
LES DESINTEGRINES

ISSUES DES VENINS DE SERPENTS:

CLASSIFICATION ET POTENTIEL THERAPEUTIQUE

O. KALLECH-ZIRI¹, J. LUIS², M. EL AYE¹ ET N. MARRAKCHI^{1, 3*}

¹ Laboratoire des Venins et Toxines, Institut Pasteur de Tunis, 13 Place Pasteur, 1002 Tunis Belvédère, Tunisie.

² CISMET, CNRS-FRE 2737, Faculté de Pharmacie, Marseille, France.

³ Faculté de Médecine de Tunis, Tunisie.

* Corresponding author: E-mail: naziba.marrakchi@pasteur.rns.tn

RESUME

La biochimie et la pharmacologie des venins de serpents révèlent un polymorphisme structural et fonctionnel de plus en plus important des protéines qu'ils contiennent. Ces dernières induisent leurs effets principalement par deux voies : soit grâce à leur activité enzymatique (protéase, phospholipase A2, L-amino acide oxydase...), soit grâce à leurs interactions avec des récepteurs membranaires. Les désintégrines, dérivant des venins de serpents, interagissent avec les récepteurs de type intégrines en tant qu'antagonistes de l'adhésion et de la migration des cellules. La caractérisation de bloqueurs d'intégrines à partir du venin de vipère, nous permet de comprendre le fonctionnement de certaines intégrines et d'envisager le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Dans cette revue, on reporte la classification des désintégrines, antagonistes des intégrines, ainsi que leur implication thérapeutique et en particulier la place et les caractéristiques structurales et fonctionnelles de la lebestatine, une désintégrine courte extraite à partir du venin de serpent tunisien *Macrovipera lebetina*.

Mots clés: Désintégrines, venin de serpent, famille de type KTS, adhésion, angiogenèse.

INTRODUCTION

Le terme « désintégrine » a été inventé en 1990 ^{1, 2} après la découverte de la première protéine purifiée à partir du venin de serpent *Agkistrodon balys* ³, pour décrire une famille de protéines du venin de vipère qui a la capacité d'inhiber l'agrégation plaquettaire. Ces protéines ont été caractérisées comme des

ABSTRACT

Biochemistry and pharmacology of snake venoms reveal structural and functional polymorphisms of proteins they contain.

These lead their effects by their enzymatic activities (proteases, phospholipases A2, L-amino acid oxydases...) or by binding to membrane receptors. Disintegrin from snake venoms play a role as antagonists of cell adhesion and migration by binding integrins and blocking their function. Characterization of integrin antagonists from snake venom allows us understanding the function of some integrins providing new information to develop new therapeutic agents.

In this review, we report classification and therapeutic implications of disintegrins.

In particular the structural and the functional characteristics of lebestatin; a short disintegrin isolated from Tunisian *Macrovipera lebetina* snake venom.

Key words: Disintegrins, snake venom, KTS family type, adhesion, angiogenesis.

molécules non enzymatiques et de faible masse moléculaire (de 4 à 10 kDa) ^{1, 4, 5}. Leur structure primaire montre une forte conservation dans l'arrangement des cystéines. Les désintégrines peuvent être solubles ou membranaires. Quatre-vingt onze désintégrines solubles ont été caractérisées dans les venins des serpents des quatre familles : Atractaspididae,

Elapidae, Viperidae et Colubridae. La majorité de ces protéines constituent le domaine C-terminal des métalloprotéases de la classe PII et sont libérées dans le venin par clivage protéolytique^{1,5,6}.

Classification et structure des désintégrines

Les désintégrines forment une famille de polypeptides riches en cystéine, de faible masse moléculaire (de 40 à 100 acides aminés), décrites pour la première fois en tant qu'inhibiteurs efficaces du récepteur plaquettaire du fibrinogène GPIIb/IIIa (α IIb β 3)⁷. Actuellement, la famille des désintégrines peut être divisée en cinq groupes différents selon la longueur des polypeptides et le nombre des ponts disulfures⁸. Le premier groupe est constitué par les désintégrines courtes avec quatre ponts disulfures et une chaîne polypeptidique de 41 à 51 acides aminés. Le deuxième groupe inclut les désintégrines de taille moyenne avec six ponts disulfures et une chaîne polypeptidique de 68 à 73 acides aminés. Le troisième groupe comporte les désintégrines longues de 84 résidus et réticulées par sept ponts disulfures. Le quatrième groupe est constitué des « désintégrines-like » formées par 100 acides aminés et contenant huit ponts disulfures. A la différence de ces 4 groupes qui contiennent des molécules à chaîne unique, le cinquième se compose de désintégrines dimériques contenant des sous-unités d'environ 67 résidus avec quatre ponts disulfures intra-chaînes et deux ponts inter-chaînes^{9,10}.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) a été employée pour déterminer la structure tridimensionnelle de plusieurs désintégrines: la kistrine 11, l'albolabrine¹², la flavoridine¹³, la salmosine 14, la rhodostomine¹⁵, l'échistatine^{16,17} et l'obtustatine^{18,19}. Ces études ont révélé que les désintégrines possèdent une structure non régulière caractérisée par un nombre variable de coudes et de boucles pour former un «core» protéique rigide stabilisé par des liaisons hydrogènes.

La séquence RGD se trouve située au niveau d'une boucle en «épingle à cheveux» stabilisée à la base par deux ponts disulfures²⁰. La boucle RGD est douée d'une grande mobilité lui permettant une reconnaissance et une liaison rapide aux sites de liaison au niveau des intégrines. Le mouvement de la boucle RGD de l'échistatine se fait dans un angle de flexibilité de l'ordre de 60-70°²¹. Par comparaison, la boucle de l'obtustatine qui possède un motif KTS,

montre un mouvement de pivotement d'un angle de l'ordre de 35° avec un maximum de déplacement de l'ordre de 5Å^{1,18}.

Boucle d'adhésion : diversification fonctionnelle

Les désintégrines, comme leur nom l'indique, sont des bloqueurs des récepteurs de type intégrine. Cette inhibition est modulée par l'appariement approprié des cystéines, qui déterminent la conformation de la boucle inhibitrice des désintégrines. La plupart des désintégrines contiennent une séquence consensus d'adhésion, Arg-Gly-Asp (RGD) dans une position conservée. Néanmoins, ce motif classique d'adhésion peut être altéré chez certains membres par exemple **la barbourine**, **l'ussuristatine 2**, **la salmosine 2** qui présentent le motif d'adhésion KGD^{22,23}, ou **l'atrollysine** qui possède un motif MVD²⁴, ce qui modifie leur affinité et leur spécificité vis à vis des intégrines.

Les désintégrines dimériques montrent la plus grande diversité de séquences dans leurs motifs de reconnaissance des récepteurs intégrines. **EC3**, une désintégrine hétérodimérique isolée du venin de la vipère *Echis carinatus*, est un antagoniste sélectif et efficace pour les intégrines α 4 β 1 et α 4 β 7. C'est également un inhibiteur plus faible des intégrines α 5 β 1 et α IIb β 3, et n'inhibe pas l'intégrine α v β 3²⁵. L'activité inhibitrice d'EC3 pour les intégrines α 4 est associée au motif MLD de sa sous-unité β . La sous-unité α d'EC3 contient un motif VGD et la capacité d'EC3 d'inhiber 5 réside dans les deux sous-unités²⁵. L'implication de la séquence MLD dans la spécificité inhibitrice de l'intégrine⁴, est également soutenue par les études sur les désintégrines VLO5, EMS11 et EO5 isolées respectivement des venins de *Vipera lebetina obtusa*, *Eristocophis multisquamatus* et *Echis ocellatus*⁸. EMF10, une autre désintégrine hétérodimérique issue du venin d'*Eristocophis macmahoni*, est un inhibiteur sélectif de l'intégrine α 5 β 1 extrêmement puissant. Elle inhibe aussi partiellement l'adhérence des cellules exprimant les intégrines α IIb β 3, α v β 3 et α 4 β 1 à leurs ligands appropriés²⁶. La reconnaissance sélective de l'intégrine α 5 β 1 par EMF10, est associée à la séquence **MGD(W)**, un motif situé dans la boucle active de la sous-unité β et peut également dépendre du motif **RGD(N)** dans la sous-unité²⁶. D'autres désintégrines dimériques qui bloquent la fonction de l'intégrine α 5 β 1 (EO4, VLO4, VB7 et VA6 des

venins d'*Echis ocellatus*, *Vipera lebetina obtusa*, *Vipera berus* et *Vipera ammodytes* respectivement) contiennent RGD ou KGD dans les deux sous-unités, avec l'exception de EO4, qui possède un motif VGD dans sa sous-unité β et EMS11, qui exprime un motif **MLD** dans sa sous-unité α ⁸. Il a aussi été rapporté que la présence du motif **WGD** dans CC8, une désintégrine hétérodimérique isolée du venin de la vipère d'Afrique du Nord, *Cerastes cerastes cerastes*, augmente son effet inhibiteur sur les intégrines α IIb β 3, α v β 3 et α 5 β 1²⁷.

Les désintégrines contenant le motif RGD montrent une affinité et une sélectivité différentes envers les intégrines qui reconnaissent la séquence RGD dans leurs ligands (i.e. α IIb β 3, α v β 3 et α 5 β 1)^{28,29}. Des expériences de mutagenèse dirigée sur la kistrine ont montré que l'arginine et l'acide aspartique sont extrêmement importants pour une liaison de forte affinité avec l'intégrine GPIIb/IIIa. En effet, le changement du motif RGD par LDV fait que, contrairement à la kistrine native qui reconnaît α v β 3 et α 5 β 1, la protéine mutée ne se lie pas à ces intégrines, mais reconnaît spécifiquement α 4 β 1. De même, le remplacement dans l'échistatine de l'arginine par une alanine ou une ornithine diminue son affinité pour le complexe GPIIb/IIIa. L'acide aminé près de l'acide aspartique pourrait quant à lui influencer l'affinité; la phénylalanine présente dans la **flavolidine** semble accroître son affinité pour la GPIIb/IIIa³⁰. De même, le résidu tryptophane qui suit la séquence KGD joue un rôle crucial dans l'activité biologique et la spécificité de la **barbourine**³¹. Une double substitution de deux alanines qui encadrent la séquence RGD par des prolines dans la **dendrospine**, réduit fortement l'effet anti-agrégant et l'adhésion cellulaire³². La **piscivostatine** est une désintégrine dimérique issue du venin d'*Agkistrodon piscivorus* qui possède deux motifs, reconnus par le récepteur GPIIb/IIIa: RGD et KGD. L'existence de ces deux motifs fait que son activité biologique vis-à-vis de l'agrégation plaquettaire est différente des désintégrines monomériques telle que l'**échistatine**.

Le site d'interaction des désintégrines avec le récepteur GPIIb/IIIa a été examiné par Calvete et al.³³. En utilisant le complexe GPIIb/IIIa plaquettaire purifié, le site de quatre désintégrines marquées à l'iode 125: **albolabrine**, **échistatine**, **bitistatine** et **éristostatine** a été identifié. Il se situe au niveau des résidus 217-302 dans l'unité GPIIIa. Cependant, il ne

faut pas oublier que l'intégrine purifiée à partir des plaquettes peut avoir une structure différente de celle de la protéine native et qu'un site artificiel d'interaction pourrait être créé.

De plus, il a été montré que deux désintégrines (échistatine et éristostatine), qui sont différentes mais apparentées, se lient à des épitopes différents sur les intégrines α v β 3 et GPIIb/IIIa³⁴. Ceci est dû à une différence de résidus d'acides aminés qui entourent la séquence RGD.

En plus de la boucle RGD, d'autres caractéristiques structurales se sont révélées importantes pour l'affinité et la sélectivité des désintégrines. En effet, Wright et al.³⁵ ont étudié l'importance de la région C-terminale de l'échicétine dans sa liaison à l'intégrine GPIIb/IIIa. Pour cela un décapeptide correspondant aux résidus constituant l'extrémité C-terminale a été synthétisé et il a été trouvé que le peptide inhibe l'adhésion du complexe GPIIb/IIIa à l'échicétine immobilisée ou non au fibrinogène, et active le récepteur GPIIb/IIIa qui se lie à la fibronectine, à la vitronectine et au collagène type I et IV. Les auteurs en concluent que le peptide-non RGD interagit avec GPIIb/IIIa, entraînant une activation de l'intégrine et l'extension de sa spécificité de liaison pour inclure des protéines qui ne sont pas toujours considérées comme des ligands. Des analogues ont été construits à partir de l'échistatine: R24A, D27W et l'échistatine délétée de 9 acides aminés du côté C-terminal. Il s'est avéré que l'analogue R24A n'interagit plus avec α IIb β 3 et α v β 3; l'analogue D27W augmente son affinité vis-à-vis de α IIb β 3 et diminue celle vis-à-vis de α v β 3. Quant à la protéine délétée, son affinité vis-à-vis de α IIb β 3 diminue. Il a été de ce fait conclu que la boucle RGD détermine sa reconnaissance spécifique à α IIb β 3 et α v β 3 et que le côté C-terminal supporte la liaison au reste de l'intégrine²⁸.

Aujourd'hui quatre désintégrines courtes non-RGD ont été caractérisées. Trois possèdent le motif fonctionnel KTS: l'obtustatine³⁶, la vipéristatine³⁷, et la lebestatine³⁸ qui sont issues respectivement des venins de *Vipera lebetina obtusa*, *Vipera lebetina plaestenea* et *Macrovipera lebetina*. La quatrième désintégrine est la jerdostatine issue du venin de *Trimersurus jerdonii*. Elle présente un motif RTS³⁹. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que le motif KTS, ainsi que le motif RTS, bloque spécifiquement et avec une haute affinité l'intégrine α 1 β 1^{39,40}.

La figure 1 montre un diagramme de la famille des intégrines et les différents motifs des tripeptides trouvés dans les désintégrines qui bloquent les interactions spécifiques intégrine-ligand.

Désintégrines et agrégation plaquettaire

Les désintégrines forment un groupe d'inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire qui perturbent les interactions entre l'intégrine GPIIb/IIIa (α IIb β 3) et le fibrinogène. L'étude des venins de serpents a déjà été à l'origine de la conception et du développement d'un certain nombre de composés utilisés en pharmacopée. Les structures de tels composés actifs, outils de diagnostic ou médicaments en cours d'application, ont été calquées sur celles de molécules naturelles, et ce après que les activités biologiques de ces dernières aient été élucidées et clairement définies. Parmi ces molécules on peut citer l'éptifibatide (intégréline) qui est un heptapeptide synthétique qui mime le site actif de la barbourine ⁴¹.

Désintégrines, métastase et angiogenèse

Pour les cellules non plaquettaires, les désintégrines ont été utilisées le plus fréquemment dans les modèles angiogéniques ⁴², de migration neutrophile ⁴³, de détachement rétinale tractionnaire ⁴⁴, de métastases expérimentales chez la souris ⁴⁵ et de la thrombocytopénie associée aux infections bactériennes Gram+ ⁴⁶. Elles sont capables d'inhiber les fonctions des cellules exprimant les intégrines α 4 β 1, α 5 β 1, α v β 5, α 3 β 1, α v β 3 et α IIb β 3. Cette inhibition empêche les cellules cancéreuses d'envahir les matrices artificielles des tissus connectifs et d'adhérer aux ligands natifs (fibronectine, vitronectine, collagène de type IV, fibrinogène, VCAM-1 et laminine) ⁴⁷.

Les désintégrines monomériques et homodimériques de type RGD inhibent l'adhésion et la migration des cellules endothéliales dépendantes du récepteur α v β 3. On peut citer l'exemple de l'accutine ⁴⁸, la triflavine ⁴⁹, la salmosine ^{50, 51}, la rhodostomine ^{42, 52} et la contortrostatine ⁵³. Cette inhibition est induite par un mécanisme apoptotique des cellules endothéliales. Par exemple, l'accutine ⁴⁸ inhibe l'angiogenèse in vitro (la formation des tubes en utilisant les cellules HUVECs) et in vivo (en utilisant le modèle CAM) et elle induit l'apoptose de la fragmentation de l'ADN mesurée par électrophorèse et cytométrie de flux.

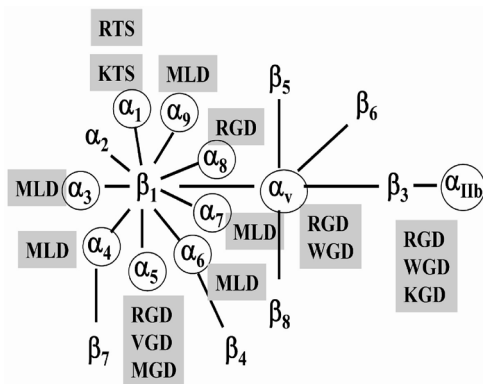


Figure 1. Diagramme de la famille des intégrines et les différents motifs inhibiteurs correspondants trouvés dans les désintégrines ¹.

Un autre modèle d'inhibition métastatique utilisé est la xénogreffe (orthotopique) chez les souris dans lequel la désintégrine homodimérique, la contortrostatine est injectée dans des masses tumorales du cancer du sein MDA-MB-435. Elle inhibe non seulement la croissance de la tumeur, mais réduit aussi le nombre des micro- et macro-métastases pulmonaires ⁵³. De même l'échistatine qui inhibe les intégrines α IIb β 3, α v β 3 et α 5 β 1, réduit la colonisation pulmonaire chez les souris C57BL/6 injectées avec un mélanome murin B16F10 ⁵⁴.

La séquence MLD qui se trouve au niveau des désintégrines hétérodimériques est responsable de l'inhibition des intégrines α 4 β 1, α 4 β 7 et α 9 β 1. Ces intégrines se trouvent à la surface des leucocytes et participent à la réponse immunitaire au cours de l'inflammation. Des études préliminaires dans des systèmes biologiques ont montré l'efficacité des désintégrines de type MLD, en particulier EC3 et EC6, pour inhiber la migration des neutrophiles humains à travers les cellules HUVECs ⁵⁵. EC3 est identifiée comme un accélérateur de l'apoptose spontanée des neutrophiles humains ⁴³.

La famille des désintégrines la plus récemment décrite est celle qui possède le motif d'adhésion KTS. Les protéines appartenant à cette famille agissent spécifiquement à travers l'intégrine α 1 β 1, récepteur spécifique du collagène de type IV. Cette intégrine est exprimée essentiellement à la surface des cellules endothéliales vasculaires, suggérant son implication dans l'angiogenèse. Des études expérimentales utilisant des souris « knock out » déficientes pour le gène α 1 montrent une réduction de la

vascularisation, ainsi qu'une inhibition de la croissance tumorale³⁶. De plus, l'utilisation de l'anticorps anti- $\alpha 1\beta 1$ réduit la croissance tumorale et l'angiogénèse des cellules cancéreuses dérivant de l'épiderme humain³⁷. Cette corrélation entre l'étude génétique et l'étude pharmacologique évalue l'importance de l'intégrine $\alpha 1\beta 1$ dans les processus angiogéniques qui pourrait donc être une cible pharmacologique pour bloquer le développement tumoral. L'obtustatine³⁶, la viperistatine³⁷, la lebestatine³⁸ et la jerdostatine³⁹ sont des désintégrines monomériques courtes qui agissent via ce récepteur.

La lebestatine diffère de l'obtustatine par deux acides aminés en position 24 (Arg/Leu) et 38 (Ser/Leu). Les séquences de la lebestatine et de la viperistatine sont similaires. Les différences se situent en positions 38 (Ser/Val) et 40 (Pro/Gln). Cette similarité au niveau de la structure primaire qui atteint 97 % est confirmée au niveau de la structure tertiaire. En effet, la modélisation par homologie de la lebestatine et de la viperistatine, en prenant comme modèle la structure tertiaire de l'obtustatine, montre que ces trois molécules sont parfaitement superposables (Figure 2a). Les principales différences structurales entre ces trois peptides sont localisées au niveau de la boucle d'adhésion, qui contient le motif KTSRTS (lebestatine et viperistatine) ou KTSLTS (obtustatine), et du domaine C-terminal (PSYPG41-COOH, PVYQG 41-COOH et PLYPG41-COOH pour, respectivement, la lebestatine, la viperistatine et l'obtustatine). Le remplacement d'un acide aminé neutre (Leu 24) par un acide aminé basique (Arg 24) pourrait influencer l'activité de ces peptides (Figure 2b).

En effet, nous avons montré que la concentration qui donne 50% d'inhibition (IC₅₀) de l'adhésion des cellules cancéreuses par la lebestatine est de 0,2 nM. Cette activité est 10 fois plus importante que celle de l'obtustatine (2 nM) et elle est 2,5 fois moins importante que la viperistatine (0,08 nM)³⁹. Cet effet spécifique de l'inhibition de l'adhésion, nous a poussés à tester la lebestatine sur la migration cellulaire. Nous avons montré que la lebestatine est capable d'inhiber, dans des chambres de Boyden, la migration des cellules cancéreuses vers le collagène de type IV avec une IC₅₀ de l'ordre de 0,1 nM³⁸. Alors que l'effet de l'obtustatine et de la viperistatine sur la migration des cellules cancéreuses n'a pas été étudié pour pouvoir les comparer à celui de la lebestatine. Dans les stratégies antiangiogéniques, l'idée est de cibler les cellules endothéliales qui supportent la

croissance tumorale plutôt que les cellules cancéreuses elles mêmes. Cette approche est particulièrement prometteuse car elle cible des cellules génétiquement stables, ce qui limite l'apparition d'une résistance.

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet de la lebestatine sur les cellules endothéliales. Nous avons démontré qu'elle inhibe d'une manière dose-dépendante l'adhésion et la migration des cellules HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells) en utilisant le collagène IV comme matrice.

Dans un second temps, nous avons démontré que la lebestatine inhibe, d'une manière dose-dépendante, la formation spontanée de nouveaux vaisseaux, en utilisant la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet comme modèle. Nos résultats ont montré qu'elle inhibe aussi l'angiogénèse induite par des facteurs de croissance comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) en utilisant seulement 0,5 μ g de protéine/embryon³⁸.

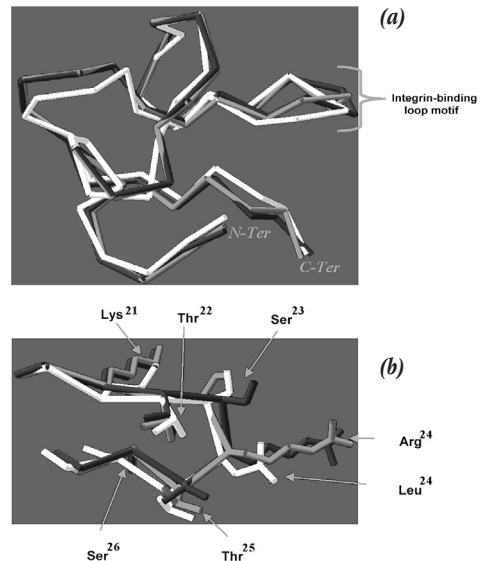


Figure 2. Modèles moléculaires de la lebestatine, la viperistatine et l'obtustatine. (a) superposition des atomes de la lebestatine (gris), l'obtustatine (blanc) et la viperistatine (gris foncé), (b) superposition de la boucle d'adhésion des trois molécules³⁸.

L'obtustatine a été aussi testée sur ce modèle en utilisant le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) comme inducteur de l'angiogénèse et l'inhibition est observée à une dose de 5 μ g de protéine/embryon⁴⁰.

Quant à la viperistatine, elle n'a pas été testée sur l'angiogenèse. Ces différences d'activités de la lebestatine et de l'obtustatine au niveau de ce test sont en corrélation avec celles observées au niveau de l'inhibition de l'adhésion des cellules cancéreuses.

En regardant les séquences de ces différentes protéines appartenant à la famille des désintégrines de type KTS, il est clair que la différence observée au niveau de l'activité est dûe, en fait, au changement de quelques acides aminés. La boucle d'adhésion KTS ainsi que l'extrémité C-terminale seraient donc responsables de l'activité de ces peptides. En effet, la synthèse de différents analogues de la lebestatine était nécessaire afin d'entreprendre des études de relation structure-fonction susceptibles de définir le site pharmacologique et de sélectionner ou conserver le composé le plus actif. Les résultats ont montré que le changement d'un acide aminé neutre, qui suit le motif d'adhésion KTS, par un acide aminé très basique augmenterait l'effet de la lebestatine par rapport à l'obtustatine (Kallech-Ziri et al., manuscrit soumis à Peptide). A partir de cette relation structure-activité, nous avons pu concevoir un peptidomimétique ayant des activités anti-angiogéniques (Brevet en cours de dépôt en collaboration entre la Faculté de Pharmacie de Marseille et l'Institut Pasteur de Tunis).

Bien que le développement d'anticorps monoclonaux humanisés anti- $\alpha 1$ soit la stratégie pharmacologique privilégiée à l'heure actuelle, les peptides courts de type KTS ou peptidomimétiques pourraient être une approche alternative ou complémentaire pour le traitement des maladies cancéreuses.

CONCLUSION

Il est évident que l'intérêt des désintégrines dépasse le fait d'être un simple composant des venins de serpents et leurs interactions dépassent l'agrégation plaquettaire. L'évolution a offert une famille exclusive de molécules d'adhésion qui fournit des intérêts significatifs aux interactions entre les cellules et leur environnement extra cellulaire. Les désintégrines se sont avérées être utiles dans l'évaluation des signaux intracellulaires d'adhésion, de l'apoptose, de l'angiogenèse, de la caractérisation des cellules cancéreuses, des thromboses, des hémostases, de l'évolution des protéines et de la motilité cellulaire.

La lebestatine, une désintégrine courte extraite à partir du venin de *Macrovipera lebetina*³⁸ (Kallech-Ziri et al., soumis 2007; brevet en cours), possédant

un motif d'adhésion KTS inhibe l'adhésion des cellules issues d'un phéochromocytome (PC12) sur le collagène de type I et IV avec une IC50 de 0,2 nM. Elle inhibe aussi la migration des cellules cancéreuses vers le collagène IV avec une IC50 de 0,1 nM et en même temps elle montre une activité anti-angiogénique *in vitro* et *in vivo* (modèle CAM)³⁸. Ce peptide et/ou peptidomimétique sera (ont) testé(s) et évalué(s) pour leur potentialités thérapeutiques.

REFERENCES

- 1- J.J. Calvete, C. Marcinkiewicz, D. Monleon, V. Esteve, B. Celda, P. Juarez and L. Sanz (2005). Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon.*, **45**, 1063-1074.
- 2- R.J. Gould, M.A. Polokoff, P.A. Friedman, T.F. Huang, J.C. Holt, J.J. Cook and S. Niewiarowski (1990). Disintegrins: a Family of Integrin Inhibitory Proteins From Viper Venoms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **195**, 168-171.
- 3- C. Ouyang, H.I. Yeh and T.F. Huang (1983). A potent platelet aggregation inhibitor purified from Agkistrodon halys (mamushi) snake venom. *Toxicon.*, **21**, 797-804.
- 4- J. J. Calvete (2005). Structure-function correlations of snake venom disintegrins. *Curr. Pharm. Des.*, **11**, 829-835.
- 5- M.A. McLane, E.E. Sanchez, A. Wong, C. Paquette-Straub and J.C. Perez (2004). Disintegrins. *Curr. Drug. Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.*, **4**, 327-355.
- 6- R.M. Kini and H.J. Evans (1992). Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon.*, **30**, 265-293.
- 7- T.F. Huang, J.C. Holt, H. Lukasiewicz and S. Niewiarowski (1987). Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16157-16163.
- 8- J.J. Calvete, M.P. Moreno-Murciano, R.D. Theakston, D.G. Kisiel and C. Marcinkiewicz (2003). Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochem. J.*, **372**, 725-734.
- 9- S. Bilgrami, S. Tomar, S. Yadav, P. Kaur, J.

- Kumar, T. Jabeen, S. Sharma and T.P. Singh** (2004). Crystal structure of schistatin, a disintegrin homodimer from saw-scaled viper (*Echis carinatus*) at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **341**, 829-837.
- 10- **J.J. Calvete, M. Jurgens, C. Marcinkiewicz, A. Romero, M. Schrader and S. Niewiarowski** (2000). Disulphide-bond pattern and molecular modelling of the dimeric disintegrin EMF-10, a potent and selective integrin $\alpha 5\beta 1$ antagonist from *Eristocophis macmahoni* venom. *Biochem. J.*, **345** (Pt 3), 573-581.
- 11- **M. Adler, R. A. Lazarus, M. S. Dennis and G. Wagner** (1991). Solution Structure of Kistrin, a Potent Platelet Aggregation Inhibitor and GP IIb-IIIa Antagonist. *Science*. **253**, 445-448.
- 12- **M. Jaseja, K. J. Smith, X. Lu, J. A. Williams, H. Trayer, I. P. Trayer and E. I. Hyde** (1993). 1H-NMR Studies and Secondary Structure of the RGD-Containing Snake Toxin, Albolabrin. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 853-860.
- 13- **H. Senn and W. Klaus** (1993). The Nuclear Magnetic Resonance Solution Structure of Flavordin, an Antagonist of the Platelet GP IIb-IIIa Receptor. *J. Mol. Biol.*, **232**, 907-925.
- 14- **J. Shin, S. Y. Hong, K. Chung, I. Kang, Y. Jang, D. S. Kim and W. Lee** (2003). "Solution structure of a novel disintegrin, salmosin, from *Agkistrodon halys* venom. *Biochemistry*. **42**, 14408-14415.
- 15- **R. T. Guo, L. J. Chou, Y. C. Chen, C. Y. Chen, K. Pari, C. J. Jen, S. J. Lo, S. L. Huang, C. Y. Lee, T. W. Chang and W. J. Chaung** (2001). Expression in *Pichia pastoris* and characterization by circular dichroism and NMR of rhodostomin. *Proteins*. **43**, 499-508.
- 16- **V. Saudek, R. A. Atkinson, P. Lepage and J. T. Pelton** (1991). The secondary structure of echistatin from 1H-NMR, circular-dichroism and Raman spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **202**, 329-338.
- 17- **R. A. Atkinson, V. Saudek and J. T. Pelton** (1994). Echistatin: the refined structure of a disintegrin in solution by 1H NMR and restrained molecular dynamics. *Int. J. Pept. Protein. Res.*, **43**, 563-572.
- 18- **M. Paz Moreno-Murciano, D. Monleon, C. Marcinkiewicz, J. J. Calvete and B. Celda** (2003). NMR solution structure of the non-RGD disintegrin obtustatin. *J. Mol. Biol.* **329**, 135-145.
- 19- **D. Monleon, M. P. Moreno-Murciano, H. Kovacs, C. Marcinkiewicz, J. J. Calvete and B. Celda** (2003). Concerted motions of the integrin-binding loop and the C-terminal tail of the non-RGD disintegrin obtustatin. *J. Biol. Chem.*, **278**, 45570-45576.
- 20- **S. Niewiarowski, M. A. McLane, M. Kloczewiak and G. J. Stewart** (1994). Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin. Hematol.*, **31**, 289-300.
- 21- **Y. Chen, A.K. Suri, D. Kominos, G. Sanyal, A. M. Naylor, S. M. Pitzenberger, V. M. Garsky, R. M. Levy and J. Baum** (1994). Three-dimensional structure of echistatin and dynamics of the active site. *J. Biomol. NMR*, **4**, 307-324.
- 22- **R. M. Scarborough, J. W. Rose, M. A. Hsu, D. R. Phillips, V. A. Fried, A. M. Campbell, L. Nannizzi and I. F. Charo** (1991). Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus M. barbouri*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 9359-9362.
- 23- **K. Oshikawa and S. Terada** (1999). Ussuristatin 2, a novel KGD-bearing disintegrin from *Agkistrodon ussuriensis* venom. *J. Biochem., (Tokyo)* **125**, 31-35.
- 24- **L. A. Hite, J. D. Shannon, J. B. Bjarnason and J. W. Fox** (1992). Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. *Biochemistry*. **31**, 6203-6211.
- 25- **C. Marcinkiewicz, J. J. Calvete, M. M. Marcinkiewicz, M. Raida, S. Vijay-Kumar, Z. Huang, R. R. Lobb and S. Niewiarowski** (1999). EC3, a novel heterodimeric disintegrin from *Echis carinatus* venom, inhibits $\alpha 4$ and $\alpha 5$ integrins in an RGD-independent manner. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12468-12473.
- 26- **C. Marcinkiewicz, J. J. Calvete, S. Vijay-Kumar, M. M. Marcinkiewicz, M. Raida, P. Schick, R. R. Lobb and S. Niewiarowski** (1999). Structural and functional characterization of EMF10, a heterodimeric disintegrin from *Eristocophis macmahoni* venom that selectively inhibits $\alpha 5 \beta 1$ integrin. *Biochemistry*. **38**, 13302 - 13309.
- 27- **J. J. Calvete, J. W. Fox, A. Agelan, S. Niewiarowski and C. Marcinkiewicz** (2002). The presence of the WGD motif in CC8 heterodimeric disinte-

- grin increases its inhibitory effect on α IIb(b) β 3, α (v) β 3, and α 5 β 1 integrins. *Biochemistry*, **41**, 2014-2021.
- 28- **C. Marcinkiewicz, S. Vijay-Kumar, M. A. McLane and S. Niewiarowski** (1997). Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of α IIb β 3 and α (v) β 3 integrins and expression of ligand-induced binding site. *Blood*, **90**, 1565-1575.
 - 29- **I. Wierzbicka-Patynowski, S. Niewiarowski, C. Marcinkiewicz, J. J. Calvete, M. M. Marcinkiewicz and M. A. McLane** (1999). Structural requirements of echistatin for the recognition of α (v) β 3 and α 5 β 1 integrins. *J. Biol. Chem.*, **274**, 37809-37814.
 - 30- **J.J. Calvete, W. Schafer, T. Soszka, W. Q. Lu, J. J. Cook, B.A. Jameson and S. Niewiarowski** (1991). Identification of the disulfide bond pattern in albolabrin, an RGD-containing peptide from the venom of *Trimeresurus albolabris*: significance for the expression of platelet aggregation inhibitory activity. *Biochemistry*, **30**, 5225-5229.
 - 31- **H. Minoux, C. Chipot, D. Brown and B. Maigret** (2000). Structural analysis of the KGD sequence loop of barbourin, an α IIb β 3-specific disintegrin. *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **14**, 317-327.
 - 32- **B. Wattam, D. Shang, S. Rahman, S. Egglezou, M. Scully, V. Kakkar and X. Lu** (2001). Arg-Tyr-Asp (RYD) and Arg-Cys-Asp (RCD) motifs in dendroaspin promote selective inhibition of β 1 and β 3 integrins. *Biochem. J.*, **356**, 11-17.
 - 33- **J. J. Calvete, M. A. McLane, G. J. Stewart and S. Niewiarowski** (1994). Characterization of the cross-linking site of disintegrins albolabrin, bitistatin, echistatin, and eristostatin on isolated human platelet integrin GPIIb/IIIa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202**, 135-140.
 - 34- **M.A. McLane, S. Vijay-Kumar, C. Marcinkiewicz, J. J. Calvete and S. Niewiarowski** (1996). Importance of the structure of the RGD-containing loop in the disintegrins echistatin and eristostatin for recognition of α IIb β 3 and α v β 3 integrins. *FEBS Lett.*, **391**, 139-143.
 - 35- **P.S. Wright, V. Saudek, T.J. Owen, S.L. Harbeson and A.J. Bitonti** (1993). An echistatin C-terminal peptide activates GPIIb/IIIa binding to fibrinogen, fibronectin, vitronectin and collagen type I and type IV. *Biochem. J.*, **293**(Pt 1) 263-267.
 - 36- **M.P. Moreno-Murciano, D. Monleon, J.J. Calvete, B. Celda and C. Marcinkiewicz** (2003). Amino acid sequence and homology modeling of obtustatin, a novel non-RGD-containing short disintegrin isolated from the venom of *Vipera lebetina obtusa*. *Protein. Sci.*, **12**, 366-371.
 - 37- **D. G. Kisiel, J. J. Calvete, J. Katzhendler, A. Fertala, P. Lazarovici and C. Marcinkiewicz** (2004). Structural determinants of the selectivity of KTS-disintegrins for the α 1 β 1 integrin. *FEBS Lett.*, **577**, 478-482.
 - 38- **O. Kallech-Ziri, J. Luis, S. Daoud, A. Bazaa, N. Srairi Abid, N. Andreotti, M. Lehmann, R. Zouari, Mabrouk. K, J. Marvaldi, J. M. Sabatier, M. El Ayeb and N. Marrakchi** (2005). Lebestatin, a disintegrin from *Macrovipera* venom, inhibits integrin-mediated cell adhesion, migration and angiogenesis. *Lab. Invest.*, **85**, 1507-1516.
 - 39- **L. Sanz, R. Q. Chen, A. Perez, R. Hilario, P. Juarez, C. Marcinkiewicz, D. Monleon, B. Celda, Y. L. Xiong, E. Perez-Paya and J. J. Calvete** (2005). cDNA cloning and functional expression of jerdostatin, a novel RTS-disintegrin from *Trimeresurus jerdonii* and a specific antagonist of the α 1 β 1 integrin. *J. Biol. Chem.*, **280**, 40714-40722.
 - 40- **C. Marcinkiewicz, P. H. Weinreb, J. J. Calvete, D. G. Kisiel, S. A. Mousa, G. P. Tuszynski and R.R. Lobb** (2003). Obtustatin: a potent selective inhibitor of α 1 β 1 integrin in vitro and angiogenesis *in vivo*. *Cancer. Res.*, **63**, 2020-2023.
 - 41- **R.M. Scarborough, M. A. Naughton, W. Teng, J. W. Rose, D. R. Phillips, L. Nannizzi, A. Arfsten, A. M. Campbell and I. F. Charo** (1993). Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1066-1073.
 - 42- **T.F. Huang, C.H. Yeh and W. B. Wu** (2001). Viper venom components affecting angiogenesis. *Haemostasis*, **31**, 192-206.
 - 43- **A.L. Coelho, M.S. De Freitas, A. Mariano-Oliveira, D. C. Rapozo, L. F. Pinto, S. Niewiarowski, R. B. Zingali C. Marcinkiewicz and C. Barja-Fidalgo** (2004). RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. *Exp. Cell. Res.*, **292**, 371-384.
 - 44- **T.J. Tsai, J.R. Sheu, Y.M. Chen, C.J. Yen, C.F.**

- Chen and T. F. Huang (1995). Disintegrin modulates rat glomerular mesangial cell behavior. *Nephron*, **70**, 83-90.
- 45- E.H. Danen, C. Marcinkiewicz, I. M. Cornelissen, A. A. van Kraats, J. A. Pachter, D. J. Ruiter, S. Niewiarowski and G. N. van Muijen (1998). The disintegrin ristostatin interferes with integrin alpha 4 beta 1 function and with experimental metastasis of human melanoma cells. *Exp. Cell. Res.*, **238**, 188-196.
- 46- J. R. Sheu, W.C. Hung, C.H. Wu, M. C. Ma, Y. C. Kan, C. H. Lin, M. S. Lin, H. N. Luk and M. H. Yen (1999). Reduction in lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia by triflavin in a rat model of septicemia. *Circulation*, **99**, 3056-3062.
- 47- Q. Zhou, P. Hu, M.R. Ritter, S.D. Swenson, S. Argounova, A. L. Epstein and F. S. Markland (2000). Molecular cloning and functional expression of contortrostatin, a homodimeric disintegrin from southern copperhead snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, **375**, 278-288.
- 48- C. H. Yeh, H. C. Peng and T. F. Huang (1998). Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin alphav-beta3 antagonist and inducing apoptosis. *Blood*, **92**, 3268-3276.
- 49- J. R. Sheu, M. H. Yen, Y. C. Kan, W. C. Hung, P. T. Chang and H. N. Luk (1997). Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1336**, 445-454.
- 50- S. I. Kim, K. S. Kim, H. S. Kim, M. M. Choi, D. S. Kim, K. H. Chung, and Y. S. Park (2004). Inhibition of angiogenesis by salmosin expressed in vitro. *Oncol. Res.*, **14**, 227-233.
- 51- I. C. Kang, Y. D. Lee and D. S. Kim (1999). A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. *Cancer. Res.*, **59**, 3754-3760.
- 52- C. H. Yeh, H. C. Peng, R. S. Yang and T. F. Huang (2001). Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective alpha(v)beta(3) blockade of endothelial cells. *Mol. Pharmacol.*, **59**, 1333-1342.
- 53- F. S. Markland, K. Shieh, Q. Zhou, V. Golubkov, R. P. Sherwin, V. Richters and R. Sposto (2001). A novel snake venom disintegrin that inhibits human ovarian cancer dissemination and angiogenesis in an orthotopic nude mouse model. *Haemostasis*, **31**, 183-191.
- 54- V.L. Morris, E.E. Schmidt, S.Koop, I.C. MacDonald, M.Grattan, R.Khokha, M. A. McLane, S. Niewiarowski, A.F. Chambers and A.C. Groom (1995). Effects of the disintegrin ristostatin on individual steps of hematogenous metastasis. *Exp. Cell. Res.*, **219**, 571-578.
- 55- C. Marcinkiewicz, Y. Taooka, Y. Yokosaki, J.J. Calvete, M.M. Marcinkiewicz, R.R. Lobb, S. Niewiarowski and D. Sheppard (2000). Inhibitory effects of MLDG-containing heterodimeric disintegrins reveal distinct structural requirements for interaction of the integrin alpha 9beta 1 with VCAM-1, tenascin-C, and osteopontin. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31930-31937.
- 56- A. Pozzi, P.E. Moberg, L.A. Miles, S. Wagner, P. Soloway and H.A. Gardner (2000). Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **97**, 2202-2207.
- 57- D.R. Senger, C.A. Perruzzi, M. Streit, V.E. Koteliansky, A.R. de Fougères and M. Detmar (2002). The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, **160**, 195-204.