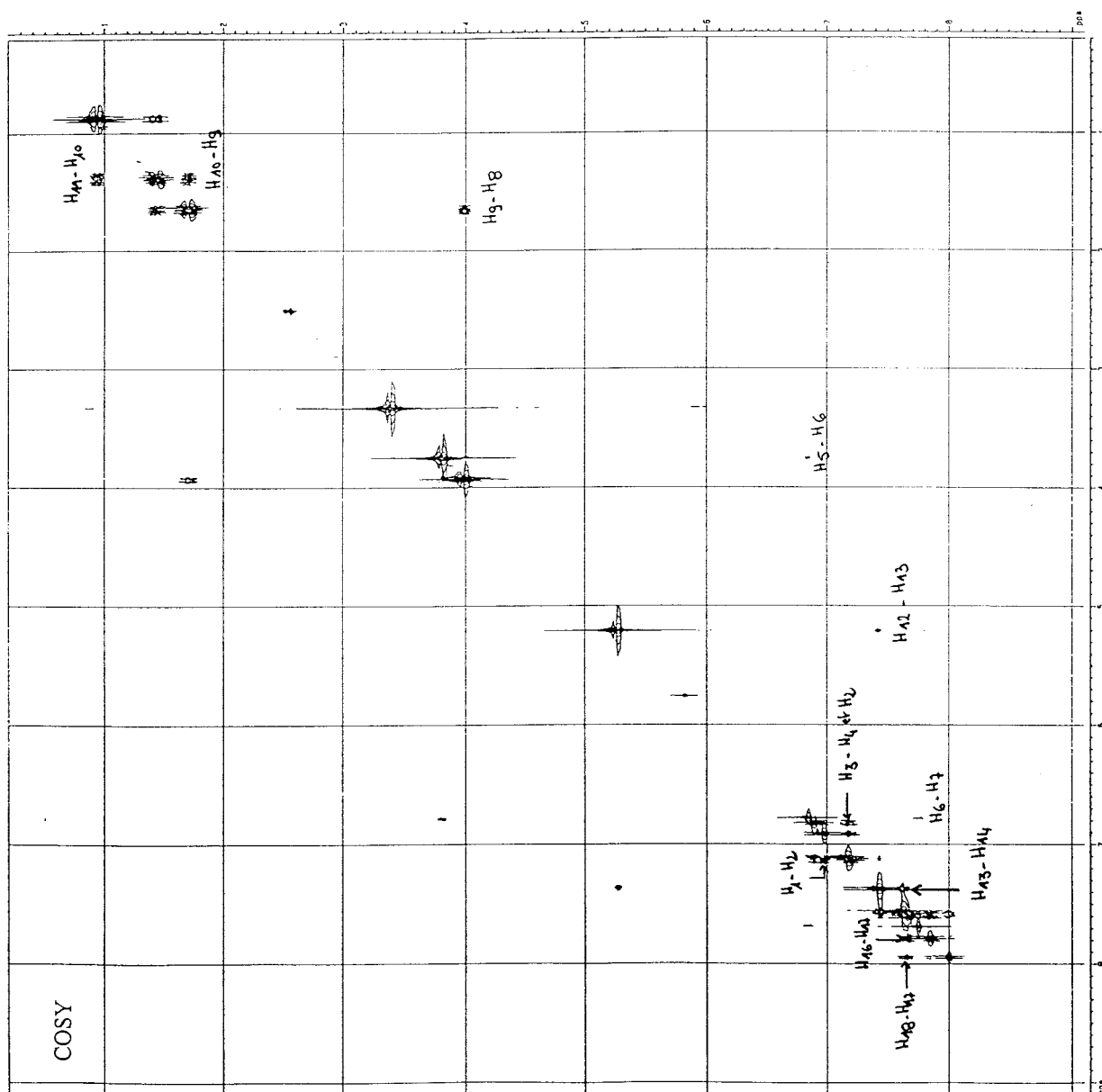
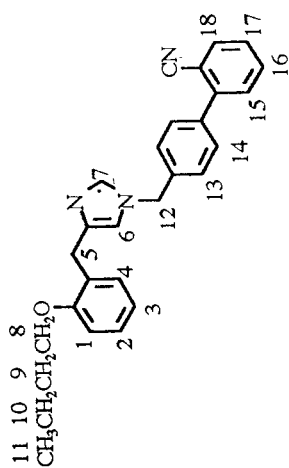
6,82	triplet n°2	H ₃
6,93-6,95	multiplet n°3	H ₁ et H ₄
7,15-7,16	multiplet n°4	H ₂

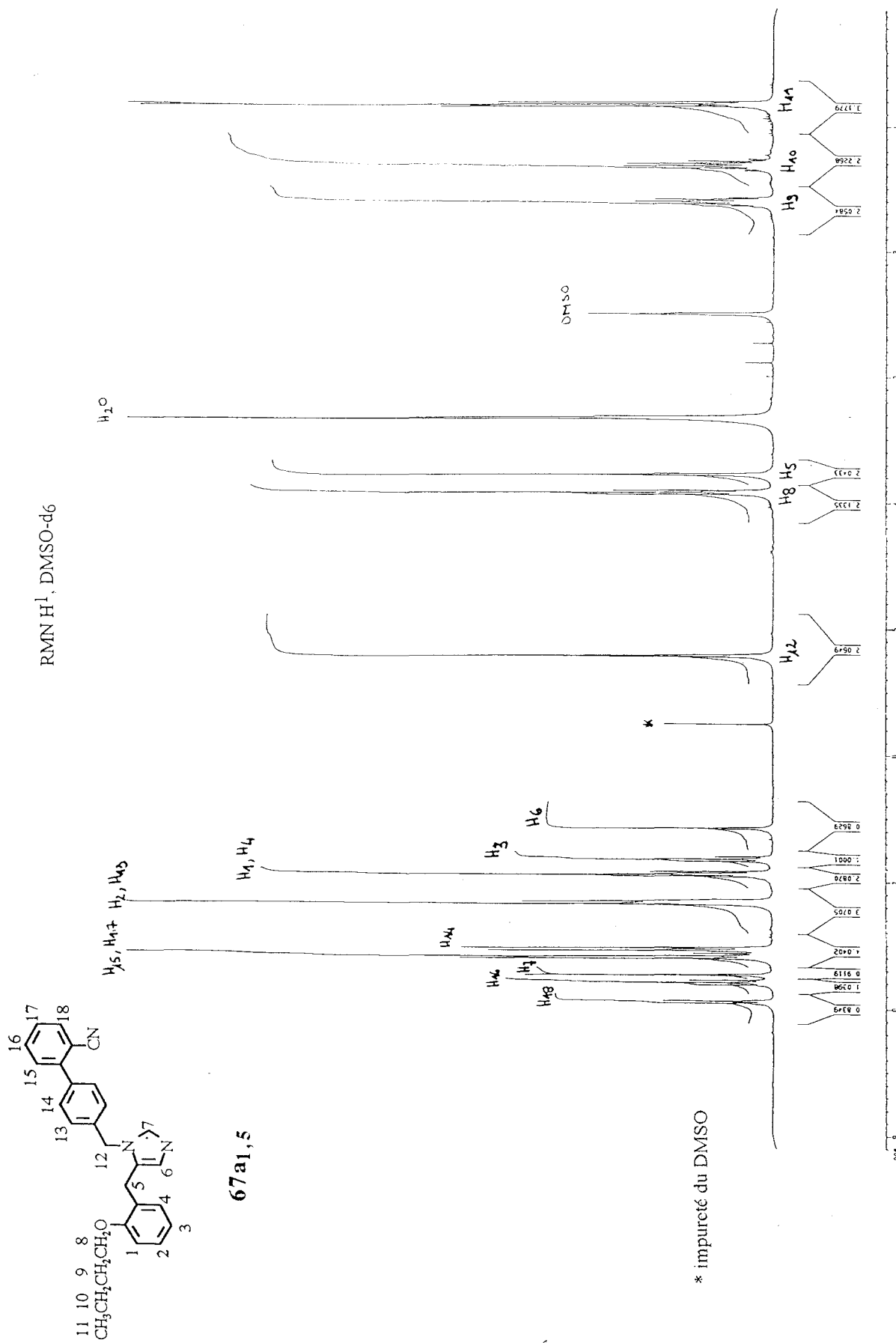




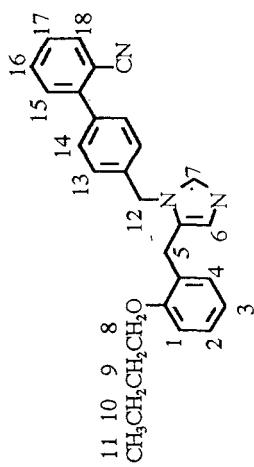
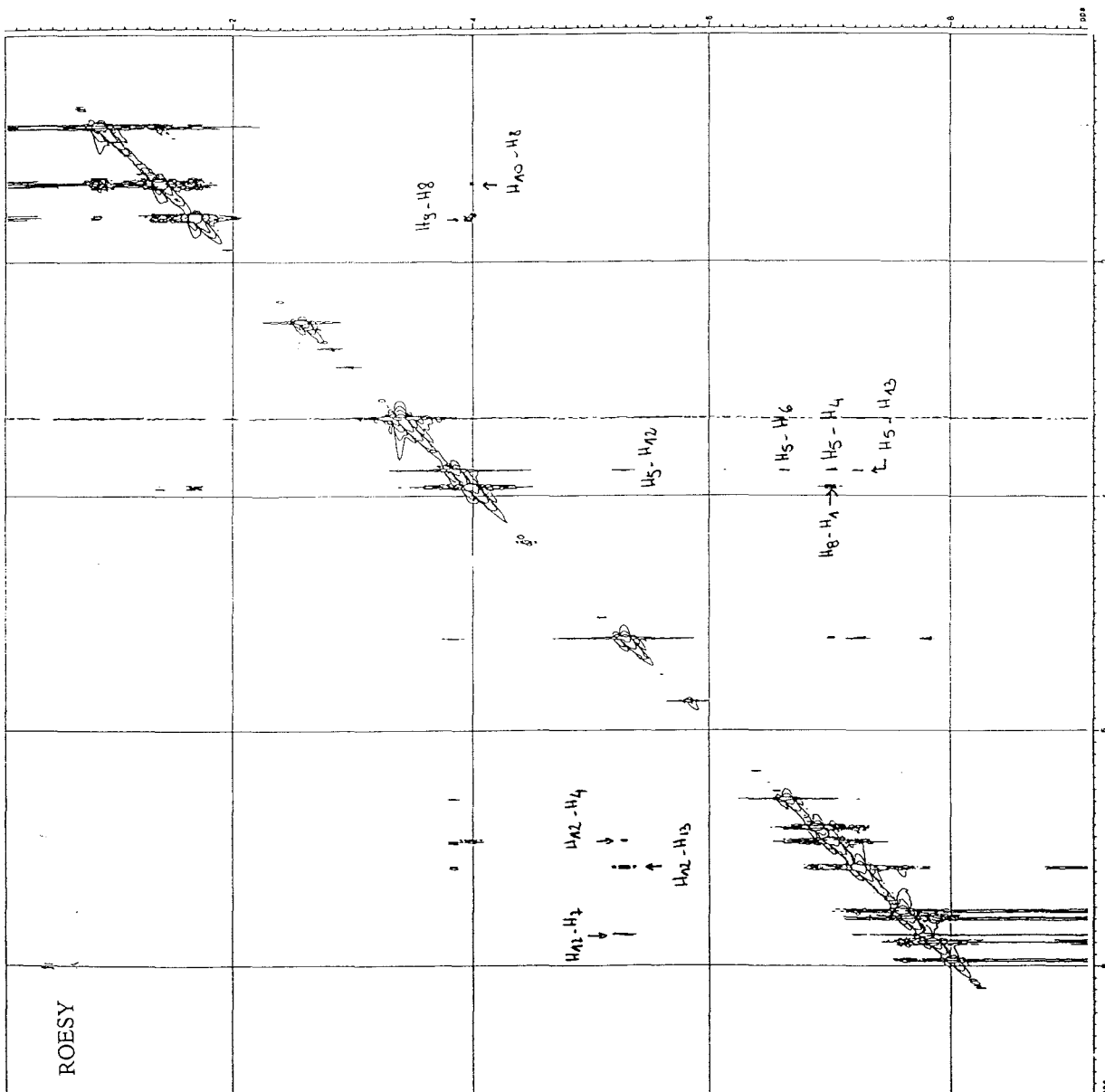
67a1,4



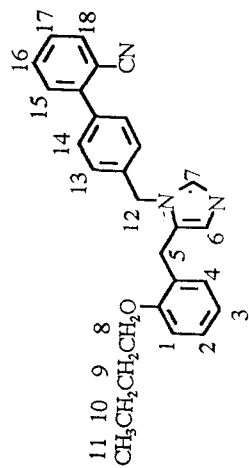
**67a1,4**



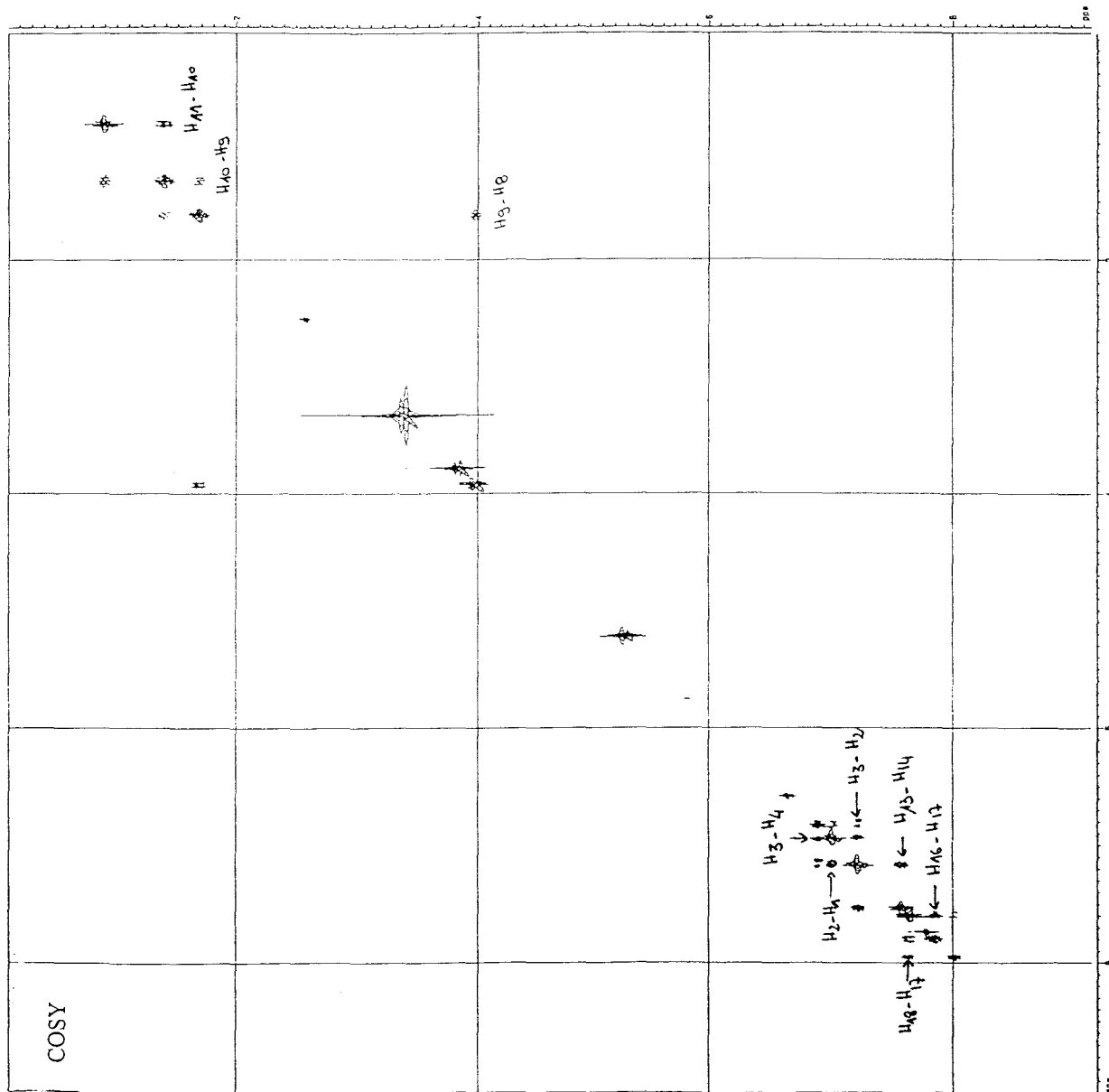
Spectre 4



67a1,s



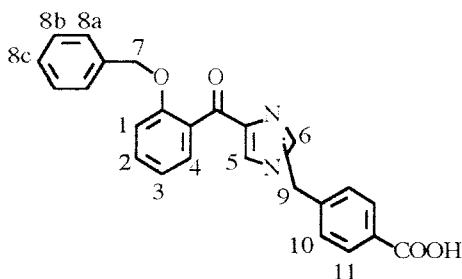
67a1,s



4.2.3.2 Etude des isomères (2-benzyloxyphényl)-[1-(4-carboxybenzyl)imidazol-4 et 5-yl] cétones **80a₁**, **4-80a₁**, **5**

La même démarche que précédemment a été suivie pour déterminer la structure de ces deux composés : RMN H^1 1D, expériences COSY et NOESY.

1- Identification des isomères



Expériences NOESY (cf spectres 8 et 11, pages 167 et 170)

L'absence d'interaction dipolaire entre les protons H₉ (singulet à 5,70 ppm) et le proton H₅ (singulet à 7,40 ppm) pour le composé correspondant au spectre 8 permet de dire sans aucune ambiguïté qu'il s'agit de l'isomère π . Par conséquent, l'autre composé (spectre 11) est l'isomère τ .

Remarque : L'identification de l'isomère τ uniquement à partir de son spectre NOESY est impossible car les deux protons imidazoliques H₅ et H₆ ne sont pas différenciables, ils présentent des déplacements chimiques voisins. L'interaction entre H₁₂ et H₅ est masquée par celle entre H₁₂ et H₆

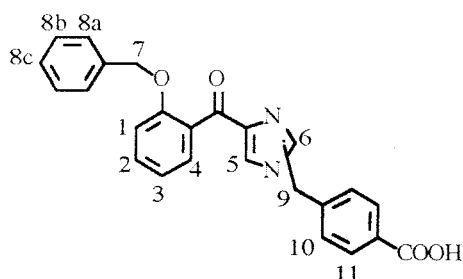
2- Identification des protons aromatiques

Expériences RMN H¹ 1D

L'attribution des protons aromatiques à partir de la RMN 1D (cf spectres 7 et 10, pages 166 et 169) est particulièrement délicate. Les études COSY et NOESY ont permis de résoudre ce problème.

Expériences COSY

Pour les deux isomères, les signaux et interactions scalaires observables en théorie sont les suivants :

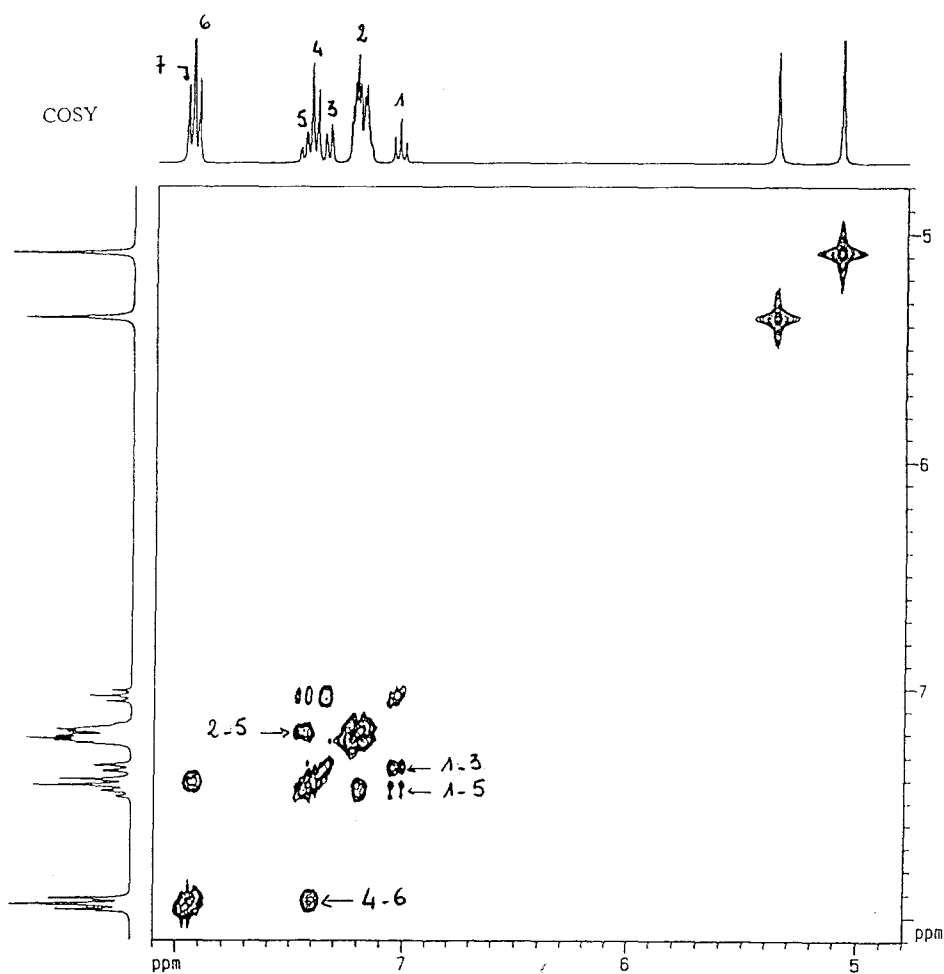
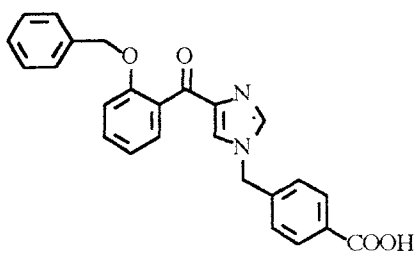


Protons	Signaux en RMN 1D et intégrations	Nombre de tâches de corrélation en COSY	Protons corrélés
H ₁	(d, 1H)	1	H ₂
H ₂	(t, 1H)	2	H ₁ , H ₃
H ₃	(t, 1H)	2	H ₂ , H ₄
H ₄	(d, 1H)	1	H ₃
H ₅	(s, 1H)	0	-
H ₆	(s, 1H)	0	-
H _{8a}	(d, 2H)	1	H _{8b}
H _{8b}	(t, 2H)	2	H _{8a} , H _{8c}
H _{8c}	(t, 1H)	1	H _{8b}
H ₁₀	(d, 2H)	1	H ₁₁
H ₁₁	(d, 2H)	1	H ₁₀

Expérimentalement, les signaux et interactions scalaires observés sont :

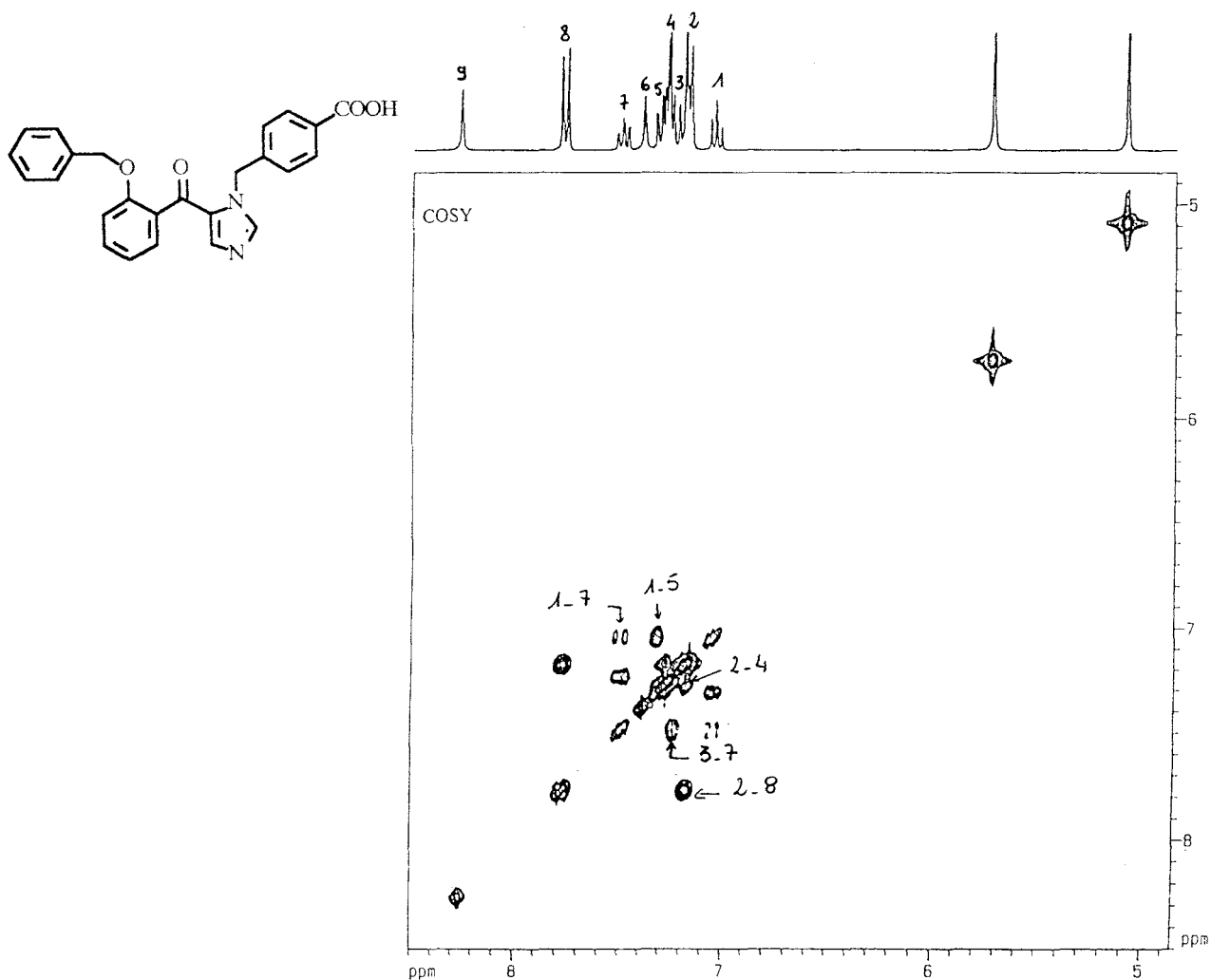
Isomère τ

Déplacements chimiques (ppm)	Signaux en RMN 1D et intégrations	Nombre de tâches de corrélation en COSY	Massifs corrélés
7,03	n°1 (t, 1H)	2	n°3, n°5
7,15-7,30	n°2 (multiplet, 6H)	1	n°5
7,35	n°3 (dd, 1H)	1	n°1
7,41	n°4 (d, 2H)	1	n°6
7,45	n°5 (td, 1H)	2	n°1, n°2
7,84	n°6 (multiplet, 3H)	1	n°4
7,88	n°7 (s, 1H)	0	-



Isomère π

Déplacements chimiques (ppm)	Signaux en RMN 1D et intégrations	Nombre de tâches de corrélation en COSY	Massifs corrélés
7,05	n°1 (t, 1H)	2	n°7, n°5
7,1-7,2	n°2 (multiplet, 3H)	2	n°4, n°8
7,25	n°3 (d, 1H)	1	n°7
7,27	n°4 (multiplet, 3H)	1	n°2
7,32	n°5 (dd, 1H)	1	n°1
7,40	n°6 (s, 1H)	0	-
7,48	n°7 (td, 1H)	2	n°1, n°3
7,78	n°8 (d, 2H)	1	n°2
8,26	n°9 (s, 1H)	0	-



A ce niveau, certains protons peuvent être identifiés sans ambiguïté. En revanche pour les protons du noyau phénolique, il existe comme dans l'exemple précédent deux combinaisons possibles.

Isomère τ

Déplacements chimiques (ppm)	Signaux en RMN 1D et intégrations	Protons	Commentaires
7,03	n°1 (t, 1H)	H3 ou H2 ?	2 possibilités*
7,15-7,30	n°2 (multiplet, 6H)	H1 ou H4 ? + H8a, H8b, H8c	2 possibilités*
7,35	n°3 (dd, 1H)	H4 ou H1 ?	2 possibilités*
7,41	n°4 (d, 2H)	H10	
7,45	n°5 (td, 1H)	H2 ou H3 ?	2 possibilités*
7,84	n°6 (multiplet, 3H)	H11, H5	
7,88	n°7 (s, 1H)	H6	

* Les deux combinaisons possibles sont :

combinaison 1		combinaison 2	
triplet n°1	H3	triplet n°1	H2
multiplet n°2	H1	multiplet n°2	H4
multiplet n°3	H4	multiplet n°3	H1
triplet n°5	H2	triplet n°5	H3

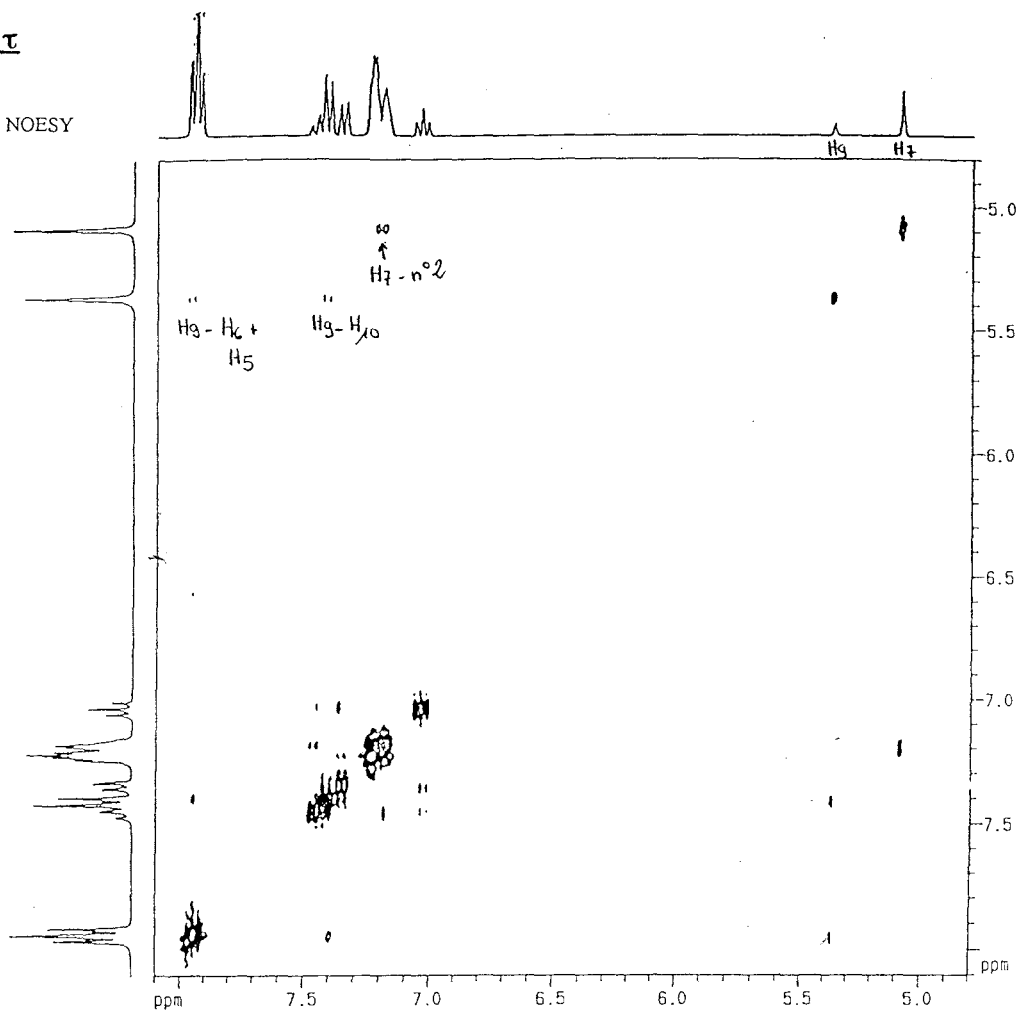
Isomère π

Déplacements chimiques (ppm)	Signaux en RMN 1D et intégrations	Nombre de tâches de corrélation en COSY	Commentaires
7,05	n°1 (t, 1H)	H3 ou H2 ?	2 possibilités*
7,1-7,2	n°2 (multiplet, 3H)	H8a, H10	
7,25	n°3 (d, 1H)	H1 ou H4 ?	2 possibilités*
7,27	n°4 (multiplet, 3H)	H8b, H8c	
7,32	n°5 (dd, 1H)	H4 ou H1 ?	2 possibilités*
7,40	n°6 (s, 1H)	H5	
7,48	n°7 (td, 1H)	H2 ou H3 ?	2 possibilités*
7,78	n°8 (d, 2H)	H11	
8,26	n°9 (s, 1H)	H6	

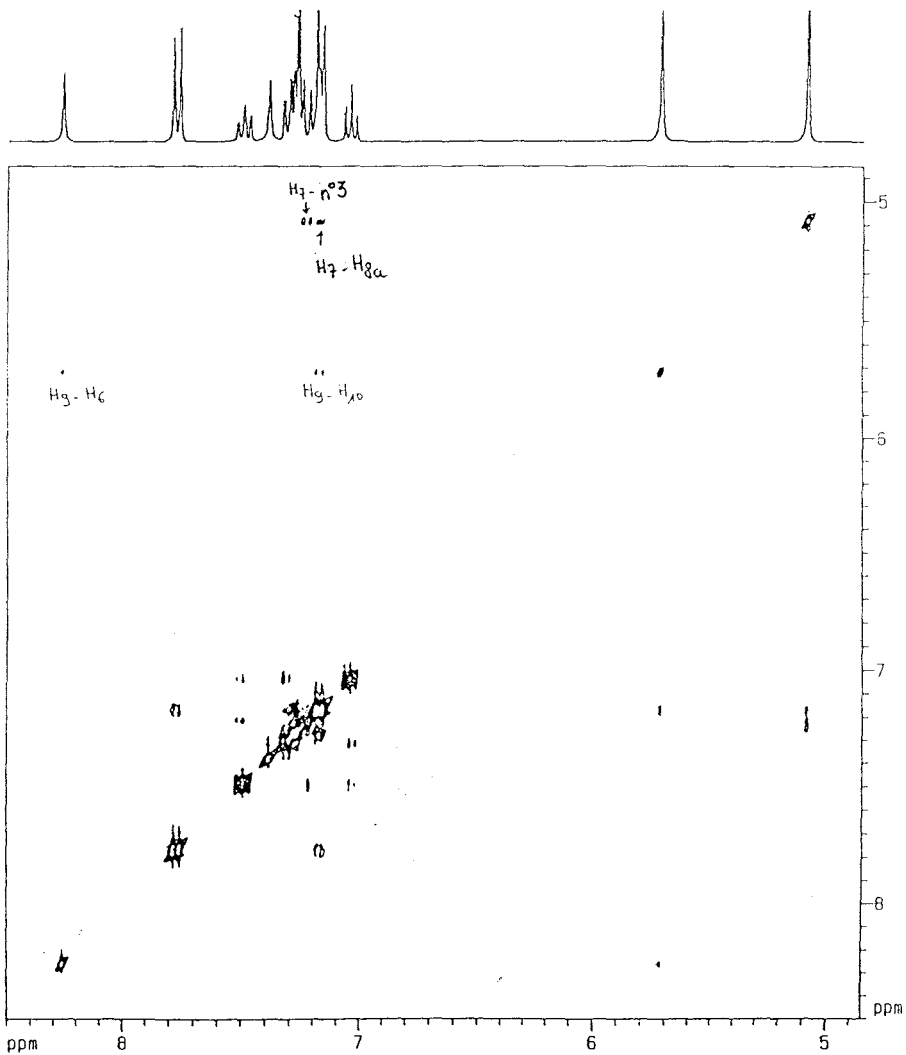
* Les deux combinaisons possibles sont :

combinaison 1		combinaison 2	
triplet n°1	H3	triplet n°1	H2
doublet n°3	H1	multiplet n°3	H4
doublet n°5	H4	multiplet n°5	H1
triplet n°7	H2	triplet n°7	H3

NOESY

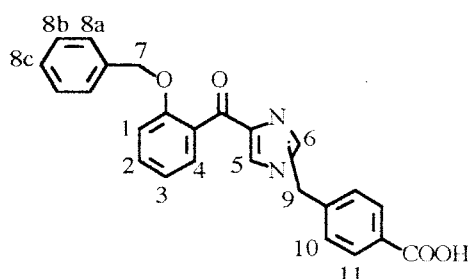


Isomère π



Les études NOESY permettent de surmonter cette difficulté.

Expériences NOESY



Les interactions dipolaires observées pour chacun des isomères sont :

Isomère τ

H7 - multiplet n°2 : H7 - H8a
 +
H7 - soit H4 si combinaison 1
soit H1 si combinaison 2

H9 - H10

H9 - H6 et H5

Isomère π

H7 - H8a

H7 - doublet n°3 : soit H4 si combinaison 1
soit H1 si combinaison 2

H9 - H10

H9 - H6

D'après les structures, les protons H7 peuvent interagir avec le proton H1, mais pas avec H4. Nous pouvons donc définir avec précision la structure de chacun des isomères.

Isomère τ

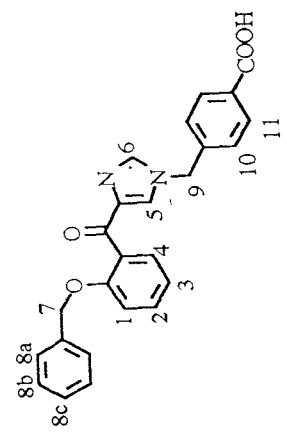
7,03	triplet n°1	H3
7,15-7,30	multiplet n°2	H1
7,35	doublet n°3	H4
7,45	triplet n°5	H2

Isomère π

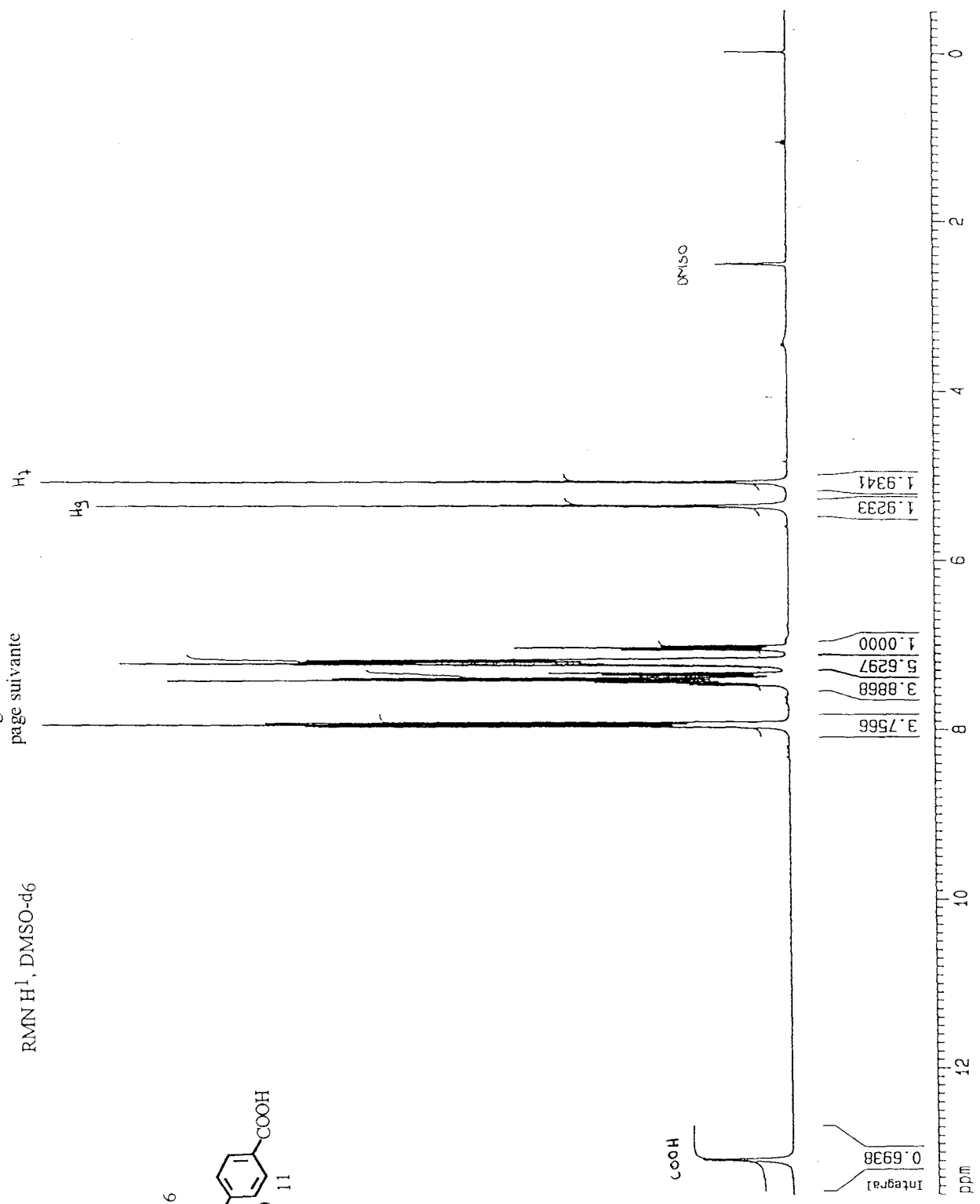
7,05	triplet n°1	H3
7,25	doublet n°3	H1
7,32	doublet n°5	H4
7,48	triplet n°7	H2

voir agrandissement
page suivante

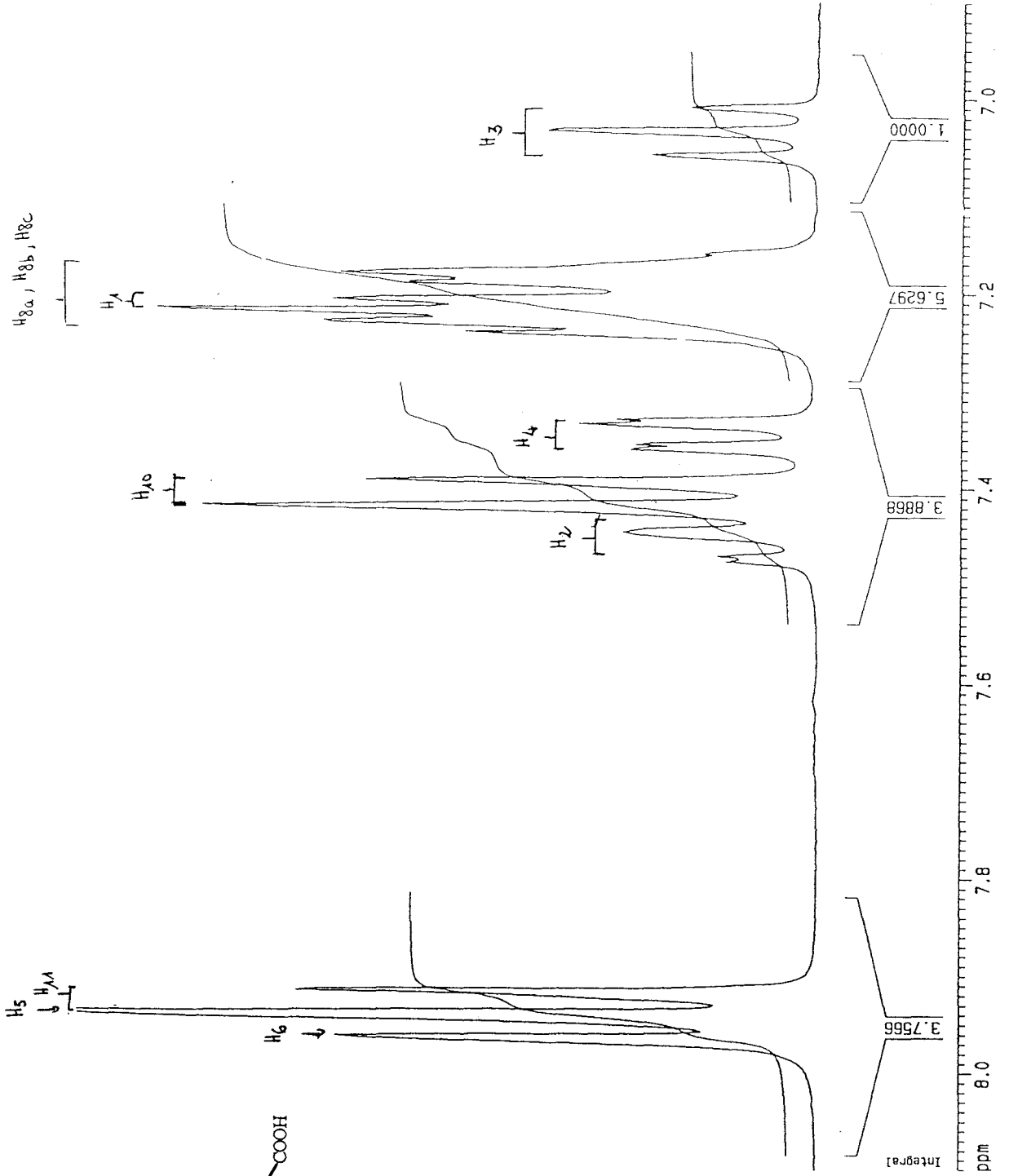
RMN H¹, DMSO-d₆

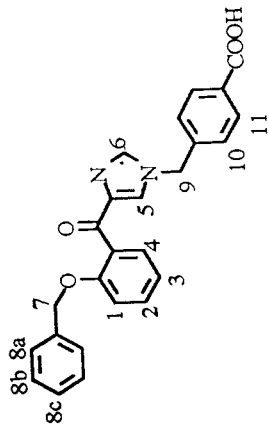
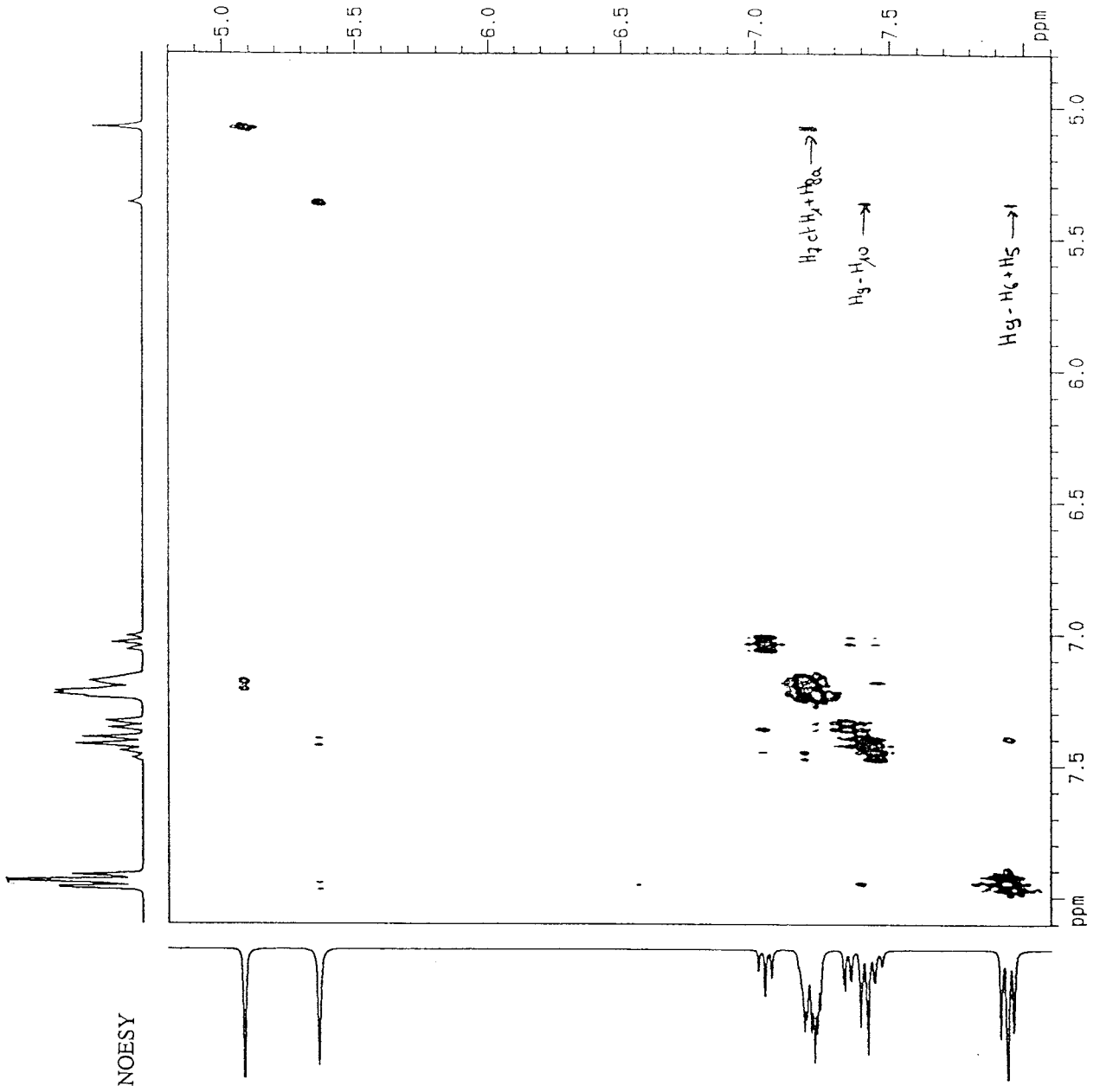


80a_{1,4}

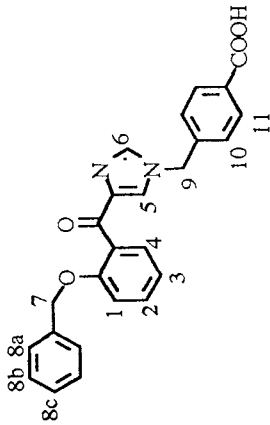
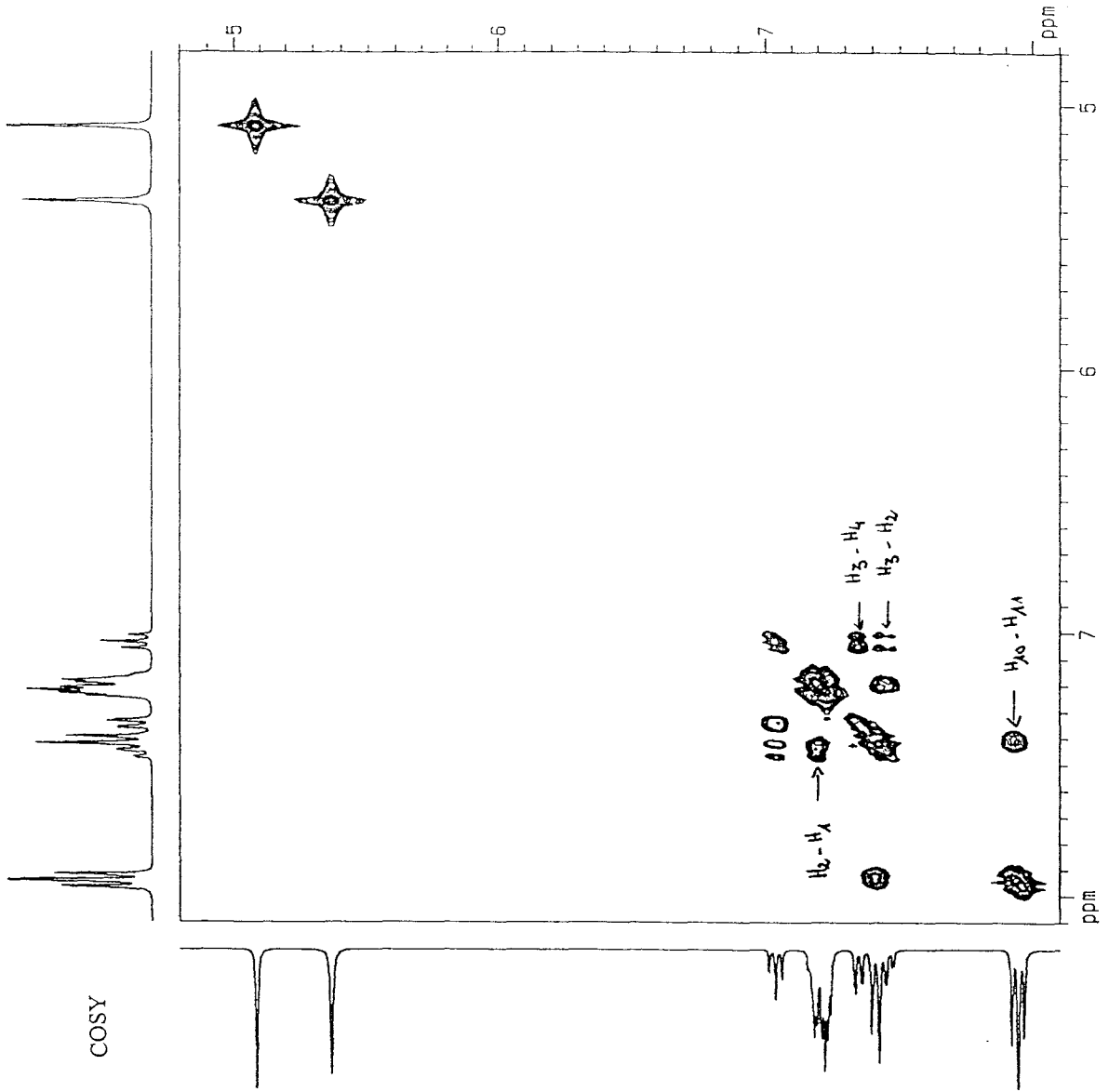


Spectre 7

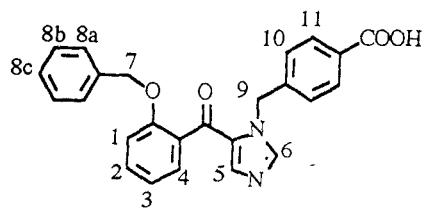




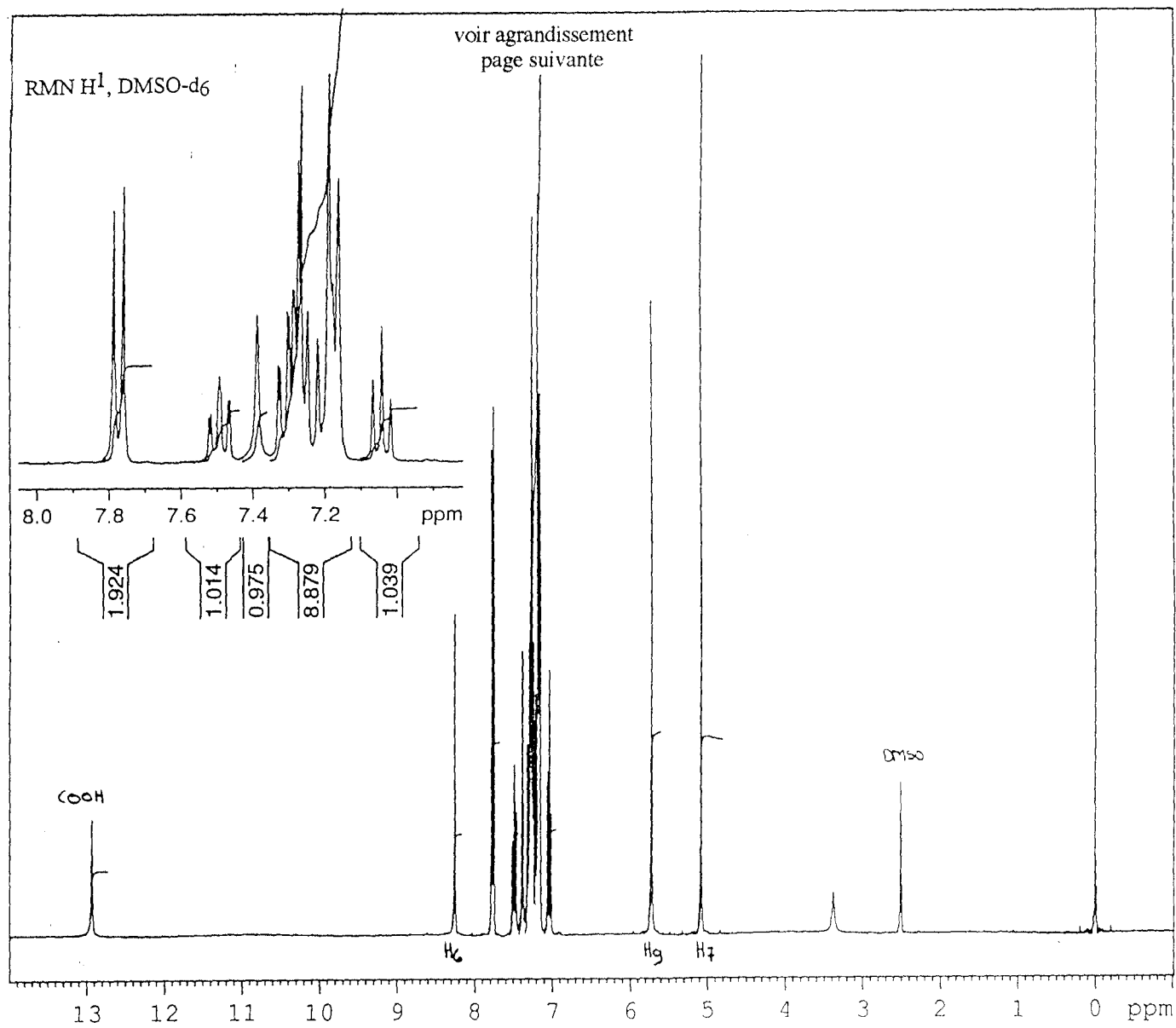
80a_{1,4}



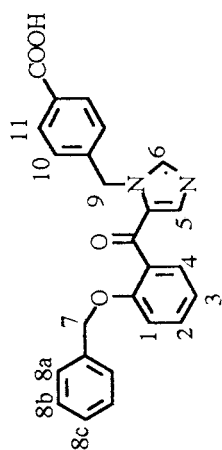
80a1,4



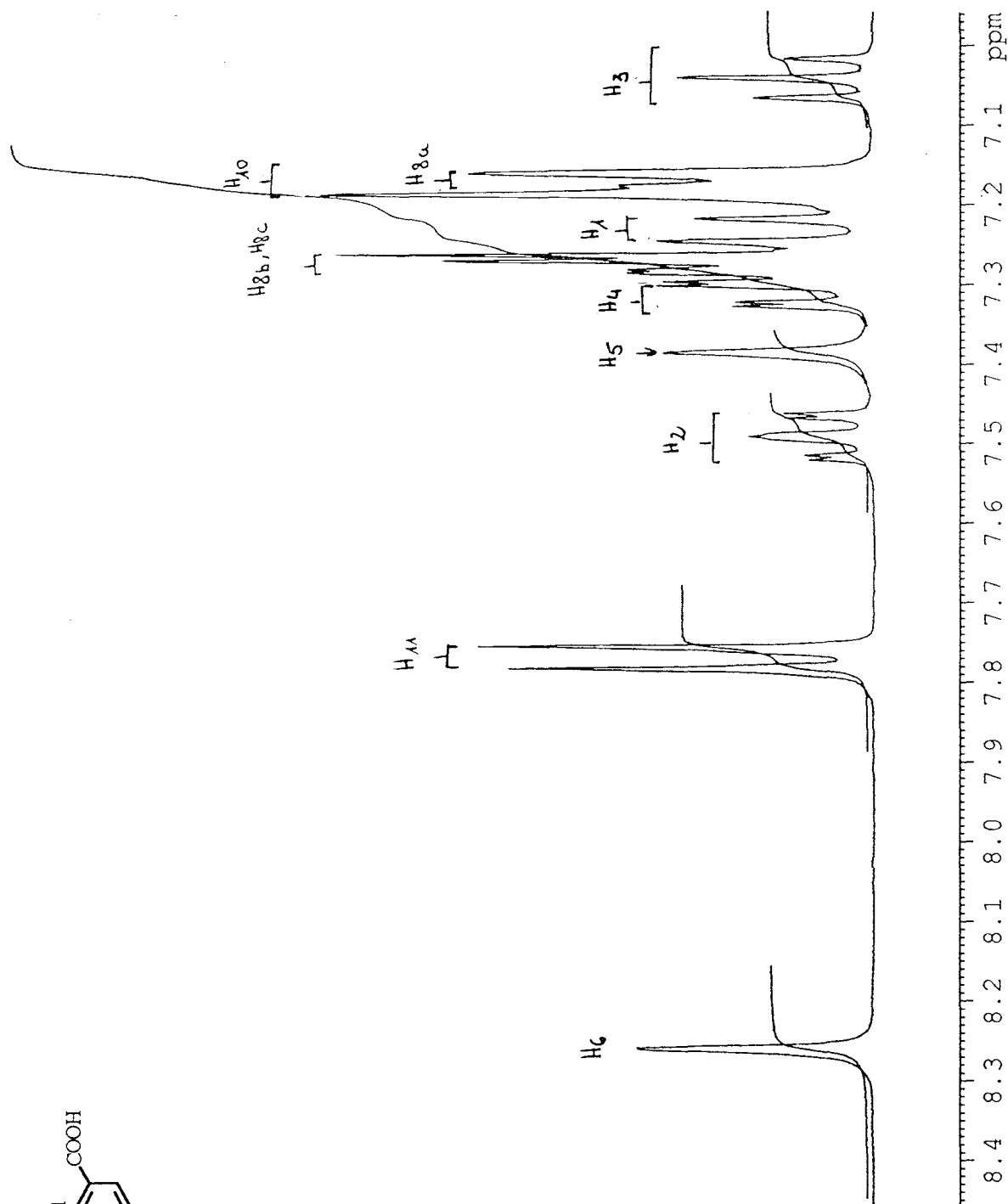
80a_{1,5}



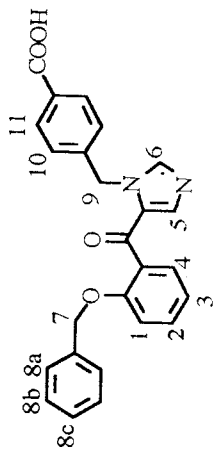
Spectre 10



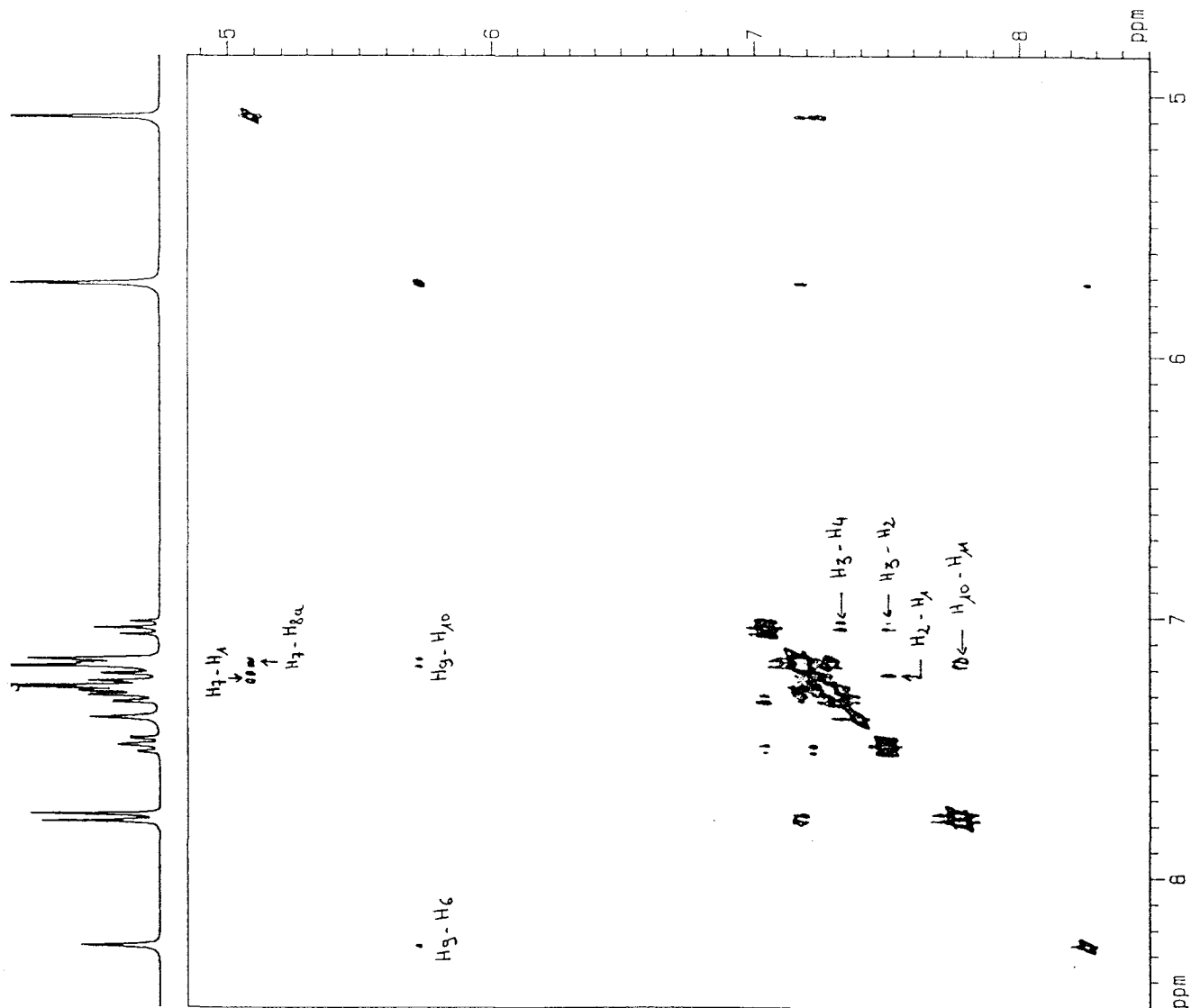
80a1,5

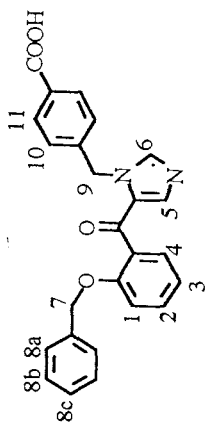
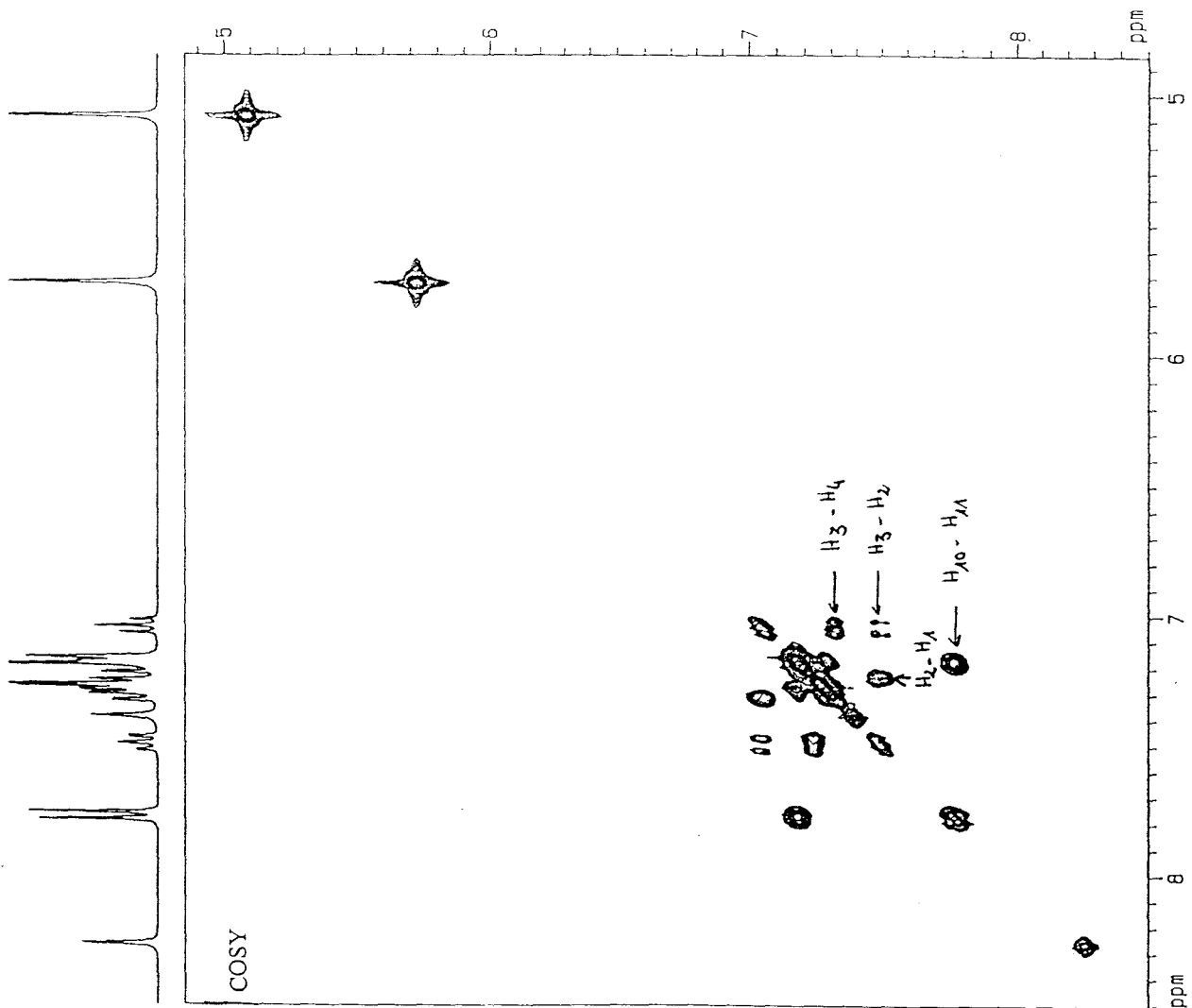


NOESY



80a1,5





80a1,5

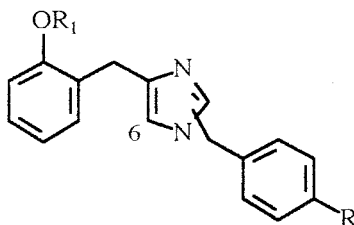
4.2.3.3. Conclusion

Les études effectuées sur ces deux couples d'isomères nous ont aidés dans la détermination des structures des autres représentants de ces familles.

Nous avons également noté que certains éléments observables en RMN 1D pouvaient nous permettre de différencier les isomères sans nécessairement recourir aux études RMN 2D.

Isomères (2-alkoxybenzyl) imidazoles N-substitués (dérivés méthyléniques)

Nous avons constaté que :



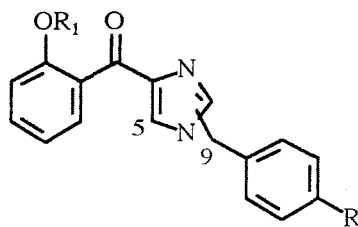
l'isomère τ correspond au composé dont le signal en RMN 1D du proton imidazolique H₆ est le plus déblindé

Nous nous sommes servis notamment de ce résultats pour différencier les isomères **69b_{1,4}** -**69b_{1,5}** où l'hydroxyle phénolique est protégé par le groupe MEM.

R ₁	R	Déplacement chimique du proton H ₆ (ppm)			
		Isomère τ		Isomère π	
C ₄ H ₉	COOCH ₃	66a_{1,4}	6,70	66a_{1,5}	6,56
C ₄ H ₉	-C ₆ H ₄ (CN)	67a_{1,4}	6,78	67a_{1,5}	6,58
C ₄ H ₉	-C ₆ H ₄ (TT)*	68a_{1,4}	6,61	68a_{1,5}	6,55
MEM	COOCH ₃	69a_{1,4}	6,72	69a_{1,5}	6,55

* TT : triphénylméthyltétrazole

Isomères (2-alkoxybenzyl)-[(1-benzyl)imidazolyl] cétones (dérivés cétoniques)



Nous avons constaté que :

l'isomère τ correspond au composé dont le signal en RMN 1D du proton imidazolique H5 est le plus déblindé et celui des protons H9 le moins déblindé.

		Déplacements chimiques (ppm)					
		Isomère τ			Isomère π		
R ₁	R		H ₉	H ₅		H ₉	H ₅
CH ₂ C ₆ H ₅	COOH	80a_{1,4}	5,34	7,88	80a_{1,5}	5,70	7,40
CH ₂ C ₆ H ₅	COOH	81a_{1,4}	5,22	7,84	81a_{1,5}	5,61	7,1-7,3

4.2.4. Synthèses régiosélectives

Après les synthèses non régiosélectives présentées précédemment, nous avons entrepris la synthèse régiosélective des isomères de position τ et π .

La stratégie de synthèse envisagée est commune pour les deux isomères (cf schéma 13). Il s'agit dans un premier temps d'alkyler régiosélectivement des dérivés de structure générale formylimidazole. La seconde étape est la synthèse des (2-alkoxyphényl)-imidazol-4(5)yl méthanols N substitués par réaction de Grignard.

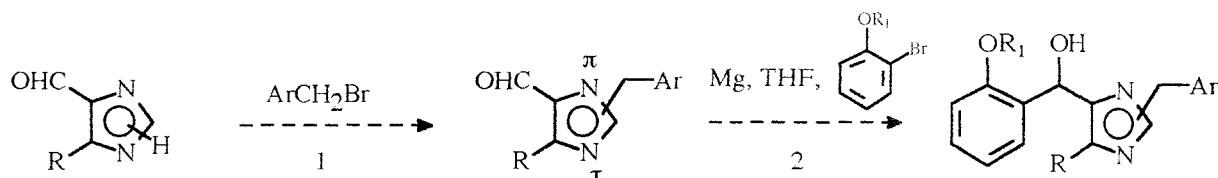


Schéma 13

Les différences entre les voies envisagées se situent dans la première partie, c'est-à-dire dans la méthode utilisée pour orienter la N-alkylation de l'imidazole.

Les deux premières voies décrites, l'une concernant l'obtention des isomères 1,5 et l'autre celle des isomères 1,4 ont pour base une réflexion commune. Cependant, ces synthèses n'ont pu être menées à leur terme par manque de temps. Seule la première étape de la première voie a été effectivement réalisée.

En revanche, une seconde approche a été menée à son terme et a conduit à la synthèse du composé 2-butyl-4-chloro-5-(2-hydroxybenzyl)-1-[[2'-(1H-tétrazol-5-yl)biphényl-4-yl]méthyl]imidazole. Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire par Yous S (Yous, travaux non publiés).

4.2.4.1. Première approche d'alkylation régiosélective envisagée

L'idée est de protéger l'azote à ne pas substituer par un groupe labile, de procéder ensuite à l'alkylation de l'azote libre, puis enfin de libérer l'azote protégé. Cette approche peut s'appliquer à la synthèse des deux isomères de position.

Synthèse des isomères 1,5 (ou π)

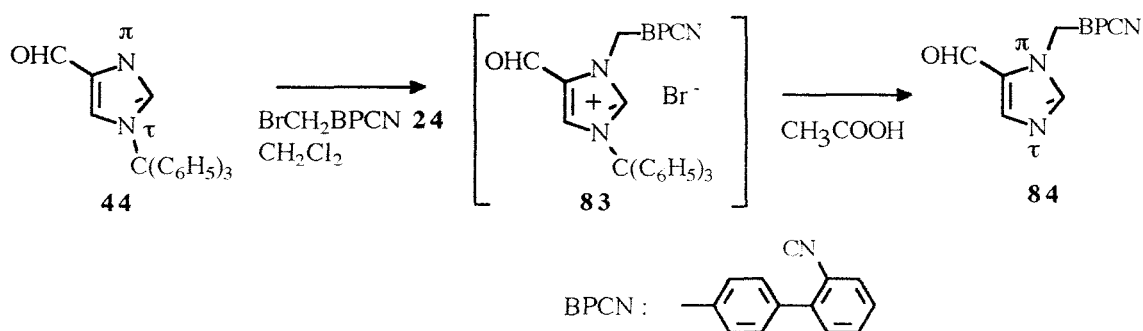


Schéma 14

Synthèse du composé 84

La matière première de cette synthèse est le composé **44** où l'azote τ est tritylé. Nous savons que le groupe protecteur trityle se fixe sélectivement sur l'azote τ (voir page 128), qu'il n'atténue pas la réactivité de l'azote π (Jones et al., 1987) et qu'il est clivable en milieu acide ou par hydrogénation catalytique.

La formation de l'imidazolium **83** est réalisée par addition du dérivé halogéné **24** au composé **44** dissous dans le dichlorométhane à température ambiante. Le composé **83** précipite dans le milieu réactionnel, il est recueilli par filtration et remis directement en réaction. La détritylation est réalisée en présence d'acide chlorhydrique 1N dans le THF. Le rendement global à partir du composé **44** est de 75%.

Synthèse des isomères 1,4 (ou τ)

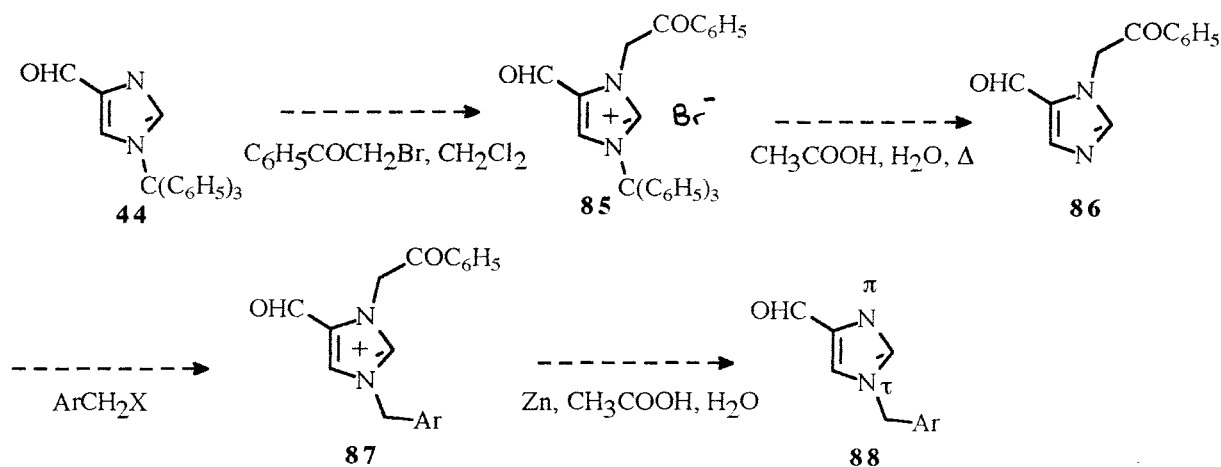


Schéma 15

L'obtention sélective de l'isomère 1,4 est plus délicate. Il n'existe pas à notre connaissance de groupe protecteur qui se fixe sélectivement sur l'azote π . Pour le protéger, il faut donc procéder en deux étapes à partir du composé **44** où l'azote τ est déjà tritylé :

- 1- alkylation de l'azote π avec formation de l'imidazolium **85**,
- 2- déprotection sélective de l'azote τ en milieu acide ou par hydrogénation catalytique.

Les deux étapes suivantes consistent à alkyler le composé **86** avec obtention d'un intermédiaire imidazolium **87**, puis à cliver le groupe protecteur fixé sur l'azote π .

Ce groupe protecteur doit résister aux conditions de clivage du trityle et doit pouvoir être clivé ensuite. Le groupe phénacyle pourrait convenir, il peut théoriquement être clivé en milieu acide en présence de zinc (Zn, CH₃COOH) (Jones et al., 1987).

4.2.4.2. Synthèse du 2-butyl-4-chloro-5-(2-hydroxybenzyl)-1-[[2'-(1H-tétrazol-5-yl)biphényl-4-yl]méthyl]imidazole **90**

Cette voie de synthèse exploite le fait que l'alkylation du composé 2-butyl-4(5)-chloroimidazole-5(4)-carboxaldéhyde **5** donne majoritairement l'isomère 1,5, résultat mis en évidence au cours de la synthèse du DuP 753 (cf page 112).

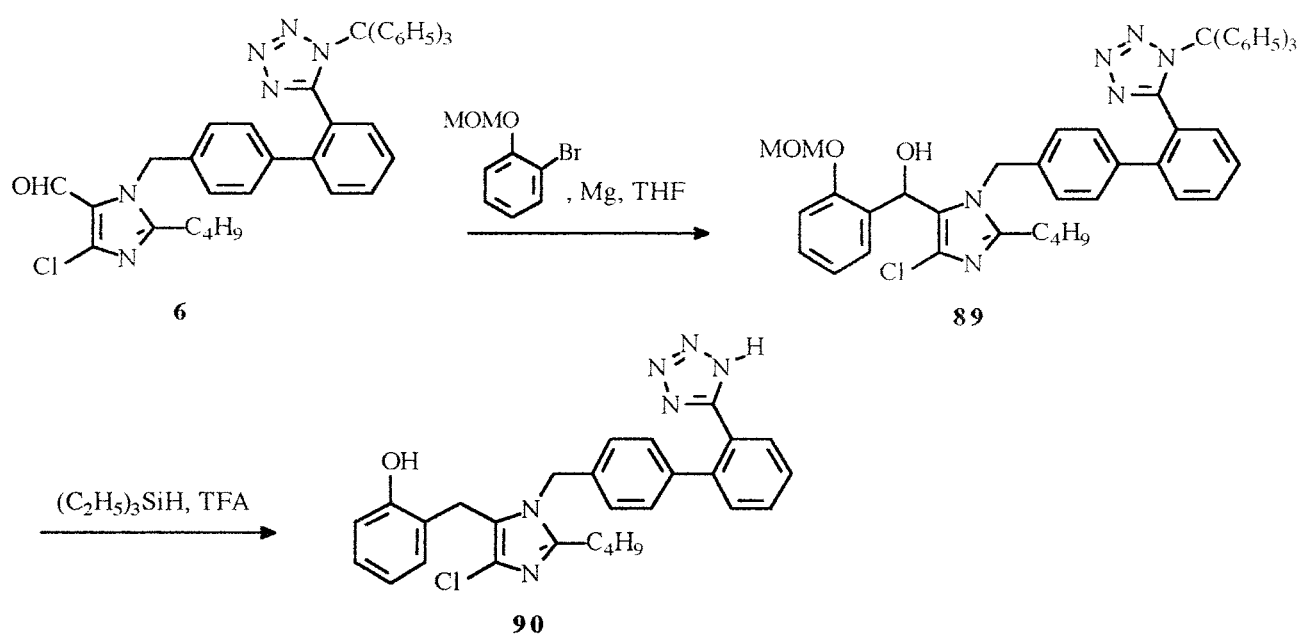
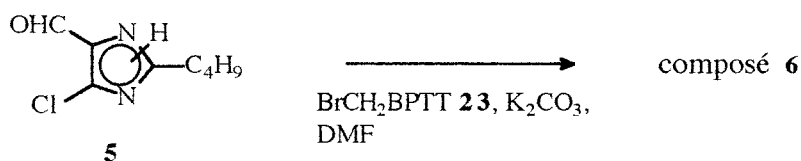


Schéma 16

MOM = CH₃OCH₂

Synthèse du composé **6** à partir du composé **5**



La matière première **6** est un intermédiaire réactionnel pour l'obtention du DuP 753. Sa synthèse a été décrite à cette occasion (cf page).

Synthèse du composé **89**

Le composé **89** est obtenu par réaction de Grignard entre le composé **6** et l'organomagnésien de l'orthobromophénol O-protégé par un groupe méthoxyméthyle (MOM). Les conditions réactionnelles sont identiques à celles utilisées pour la synthèse des dérivés **45** (cf page 129),

c'est-à-dire 2 eq d'orthobromophénol O-protégé et de magnésium pour 1 eq du composé **5**. Le THF est utilisé comme solvant. Le rendement de cette réaction est de 50%.

Synthèse du composé 90

La réduction de l'alcool méthylique du dérivé **89** est réalisée par le triéthylsilane (10 eq) en présence d'un large excès d'acide trifluoroacétique (30 eq) dans le dichlorométhane (Hong et al., 1994). Dans ces conditions (milieu acide), le trityle fixé sur le tétrazole et le groupe MOM sont clivés. Le composé **90** est obtenu avec un rendement de 68%.

Suite aux difficultés rencontrées au cours des synthèses non régiosélectives, ces trois synthèses régiosélectives offrent des alternatives très intéressantes. Pour la préparation des isomères 1,5, nous avons vérifié la faisabilité des deux voies proposées (schémas 14 et 16). En revanche, la synthèse des isomères 1,4 est plus délicate et demande à être explorée plus précisément, en particulier le choix du groupe protecteur de l'azote π (schéma 15).

Après l'exposé du travail de synthèse chimique, nous allons maintenant nous intéresser au développement de divers tests biologiques utilisés pour déterminer le profil pharmacologique des molécules originales synthétisées.

EVALUATION PHARMACOLOGIQUE

L'objet de notre travail est la synthèse et l'évaluation pharmacologique d'antagonistes potentiels des récepteurs de l'Ang II. Après synthèse des molécules, leur capacité à interagir avec la cible visée doit alors être étudiée. Pour cela, des tests sur matériel biologique sont nécessaires. Après avoir exposé dans le chapitre précédent le travail de synthèse chimique, nous allons maintenant aborder le développement des tests biologiques que nous avons mis en oeuvre pour l'évaluation pharmacologique des molécules.

Avant d'entrer dans la description de ces tests, nous allons rappeler quelques généralités sur les approches expérimentales utilisées pour définir les propriétés pharmacologiques d'une nouvelle molécule, en se limitant au cas des interactions ligand - récepteur, qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de ce travail.

5.1. GENERALITES

Les informations recherchées sont de deux types :

- les premières concernent l'étude de la liaison du ligand sur le récepteur. Ces études de liaison (binding) peuvent être réalisées soit sur le récepteur cloné, soit sur des fragments membranaires, soit sur des cellules isolées.
- les secondes concernent les effets engendrés par cette liaison. Pour effectuer ces études fonctionnelles, le modèle doit permettre d'étudier une réponse induite par la stimulation du récepteur. Ces études peuvent donc être réalisées au niveau microscopique sur des cellules isolées ou au niveau macroscopique sur l'organe isolé ou sur l'organisme entier.

5.1.1. Etudes de liaison (binding)

Les techniques de liaison sont très utiles pour caractériser l'affinité d'une molécule vis-à-vis d'une série de récepteurs connus, définissant ainsi sa sélectivité potentielle, mais sans préjuger de sa nature agoniste ou antagoniste. En effet, seule la liaison ligand - récepteur est appréciée et non l'effet engendré par cette liaison.

5.1.1.1. Notions de liaison spécifique et liaison non spécifique

Avant d'étudier les aspects techniques, il convient de différencier les "sites de liaison spécifiques" et "les sites de liaison non spécifiques".

Des critères de liaison spécifiques ont été définis et extrapolés comme critères d'identification de récepteurs :

- **le critère d'affinité** considère que plus l'affinité du ligand pour son site de liaison est élevée, plus il y a de chances qu'il s'agisse d'un site de liaison spécifique, sous-entendu d'un récepteur.
- **le critère de saturabilité** considère que le nombre de sites de liaison spécifiques dans la préparation étudiée est "limité". Autrement dit, si l'on ajoute suffisamment de radioligand, l'ensemble des sites spécifiques va être marqué. Au contraire, le nombre de sites non

spécifiques est virtuellement illimité et, dans ces conditions expérimentales classiques, la liaison non spécifique augmente de façon linéaire jusqu'à des concentrations très élevées de radioligand (cf fig 22).

- **le critère de réversibilité** : les médiateurs physiologiques et la plupart des médicaments agissent de manière réversible. A cet effet réversible doit correspondre la réversibilité de la liaison ligand - récepteur. Ce critère de réversibilité implique également que le ligand libéré du complexe ligand - récepteur est identique au ligand d'origine distinguant ainsi l'interaction ligand - récepteur de la réaction enzymatique - substrat.

- **le critère de stéréospécificité** : pour la plupart des médicaments, un isomère optique est actif alors que l'autre est pratiquement sans effet. Dans la pratique, on ne dispose pas toujours des deux isomères optiques pour vérifier ce critère.

Ces quatre critères doivent être vérifiés pour qualifier de spécifique une interaction ligand - site de liaison. Pour l'étendre à une interaction ligand - récepteur, il est nécessaire d'ajouter un **critère important de corrélation entre l'affinité *in vitro* des différents ligands et leurs effets *in vivo***.

Le terme de **liaison non spécifique** évoque la liaison à des sites qui n'ont pas la qualité de récepteurs, avec généralement une affinité faible et un caractère non saturable.

En pratique, la liaison totale du radioligand correspond à la somme de la liaison spécifique et de la liaison non spécifique. En considérant la haute affinité du radioligand (en général de l'ordre de 10^{-9} M), un excès de ligand froid (en général 10^{-6} M) pourra complètement masquer la liaison spécifique du radioligand sans affecter sa liaison aux sites de faible affinité à considérer comme non spécifiques. La liaison spécifique peut être déterminée en soustrayant la liaison non spécifique de la liaison totale (cf fig 22). Le rapport liaison non spécifique / liaison spécifique doit être le plus petit possible.

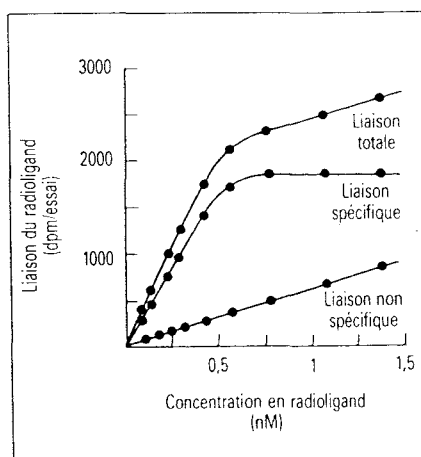


Figure 22 : Courbe de saturation d'un radioligand

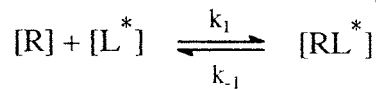
5.1.1.2. Etude des caractéristiques de la liaison d'un radioligand par expériences de saturation

Il s'agit de définir les valeurs suivantes :

- **la constante de dissociation** du complexe ligand - récepteur (K_D) qui traduit l'affinité du ligand pour le récepteur
- **la densité de sites spécifiques** (B_{max}) dans la préparation utilisée.

Dans les expériences dites de saturation, des concentrations identiques de récepteurs [R] sont prélevées à partir de la suspension particulaire et exposées à des concentrations croissantes de ligand marqué [L*]. La liaison spécifique est étudiée à l'équilibre, c'est à dire dans des conditions cinétiques (expérimentées préalablement) qui déterminent le temps optimal pour la saturation des récepteurs.

L'interaction du radioligand avec une population homogène de sites de liaison peut être décrite par la réaction :



La constante de dissociation à l'équilibre est alors définie suivant l'équation 1 :

$$K_D = \frac{[R][L^*]}{[RL^*]}$$

En résolvant l'équation 1, on montre que (cf fig 23) :

K_D est égale à la concentration du ligand L qui occupe la moitié de la totalité des récepteurs R

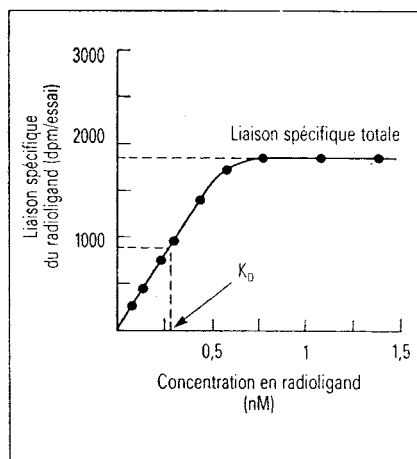


Figure 23: Détermination du K_D à partir d'une courbe de saturation

Représentation de Scatchard

La courbe représentée sur la figure 23 est hyperbolique et ne permet pas une détermination précise des valeurs de K_D et B_{max} . Comme en enzymologie, la représentation linéaire de Scatchard est utilisée pour faciliter la détermination de ces paramètres (cf fig 24).

Cette représentation exprime le rapport $[RL^*] / [L^*]$ (ou B / F , B pour "bound" et F pour "free") en fonction de $[RL^*]$ (ou B) :

$$\frac{B}{F} = - \frac{1}{K_D} B + \frac{B_{max}}{K_D}$$

Dans ce cas :

K_D est égal à moins l'inverse de la pente de régression linéaire

B_{max} correspond à la concentration au point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses ($B / F = 0$)

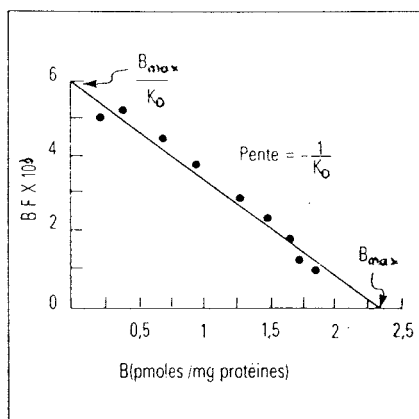
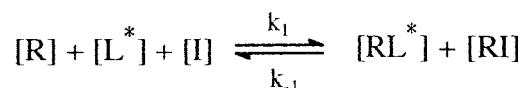


Figure 24: Représentation de Scatchard

5.1.1.3. Etude des caractéristiques de la liaison d'un ligand froid par expériences de compétition

Dans ces expériences, on introduit une substance non marquée I (I pour inhibitrice). Dans ce cas, la réaction devient alors :



Pratiquement, les concentrations des récepteurs $[R]$ et du ligand $[L^*]$ sont fixes, tandis que la concentration de $[I]$ constitue la variable expérimentale (courbe dose - réponse). Dans ces conditions, l'augmentation de $[I]$ amène aussi une augmentation de $[RI]$, mais une diminution de $[RL^*]$, à cause d'un nouveau partage de $[R]$ et de $[I]$. Puisqu'il s'agit d'une relation de type

compétitif, on parle d'expérience de compétition. Lorsque cette diminution est de 50%, la concentration effective de l'agent compétitif correspond à ce que l'on dénomme **IC₅₀** ("inhibitory concentration of 50%") (cf fig 25).

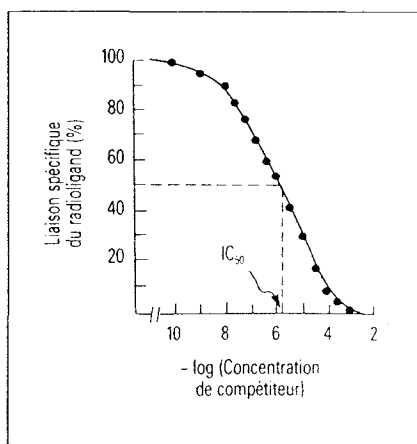


Figure 25: Courbe de compétition

Il est également d'usage de calculer une autre valeur numérique pour estimer le degré de compétitivité de la substance I. C'est la **constante d'inhibition K_i**, qui est définie par l'équation :

$$K_i = \frac{[R] [I]}{[RI]}$$

Après transformation, on obtient :

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [L^*] / K_D}$$

Il est préférable d'utiliser la valeur de K_i qui ne varie pas en fonction de [L*], contrairement à la valeur de l'IC₅₀.

5.1.2. Etudes fonctionnelles

Après la caractérisation de l'affinité d'une molécule pour son site de liaison, on s'intéresse ici à la détection, à la quantification et à la comparaison des effets de celle-ci en déterminant un certain nombre de paramètres qualitatifs : agoniste, antagoniste et quantitatifs : puissance (DE₅₀, pA₂), efficacité/activité intrinsèque.

5.1.2.1. Notions d'agonistes et antagonistes

5.1.2.1.1. Définitions

Un agoniste est une molécule pourvue d'une activité intrinsèque, c'est à dire qu'elle est capable de déclencher, par sa liaison à des récepteurs spécifiques, une action biologique.

Par opposition, un **antagoniste** est une molécule dépourvue d'activité intrinsèque, c'est à dire qu'elle est incapable de déclencher la séquence action - effet.

5.1.2.1.2. Les agonistes

Trois types d'agonistes existent (cf fig 26) :

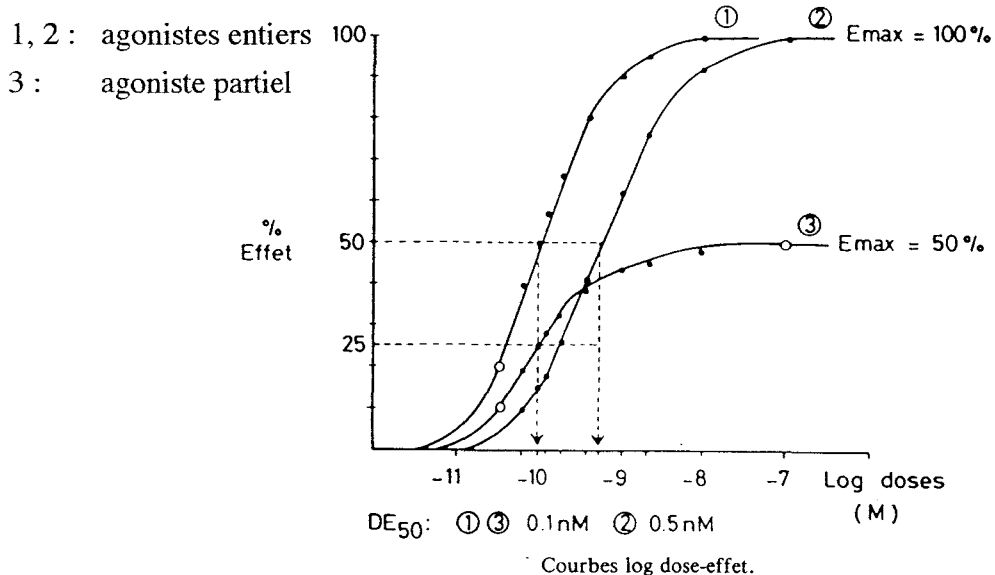
- les **agonistes "entiers"** avec lesquels une réponse maximale est obtenue,
- les **agonistes partiels** avec lesquels, même à des concentrations élevées, une réponse maximale ne sera jamais atteinte,
- les **agonistes inverses**, avec lesquels une réponse, mais inverse à celle observée avec des agonistes est obtenue. On peut parler dans ce cas d'activité intrinsèque "négative".

Ces notions font appel à la notion d'**efficacité intrinsèque**, c'est à dire à la capacité de l'agoniste à induire l'effet. Cette efficacité est une valeur relative, elle est égale à 100% pour les agonistes entiers et inférieure à 100% pour les agonistes partiels (cf fig 26).

L'activité d'un agoniste est également caractérisée par sa **puissance CE₅₀** (ou **DE₅₀**) (concentration (ou dose) efficace 50) définie comme suit (cf fig 26) :

CE₅₀ (ou DE₅₀) est égale à la concentration (ou dose) de l'agoniste qui produit un effet égal à 50% de l'effet maximal obtenu avec ce dernier

Le logarithme changé de signe de la valeur de la CE₅₀ est quelques fois dénommé pD₂.



Légende 1 (Agonistes ① ② et ③). — Les puissances des agonistes (DE₅₀) sont respectivement de 0.1 nM ① ③ et 0.5 nM ②, mesurées sur l'abscisse (4), perpendiculairement aux points de rencontre de chaque courbe avec la droite virtuelle correspondant aux 50% de l'effet maximal (E_{max}), dont l'amplitude est la même pour les agonistes ① et ②. La puissance de l'agoniste ③ est égale à celle de l'agoniste ①, pour une efficacité relative de 50% par rapport aux agonistes ① et ②; la mesure de la puissance de ③ est donc effectuée à partir de l'horizontale des 25%.

Figure 26

5.1.2.1.3. Les antagonistes

Il existe également différents types d'antagonismes. Les distinctions sont effectuées sur deux notions :

- la nature du site de fixation avec :

- **l'antagonisme compétitif** avec liaison de l'antagoniste sur le même site de liaison que l'agoniste,
- **l'antagonisme non compétitif** avec liaison de l'antagoniste sur un site de liaison différent de celui occupé par l'agoniste (effet de type allostérique)

- la nature de la liaison ligand-récepteur (cf fig 27) :

- **l'antagonisme réversible** (ou surmontable) caractérisé par un déplacement vers la droite de la courbe dose-effet de l'agonisme sans diminution de la réponse maximale ,
- **l'antagonisme irréversible** (ou insurmontable) caractérisé par une dépression induite par l'antagoniste de la réponse maximale de l'agoniste.

La puissance d'un antagoniste est caractérisée par la constante **pA₂** qui est égale :

pA₂ est égale au logarithme changé de signe de la concentration molaire d'antagoniste qui oblige à doubler la concentration de l'agoniste pour obtenir le même effet.

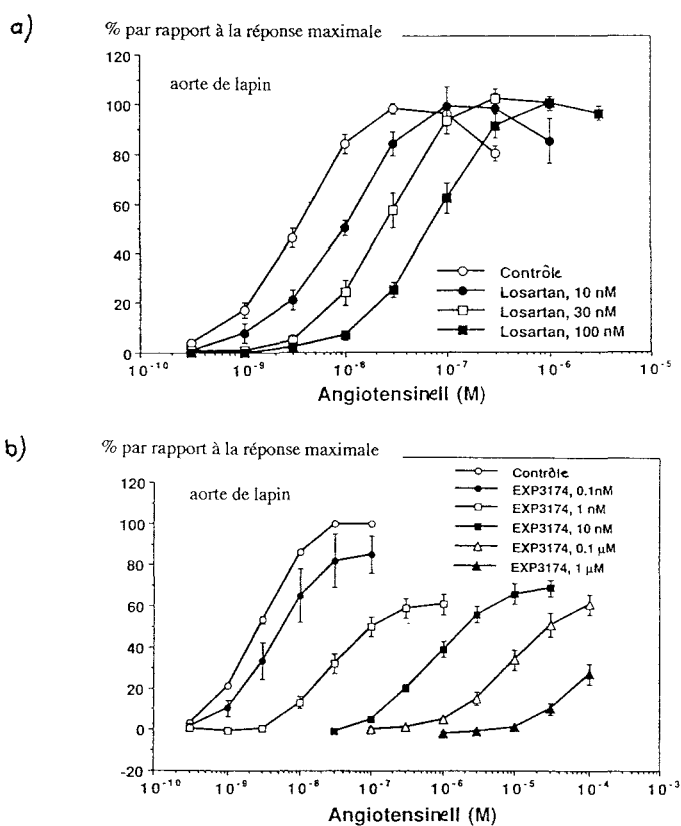


Figure 27 : Courbes dose-effet du a) DuP 753, antagoniste compétitif et réversible et b) de son métabolite, EXP 3174, antagoniste non compétitif et irréversible

5.2. MODELES DEVELOPPES POUR L'EVALUATION PHARMACOLOGIQUE DES MOLECULES SYNTHETISEES

Cette évaluation est réalisée en deux étapes :

- une étape *ex-vivo* comprenant des études de binding et sur organe isolé. Ces deux tests sont complémentaires. Le screening réceptologique permet d'évaluer l'affinité des molécules pour les récepteurs de l'Ang II et celui sur organe isolé, screening fonctionnel, permet de caractériser leur profil agoniste ou antagoniste.
- une étape *in vivo* où deux objectifs sont recherchés : le premier est de caractériser l'activité et l'efficacité des produits dans le domaine visé, on peut alors parler de pharmacologie d'activité et d'efficacité. Le deuxième est d'avoir une vision plus large de leurs actions et notamment de connaître leur toxicité éventuelle. On s'oriente ici vers le domaine de la pharmacologie de sécurité. Les études de pharmacologie d'activité précèdent bien entendu celles de sécurité, néanmoins l'évaluation de la toxicité et d'une interaction éventuelle avec les grands systèmes de l'organisme sont effectuées de plus en plus tôt dans le développement d'une molécule, celles-ci constituant souvent des critères de choix majeurs lors de la sélection d'un composé parmi plusieurs candidats.

A la naissance d'une nouvelle molécule, il est important de cerner le plus rapidement son profil pharmacologique et de savoir si elle présente un intérêt ou non. Les premiers tests *ex vivo* et *in vivo* sont alors effectués dans une stratégie de screening. Le premier et principal objectif du screening est une caractérisation qualitative des propriétés du composé. On cherche à savoir si il se lie ou non au récepteur, si il est capable d'induire ou au contraire de bloquer certains effets... Le second objectif est d'établir une hiérarchie entre différents composés et pouvoir ainsi déduire des relations structure-affinité et activité pour orienter, guider la synthèse vers de nouvelles molécules. Ici une quantification des effets est nécessaire.

5.2.1. Screening *ex vivo*

5.2.1.1. Screening réceptologique

A l'heure actuelle, deux sous-types de récepteurs sont connus pour l'Ang II : les récepteurs AT₁, responsables de la majorité, voire de la totalité des effets connus et imputables à l'Ang II et les récepteurs AT₂ dont la fonction reste encore inconnue aujourd'hui. Le binding sur ces deux sous types de récepteurs a été développé.

5.2.1.1.1. Binding des récepteurs AT₁

Les protocoles décrits et utilisés pour évaluer l'affinité pour les récepteurs AT₁ sont extrêmement variés. Certains travaillent avec des cellules primaires, d'autres avec des lignées cellulaires, sur cellules intactes ou sur membranes. Le type cellulaire et l'espèce sont également très diversifiés : cellules musculaires lisses vasculaires, cellules de corticosurrénales, hépatocytes, de rat, de lapin ou d'homme. Plusieurs ligands marqués sont aussi employés : [³H]Ang II, [¹²⁵I]Ang II, [¹²⁵I][Sar¹, Ile⁸] Ang II...

Le test qui a été mis au point et utilisé pour ce travail emploie des membranes cellulaires d'une lignée d'hépatomes humains, PLC-PRF-5 (ECACC 85061113). Le ligand marqué est l'Ang II tritiée, [tyrosyl-3,5-³H] Ang II (5-L-isoleucine) (Wintersgill et al., 1992; Mestdagh, Goossens, 1993).

Pourquoi ce choix?

1- pourquoi une lignée cellulaire?

L'avantage d'une lignée cellulaire sur des cellules primaires est que leur phénotype est parfaitement établi, il n'évolue pas après plusieurs passages et la population cellulaire est homogène. Ces cellules peuvent donc être cultivées à volonté.

2- pourquoi des membranes?

Sur un plan pratique, l'utilisation de membranes est beaucoup plus commode que celle de cellules intactes où l'on est tributaire de la culture cellulaire. Ici la préparation des membranes peut se faire sur une grande quantité de cellules, elles sont alors conservées à -78°C et peuvent être utilisées quand on le souhaite.

Cependant, cette technique comporte un risque de dénaturation du récepteur. Les cellules étant lysées, le récepteur n'est pas dans son environnement naturel et ses propriétés peuvent alors être modifiées. Des essais comparatifs sur homogénats de cellules et sur membranes centrifugées à 30 000g n'ont montré aucune différence de l'affinité du [³H] DuP 753 pour les récepteurs, les pK_i sont égaux à 8,52 et 8,49 respectivement. Le récepteur conserve donc son intégrité.

D'autre part, la courbe de compétition de l'Ang II vis-à-vis du [³H] DuP 753 a permis de mettre en évidence :

- sur homogénat de cellules, la présence de deux sites de liaison en l'absence d'inhibiteurs de protéases et d'un seul en présence de ceux-ci
- sur membranes cellulaires centrifugées à 30 000g, en l'absence ou en présence d'inhibiteurs de protéases, la présence d'un seul site de liaison d'affinité supérieure à celle obtenue sur homogénat de cellules.

De plus la dégradation de l'Ang II par des protéases semble être réduite en grande partie par centrifugation.

Pour toutes ces raisons, les tests ultérieurs ont été effectués sur des membranes cellulaires centrifugées à 30 000g plutôt que sur homogénat.

3- pourquoi des cellules d'hépatomes humains?

Le foie est une cible importante de l'Ang II, une forte densité de récepteurs y est présente. Se pose alors le problème de la spécificité, c'est-à-dire de savoir si un ou plusieurs sous-types de récepteurs sont présents. Diverses études ont montré que cette lignée cellulaire présente une grande spécificité pour les récepteurs AT₁ (Wintersgill et al., 1992). Cela a été vérifié par la faible affinité obtenue avec le CGP 42112 et le PD 123177, ligands AT₂ sélectifs (cf tableau 8 page 148). Enfin le choix de cellules humaines permet de s'affranchir des différences pouvant exister entre espèces. Par exemple chez le rat, deux sous-types de récepteurs AT₁ ont été identifiés alors que chez l'homme un seul type est connu à l'heure actuelle.

4- pourquoi l'Ang II tritiée?

Deux types de radioligands ont été testés : [tyrosyl-3,5-H³] Ang II (5-L-isoleucine) et [butyl-1,2-H³] DuP 753.

Une comparaison des courbes de compétition vis-à-vis des deux ligands est représentée dans le tableau suivant :

	[H ³] DuP 753	[H ³] Ang II
compétition Ang II	pKi = 9,13	pKi = 9,47
compétition DuP 753	pKi = 8,49	pKi = 8,79

Les pKi obtenus en utilisant [H³] Ang II comme radioligand sont sensiblement supérieurs à ceux déterminés avec [H³] DuP 753.

Finalement le choix du radioligand s'est porté sur [tyrosyl-3,5-H³] Ang II (5-L-isoleucine) car le rapport liaison spécifique sur liaison non spécifique est supérieur à celui observé avec [butyl-1,2-H³] DuP 753, ce rapport étant de l'ordre de 15% avec l'Ang II tritiée.

Remarque : les études récentes de mutagénèse dirigée ont montré que les sites de fixation sur les récepteurs AT₁ de deux antagonistes peuvent être différents. On peut alors imaginer qu'un antagoniste en se liant à un site qui lui est propre peut inhiber la liaison de l'Ang II sans influencer celle d'un autre antagoniste. Pour ces études de compétition, l'emploi du peptide endogène comme ligand marqué est donc préférable.

5.2.1.1.2. Binding des récepteurs AT₂

Ici, le nombre de méthodes décrites est beaucoup plus restreint. Trois grandes techniques peuvent être mentionnées :

- utilisation de surrénales de rat comme source des deux récepteurs AT₁ et AT₂. Le binding d'un récepteur est réalisé en bloquant l'autre par un ligand sélectif. Par exemple, le binding sur les récepteurs AT₁ est réalisé en présence de PD 123177, ligand AT₂, à la concentration de 10⁻⁶M.
- utilisation de membranes issues de cervelet de veau où une forte densité de récepteurs AT₂ est présente.
- utilisation de lignées cellulaires. La plus importante est une lignée de phéochromocytomes PC12W.

Pour les raisons exposées précédemment, les premiers essais ont été réalisés avec la lignée cellulaire de phéochromocytomes PC12W. Ces cellules sont décrites comme exprimant les récepteurs AT₂ (Speth et al., 1990). Cependant les résultats n'ont pas été satisfaisants. la concentration en récepteurs AT₂ n'étant pas suffisante, une forte liaison non spécifique a été observée (Mestdagh, Goossens, 1994).

La méthode avec des membranes de cervelet de veau a alors été utilisée (Bennet et al., 1976; Mestdagh, Goossens, 1994). Il est intéressant de noter que chez l'animal adulte, les récepteurs AT₂ sont peu nombreux. Par contre chez le nouveau-né, une forte densité de récepteurs AT₂ est présente, en particulier dans le cerveau, ce qui justifie ce choix.

Une particularité de cette méthode est l'addition de dithiothreitol (DTT) au milieu d'incubation. Cet agent réducteur augmente la liaison de l'Ang II aux récepteurs AT₂ (cf fig 28). La sensibilisation est maximale à partir d'une concentration de 1 mM en DTT (une préincubation des membranes est préférable pour obtenir une bonne sensibilisation). Un autre intérêt de cette incubation est lié à la diminution de la liaison de l'Ang II sur les récepteur AT₁ en présence de DTT. Ceci peut permettre de diminuer la liaison non spécifique en supprimant la composante liée à la présence éventuelle de traces de ces récepteurs dans la préparation.

Le mécanisme d'action du DTT sur les récepteurs AT₁ ou AT₂ n'est pas encore clairement déterminé. Le DTT, agent réducteur, est capable de couper des ponts disulfure. Pour les récepteurs AT₁, l'existence de ces ponts est supposées comme primordiale pour la conformation du récepteur et leur rupture entraînerait un changement de conformation néfaste pour la liaison de l'Ang II. Pour les récepteurs AT₂, l'existence de ponts disulfure n'est pas montrée (bien que quatre résidus cystéines existent en bonne position pour en créer (cf page 15)). Si ces ponts n'existent pas, on pourrait comprendre que le DTT n'influence pas la liaison de l'Ang II, mais en revanche on n'explique pas pourquoi une augmentation est observée. S'ils existent, leur rupture et le changement de conformation qui en résulte ne perturberaient pas la

liaison de l'Ang II, voire même au contraire pourraient l'augmenter... Mais il existe d'autres hypothèses comme par exemple un lien avec une autre protéine qui serait rompu en présence de DTT et qui influencerait la liaison de l'Ang II sur ces récepteurs...

Le ligand marqué choisi est également l'Ang II tritiée.

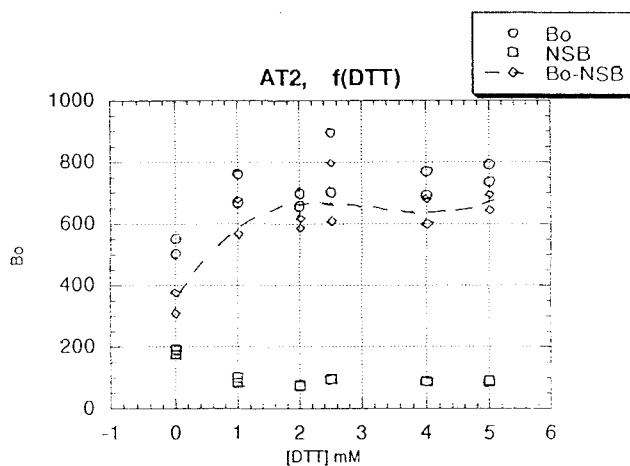


Figure 28 : Sensibilisation des récepteurs AT₂ en présence de DTT

Le tableau suivant présente les affinités^a des molécules de référence pour les deux types de récepteurs déterminées selon les méthodes décrites précédemment.

	Ang II	Saralazine	DuP 753	PD 123177	CGP 42112
AT ₁	9,5	9,4	8,8	< 5	6,3
AT ₂	9,4	ND	< 5	7,3	ND

* les affinités sont exprimées en pK_i

ND : non déterminé

- Saralazine : antagoniste peptidique AT₁ sélectif
- DuP 753 : antagoniste non peptidique AT₁ sélectif
- PD 123177 : ligand non peptidique AT₂ sélectif
- CGP 42112 : ligand peptidique AT₂ sélectif

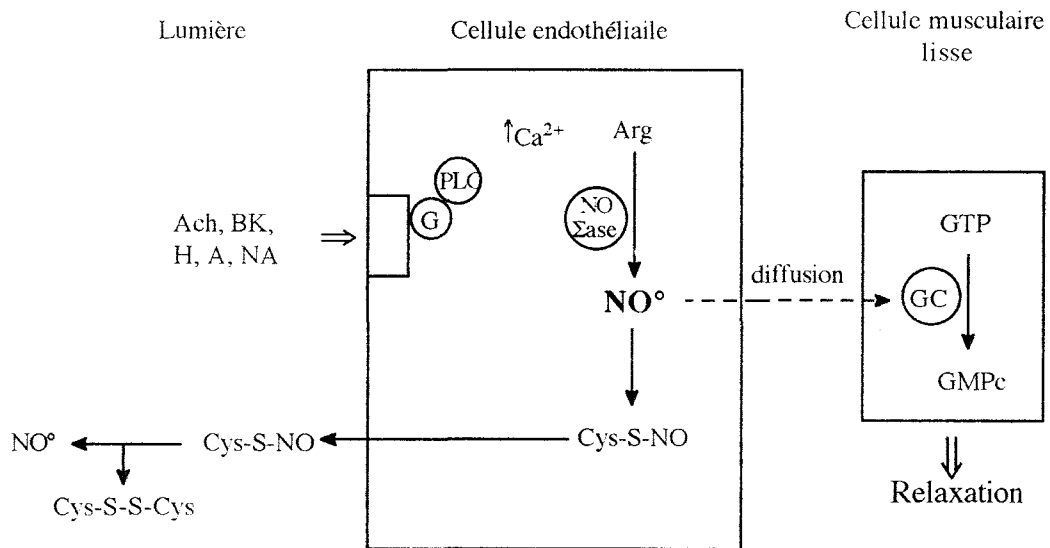
Tableau 8

5.2.1.2. Screening fonctionnel : test sur organe isolé

L'Ang II est un des agents vasoconstricteur les plus puissants de l'organisme. Cet effet peut être facilement observé *in vitro*. Un fragment de vaisseau prélevé sur un animal est plongé dans un bain de survie et relié à des capteurs de tension. Les contractions induites par l'Ang II sont alors visualisées par enregistrement des variations de tension. Cette méthode est très largement utilisée pour effectuer le screening fonctionnel des antagonistes de l'Ang II.

Les modèles les plus utilisés sont l'aorte thoracique ou abdominale de rat ou de lapin. Notre choix s'est porté sur l'aorte thoracique de lapin. Il est décrit que seuls les récepteurs AT₁ seraient exprimés sur ce tissu, alors que sur l'aorte de rat, les deux récepteurs AT₁ et AT₂ seraient présents (Bottari et al., 1993).

Nous avons choisi d'utiliser le modèle de l'aorte désendothélisée afin d'obtenir une réponse uniquement due à la stimulation des cellules musculaires lisses vasculaires et de s'affranchir des effets vasodilatateurs de l'endothélium. En effet, divers neuromédiateurs et en particulier l'acétylcholine sont susceptibles d'entraîner la genèse d'EDRF (endothelium derived relaxing factor) par les cellules endothéliales. L'EDRF (ou NO) formé diffuse à travers la membrane plasmatique et induit la relaxation des cellules musculaires lisses en augmentant la concentration en GMP_c par activation d'une guanylate cyclase (cf fig 29).



Abréviations : Ach : acétylcholine, H : histamine, BK : bradykinine, A : adrénaline, NA : noradrénaline, PLC : phospholipase C, G : protéine G, NO Sase : NO synthétase, GC : guanylate cyclase

Figure 29

La méthode de désendothélisation par abrasion à l'aide d'un "goupillon" en papier a été validée par la non relaxation induite par l'acétylcholine après contraction de l'aorte avec la noradrénaline (expérience de Furchgott négative) (cf fig 30).

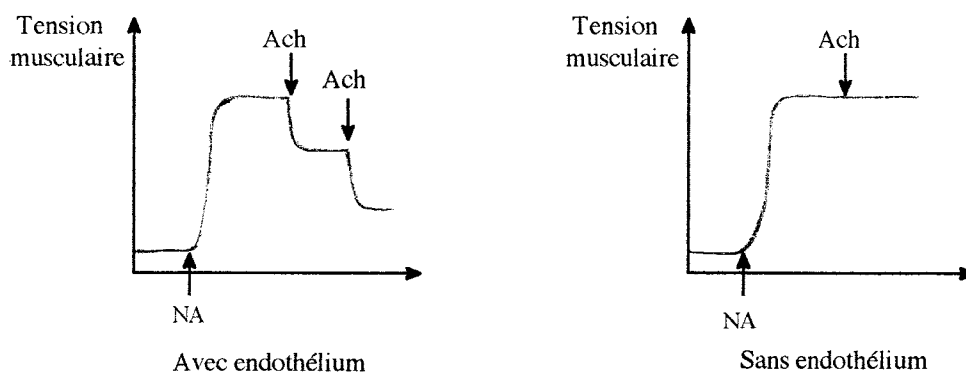


Figure 30

Le protocole d'étude consiste dans un premier temps à déterminer la précharge à appliquer à l'organe. Cette précharge impose à l'organe une certaine tension de base, ainsi des variations sont enregistrables.

Cette précharge est fonction de l'organe étudié et du type de préparation. Dans le cas des anneaux d'aorte thoracique de lapin, une précharge de l'ordre de 4g est généralement utilisée. Suite à un essai préliminaire, la réponse obtenue avec une précharge de 5g est la plus importante et la plus reproductible, donc la plus satisfaisante.

Précharge (g)	4	5	6
contraction ^a (mg)	1100	1600	1650

^a contraction induite par la noradrénaline à la concentration de 10^{-7} M, n = 2

La deuxième étape concerne le choix de la concentration de l'Ang II à utiliser pour contracter la préparation. Cette concentration a été déterminée sur la base d'une étude de relation dose-effet et choisie de manière à induire une réponse équivalente à 80% de la réponse maximale, pour avoir ainsi une sensibilité maximale. Elle a donc été choisie égale à 10^{-8} M.

Concentration Ang II (M)	10^{-9}	$3 \cdot 10^{-9}$	10^{-8}	$3 \cdot 10^{-8}$	10^{-7}	$3 \cdot 10^{-7}$
% contraction ^a	11	52	81	92	89	87

^a pourcentage de contraction, égal au rapport de la contraction obtenue avec l'Ang II sur la contraction obtenue par la noradrénaline à $3 \cdot 10^{-6}$ M qui sert de référence. n = 4

Dans un deuxième temps, la reproductibilité de la réponse a été étudiée. Dans ce but, la stimulation trois fois de suite de la préparation a montré que l'intensité des contractions induites par l'Ang II à 10^{-8} M n'est pas stable, elle augmente de 20% entre la contraction n°1 et la n°3. Pour cette raison, dans le plan expérimental, un groupe témoin traité par le véhicule des produits à tester est inclus. Les pourcentages d'inhibition sont alors calculés par rapport aux valeurs de ce groupe témoin.

Contraction n°	1	2	3
% contraction ^a	100	108	120

^a pourcentage de contraction, la contraction n°1 est prise comme référence. n = 4

Enfin restait à déterminer le temps d'incubation du produit à tester. Dans la littérature, ce temps varie de cinq à trente minutes. Nous avons choisi une durée intermédiaire de quinze minutes.

A partir de ces données, le protocole expérimental illustré par le graphique suivant a été établi (cf fig 31) :

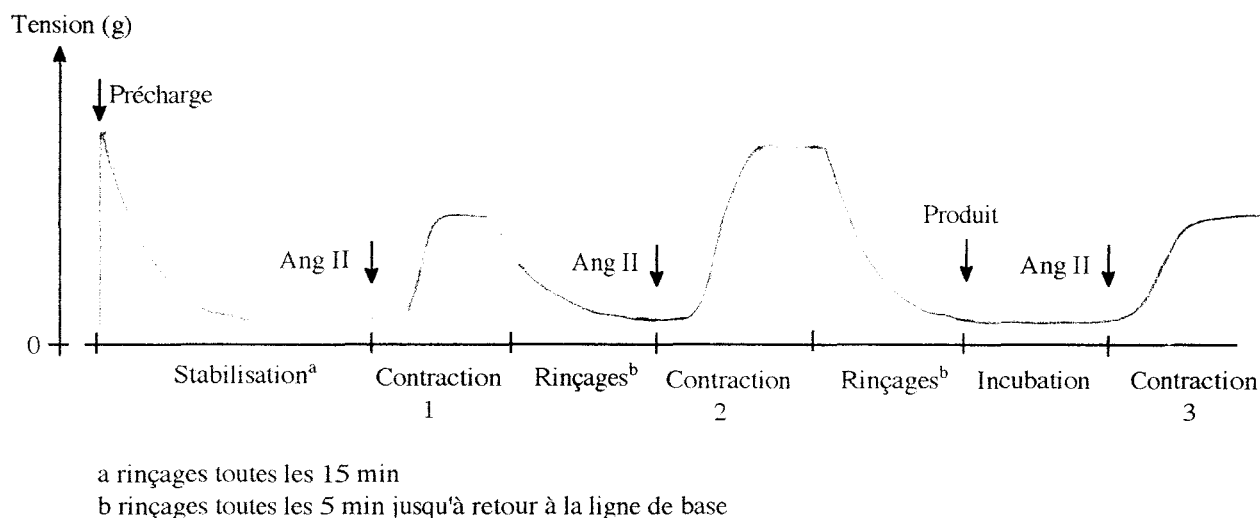


Figure 31

Après application de la précharge de 5g, une période de stabilisation de 75 min est observée. Deux contractions sont alors induites par addition d'Ang II dans le bain de survie. La première sert à stimuler la préparation, la seconde sert de référence. Puis le produit à tester est injecté et après quinze minutes d'incubation, une nouvelle contraction est déclenchée par l'Ang II.

Deux antagonistes des récepteurs AT₁ de l'Ang II ont été testés pour valider le modèle :

Produits	pKi		Concentration (mol / l)	% d'inhibition ^c
	AT ₁ ^a	AT ₂ ^b		
Saralazine	9,4	ND	3.10 ⁻⁸	96 ^d
DuP 753	8,8	< 5	3.10 ⁻⁷	75 ^d

a binding des récepteurs AT₁ sur cellules PLC-PRF avec [³H] Ang II

b binding des récepteurs AT₂ sur membranes de cervelet de veau avec [³H] Ang II

ND non déterminé

c pourcentage d'inhibition de la contraction induite par l'Ang II sur aorte thoracique désendothélisée de lapin

d n = 6

La Saralazine, antagoniste peptidique et le DuP 753, antagoniste non peptidique sélectifs des récepteurs AT₁ inhibent la contraction de l'aorte induite par l'Ang II. Le pouvoir inhibiteur de la Saralazine est 10 fois à 30 supérieur à celui du DuP 753, une inhibition voisine étant obtenue avec une concentration dix fois inférieure.

Remarques :

- Ces tests sur organes isolés et donc sur animaux peuvent être remplacés par des tests sur cellules isolées consistant à mesurer soit un second messenger impliqué dans le système de transduction du récepteur, soit la réponse cellulaire. Pour le récepteur AT₁, cela est tout à fait envisageable et a même déjà été réalisé par dosage du calcium intracellulaire.
- Nous n'avons pas présenté ici de test pour le screening fonctionnel des récepteurs AT₂. Cela n'est pas une omission, mais il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle sur organe isolé permettant d'évaluer l'action de l'Ang II par stimulation de ces récepteurs, le rôle de ces récepteurs n'étant toujours pas connu. La solution serait peut être justement de s'orienter vers le dosage d'un second messenger, lorsque les systèmes de transduction seront établis.

5.2.2. Screening *in vivo*5.2.2.1 Test d'observation neurocomportemental d'IRWIN

Ce test constitue souvent la première étape pour évaluer un produit *in vivo*. Il permet tout d'abord d'évaluer la toxicité du produit (information indispensable pour la suite des tests *in vivo*). Il permet également de déceler une action insoupçonnée, en particulier sur le système nerveux central.

Le comportement des animaux est analysé suivant une grille d'observation standardisée (cf partie expérimentale, page 123) pour déceler des effets neurocomportementaux, psychotropes ou neurotoxiques.

5.2.2.2 Screening cardiovasculaire : effet antihypertenseur chez le rat hypertendu rénal (RHR) vigile

In vivo, l'évaluation de l'efficacité d'un inhibiteur du SRA consiste à étudier son effet antihypertenseur. En effet, le SRA joue un rôle essentiel dans le contrôle de la pression artérielle et un déséquilibre de ce système entraîne l'apparition d'une hypertension. Différents modèles existent, les trois principaux sont l'étude de :

- l'inhibition de l'augmentation de la pression artérielle induite par administration d'Ang II chez le rat normotendu
- la diminution de la pression artérielle après administration de la substance chez le rat spontanément hypertendu (SHR)
- la diminution de la pression artérielle après administration de la substance chez le rat hypertendu rénal (RHR).

La principale différence entre ces modèles est la nature et la cause impliquée dans l'apparition de l'hypertension. Pour le SHR, par exemple, l'hypertension est d'origine génétique et est liée en particulier à une augmentation du tonus sympathique. En revanche, chez le RHR, l'hypertension résulte d'une suractivation du SRA. Ce modèle est probablement le plus sensible pour étudier l'action d'inhibiteurs du SRA.

Il existe en fait plusieurs modèles d'hypertension rénale qui conduisent tous à une suractivation du SRA. Ces modèles consistent soit à poser un "clip" autour de l'artère rénale pour diminuer le débit de filtration rénale en laissant les deux reins intacts (modèle deux reins-un clip) ou en pratiquant l'ablation d'un rein (modèle un rein-un clip), soit à ligaturer complètement l'artère rénale d'un des deux reins.

Les hypertensions obtenues sont différentes selon les modèles, mais sont toutes rénine-dépendantes. Dans le cas du modèle deux reins-un clip, l'hypertension est également volodépendante. Dans les deux autres modèles, l'hypertension résulte essentiellement d'une activation sympathique réflexe qui conduit à une hypersécrétion de rénine (Cangiano et al., 1979).

Dans les méthodes avec pose de clips, l'hypertension est obtenue après quelques semaines et présente un caractère chronique. Ces modèles sont généralement utilisés pour étudier l'effet d'un traitement chronique d'un inhibiteur du SRA.

Dans notre cas, nous avons choisi le modèle de ligature de l'artère rénale car cette méthode permet d'induire de façon aiguë une activation du SRA. Les animaux présentent une hypertension seulement sept jours après la ligature, ce qui explique notre préférence pour ce modèle sur les précédents dans une optique de screening.

La pression artérielle moyenne (PAM) obtenue dans ce type de modèle est relativement hétérogène. Elle peut varier de 140 mmHg à 200 mmHg, la PAM chez le rat normotendu étant en moyenne de l'ordre de 110 mmHg (la PAM d'un rat Wistar pesant 300-400g est comprise entre 100-120 mmHg). Afin de normaliser les résultats, ceux-ci sont exprimés en pourcentages de normalisation de la PAM, c'est à dire par la capacité du produit à ramener la PAM à une valeur normale, l'effet maximal antihypertenseur (100%) pouvant être obtenu correspondant alors à une diminution de la PAM de Δ_1 (cf fig 32).

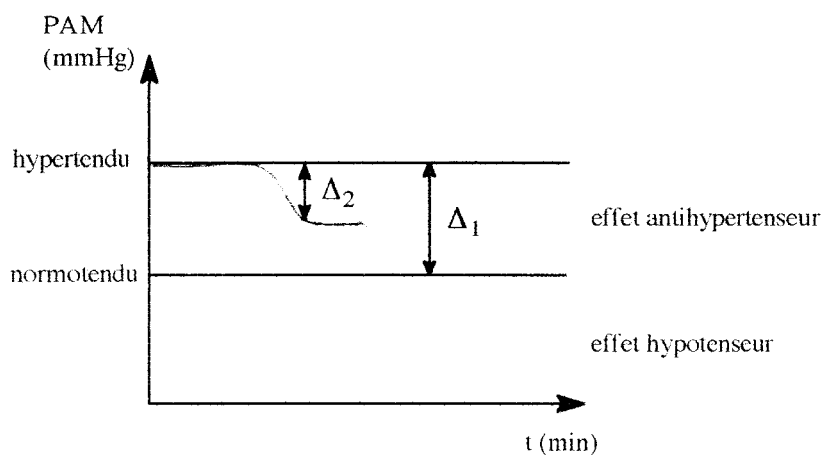


Figure 32

Un produit qui abaisse la PAM de Δ_2 présente donc un pourcentage de normalisation égal à :

$$\% \text{ de normalisation} = (1 - (1 - \Delta_2) / \Delta_1) * 100$$

Il est à noter que cette représentation permet également de distinguer une molécule douée de propriétés antihypertensives, d'une molécule présentant des effets hypotenseurs. Un agent antihypertenseur abaisse la valeur de PAM jusqu'au niveau de celle d'un animal normotendu en s'opposant à la cause de l'hypertension. Un agent hypotenseur entraîne au contraire une diminution de la PAM en dessous de celle considérée comme normale, en général par un mécanisme non spécifique et indépendant de l'éthiologie de l'hypertension, par exemple par un effet vasodilatateur comme avec l'Hydralazine ou le Minoxidil.

Dans une stratégie de screening, deux objectifs sont recherchés :

- 1- savoir si la molécule possède un profil antihypertenseur
- 2- comparer les effets de différentes molécules pour pouvoir établir une hiérarchie et essayer de dégager des relations structure-activité.

On recherche donc dans un premier temps plus une caractérisation qualitative que quantitative des effets sur la pression artérielle d'une molécule. Néanmoins, deux paramètres sont importants pour apprécier l'activité des molécules étudiées :

- le pouvoir antihypertenseur, estimé par les doses permettant d'obtenir l'effet antihypertenseur
- la durée de l'effet.

Le modèle a été validé avec deux molécules de référence: un inhibiteur de l'ACE, l'Enalaprilate et un antagoniste des récepteurs AT₁, le DuP 753.

Produits	Dose (mg/kg)	% de normalisation de PAM RHR ^a	Durée de l'effet ^b (min)
Enalaprilate	0,03	45	<40
	0,1	72	>80
	0,3	83	>80
DuP 753	0,3	25	<5
	1	45	<15
	3	93	> 80

^a a pourcentage de normalisation de la pression artérielle moyenne après administration par voie intraveineuse chez le rat hypertendu rénal, n = 2

^b temps pour retourner aux valeurs de PAM avant administration

Les deux substances diminuent la PAM du RHR sur des durées importantes, supérieures à 80 min pour l'Enalaprilate dès la dose de 0,1 mg/kg et pour le DuP 753 à la dose de 3 mg/kg. Ces résultats montrent que l'Enalaprilate a un pouvoir antihypertenseur environ dix fois supérieur au DuP 753 car produisant un effet antihypertenseur équivalent à celui du DuP 753 à des doses dix fois inférieures.

5.2.3. Stratégie pour l'évaluation pharmacologique des molécules synthétisées

En général, deux étapes importantes jalonnent un travail de recherche exploratoire. La première est la découverte d'un composé "chef de file", la seconde consiste à réaliser de multiples pharmacomodulations pour tenter d'améliorer les caractéristiques de ce composé leader. Il apparaît que pour ces deux étapes un grand nombre de molécules doit être synthétisé et la connaissance des premiers paramètres pharmacologiques (affinité, inhibition de la contraction sur aorte isolée...) doit être la plus rapide possible pour pouvoir orienter, guider la synthèse de nouveaux composés en fonction des relations structure-affinité et activité qui peuvent se dessiner. Pour cette raison, les protocoles des quatre tests présentés précédemment ont été établis de manière à obtenir le plus rapidement possible les informations souhaitées. L'ordre dans lequel sont réalisés ces tests n'est pas aléatoire, il doit permettre d'effectuer à chaque étape une sélection des molécules potentiellement intéressantes.

Première étape : le binding

Ce test permet de savoir si une molécule possède ou non une affinité pour le récepteur. Il arrive donc en tête et est réalisé avec toutes les molécules.

Les molécules sont testées dans un premier temps à une concentration de $10^{-5}M$. Si aucun effet inhibiteur de la liaison de l'Ang II n'est obtenu à cette concentration, la molécule est considérée comme non affine pour le récepteur. Dans le cas où le pourcentage de déplacement à cette dose est supérieur à 80%, le pK_i est déterminé.

Seconde étape : l'aorte isolée

Ce test renseigne sur la nature de l'interaction de la molécule avec sa cible : antagoniste, agoniste... Toutes les molécules ayant montré une affinité pour les récepteurs doivent donc être testées. Cependant dans un premier temps, nous avons décidé de tester l'ensemble des molécules à la fois en binding et sur aorte isolée de lapin, après avoir considéré que nous ne possédions pas assez de recul sur les séries chimiques synthétisées. En effet, certaines molécules peuvent réserver des surprises. Par exemple, l'antagoniste CV 11194 possède une affinité moyenne pour les récepteurs AT_1 , IC_{50} égale à $5,5 \cdot 10^{-7}M$ sur membranes de corticosurrénales de boeuf, alors que son pouvoir inhibiteur de la contraction de l'aorte induite par l'Ang II est excellent, IC_{50} égale à $5,5 \cdot 10^{-11}M$, soit une différence de quatre unités logarithmiques (Kubo et al., 1993a). Les conditions rencontrées avec des cultures cellulaires et encore à plus fortes raisons avec des membranes sont totalement artificielles et très éloignées des conditions naturelles dans lesquelles se trouve le récepteur. Cela peut donc induire des divergences importantes avec les conditions *in vivo*. Entre l'organe isolé et l'animal entier, le fossé est moins grand et les résultats peuvent être plus représentatifs de la réalité, d'où un intérêt supplémentaire pour ce test qui constitue un tremplin entre l'*ex vivo* et l'*in vivo*.

Cependant, après avoir testé une trentaine de molécules, nous avons constaté que seules celles ayant une affinité supérieure à un pK_i de 6,5 présentent un effet inhibiteur sur l'aorte isolée. Ce n'est donc qu'après avoir considéré que nous avions un recul suffisant sur le modèle avec les séries chimiques étudiées que nous avons décidé de ne tester que les composés dont le pK_i est supérieur ou égal à 6.

Comme pour le binding, les molécules sont testées à une concentration de $10^{-5}M$. Si aucune inhibition n'est obtenue à cette concentration, la molécule est considérée inactive.

Troisième étape : phase *in vivo*

A l'issue des deux tests *ex vivo*, le potentiel d'une molécule peut être apprécié et on juge à ce niveau de la poursuite des essais.

RHR

Pour le screening d'activité *in vivo*, seules les molécules ayant montré une affinité pour les récepteurs de l'Ang II et un effet inhibiteur sur aorte isolée sont retenues pour évaluer leur éventuel effet antihypertenseur chez le RHR.

Les effets des produits à tester sont alors évalués sur des groupes de deux animaux à trois doses croissantes : 3 - 10 - 30 mg/kg par voie intraveineuse.

Irwin

Pour le test d'Irwin, les critères de sélection sont un peu différents. Les molécules sélectionnées pour être étudiées sur RHR sont obligatoirement testées. Pour les autres, il peut être intéressant et souhaitable de les tester aussi. Ces molécules appartiennent souvent à une même famille chimique, on peut donc avoir ainsi des renseignements sur la toxicité éventuelle de cette structure ou sur sa capacité par exemple à passer la barrière méningée et induire des effets centraux.

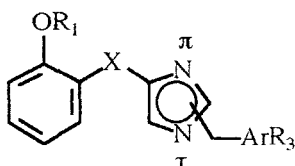
Les molécules solubles en milieux aqueux sont testées à une dose de 300 mg/kg par voie intraveineuse. Cette dose est importante et peut être diminuée en fonction de la limite de solubilité des produits. Si un effet est observé à cette dose, la dose maximale sans effet est recherchée.

Note : Dans les modèles *in vivo*, la voie intraveineuse est choisie en priorité de façon à s'affranchir de tout problème d'absorption éventuel.

RESULTATS - DISCUSSIONS

6.1. MOLECULES INSPIREES DE LA CONFORMATION "SCORPION" : 4- ET 5-(2-ALKOXYBENZYL)-1-BENZYL-IMIDAZOLES ET (2-ALKOXYPHENYL)-[(1-BENZYL)-IMIDAZOL-4 ET 5-YL) CETONES

Les affinités de six molécules : un dérivé méthylénique et cinq cétones ont été évaluées en binding des récepteurs AT₁. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.



Produits	R ₁	X	ArR ₃	% de déplacement
70 _{a1,4}	C ₄ H ₉	CH ₂		0%
80 _{1,4} - 80 _{1,5}	CH ₂ C ₆ H ₅	CO		0%
81 _{1,4} - 81 _{1,5}	CH ₂ C ₆ H ₅	CO		0%
82 _{1,4}	H	CO		0%

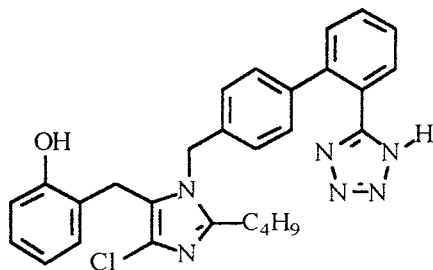
π = isomère 1,4 τ = isomère 1,5

Aucun de ces composés ne présente une affinité pour les récepteurs AT₁. Ces premiers résultats sont décevants, cependant cette absence d'affinité peut s'expliquer par l'absence dans la structure de ces molécules de certains éléments importants pour l'affinité comme par exemple une chaîne carbonée pour les dérivés cétoniques.

Malheureusement les difficultés rencontrées au cours de la synthèse ne nous ont pas permis de préparer tous les composés souhaités et nécessaires pour étudier et déterminer les premières relations structure-affinité. A ce niveau, il nous est impossible de statuer sur la validité ou non de notre hypothèse de départ, à savoir la présence d'une interaction à trois centres (hydroxyle de Tyr⁴, imidazole de His⁶, acide carboxylique de Phe⁸) et l'adoption de la conformation "scorpion" par l'Ang II pour se lier au récepteur.

Cependant une avancée a été réalisée avec le développement des synthèses régiosélectives qui a permis de surmonter le problème de séparation des isomères de position obtenue après alkylation des synthons (2-alkoxybenzyl) imidazoles **47**.

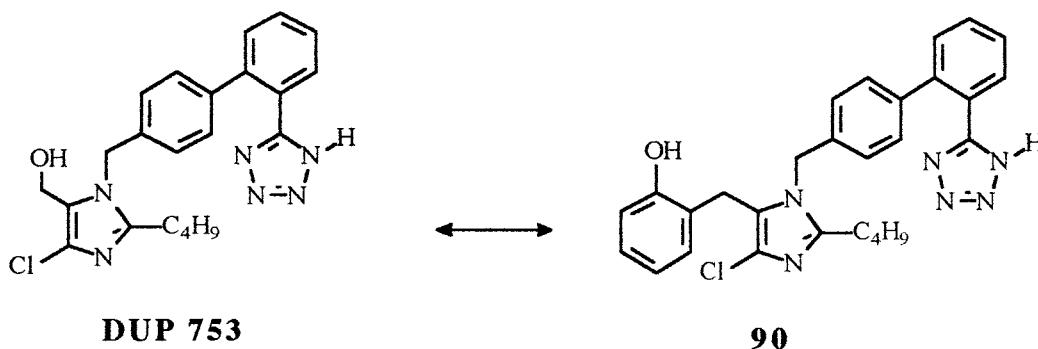
L'une de ces synthèses a abouti à la préparation du composé **90** : 2-butyl-4-chloro-5-(2-hydroxybenzyl)-1-[[2'-(1H-tétrazol-5-yl)biphényl-4-yl]méthyl]imidazole qui présente une bonne affinité pour les récepteurs AT₁ : pK_i = 7,8.

**90**

pK_i = 7,8 (AT₁)

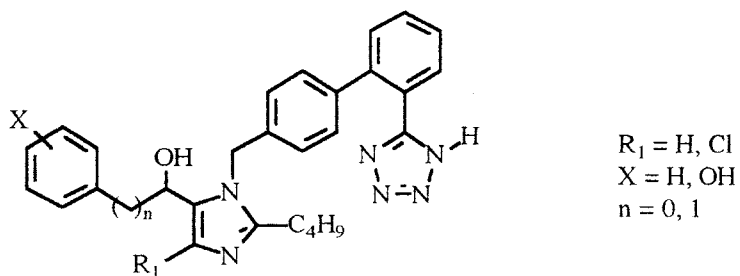
Ce composé dont la structure N,C benzylimidazole répond à notre hypothèse de travail constitue un nouveau point de départ pour argumenter l'hypothèse de la conformation "scorpion" adoptée par l'Ang II pour sa liaison au récepteur. Il serait intéressant de comparer l'affinité du composé **90** avec celle de son isomère de position 5-chloro-4-(2-hydroxybenzyl)imidazole N₁ substitué. Si notre hypothèse est correcte, cet isomère doit présenter une affinité supérieure à celle du composé **90**.

D'autre part, un autre regard peut être porté sur le dérivé **90**. Il peut en effet être considéré comme un analogue du DuP 753, où l'hydroxyméthyle est remplacé par un groupe 2-hydroxybenzyle.

**DUP 753****90**

Dans l'hypothèse où le groupe en position 4 sur l'imidazole du DuP 753 joue le rôle du phénol de la tyrosine de l'Ang II, l'introduction de la structure phénolique laissait espérer un effet bénéfique sur l'affinité. Or le dérivé **90** présente une affinité inférieure d'une unité logarithmique à celle du DuP 753 (pK_i = 8,8). Cette diminution peut s'expliquer par une gêne stérique entre l'atome de chlore et le noyau phénolique, qui empêche une bonne orientation de ce dernier pour interagir avec le récepteur. Une des premières pharmacomodulations à réaliser est donc d'étudier l'analogue non chloré du composé **90**. D'autres modifications sont également envisageables pour étudier la région occupée par l'hydroxyméthyle du Dup 753 et voir si il existe ou non une opportunité pour introduire une structure phénolique par analogie au phénol

de la tyrosine de l'Ang II. Des composés conservant la fonction hydroxyméthyle du DuP 753 mais substituée par différentes structures aromatiques : benzyle, phényle, hydroxybenzyle... peuvent être envisagés.

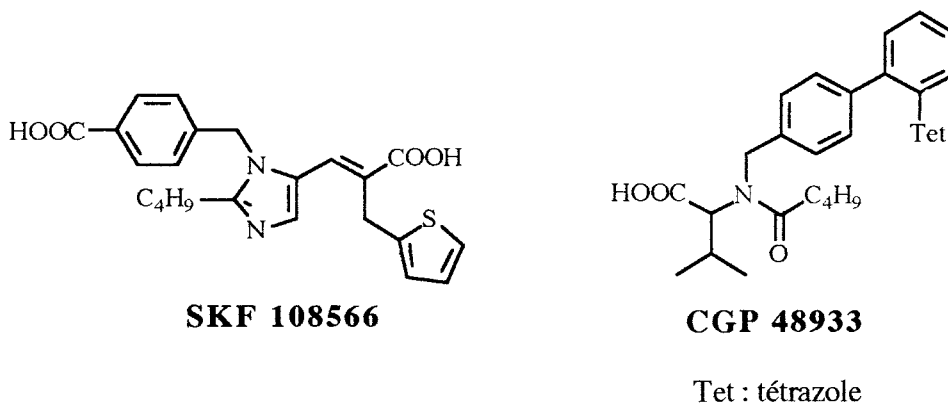


Pharmacomodulations autour du composé **90**

Note : la structure du composé **90** a pu être dévoilée après accord de la firme UCB.

6.2. NOUVELLE HYPOTHESE DE TRAVAIL ET NOUVELLE STRUCTURE ORIGINALE D'ANTAGONISTES NON PEPTIDIQUES DES RECEPTEURS DE L'ANG II

Parallèlement au travail que nous venons d'exposer, une seconde hypothèse de travail a été développée au sein du laboratoire. Compte tenu des objectifs qui nous étaient fixés (cf préface), nous n'avons pas participé à l'étude chimique, mais en revanche, nous avons étudié les produits issus de ce concept sur le plan pharmacologique. Le concept rationnel de cette série a pour origine deux antagonistes des récepteurs AT₁ : le SKF 108566 et le CGP 48933. L'application de principes de drug design tels que théorie des cycles potentiels et bioisostérie a abouti à l'élaboration d'une structure originale d'antagonistes des récepteurs de l'Ang II.



Suite à des pharmacomodulations réalisées autour de la structure d'origine, un composé possédant un pK_i égal à 5,7 a été élaboré. Puis un nouveau pas a été franchi avec la synthèse d'un composé présentant un pK_i de 6,9. Ce dérivé constitue à l'heure actuelle un chef de file et de nombreuses pharmacomodulations ont été et sont encore étudiées.

Dans le cadre de ce travail, une trentaine de produits ont été synthétisés et testés. Cinq composés se sont révélés posséder une affinité pour les récepteurs de l'Ang II et un effet inhibiteur de la contraction de l'aorte isolée de lapin induite par l'Ang II. Ils ont donc été sélectionnés pour évaluer leur éventuel effet antihypertenseur chez le rat hypertendu rénal. Trois d'entre eux induisent une diminution de la pression artérielle moyenne (PAM) à la dose de 30 mg/kg par voie intraveineuse. Ces effets sont toutefois faibles. Le DuP 753, antagoniste AT₁ de référence, normalise la PAM à une dose de 3 mg/kg avec une durée d'action supérieure à une heure, alors que les molécules testées induisent des pourcentages de normalisation compris entre 38 et 50% à une dose dix fois supérieure de 30 mg/kg, sur des durées courtes (< 30 minutes).

Les tests d'Irwin réalisés sur une vingtaine de représentants de cette famille n'ont pas révélé de toxicité aiguë (aucune dose toxique inférieure ou égale à 100 mg/kg n'a été observée), ni d'effet caractéristique sur le comportement des animaux.

Ces premiers résultats laissent espérer que cette voie puisse aboutir à l'élaboration d'antagonistes pouvant rivaliser avec ceux déjà découverts dont les affinités sont au moins égales à 10⁻⁹ M. Les travaux continuent donc dans cet axe.

CONCLUSION

Par la réalisation de ces travaux dans le cadre d'une convention CIFRE, deux objectifs principaux étaient poursuivis :

- un objectif "à caractère scientifique" avec la volonté de mener à bien un sujet de recherche
- un objectif "à caractère formateur" qui comprenait deux volets :
 - acquisition de connaissances dans les domaines de la Chimie Thérapeutique et de la Pharmacologie
 - acquisition d'une expérience professionnelle avec une formation aux méthodes de l'encadrement en vue d'une intégration future dans le secteur privé

Objectif n°1: Conception, synthèse et évaluation pharmacologique d'antagonistes non peptiques de l'Ang II

Comme nous l'avons vu dans la partie généralités, la recherche d'antagonistes des récepteurs de l'Ang II, qui a commencé il y a une quinzaine d'années, se caractérise par une approche rationnelle avec la volonté de copier au mieux le ligand endogène, l'Ang II. Nous avons essayé de s'inspirer de cette démarche rationnelle pour concevoir de nouvelles structures d'antagonistes potentiels des récepteurs de l'Ang II.

La première hypothèse de travail qui consiste à copier l'Ang II dans une conformation particulière, la conformation "scorpion" a conduit à l'élaboration de 4- ou 5- (2-alkoxybenzyl)-1-benzyl imidazoles et (2-alkoxyphényl)-(1-benzylimidazol-4 ou -5-yl) cétones.

Dans un premier temps, des synthèses non régiosélectives ont été envisagées pour la préparation de ces composés. Des difficultés de séparation des isomères de position n'ont pas permis d'obtenir tous les composés souhaités. Seule la liaison de six dérivés a pu être évaluée en binding et aucun ne présente la moindre affinité pour les récepteurs AT₁.

Sur le plan chimique, la solution a été trouvée par le développement de synthèses régiosélectives. Trois voies ont été envisagées et l'une d'entre elle a mené à la préparation du 2-butyl-4-chloro-5-(2-hydroxybenzyl)-1-[[2'-(1H-tétrazol-5-yl)biphényl-4-yl]méthyl]imidazole **90**. Ce composé N, C benzylimidazole répond à l'hypothèse de travail et possède une bonne affinité pour le récepteur AT₁, pK_i = 7,8.

A ce jour, il nous est impossible de statuer sur la validité ou non de notre hypothèse de départ et donc sur l'importance du transfert de charges entre les trois résidus Tyr⁴-His⁶-Phe⁸ mis en évidence par des études de RMN de l'Ang II en solution pour sa liaison aux récepteurs. Cependant le bon résultat obtenu avec le dérivé **90** a relancé l'intérêt pour cette famille de composés. Diverses pharmacomodulations sont envisageables et le développement des synthèses régiosélectives doit faciliter l'obtention des composés futurs.

Cette information sur la conformation adoptée par l'Ang II pour se lier à son récepteur est intéressante sur un plan fondamental. Associée aux résultats de mutagénèse dirigée, elle pourrait faire progresser les connaissances sur le site de fixation de l'Ang II sur ces récepteurs.

Parallèlement, une deuxième famille de composés dont la structure est inspirée de deux antagonistes des récepteurs de l'Ang II déjà existants, le SKF 108566 et le CGP 48933 a été élaborée et synthétisée au sein du laboratoire. Nous avons participé à leur évaluation pharmacologique. Cette évaluation a été effectuée dans une stratégie de screening comprenant des tests in vitro : binding des récepteurs AT₁ et AT₂, aorte isolée de lapin et des test in vivo : test d'IRWIN et recherche d'un effet antihypertenseur chez la rat hypertendu rénal. Les meilleurs composés possèdent des affinités de l'ordre de 10⁻⁷ M (pK_i = 6,8-6,9) pour les récepteurs AT₁. Cinq présentent un effet inhibiteur de la contraction de l'aorte isolée de lapin induite par l'Ang II et trois d'entre eux présentent des effets antihypertenseurs chez le rat hypertendu rénal par voie intraveineuse à la dose de 30 mg/kg.

Ce travail constitue un point de départ dans les recherches d'antagonistes des récepteurs de l'Ang II menées au laboratoire. Deux composés intéressants ont été synthétisés : le dérivé **90**, dont le pK_i est égal à 7,8 et qui répond à la première hypothèse de travail et le second dont le pK_i est égal à 6,9 et qui appartient à la deuxième famille. Ils constituent à l'heure actuelle "deux chefs de file". Diverses pharmacomodulations doivent maintenant être réalisées pour tenter de définir des relations structure-affinité pour pouvoir ainsi élaborer des molécules susceptibles de concurrencer les antagonistes déjà existants dont les affinités sont supérieures à 10⁻⁹ M car l'enjeu est d'importance.

En effet les perspectives thérapeutiques pour les inhibiteurs du SRA sont séduisantes et prometteuses. La première indication qui vient à l'esprit est l'hypertension artérielle. Cependant dans ce domaine la concurrence est importante et les perspectives de développement sont limitées. Plus prometteuse est la mise en évidence de SRA tissulaires, de sous-types de récepteurs dont les rôles ne sont pas encore connus, mais pour lesquels on soupçonne une intervention dans la croissance cellulaire. Les phénomènes d'hypertrophie et d'hyperplasie cellulaires sont présents dans de nombreuses pathologies graves, athérosclérose, resténose, hypertrophie ventriculaire gauche pour le domaine cardiovasculaire, mais aussi cancers... contre lesquelles on ne dispose pas encore de remède vraiment efficace.

Objectif n°2: Formation et intégration au monde industriel

Dans l'intitulé de la convention CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche), les trois mots : industrielle, formation et recherche symbolisent bien les objectifs à atteindre.

Concernant l'aspect recherche, ce mémoire présente les travaux réalisés et les résultats obtenus.

Ingénieur chimiste de formation, ma participation à ce travail de drug design depuis la conception jusqu'aux études de pharmacologie, m'a permis d'acquérir des connaissances dans

les domaines de la Chimie Thérapeutique (conception et synthèse de nouvelles molécules) et de la Pharmacologie. Cette formation pratique a été complétée par une formation théorique avec la préparation pendant la première année de cette thèse du Mastère en Drug Design (Université de Lille II).

Au cours de mon séjour dans l'entreprise, j'ai également été formée aux méthodes d'encadrement en participant au management du secteur de Pharmacologie Générale du CERB.

Cette expérience professionnelle complétée des connaissances acquises au cours de ces trois ans devront me permettre d'intégrer avec le maximum d'atouts l'industrie pharmaceutique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abraham MH, Duce PP, Prior DV, Barratt DG, Morris JJ, Taylor PJ

Hydrogen bonding. Part 9. Soluble proton donor and proton acceptor salts for use in drug design

J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 1989 : 1355-1377

Ashton WT, Hutchins SM, Greenlee WJ, Doss GA, Chang RSL, Lotti VJ, Faust KA, Chen TB, Zingaro GJ, Kivlighn SD, Siegl PKS

Nonpeptide angiotensin II antagonists derived from 1H-pyrazole-5-carboxylates and 4-aryl-1H-imidazole-5-carboxylates

J. Med. Chem. 1993a; **36** : 3595-3605

Ashton WT, Cantone CL, Chang LL, Hutchins SM, Strelitz RA, MacCoss M, Chang RSL, Lotti VJ, Faust KA, Chen TB, Bunting P, Schorn TW, Kivlighn SD, Siegl PKS

Nonpeptide angiotensin II antagonists derived from 4H-1,2,4-triazoles and 3H-imidazo[1,2-b][1,2,4]triazoles

J. Med. Chem. 1993b; **36** : 591-609

Ashton WT, Chang LL, Flanagan KL, Hutchins SM, Naylor EM, Chakravarty PK, Patchett AA, Greenlee WJ, Chen TB, Faust KA, Chang RSL, Lotti VJ, Zingaro GJ, Schorn TW, Siegl PKS, Kivlighn SD

Triazolinone biphenylsulfonamide derivatives as orally active angiotensin II antagonists with potent AT₁ receptor affinity and enhanced AT₂ affinity

J. Med. Chem. 1994; **37** : 2808-2824

Atwal KS, Ahmed SZ, Bird JE, Delaney CL, Dickinson KEJ, Ferrara FN, Hedberg A, Miller AV, Moreland S, O'Reilly BC, Schaeffer TR, Waldron TL, Weller HN

Dihydropyrimidine angiotensin II receptor antagonists

J. Med. Chem. 1992; **35** : 4751-4763

Benghiat E, Crooks PA

Preparation of S-(3-indolylmethyl) derivatives of mercaptoamino acids

Synthesis 1982 : 1033-1036

Bennet JP, Snyder SH

Angiotensin II binding to mammalian brain membranes

J. Biol. Chem. 1976; **251** : 7423-7430

Bergsma DJ, Ellis C, Kumar C, Nuthulaganti P, Kersten H, Elshourbagy N, Griffin E, Stadel JM, Aiyar N

Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor

Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992; **183** : 989-995

Bergsma DJ, Ellis C, Nuthulaganti PR, Nambi P, Scaife K, Kumar C, Aiyar N

Isolation and expression of a novel angiotensin II receptor from *Xenopus laevis* Heart

Mol. Pharmacol. 1993; **44** : 277-284

Bernhart CA, Perreaut PM, Ferrari BP, Muneaux YA, Assens JLA, Clément J, Haudricourt F, Muneaux CF, Taillades JE, Vignal MA, Gougat J, Guiraudou PR, Lacour CA, Roccon A, Cazaubon CF, Brelière JC, Le Fur G, Nisato D

A new series of imidazolones : highly specific and potent nonpeptide AT₁ angiotensin II receptor antagonists

J. Med. Chem. 1993; **36** : 3371-3380

Bernhart CA, Haudricourt FB, Gougat AJ, Lacour C

Cyclopentanespiro-dihydro-pyrimidinones as angiotensin II AT₁ receptor antagonists

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 157-162

Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Thomas WG, Conrad KM, Baker KM

Angiotensin II stimulates *sis*-inducing factor-like DNA binding activity

J. Biol. Chem. 1994; **269** : 31443-31449

Bihoreau C, Monnot C, Davies E, Teutsch B, Bernstein KE, Corvol P, Clauser E
Mutation of Asp⁷⁴ of the rat angiotensin II receptor confers changes in antagonist affinities and abolishes G-protein coupling
Proc. Natl. Acad. Sci. 1993; **90** : 5133-5137

Blankley CJ, Hodges JC, Klutchko SR, Himmelsbach RJ, Chucholowski A, Connolly CJ, Neergaard SJ, Van Nieuwenhze MS, Sebastian A, Quin J, Essenburg AD, Cohen DM
Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of non-peptide angiotensin II receptor binding inhibitors specific for the AT₂ subtype
J. Med. Chem. 1991; **34** : 3248-3260

Bottari SP, Taylor V, King IN, Bogdal Y, Whitebread S, de Gasparo M
Angiotensin II AT₂ receptors do not interact with guanine nucleotide binding proteins
Eur. J. Pharmacol. 1991; **207** : 157-163

Bottari SP, King IM, Reichlin S, Dahlstroem I, Lydon N, de Gasparo M
The angiotensin AT₂ receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992; **183** : 206-211

Bottari SP, de Gasparo M, Steckelings UM, Levens NR
Angiotensin II receptor subtypes : characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications
Front. Neuroendocrinol. 1993; **14** : 123-171

Bovy PR, Trapani AJ, McMahon EG, Palomo M
A carboxy-terminus truncated analogue of angiotensin II, [Sar¹] ANG II-(1-7)-amide, provides an entry to a new class of angiotensin II antagonists
J. Med. Chem. 1989; **32** : 520-522

Bovy PR, Reitz DB, Collins JT, Chamberlain TS, Olins GM, Corpus VM, McMahon EG, Palomo MA, Koepke JP, Smits GL, McGraw DE, Gaw JF
Nonpeptide angiotensin II antagonists : N-phenyl-1H-pyrrole derivatives are angiotensin II receptor antagonists
J. Med. Chem. 1993; **36** : 101-110

Bradbury RH, Allott CP, Dennis M, Fisher E, Major JS, Masek BB, Oldham AA, Pearce RJ, Rankine N, Revill JM, Roberts DA, Russel ST
New nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. 2. Synthesis, biological properties, and structure-activity relationships of 2-alkyl-4-(biphenylmethoxy)quinoline derivatives
J. Med. Chem. 1992; **35** : 4027-4038

Bradbury RH, Allott CP, Dennis M, Girdwood JA, Kenny PW, Major JS, Oldham AA, Ratcliff AH, Rivett JE, Roberts DA, Robins PJ
New nonpeptide angiotensin II antagonists. 3. Synthesis, biological properties, and structure-activity relationships of 2-alkyl-4-(biphenylmethoxy)pyridine derivatives.
J. Med. Chem. 1993; **36** : 1245-1254

Bradbury RH, Edwards MP, Fisher E, Girdwood JA, Major JS, Oldham AA, Patel ML, Pearce RJ, Revill J, Ratcliffe AH
New nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Synthesis, biological properties and structure-activity relationships of 3-substituted 2,6-dialkyl-4-(biphenyl)methylamino-pyridine derivatives
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 139-144

Brechler V, Levens NR, de Gasparo M, Bottari SP
Angiotensin AT₂ receptor mediated inhibition of particulate guanylate cyclase : a link with protein tyrosine phosphatase stimulation?
Receptors Channels 1994; **2** : 79-87

Bridges RJ, Stanley MS, Anderson MW, Cotman CW, Chamberlin RA
Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereoisomer
J Med Chem 1991; 34 : 717-725

Bühlmayer P, Criscione L, Fuhrer W, Furet P, de Gasparo M, Stutz S, Whitebread S
Nonpeptidic angiotensin II antagonists : synthesis and *in vitro* activity of a novel series of novel naphthalene and tetrahydronaphthalene derivatives
J. Med. Chem. 1991; 34 : 3105-3114

Bühlmayer P
Angiotensin II antagonists : patent activity since the discovery of DuP 753
Current Opinion in Ther. Pat. 1992 : 1693-1718

Bühlmayer P, Furet P, Criscione L, de Gasparo M, Whitebread S, Schmidlin T, Lattmann R, Wood J
Valsartan, a potent, orally active angiotensin II antagonist developed from the structurally new amino acid series
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; 4 : 29-34

Bunkenburg B, van Amelsvoort T, Rogg H, Wood JM
Receptor-mediated effects of angiotensin II on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats
Hypertension 1992; 20 : 746-754

Burns L, Clark KL, Bradley J, Robertson MJ, Clark AJL
Molecular cloning of the canine angiotensin II receptor. An AT₁-like receptor with reduced affinity for DuP 753
FEBS Lett. 1994; 343 : 146-150

Butcher RD, Schöllmann C, Marmé D
Angiotensin II mediates intracellular signalling in vascular smooth muscle cells by activation of tyrosine-specific protein kinases and c-raf-1
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993; 196 : 1280-1287

Cangiano JL, Rodriguez-Sargent C, Martinez-Maldonado M
Effects of antihypertensive treatment on systolic blood pressure and renin in experimental hypertension in rats
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1979; 208 : 310-313

Carey RM, Peach MJ, Vaughan ED, Ayers CR
Response of angiotensin II and [des-aspartyl¹]-angiotensin II in man : are three different receptors ?
Circ. Res. 1978; 43 : 163-169

Carini DJ, Duncia JV, Chiu AT, Johnson AL, Price WA, Wong PC, Timmermans PBMWM
Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists : N-[(benzyloxy)benzyl]imidazoles and related compounds as potent antihypertensives
J. Med. Chem. 1990; 33 : 1330-1336

Carini DJ, Duncia JV, Aldrich PE, Chiu AT, Johnson AL, Pierce ME, Price WA, Santella JB, Wells GJ, Wexler RR, Wong PC, Yoo SE, Timmermans PBMWM
Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists : the discovery of a series of N-(biphenylmethyl)imidazoles as potent, orally active antihypertensives.
J. Med. Chem. 1991; 34 : 2525-2547

Carini DJ, Chiu AT, Johnson AL, Wong PC, Wexler RR, Timmermans PBMWM
The preparation of (perfluoroalkyl)imidazoles as nonpeptide angiotensin II receptor antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1993; 3 : 895-898

Carini DJ, Ardecky RJ, Ensinger CL, Pruitt JR, Wexler RR, Wong PC, Huang SM, Aungst BJ, Timmermans PBMWM
 Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists : the discovery of DMP 581 and DMP 811
 Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 63-68

Cazaubon C, Gougat J, Bousquet F, Guiraudou P, Gayraud R, Lacour C, Roccon A, Galindo G, Barthelemy G, Gautret B, Bernhart C, Perreaut P, Breliere JC, Le Fur G, Nisato D
 Pharmacological characterization of SR 47436, a new nonpeptide AT₁ subtype angiotensin II receptor antagonist
 J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993; **265** : 826-834

Chakravarty PK, Naylor EM, Chen A, Chang RSL, Chen TB, Faust KA, Lotti VJ, Kivlighn SD, Gable RA, Zingaro GJ, Schorn TW, Schaffer LW, Broten TP, Siegl PKS, Patchett AA, Greenlee WJ
 A highly potent, orally active imidazo-[4,5-b]pyridine biphenylacysulfonamide (MK-996; L-159,282) : a new AT₁-selective angiotensin II receptor antagonist
 J. Med. Chem. 1994a; **37** : 4068-4072

Chakravarty PK, Strelitz RA, Chen TB, Chang RSL, Lotti VJ, Zingaro GJ, Schorn TW, Kivlighn SD, Siegl PKS, Patchett AA, Greenlee WJ
 Quinazolinone biphenyl acylsulfonamides : a potent new class of angiotensin II receptor antagonists
 Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994b; **4** : 75-80

Chang LL, Ashton WT, Flanagan KL, Strelitz RA, MacCoss M, Greenlee WJ, Chang RSL, Lotti VJ, Faust KA, Chen TB, Bunting P, Zingaro GJ, Kivlighn SD, Siegl PKS
 Triazolinones as nonpeptide angiotensin II antagonists. 1. Synthesis and evaluation of potent 2,4,5-trisubstituted triazolinones
 J. Med. Chem. 1993; **36** : 2558-2568

Chang LL, Ashton WT, Flanagan KL, Chen TB, O'Malley SS, Zingaro GJ, Kivlighn SD, Siegl PKS, Lotti VJ, Chang RSL, Greenle WJ
 Triazolinone biphenylsulfonamides as angiotensin II receptor antagonists with high affinity for both the AT₁ and AT₂ subtypes
 J. Med. Chem. 1994a; **37** : 4464-4478

Chang LL, Ashton WT, Flanagan KL, Rivero RA, Chen TB, O'Malley SS, Zingaro GJ, Kivlighn SD, Siegl PKS, Lotti VJ, Chang RSL, Greenle WJ
 Potent triazolinone-based angiotensin II receptor antagonists with equivalent affinity for both the AT₁ and AT₂ subtypes
 Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994b; **4** : 2787-2792

Chang LL, Greenle WJ
 Angiotensin II receptor antagonists : nonpeptides with equivalent high affinity for both the AT₁ and AT₂ subtypes
 Current Pharmaceutical Design. 1995, **1** : 407-424

Chiu AT, Duncia JV, McCall DE, Wong W, Price WA
 Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. III. Structure-function studies
 J. Pharmacol. Exp. Ther. 1989; **250** : 867-874

Corey EJ, Gras JL, Ulrich P
 A new method for protection of the hydroxyl function
 Tetrahedron Lett. 1976; **11** : 809-812

Corey EJ, Danheiser RL, Chandrasekaran S, Siret D, Kech GE, Gras JL
 Stereospecific total synthesis of Gibberellic acid. A key tricyclic intermediate
 J. Amer. Chem. Soc. 1978; **100** : 8031-8034

Cushman JA, Mishra PK, Bothner-By AA, Khosla MS
Conformations in solution of angiotensin II and its 1-7 and 1-6 fragments
Biopolymers 1992; **32** : 1163-1171

Daemen MJAP, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM
Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall
Circ. Res. 1991; **68** : 450-456

De B, Winn M, Zydowsky TM, Kerkman DJ, DeBernardis JF, Lee J, Buckner S, Warner R, Brune M, Hancock, Opgenorth J, Marsh K
Discovery of a novel class of orally active, non peptide angiotensin II antagonists
J. Med. Chem. 1992; **35** : 3714-3717

de Gasparo M, Bottari S, Levens NR
Chap 102 : Characteristics of angiotensin II receptors and their role in cell and organ physiology
Hypertension : Pathophysiology, Diagnosis, and Management; second edition, Laragh JH, Vrenner BM Ed; Raven Press ; 1995a : 1695-1720

de Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend T, Harding JW, Inagami T, Timmermans PBMWM
Proposed update of angiotensin receptor nomenclature
Hypertension 1995b; **25** : 924-927

de Laszlo SE, Quagliato CS, Greenlee WJ, Patchett AA, Chang RSL, Lotti VJ, Chen TB, Scheck SA, Faust KA, Kivlighn SD, Schorn TS, Zingaro GJ, Siegl PKS
A potent, orally active, balanced affinity angiotensin II AT₁ antagonist and AT₂ binding inhibitor
J. Med. Chem. 1993; **36** : 3207-3210

Dellipizi A, Hilchey SD, Bell-Quilley CP
Natriuretic action of angiotensin (1-7)
Br. J. Pharmacol. 1994; **111** : 1-3

Deprez P, Guillaume J, Becker R, Corbier A, Didierlaurent S, Fortin M
Sulfonylureas and sulfonylcarbmates as new non-tetrazole angiotensin II receptor antagonists.
Discovery of a highly potent orally active (imidazolylbiphenyl)sulfonylurea (HR 720)
J. Med. Chem. 1995; **38** : 2357-2377

Dostal DE, Baker KM
Evidence for a role of an intracardiac renin-angiotensin system in normal and failing hearts
Trends Cardiovasc; Med. 1993; **3** : 67-74

Dox AW
Acetamidine hydrochlorhyde
Org. Syn. Coll 1941; **1** : 5-6

Dudley DT, Panek RL, Major TC, Lu GH, Bruns RF, Klinkefus BA, Hodges JC, Weishaar RE
Subclasses of angiotensin II binding sites and their functional significance
Mol. Pharmacol. 1990; **38** : 370-377

Dudley DT, Hamby JM
Recent advances in angiotensin II receptor antagonists
Current Opinion in Ther. Pat. 1993; 581-596

- Duncia JV, Chiu AT, Carini DJ, Gregory GB, Johnson AL, Price WA, Wells GJ, Wong PC, Calabrese JC, Timmermans PBMWM
The discovery of potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists : a new class of potent antihypertensives
J. Med. Chem. 1990; **33** : 1312-1329
- Duncia JV, Santella III JB, Chiu AT, Wong PC, Wexler RR
Dibenzobicyclo[2.2.2.]octane angiotensin II receptor antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995; **5** : 241-246
- Dzau VJ, Pratt RE
Tissue renin-angiotensin system in experimental restenosis after vascular injury : evidence for local activation
J. Cardiovasc. Pharmacol. 1992; **20** : S28-S32
- Dzau VJ, Sasamura H, Hein L
Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes : physiological implications
J. Hypertension 1993; **11** : S13-S18
- Dzurion P, Schunack W
Imidazol-4-carbinole aus Iminoestern und Dihydroxyaceton
Arch. Pharmaz. 1974; **304** :470-473
- Eberhardt RT, Kevak RM, Kang PM, Frishman WH
Angiotensin II receptor blockade : an innovative approach to cardiovascular pharmacotherapy
J. Clin. Pharmacol. 1993; **33** : 1023-1038
- Elliott DF, Peart WS
Amino acid sequence in a hypertensin
Nature 1956; **177** : 527-528
- Estenne G, Dodey P, Renaut P, Leclerc G
Synthesis and biological evaluation of new arylthiophene analogs of DuP753
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995; **5** : 15-18
- Feng YH, Noda K, Saad Y, Liu XP, Husain A, Karnik S
The docking of Arg² of angiotensin II with Asp²⁸¹ of AT₁ receptor is essential for full agonism
J. Biol. Chem. 1995; **270** : 12846-12850
- Ferrari B, Taillades J, Perreaut P, Bernhart C, Gougat J, Guiraudou P, Cazaubon C, Roccon A, Nisato D, Le Fur G, Brelière JC
Development of tetrazole bioisosteres in angiotensin II antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 45-50
- Fitch KJ, Walsh TF, Patchett AA, Chang RSL, Siegl PKS, Faust KA, Chen TB, Lotti VJ, Kivlighn SD, Zingaro GJ, Greenlee WJ
AT₁ selective angiotensin II antagonists with phenoxyphenylacetic acid as a biphenyl replacement part I
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995; **5** : 155-158
- Furukawa Y, Kishimoto S, Nishikawa K
Hypotensive imidazole derivatives
US Patent n°4 340 598, 1982a
- Furukawa Y, Kishimoto S, Nishikawa K
Hypotensive imidazole-5-acetic acid derivatives
US Patent n°4 355 040, 1982b

Furuta H, Guo DF, Inagami T

Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type-1 receptor
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992; **183** : 8-13

Garcia KC, Desiderio SV, Ronco PM, Verroust PJ, Amzel LM

Recognition of angiotensin II : antibodies at different levels of an idiotypic network are superimposable
 Science 1992a; **257** : 528-531

Garcia KC, Ronco PM, Verroust PJ, Brünger AT, Amzel LM

Three dimensional structure of an angiotensin II-Fab complex at 3 Å : hormone recognition by an anti-idiotypic antibody
 Science 1992b; **257** : 502-507

Garcia-Sainz GA

Angiotensin II receptors : one type coupled to two signals or receptor subtypes ?
 Trends Pharmacol. Sci. 1987; **8** : 48-49

Geerts JP

Diazafulvénium : agent de substitution électrophile aromatique
 UCB Pharma, communication privée, 1992

Glinka TW, de Laszlo SE, Siegl PKS, Chang RS, Kivlighn SD, Schorn TS, Faust KA, Chen TB, Zingaro GJ, Lotti VJ, Greenlee WJ

A new class of balanced AT₁ / AT₂ angiotensin II antagonists : quinazolinone A II antagonists with acylsulfonamide and sulfonylcarbamate acidic functionalities
 Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994a; **4** : 81-86

Glinka TW, de Laszlo SE, Tran J, Chang RS, Chen TB, Lotti VJ, Greenlee WJ

L-161,638 : a potent AT₂ selective quinazolinone angiotensin II binding inhibitor
 Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994b; **4** : 1479-1484

Gribble GW, Leese RM

Reactions of sodium borohydride in acedic media; IV. Reduction of diarylmethanols and triarylmethanols in trifluoroacetic acid
 Synthesis 1977 : 172-177

Groblewski T, Maigret B, Nouet S, Larguier R, Lombard C

Amino acids of the third transmembrane domain of the AT_{1A} angiotensin II receptor are involved in the differential recognition of the peptide and nonpeptide ligands
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995; **209** : 153-160

Hahn AWA, Jonas U, Buehler FR, Resink TJ

Identification of a fourth angiotensin AT₁ receptor subtype in rat
 Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993a; **192** : 1260-1265

Hahn AWA, Kern F, Bühler FR, Resink TJ

The renin-angiotensin system and extracellular matrix
 Clin. Investig. 1993b; **71** : S7-S12

Hall MM, Khosla MC, Khairallah PA, Bumpus FM

Angiotensin analogs. Influence of sarcosine substituted in position 1.
 J. Pharmacol. Exp. Ther. 1974; **188** : 222-228

Hanson SR, Powell JS, Dodson T, Lumsden A

Effects of angiotensin converting enzyme inhibition with cilizapril on intimal hyperplasia in injured arteries and vascular grafts in the baboon
 Hypertension 1991; **18** : 70-76

Hara M, Kiyama R, Nakajima S

Kinetic studies on the interaction of nonlabeled antagonists with the angiotensin II receptor
Eur. J. Pharmacol. 1995; **289** : 267-273

Harris RC, Inagami T

Chap 103 : Molecular biology and pharmacology of angiotensin receptor subtypes
Hypertension : Pathophysiology, Diagnosis, and Management; second edition, Laragh JH,
Vrenner BM Ed; Raven Press ; 1995a : 1721-1738

Harmat N, Giorgi R, Bonaccorsi F, Cerbai G, Colombani SP

4-diazinyl- and 4-pyridinylimidazoles : potent angiotensin II antagonists. A study of their
activity and computational characterization
J. Med. Chem 1995; **38** : 2925-2937

Hill DT, Girard GR, Weinstock J, Edwards RM, Weidley EF, Ohlstein E, Peishoff CE, Baker
E, Aiyar N

D and L-N-[(1-benzyl-1H-imidazol-5-yl)-alkyl]-amino acids as angiotensin II AT₁ antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1995; **5** : 19-24

Hjorth SA, Schambye HT, Greenlee WJ, Schwartz TW

Identification of peptide binding residues in the extracellular domains of the AT₁ receptor
J. Biol. Chem. 1994; **269** : 30953-30959

Hodges JC

Regiospecific synthesis of 3-substituted L-histidines
Synthesis 1987; 20-24

Hodges JC

Angiotensin antagonists : agents that interact with the AT₂ receptor and their potential
therapeutic utilities
Exp. Opin. Ther. Patents 1994; **4** : 1325-1338

Holtz J

The cardiac renin-angiotensin system : physiological relevance and pharmacological modulation
Clin. Investig. 1993; **71** : S25-S34

Hsieh KH, Kiraly-Olah IC, Jorgensen EC

Angiotensin II analogues. 13. Role of the hydroxyl group of position 4 tyrosine in pressor
activity
J. Med. Chem. 1979; **22** : 1044-1047

Hsieh KH, Marshall GR

Role of the C-terminal carboxylate in angiotensin II activity : alcohol, ketone and ester
analogues of angiotensin II
J. Med. Chem. 1986; **29** : 1968-1971

Hsieh KH, LaHann TR, Speth RC

Topographic probes of angiotensin and receptor : potent angiotensin II agonist containing
diphenylalanine and long-acting antagonists containing biphenylalanine and 2-indan amino acid
in position 8
J. Med. Chem. 1989; **32** : 898-903

Huang HC, Reitz DB, Chamberlain TS, Olins GM, Corpus VM, McMahon EG, Palomo MA,
Koepke JP, Smits GJ, McGraw DE, Blaine EH, Manning RE

Synthesis and structure-activity relationships of nonpeptide, potent triazolone-based angiotensin
II receptor antagonists
J. Med. Chem. 1993; **36** : 2172-2181

Hudlicky M

Reduction and oxidation tables

J. Chem. Ed. 1977; **54** : 100-106

Huff BE, Staszak MA

A new method for the preparation of tetrazoles from nitriles using trimethylsilylazide / trimethylaluminium

Tetrahedron Lett. 1993; **34** : 8011-8014

Hunyady L, Baukal AJ, Balla T, Catt KJ

Independence of type I angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction

J. Biol. Chem. 1994; **269** : 24798-24804

Ishiyama M, Umemura K, Uematsu T, Nakashima M

Effects of losartan, an angiotensin II antagonist, on the development of cardiac hypertrophy due to volume overload

Biol. Pharm. Bull. 1995; **18** : 700-704

Itazaki K, Shigeri Y, Fujimoto M

Molecular cloning and characterization of the angiotensin receptor subtype in porcine aortic smooth muscle

Eur. J. Pharmacol. 1993; **245** : 147-156

Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ

Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II

J. Clin. Invest. 1993a; **91** : 2268-2274

Jaillon P

L'aldostérone : cinq années qui changent tout

La Lettre du Pharmacologue 1995; **9** : 3

Janiak P, Pillon A, Prost JF, Vilaine JP

Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury

Hypertension 1992; **20** : 737-745

Ji H, Leung M, Zhang Y, Catt KJ, Sandberg K

Differential structural requirements for specific binding of nonpeptide and peptide antagonists to the AT₁ angiotensin receptor

J. Biol. Chem. 1994; **269** : 16533-16536

Jones JH, Rathbone DL, Wyatt PB

The regiospecific alkylation of histidine side chains

Synthesis 1987; 1110-1113

Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T

Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition

J. Biol. Chem. 1993; **268** : 24543-24546

Kauffman RF, Bean JS, Zimmerman KM, Brown RF, Steinberg M

Losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, inhibits neointima formation following balloon injury to rat carotid arteries

Life Sci. 1991; **49** : PL223-PL228

Kawamura M, Terashita ZI, Okuda H, Imura Y, Shino A, Nakao M, Nishikawa K

TCV 116, a novel angiotensin II receptor antagonist, prevents intimal thickening and impairment of vascular function after carotid injury in rats

J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993; **266** : 1664-1669

Keenan RM, Weinstock J, Finkelstein JA, Franz RG, Gaitanopoulos DE, Girard GR, Hill DT, Morgan TM, Samanen JM, Hempel J, Eggleston DS, Aiyar N, Griffin E, Ohlstein EH, Stack EJ, Weidley EF, Edwards RM

Imidazole-5-acrylic acids : potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Designed using a novel peptide pharmacophore model

J. Med. Chem. 1992; **35** : 3858-3872

Keenan RM, Weinstock J, Finkelstein JA, Franz RG, Gaitanopoulos DE, Girard GR, Hill DT, Morgan TM, Samanen JM, Peishoff CE, Tucker LM, Aiyar N, Griffin E, Ohlstein EH, Stack EJ, Weidley EF, Edwards RM

Potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. 2. 1-(carboxybenzyl) imidazole-5-acrylic acids

J. Med. Chem. 1993; **36** : 1880-1892

Kelley JL, Miller CA, McLean EW

Attempted inhibition of histidine decarboxylase with β -alkyl analogues of histidine

J. Med. Chem. 1977; **20** : 721-723

Kevin NJ, Rivero RA, Greenlee WJ, Chang RSL, Chen TB

Substituted phenylthiophene benzoylsulfonamides with potent binding affinity to angiotensin II AT₁ and AT₂ receptors

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 189-194

Khosla MC, Hall MM, Smeby RR, Bumpus FM

Agonist and antagonist relationships in 1- and 8-substituted analogs of angiotensin II

J. Med. Chem. 1974; **17** : 1156-1160

Kim D, Mantlo NB, Chang RSL, Kivlighn SD, Greenlee WJ

Evaluation of heterocyclic acid equivalents as tetrazole replacements in imidazopyridine-based nonpeptide angiotensin II receptor antagonists

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 41-44

Kivlighn SD, Huckle WR, Zingaro GJ

Discovery of L 162313 : a nonpeptide that mimics the biological actions of angiotensin II

Am. J. Physiol. 1995; **268** : R820-R823

Kiyama R, Honma T, Hayashi K, Ogawa M, Hara M, Fujimoto M, Fujishita T

Novel angiotensin II receptor antagonists. Design, synthesis, and *in vitro* evaluation of dibenzo[a,d]cycloheptene and dibenzo[b,f]oxepin derivatives searching for bioisosteres of biphenyltetrazole using a three-dimensional search technique

J. Med. Chem. 1995; **38** : 2728-2741

Kline T

Preparation of 2-iodotryptamine and 2-iodo-5-methoxytryptamine

J. Heterocyclic Chem. 1985; **22** : 505-509

Klutchko S, Hodges JC, Blankley CJ, Colbry NL

4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridine-6-carboxylic acids (Spinacines)

J. Heterocyclic Chem. 1991; **28** : 97-108

Klutchko S, Hamby JM, Hodges JC

Tetrahydroisoquinoline derivatives with AT₂-specific angiotensin II receptor binding inhibitory activity

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 57-62

Kohzuki M, Yasujima M, Kanazawa M, Yoshida K, Fu LP

Antihypertensive and renal-protective effects of losartan in streptozotocin diabetic rats

J. Hypertension 1995; **13** : 97-103

Kozikowski AP, Ishida H

Use of N,N-dimethyl(methylene)ammonium chloride in the functionalization of indoles
Heterocycles 1980; **14** : 55-58

Kubo K, Inada Y, Kohara Y, Sugiura Y, Ojima M, Itoh K, Furukawa Y, Nishikawa K, Naka T

Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Synthesis and biological activity of benzimidazoles

J. Med. Chem. 1993a; **36** : 1772-1784

Kubo K, Kohara Y, Imamiya E, Sugiura Y, Inada Y, Furukawa Y, Nishikawa K, Naka T

Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Synthesis and biological activity of benzimidazocarboxylic acids

J. Med. Chem. 1993b; **36** : 2182-2195

Kubo K, Kohara Y, Yoshimura Y, Inada Y, Shibouta Y, Furukawa Y, Kato T, Nishikawa K, Naka T

Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Synthesis and biological activity of potential prodrugs of benzimidazole-7-carboxylic acids

J. Med. Chem. 1993c; **36** : 2343-2349

Lam JYT, Lacoste L, Bourassa MG

Cilizapril and early atherosclerotic changes after balloon injury of porcine carotid arteries

Circulation 1992; **85** : 1542-1547

Levin JJ, Chan PS, Porter RS

2,3,6-substituted quinazolinones as angiotensin II receptor antagonists

Drugs Fut. 1995; **20** : 55-65

Lin HS, Rampersaud AA, Zimmerman K, Steinberg MI, Boyd DB

Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists : synthetic and computational chemistry of N-[[4-[2-(2H-tetrazo-5-yl)-1-cycloalken-1-yl]phenyl]methyl]imidazole derivatives and their *in vitro* activity.

J. Med. Chem. 1992; **35** : 2658-2667

Mantlo NB, Chakravarty PK, Ondeyka DL, Siegl PKS, Chang RS, Lotti VJ, Faust KA, Chen TB, Schorn TW, Sweet CS, Emmert SE, Patchett AA, Greenlee WJ

Potent, orally active imidazo[4,5-b]pyridine-based angiotensin II receptor antagonists

J. Med. Chem. 1991; **34** : 2919-2922

Mantlo NB, Kim D, Ondeyka D, Chang RSL, Kivlighn SD, Siegl PKS, Greenlee WJ

Imidazo[4,5-b]pyridine-based AT₁ / AT₂ angiotensin II receptor antagonists

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 17-22

Marie J, Maigret B, Joseph MP, Larguier R, Nouet S, Lombard C, Bonnafous JC

Tyr²⁹² in the seven transmembrane domain of the AT_{1a} angiotensin II receptor is essential for its coupling to phospholipase C

J. Biol. Chem. 1994; **269** : 20815-20818

Martin MM, Su B, Elton TS

Molecular cloning of the human angiotensin II type 2 receptor cDNA

Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994; **205** : 645-651

Matsoukas JM, Goghari MH, Scanlon MN, Franklin KJ, Moore GJ

Synthesis and biological activities of analogues of angiotensins II and III containing O-methyltyrosine and D-tryptophan

J. Med. Chem. 1985; **28** : 780-783

Matsoukas J, Cordopatis P, Belte U, Goghari MH, Ganter RC, Franklin KJ, Moore GJ
Importance of the N-terminal domain of the type II angiotensin antagonist Sarmesin for receptor blockade

J. Med. Chem. 1988; **31** : 1418-1421

Matsoukas J, Bigam G, Zhou N, Moore GJ

I. ¹H NMR studies of [Sar¹] ANG II conformation by Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy in the rotating frame (ROESY) : clustering of the aromatic rings in DMSO
Peptides 1990; **11** : 359-366

Matsoukas J, Bigam G, Yamdagni R, Moore GJ

Conformational studies of angiotensin II and analogues in DMSO by ¹H NMR : lability and intramolecular interactions of the tyrosine hydroxyl and histidine imidazole NH protons
Collect. Czech. Chem. Commun. 1991; **56** : 1348-1357

Matsoukas JM, Agelis G, Hondrelis J, Yamdagni R, Wu Q, Ganter R, Smith JR, Moore D, Moore GJ

Synthesis and biological activities of angiotensin II, Sarilesin, and Sarmesin analogues containing Aze or Pip at position 7
J. Med. Chem. 1993; **36** : 904-911

Matsoukas JM, Hondrelis J, Keramida M, Mavromoustakos T, Makriyannis A, Yamdagni R, Wu Q, Moore GJ

Role of the NH₂-terminal domain of angiotensin II (ANG II) and [Sar¹] angiotensin II on conformation and activity
J. Biol. Chem. 1994; **269** : 5303-5312

Matsui T, Sugiura T, Nakai H, Iguchi S, Shigeoka S, Takada H, Odagaki Y, Nagao Y, Ushio Y, Ohmoto K, Iwamura H, Yamazaki S, Arai Y, Kawamura M

Novel 5-HT₃ antagonists. Isoquinolines and 3-aryl-2-pyridones
J. Med. Chem. 1992; **35** : 3307-3319

Mederski WWKR, Dorsch D, Bokel HH, Beier N, Lues I, Schelling P

Non-peptide angiotensin II receptor antagonists : synthesis and biological activity of a series of novel 4,5-dihydro-4-oxo-3H-imidazo[4,5-c]pyridine derivatives
J. Med. Chem 1994; **37** : 1632-1645

MERCATOR Study Group

Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilizapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty?

Results of the MERCATOR study: a multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial

Circulation 1992; **86** : 100-110

Mestdagh N, Goossens JF

Le binding des récepteurs AT₁ a été mis au point et réalisé par ces deux personnes
Communication personnelle, 1993

Mestdagh N, Goossens JF

Le binding des récepteurs AT₂ a été mis au point et réalisé par ces deux personnes
Communication personnelle, 1994

Middlemiss D, Watson SP

A medicinal chemistry case study : an account of an angiotensin II antagonist drug discovery programme

Tetrahedron 1994; **50** : 13049-13080

Molloy CJ, Taylor DS, Weber H
Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells
J. Biol. Chem. 1993; **268** : 7338-7345

Moore GJ
Kinetics of acetylation-deacetylation of angiotensin II
Int. J. Peptide Protein Res. 1985a; **26** : 469-481

Moore GJ, Matsoukas JM
Angiotensin as a model for hormone-receptor interactions
Biosci. Rep. 1985b; **5** : 407-416
Moore GJ, Goghari MH, Franklin KJ
Influence of methylation of the histidine ring of [Sar¹]A II on conformation and biological activity
Int. J. Peptide Protein Res. 1993; **42** : 445-449

Moore GJ
Designing peptide mimetics
Trends Pharmacol. Sci. 1994; **15** : 124-129

Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ
Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors
J. Biol. Chem. 1993; **268** : 24539-24542

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE
Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor
Nature 1991; **351** : 233-236

Nahmias C, Strosberg AD
The angiotensin AT₂ receptor : searching for signal-transduction pathways and physiological function
Trends Pharmacol. Sci. 1995; **16** : 223-225

Nakajima M, Mukoyama M, Pratt RE, Horiuchi M, Dzau VJ
Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993; **197** : 393-399

Naylor EM, Chakravarty PK, Costello CA, Chang RSL, Chen TB, Faust KA, Lotti VJ, Kivlighn SD, Zingaro GJ, Siegl PKS, Wong PC, Carini DJ, Wexler RR, Patchett AA, Greenlee WJ
Potent imidazole angiotensin II antagonists : acyl sulfonamides and acyl sulfamides as tetrazole replacements
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 69-74

Nelson EB, Harm SC, Goldberg M, Shahinfar S, Goldberg A, Sweet CS
Chap 174 : Clinical profile of the first angiotensin II (AT₁ specific) receptor antagonists
Hypertension : Pathophysiology, Diagnosis, and Management; second edition, Laragh JH, Vrenner BM Ed; Raven Press ; 1995 : 2895-2916

Nicolaï E, Curé G, Goyard J, Kirchner M, Teulon JM, Versigny A, Cazes M, Caussade F, Virone-Oddos A, Cloarec A
Synthesis and SAR studies of a novel triazolopyrimidine derivatives as potent, orally active angiotensin II receptor antagonists
J. Med. Chem. 1994; **37** : 2371-2386

Nikiforovich GV, Marshall GR

Three-dimensional recognition requirements for angiotensin agonists : a novel solution for an old problem

Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993; **195** : 222-228

Noda K, Saad Y, Kinoshita A, Boyle TP, Graham RM, Husain A, Karnik SS

Tetrazole and carboxylate groups of angiotensin receptor antagonists bind to the same subsite by different mechanisms

J. Biol. Chem. 1995; **270** : 2284-2289

O'Brien ER, Schwartz SM

Update on the biology and clinical study of restenosis

Trends Cardiovasc. Med. 1994; **4** : 169-178

Palkowitz AD, Steinberg MI, Thrasher KJ, Reel JK, Hauser KL, Zimmerman KM, Wiest SA, Whitesitt CA, Simon RL, Pfeifer W, Lifer SL, Boyd DB, Barnett CJ, Wilson TM, Deeter JB, Takeuchi K, Riley RE, Miller WD, Marshall WS

Structural evolution and pharmacology of a novel series of triacid angiotensin II receptor antagonists

J. Med. Chem. 1994; **37** : 4508-4521

Papadopoulos EP, Jarrar A, Issidorides CH

Oxidations with manganese dioxide

J. Amer. Chem. Soc. 1966; **31** : 615-616

Perlman S, Schambye HT, Rivero RA, Greenlee WJ, Hjorth SA, Schwartz TW

Non-peptide angiotensin agonist. Functional and molecular interaction with the AT₁ receptor

J. Biol. Chem. 1995; **270** : 1493-1496

Perreaut P, Clément J, Muneaux C, Muneaux Y, Cazaubon C, Gougat J, Guiraudou P, Lacour C, Nisato D, Le Fur G, Brelière JC

Dihydro-imidazolone derivatives as angiotensin II receptor antagonists : chiral effect on the activity

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 163-168

Pierce ME, Carini DJ, Huhn GF, Wells GJ, Arnett JF

Practical synthesis and regioselective alkylation of methyl 4(5)-(pentafluoroethyl)-2-propylimidazole-5(4)-carboxylate to give DuP 532, a potent angiotensin II antagonist

J. Org. Chem. 1993; **58** : 4642-4645

Pinto YM, Buikema H, van Gilst WH

Hyperactive tissue renin-angiotensin systems in cardiovascular dysfunction : experimental evidence and clinical hypotheses

Clin. Exper. Hypertension 1995; **17** : 441-468

Plucinska K, Kataoha T, Yodo M, Cody WL, He JX, Humblet C, Lu GH, Lunney E, Major TC, Panek RL, Schelkun P, Skeeane R, Marshall GR

Multiple binding modes for the receptor-bound conformations of cyclic angiotensin II agonists

J. Med. Chem. 1993; **36** : 1902-1913

Powell JS, Clozel JP, Kuhn H

Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal thickening after vascular injury

Science 1989; **245** : 186-188

Pörsti I, Bara AT, Busse R, Hecker M

Release of nitric oxide by angiotensin (1-7) from porcine coronary endothelium : implications for a novel angiotensin receptor

Br. J. Pharmacol. 1994; **111** : 652-654

Prescott MF, Webb RL, Reidy MA
 Angiotensin-converting enzyme inhibitor versus angiotensin II, AT₁ receptor antagonist
Amer. J. Pathology 1991; **39** : 1291-1296

Prescott MF, Sawyer WK
 ACE inhibition versus angiotensin II, AT₁ receptor antagonism : a review of effects on intimal lesion formation in animal models of vascular injury, restenosis, and atherosclerosis
Drug. Develop. Res. 1993; **29** : 88-93

Quan ML, Olson RE, Carini DJ, Ellis CD, Hillyer GL, Lalka GK, Liu J, VanAtten MK, Chiu AT, Wong PC, Wexler RR, Timmermans PBMWM
 Balanced angiotensin II receptor antagonists. I. The effects of biphenyl "ortho" substitution on the AT₁/AT₂ affinities
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 2011-2016

Quan ML, Chiu AT, Ellis CD, Wong PC, Wexler RR, Timmermans PBMWM
 Balanced AT₁/AT₂ receptor antagonists. 4. XR510 and related 5-(3-amidopropanoyl) imidazoles possessing equal affinity for the AT₁ and AT₂ receptors
J. Med. Chem. 1995; **38** : 2938-2945

Quick J, Ramachandra R
 The β -MEM protecting group in alkaloid synthesis. Synthesis of abresoline.
Synth. Comm. 1978; **8** : 511-514

Rakugi I, Kim DK, Krieger JE
 Induction of angiotensin converting enzyme in the neointima after vascular injury
J. Clin. Invest. 1994; **93** : 339-346

Rauk A, Hamilton G, Moore GJ
 Mechanistic consequences of charge transfer systems in serine proteases and angiotensin : semiempirical computations
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987; **145** : 1349-1355

Reitz DB, Garland DJ, Norton MB, Collins JT, Reinhard EJ, Manning RE
 N₁-sterically hindered 2H-imidazol-2-one angiotensin II receptor antagonists : the conversion of surmountable antagonists to insurmountable antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1993; **3** : 1055-1060

Reitz DB, Penick MA, Norton MB, Reinhard EJ, Olins GM, Corpus VM, Palomo MA, McGraw DE, McMahon EG
 1H-1,2,4-triazole angiotensin II receptor antagonists : "C-linked" analogs of SC 50560
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994a; **4** : 105-110

Reitz DB, Penick MA, Reinhard EJ, Cheng BK, Olins GM, Corpus VM, Palomo MA, McGraw DE, McMahon EG
 1H-1,2,4-triazole angiotensin II receptor antagonists : N-phenylpyridinylmethyl and N-pyridinylphenylmethyl analogs of SC 50560
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994b; **4** : 99-104

Ries UJ, Mihm G, Narr B, Hasselbach KM, Wittneben H, Entzeroth M, van Meel JCA, Wiene W, Huel NH
 6-substituted benzimidazoles as new nonpeptide angiotensin II receptor antagonists : synthesis, biological activity, and structure-activity relationships
J. Med. Chem. 1993; **36** : 4040-4051

Rivero RA, Kevin NJ, Allen EE
 New potent angiotensin II receptor antagonists containing phenylthiophenes and phenylfurans in place of the biphenyl moiety
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1993; **3** : 1119-1124

Rivero RA, Greenlee WJ, Chang RSL

Substituted 1,3-benzodioxole & 1,3-benzodithiole -2- carboxylates and their tetrazole analogs with potent binding affinity to the angiotensin II AT₁ receptor

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 747-750

Robertson MJ, Dougall IG, Harper D, McKechnie KCW, Leff P

Agonist-antagonist interactions at angiotensin receptors : application of a two-state receptor model

Trends Pharmacol. Sci. 1994; **15** : 364-369

Ruzicka M, Yuan B, Harmsen E, Leenan FHH

The renin-angiotensin system and volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. Effects of angiotensin converting enzyme inhibitor versus angiotensin II receptor blocker

Circulation 1993; **87** : 921-930

Ryono DE, Bird JE, Buote J, Delaney CL

Quinoline-4-carboxylic acids as angiotensin II receptor antagonists

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994a; **4** : 195-200

Ryono DE, Lloyd J, Poss MA, Bird JE, Buote J, Chong S, Dejneka T, Dickinson KEJ, Gu Z, Mathers P, Moreland S, Morrison RA, Petrillo EW, Powell JR, Schaeffer T, Spitzmiller ER, White RE

Orally active prodrugs of quinoline-4-carboxylic acid angiotensin II receptor antagonists

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994b; **4** : 201-206

Sadoshima JJ, Izumo S

Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts

Circ. Res. 1993a; **73** : 413-423

Sadoshima JJ, Izumo S

Signal transduction pathways of angiotensin II-induced *c-fos* gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. Roles of phospholipid-derived second messengers

Circ. Res. 1993b; **73** : 424-438

Salimbeni A, Canevotti R, Paleari F, Bonaccorsi F, Renzetti AR, Belvisi L, Bravi G, Scolastico C

Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Synthesis, *in vitro* activity, and molecular modeling studies of N-[(heterobiaryl)methyl]imidazoles

J. Med. Chem. 1994; **37** : 3928-3938

Samanen J, Narindray D, Adams W, Cash T, Yellin T, Regoli D

Effects of D-amino acid substitution on antagonist activities of angiotensin II analogues

J. Med. Chem. 1988; **31** : 510-516

Samanen J, Cash T, Narindray D, Brandeis E, Yellin T, Regoli D

The role of position 4 in angiotensin II antagonists : a structure-activity study

J. Med. Chem. 1989a; **32** : 1366-1370

Samanen J, Narindray D, Cash T, Brandeis E, Adams W, Yellin T, Eggleston D, DeBrosse C, Regoli D

Potent angiotensin II antagonists with non- β branched amino acids in position 5

J. Med. Chem. 1989b; **32** : 466-472

Samanen J, Cash T, Narindray D, Brandeis E, Adams W, Weideman H, Yellin T, Regoli D

An investigation of angiotensin II agonist and antagonist analogues with 5,5-dimethyl-thiazolidine-4-carboxylic acid and other constrained amino acids

J. Med. Chem. 1991; **34** : 3036-3043

Samanen J, Peishoff CE, Keenan RM, Weinstock J
Refinement of a molecular model of angiotensin II employed in the discovery of potent nonpeptide antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1993; **3** : 909-914

Sandberg K, Ji H, Clark AJL, Shapira H, Catt KJ
Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype
J. Biol. Chem. 1992; **267** : 9455-9458

Santella III JB, Duncia JV, Ensinger CL, VanAtten MK, Carini DJ, Wexler RR, Chiu AT, Wong PC, Timmermans PBMWM
Balanced angiotensin II receptor antagonists. III. The effects of substitution at the imidazole 5-position
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 2235-2240

Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T
Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor
Nature 1991; **351** : 230-233

Scanlon MN, Matsoukas JM, Franklin KJ, Moore GJ
A new approach to angiotensin antagonists : methylation of the tyrosine hydroxyl in angiotensin II
Life Sci. 1984; **34** : 317-321

Schambye HT, Hjorth SA, Bergsma DJ, Sathe G, Schwartz TW
Differentiation between binding sites for angiotensin II and nonpeptide antagonists on the angiotensin II type 1 receptors
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994a; **91** : 7046-7050

Schambye HT, Wijk B, Hjorth SA, Wiene W, Entzeroth M, Bergsma DJ, Schwartz TW
Mutations in transmembrane segment VII of the AT₁ receptor differentiate between closely related insurmountable and competitive angiotensin antagonists
Br. J. Pharmacol. 1994b; **113** : 331-333

Schambye HT, Hjorth SA, Weinstock J, Schwartz TW
Interaction between the nonpeptide angiotensin antagonist SKF 108566 and histidine 256 (HisVI: 16) of the angiotensin type 1 receptor
Mol. Pharmacol. 1995; **47** : 425-431

Shibouta Y, Inada Y, Ojima M, Wada T, Noda M, Sanada T, Kubo K, Kohara Y, Naka T, Nishikawa K
Pharmacological profile of a highly potent and long-acting angiotensin II receptor antagonist, 2-ethoxy-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylic acid (CV-11974), and its prodrug, (±)-1-(cyclohexyloxycarbonyloxy)-ethyl 2-ethoxy-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]-1H-benzimidazole-7-carboxylate (TCV-116)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993; **266** : 114-120

Sircar I, Hodges JC, Quin J, Bunker AM, Winters RT, Edmunds JJ, Kostlan CR, Connolly C, Kesten SJ, Hamby JM, Topliss JG, Keiser JA, Panek RL
Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. 2. Design, synthesis, and structure-activity relationships of 2-alkyl-4-(1H-pyrrol-1-yl)-1H-imidazole derivatives : profile of 2-propyl-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl]-methyl]-4-[2-(trifluoroacetyl)-1H-pyrrol-1-yl]-1H-imidazole-5-carboxylic acid (CI-996)
J. Med. Chem. 1993a; **36** : 2253-2265

Sircar I, Winters RT, Quin J, Lu GH, Major TC, Panek RL
Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. 1. Synthesis and *in vitro* structure-activity relationships of 4-[[[(1H-pyrrol-1-ylacetyl)amino]phenyl]methyl]imidazole derivatives as angiotensin II receptor antagonists

J. Med. Chem. 1993b; **36** : 1735-1745

Spear KL, Brown MS, Reinhard EJ, McMahon EG, Olins GM, Palomo MA, Patton DR
Conformational restriction of angiotensin II : cyclic analogues having high potency
J. Med. Chem. 1990; **33** : 1935-1940

Speth RC, Kim KH

Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, p-aminophenylalanine⁶-angiotensin II
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; **169** : 997-1006

Steinberg MI, Palkowitz AD, Thrasher KJ, Reel JK, Zimmerman KM, Whitesitt CA, Simon RL, Hauser KL, Lifer SL, Pfeifer W, Takeuchi K, Wiest SA, Vasudevan V, Bemis KG, Deeter JB, Barnett CJ, Wilson TM, Marshall WS, Boyd DB

Chiral recognition of the angiotensin II (AT₁) receptor by a highly potent phenoxyproline octanoamide

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 51-56

Stoll M, Steckelings M, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T

The angiotensin AT₂ receptor inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells

J. Clin. Invest. 1995; **95** : 651-657

Struijker-Boudier HA, Smits JFM, De Mey JGR

Pharmacology of cardiac and vascular remodeling

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1995; **35** : 509-539

Taguchi J, Abe J, Okazaki H, Ochiai M, Ohno M, Takuwa Y, Kurokawa K

Angiotensin converting enzyme inhibitors or DuP 753 prevent neointimal formation following balloon injury with single topical or multiple systemic application

Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993; **196** : 969-974

Takahasi K, Bardhan S, Kambayashi Y, Shirai H, Inagami T

Protein tyrosine phosphatase inhibition by angiotensin II in rat pheochromocytoma cells through type 2 receptor, AT₂

Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994; **198** : 60-66

Thomas AP, Allott CP, Gibson KH, Major JS, Masek BB, Oldham AA, Ratcliffe AH, Roberts DA, Russell ST, Thomason DA

New nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. 1. Synthesis, biological properties, and structure-activity relationships of 2-alkyl benzimidazole derivatives

J. Med. Chem. 1992; **35** : 877-885

Thomas AP, Roberts DA, Thomason DA

The synthesis and biological activity of tetrahydroquinoline angiotensin II antagonists containing a substituted biphenyltetrazole group

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 2615-2620

Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD

Angiotensin II receptors and Angiotensin II receptor antagonists

Pharmacol. Rev. 1993; **45** : 205-251

Timmis AD, Pitt B

Effects of ACE inhibitors on coronary atherosclerosis and restenosis

Br. Heart J. 1994; **72** : 57-60

Turner CE, Pietras KM, Taylor DS, Molloy CJ

Angiotensin II stimulation of rapid paxillin tyrosine phosphorylation correlates with the formation of focal adhesions in rat aortic smooth muscle cells

J. Cell Sci 1995; **108** : 333-342

Underwood DJ, Strader CD, Rivero R, Patchett AA, Greenlee W, Prendergast K
Structural model of antagonist and agonist binding to the angiotensin II, AT₁ subtype, G
protein coupled receptor
Chem. Biol. 1994; **1** : 211-221

Vinson GP, Ho MM, Puddefoot JR
The distribution of angiotensin II type 1 receptors, and the tissue renin-angiotensin systems
Molecular Medicine Today 1995; 35-39

Viswanathan M, Seltzer A, Saavedra JM
Heterogeneous expression of angiotensin II AT₁ receptors in neointima of rat carotid artery and
aorta after balloon catheter injury
Peptides 1994; **15** : 1205-1212

Walsh TF, Fitch KJ, MacCoss M, Chang RSL, Kivlighn SD, Lotti VJ, Siegl PKS, Patchett
AA, Greenlee WJ
Synthesis of new imidazo[1,2-b]pyridazine isosteres of potent imidazo[4,5-b]pyridine
angiotensin II antagonists
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 219-222

Watson SP, Middlemiss D, Pass M, Hubbard T, Panchal TA, Heron NM, Paton JMS, Butt A,
Dean AW, Donnelly M, Baylis MK
C-linked pyrazole biaryl tetrazoles as antagonists of angiotensin II. Part II : pharmacokinetics
and an efficient regioselective synthesis
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 151-156

Weinstock J, Keenan RM, Samanen J, Hempel J, Finkelstein JA, Franz RG, Gaitanopoulos
DE, Girard GR, Gleason JG, Hill DT, Morgan TM, Peishoff CE, Aiyar N, Brooks DP,
Frederickson TA, Ohlstein EH, Ruffolo RR, Stack EJ, Sulpizio AC, Weidley EF, Edwards RM
1-(carboxybenzyl) imidazole-5-acrylic acids : potent and selective angiotensin II receptor
antagonists
J. Med. Chem. 1991; **34** : 1514-1517

Weinstock J, Hill DT, Keenan RM, Franz RG, Gaitanopoulos DE, Girard GR, Eggleston DS,
Aiyar N, Griffin E, Ohlstein E, Brooks DP, Gellai M, Frederickson TA, Weidley EF, Edwards
RM
A potent long-acting imidazole-5-acrylic acid angiotensin II AT₁ receptor antagonist
Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 23-28

Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M
Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989; **163** : 284-291

Wienen W, Mauz ABM, Van Meel JCA, Entzeroth M
Different types of receptor interaction of peptide and nonpeptide angiotensin II antagonists
revealed by receptor binding and functional studies
Mol. Pharmacol. 1992; **41** : 1081-1088

Winn M, De B, Zydowsky TM, Altenbach RJ, Basha FZ, Boyd SA, Brune ME, Buckner SA,
Crowell DA, Drizin I, Hancock AA, Jae HS, Kester JA, Lee JY, Mantei RA, Marsh KC,
Novosad EI, Oheim KW, Rosenberg SH, Shiosaki K, Sorensen BK, Spina K, Sullivan GM,
Tasker AS, von Geldern TW, Warner RB, Opgenorth TJ, Kerkman DJ, DeBernardis JF
2-(Alkylamino)nicotinic acid and analogs. Potent angiotensin II antagonists
J. Med. Chem. 1993; **36** : 2676-2688

Wintersgill H, Warburton P, Bryson S, Ball S, Balmforth A
Characterization of the angiotensin II receptor expressed by the human hepatoma cell line,
PLC-PRF-5
Eur. J. Pharmacol. 1992; **227** : 283-291

Wong PC, Price WA, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PBMWM

Nonpeptide angiotensin II antagonists. XI. Pharmacology of EXP-3174 : an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent
J. Pharmacol. Exp. Ther. 1991; **255** : 211-217

Wong PC, Timmermans PBMWM

Chap 186 : Physiological effects of a new class of highly specific angiotensin II receptor antagonists

Hypertension : Pathophysiology, Diagnosis, and Management; second edition, Laragh JH, Vrenner BM Ed; Raven Press ; 1995 : 3079-3098

Wright JW, Krebs LT, Stobb JF, Harding JW

The angiotensin IV system : functional implications
Front. Neuroendocrinology 1995; **16** : 23-52

Wu MT, Ikeler TJ, Ashton WT, Chang RSL, Lotti VJ, Greenlee WJ

Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of non-peptide AT₂-selective angiotensin II receptor antagonists

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1993; **3** : 2023-2028

Yamano Y, Ohyama K, Chaki S, Guo DF, Inagami T

Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis

Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992; **187** : 1426-1431

Yamano Y, Ohyama K, Kikyo M, Sano T, Nakagomi Y, Inoue Y, Nakamura N, Morishima I, Guo DF, Hamakubo T, Inagami T

Mutagenesis and the molecular modeling of the rat angiotensin II receptor AT₁

J. Biol. Chem. 1995; **270** : 14024-14030

Yanagisawa T, Ueyama N, Kawai T, Sonogawa M, Baba H, Mochizuki S, Kozakai K, Tomiyama T

4,5,6,7-tetrahydro-8-oxo-cycloheptimidazoles : a new class of potent non-peptide angiotensin II receptor antagonists

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1993; **3** : 1559-1564

Yanagisawa H, Amemiya Y, Kanazaki T, Shimoji Y, Fujimoto K

Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists : synthesis, biological activities, and structure-activity relationships of imidazole-5-carboxylic acids bearing alkyl, alkenyl, and hydroxyalkyl substituents at the 4-position and their related compounds

J. Med. Chem. 1996; **39** : 323-338

Yang SG, Saifeddine M, Lanionu A, Hollenberg MD

Distinct signal transduction pathways for angiotensin II in guinea pig gastric smooth muscle : differential blockade by Indomethacin and tyrosine kinase inhibitors

J. Pharmacol. Exp. Ther. 1993; **264** : 958-966

Zhang J, Entzeroth M, Wienen W, Van Meel JCA

Characterization of BIBS 39 and BIBS 222 : two new nonpeptide angiotensin II receptor antagonists

Eur. J. Pharmacol. 1992; **218** : 35-41

Zydowsky TM, Winn M, De B, Condon SL, Altenbach RJ, Basha FZ, Boyd SA, Buckner SA, Hancock AA, Lee JY, Mantei RA, Novosad EI, Sorensen BK, Tasker AS, Shiosaki K,

Kerkman DJ, Opgenorth TJ, DeBernadis JF

Synthesis and *in vitro* evaluation of fused ring heterocycle-containing angiotensin II antagonists

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994; **4** : 173-176

