

Université du Québec
INRS-Santé

**Évaluation de méthodes de phosphorylation, de sulfatation et de
cyclisation de l'endothéline-1**

Par
Myriam Létourneau

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Août 1999

© droits réservés de Myriam Létourneau, 1998

Résumé

Les endothélines forment une famille d'isopeptides vasoactifs caractérisés par une chaîne de 21 acides aminés dont les extrémités amino et carboxy-terminales sont libres et par la présence de deux ponts disulfures reliant les résidus cystéines des positions 3 et 11, ainsi que 1 et 15. Étant donné leurs multiples actions physiologiques, ces peptides sont associés à plusieurs pathophysiologies; ils suscitent donc un attrait particulier pour la recherche scientifique en pharmacologie.

Trois isopeptides constituent la famille de l'endothéline: l'endothéline-1, l'endothéline-2 et l'endothéline-3. Ces peptides peuvent interagir avec deux principaux types de récepteurs, nommés ET_A et ET_B, selon une affinité qui leur est propre. Diverses études ont permis de déterminer les éléments structuraux importants pour la liaison de ces peptides avec les récepteurs. Ainsi, les extrémités amino et carboxy-terminales libres, les ponts disulfures, le noyau d'acides aminés hydrophobes à l'extrémité carboxy-terminale et la région regroupant trois acides aminés chargés sont des éléments clés pour l'activité biologique de ces peptides. Ce dernier paramètre nous apparaît particulièrement important et par conséquent, afin de déterminer le rôle joué par les acides aminés chargés négativement dans la formation proposée d'un lien ionique intra ou intermoléculaire, des analogues phosphatés et sulfatés de l'endothéline-1 ont été conçus avec l'objectif de consolider ce lien encore hypothétique toutefois. Étant donné que la synthèse de tels analogues de l'endothéline-1 n'a pas encore été tentée, divers protocoles ont été évalués. De plus, la synthèse de ces analogues nécessitant la formation de ponts disulfures, les méthodes de cyclisation ont donc également été étudiées.

Les analogues [Ser⁸PO₄]hET-1, [Thr⁸PO₄]hET-1, [Tyr⁸PO₄]hET-1 et [Tyr⁸SO₄]hET-1 ont été assemblés par synthèse peptidique sur phase solide en utilisant des dérivés dont l'amine- α est protégée par un groupe 9-fluorénylméthoxy-carbonyl (Fmoc). Deux stratégies de protection orthogonale et de cyclisation des cystéines ont été étudiées. La première a fait appel aux groupes protecteurs acétamidométhyle (Acm) pour les cystéines en position 1 et 15 et aux groupements triphénylméthyle (Trt) pour les résidus des positions 3 et 11. La formation des ponts disulfures s'est effectuée successivement, en solution, au moyen de deux agents d'oxydation différents: le ferricyanure de potassium et

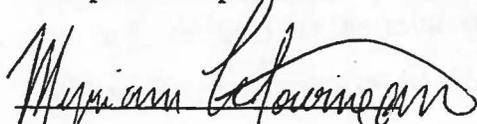
l'iode. La seconde méthode a privilégié l'usage des groupes protecteurs Trt pour les cystéines en position 1 et 15, et les dérivés cystéines méthoxytriphénylméthyle (Mmt) aux positions 3 et 11. La première cyclisation a été réalisée sur résine, dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), au moyen d'une oxydation au ferricyanure de potassium. Le dernier pont disulfure a quant à lui été formé en utilisant les mêmes agents oxydants mais avec le peptide en solution.

Un protocole de phosphorylation globale a été choisi pour obtenir les analogues phosphatés de l'endothéline-1. L'efficacité de trois agents de phosphorylation différents a été étudiée, c'est-à-dire le di-t-butyle N,N-diéthylphosphoramidite, le dibenzyle N,N-diisopropylphosphoramidite et le dibenzylphosphochloridate. D'autre part, pour l'analogue sulfaté de l'endothéline-1, un dérivé tyrosine déjà sulfaté, le N- α -Fmoc-Tyr(SO₄NH₄)-COOH a été utilisé en tant que bloc de construction de la chaîne peptidique.

Les études menées sur les méthodes de cyclisation de l'endothéline-1 ont indiqué qu'une cyclisation à l'iode des analogues peptidiques de l'endothéline provoque une oxydation des résidus tryptophane et méthionine. La cyclisation sur résine, pour sa part, fait toutefois appel à des conditions de réaction plus douces ce qui permet de réduire, voire éviter, ces réactions indésirables. Par contre, cette méthode nécessite des conditions minimisant un encombrement stérique et favorisant le repliement adéquat du peptide.

Les trois méthodes de phosphorylation évaluées n'ont pas permis d'obtenir en quantités utiles les analogues phosphatés attendus de l'endothéline-1. Aussi, les analyses par spectrométrie de masse ont confirmé que des réactions secondaires et irréversibles se sont produites au cours d'une ou de plusieurs étapes menant à la formation des analogues peptidiques.

Par contre, le protocole employé pour la formation de l'analogue sulfaté a conduit au produit désiré au moyen d'une procédure simple et directe. Une optimisation des étapes de ce protocole permettrait d'améliorer le rendement final de production de cet analogue.



Myriam Létourneau
Étudiante

Alain Fournier
Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens à souligner l'appui constant et les conseils judicieux dont j'ai pu bénéficier de la part de mon directeur, le Dr. Alain Fournier, tout au long de la poursuite de mon projet de recherche.

Je remercie également les membres du laboratoire de l'INRS-Santé et plus particulièrement Patrick Sabourin et Luc Tessier pour leurs conseils techniques, ainsi que Diane Lacoste qui m'a apporté une aide précieuse pour la mise en page du présent mémoire et Gilbert Leblanc pour la recherche bibliographique.

Enfin, je suis reconnaissante envers l'INRS-Santé pour son soutien financier m'ayant facilité la réalisation de ce projet de recherche.

Table des matières

Résumé.....	i
Remerciements.....	iii
Listes des figures et des tableaux.....	vi
Abréviations utilisées.....	viii
Introduction.....	1
Matériel et méthodologies.....	10
1. Synthèse des analogues de ET-1.....	10
1.1 Stratégies de synthèse.....	10
1.1.1 Choix de la méthode chimique de synthèse.....	10
1.1.2 Choix du support solide.....	10
1.1.3 Choix des groupements protecteurs.....	11
1.1.4 Choix de la méthode de phosphorylation.....	13
1.1.5 Choix de la méthode de sulfatation.....	13
1.2 Réactifs et solvants utilisés.....	13
1.3 Synthèse du résidu sulfaté.....	14
1.4 Protocole de synthèse des peptides.....	15
1.4.1 Fixation du premier acide aminé.....	15
1.4.2 Fixation des autres acides aminés.....	17
1.4.3 Cyclisation sur résine.....	18
1.4.4 Méthodes de phosphorylation.....	19
1.5 Clivage des peptides du support solide polymérique.....	20
2. Purification et cyclisation des analogues de ET-1.....	21
2.1 Purification des analogues phosphatés.....	21
2.2 Purification de l'analogue sulfaté.....	22
2.3 Cyclisation par la formation du pont disulfure entre les cystéines des positions 3 et 11.....	22
2.4 Cyclisation par la formation du pont disulfure entre les cystéines des positions 1 et 15.....	23

3. Caractérisation des analogues de ET-1	24
3.1 CLHP analytique	24
3.2 Électrophorèse capillaire	24
3.3 Spectrométrie de masse	24
Résultats.....	25
4. Synthèse, purification et caractérisation du dérivé sulfaté	25
4.1 Synthèse du dérivé tyrosine sulfaté	25
4.2 Purification de l'acide aminé sulfaté	25
4.3 Caractérisation du dérivé sulfaté	25
5. Synthèse, purification et cyclisation des analogues de ET-1.....	26
5.1 Synthèse des dérivés peptidiques	26
5.2 Purification des analogues de ET-1	28
5.3 Cyclisations des dérivés peptidiques en solution et sur résine	29
5.4 Phosphorylation des analogues de ET-1	31
6. Caractérisation des analogues de ET-1	34
Discussion.....	38
7. Synthèse du dérivé tyrosine sulfaté	38
7.1 Évaluation de la synthèse et de la méthode choisie.....	38
7.2 Identification et pureté de l'acide aminé	38
8. Synthèse des analogues de ET-1	39
8.1 Évaluation de la synthèse	39
8.2 Étude des méthodes de cyclisation	42
8.3 Étude des méthodes de phosphorylation	44
8.4 Identification des analogues de ET-1	46
9. Évaluation pharmacologique des analogues phosphatés et sulfatés de ET-1	48
Conclusion.....	50
Appendice A	52
Appendice B	53
Appendice C	54
Liste des références	56

Listes des figures et des tableaux

Liste des figures

- Figure 1 : Les trois isoformes de l'endothéline chez l'être humain.....2
- Figure 2 : Biosynthèse de l'endothéline-1.....4
- Figure 3 : Représentation schématique de la structure des récepteurs de l'endothéline.....5
- Figure 4 : Profils CLHP analytiques A) du Fmoc-Tyr-OH provenant de Richelieu Biotechnologies inc. au départ, B) après sulfatation avec le complexe DMF-SO₃ selon le protocole décrit à la page 16 et C) suite à l'obtention du dérivé Fmoc-Tyr(SO₄NH₄) par lyophilisation.....26
- Figure 5 : Profils CLHP analytiques des analogues bruts de ET-1. A) (Ser⁸)hET-1; B) (Thr⁸)hET-1; C) (Tyr⁸)hET-1 et D) (Tyr⁸SO₄NH₄)hET-1.....27
- Figure 6 : Profils CLHP analytiques A) de l'analogue [Cys(Acm)^{1,15}, Ser⁸PO₄]hET-1 linéaire brut et B) après purification par un système CLHP préparatif.....28
- Figure 7 : Profils CLHP analytiques A) de l'analogue [Cys(Acm)^{1,15}, Ser⁸PO₄]hET-1 linéaire et B) après formation du pont disulfure entre les cystéines 3 et 11 par oxydation au ferricyanate de potassium31
- Figure 8 : Profils CLHP analytiques A) de l'analogue [Cys(Acm)^{1,15}, Thr⁸PO₄]hET-1 monocyclisé et B) après formation du pont disulfure entre les cystéines 1 et 15 par oxydation à l'iode32
- Figure 9 : Profils obtenus par électrophorèse capillaire utilisant une solution tamponnée d'acide citrique à un pH de 2,5 de l'analogue [Tyr⁸SO₄]hET-1 A) linéaire, B) monocyclique et C) bicyclique.....32

Figure 10 : Profils CLHP analytiques A) de l'analogue [Ser ⁸]hET-1 monocyclisé et B) après formation du pont disulfure entre les cystéines 1 et 15 par oxydation au DMSO et au ferricyanate de potassium.....	33
Figure 11 : Profils CLHP analytiques A) de [Cys(Acm) ^{1,15} , Tyr ⁸ PO ₃]hET-1 et B) [Cys(Acm) ^{1,15} , Tyr ⁸ PO ₄]hET-1.....	34
Figure 12 : Profils CLHP analytiques A) de [Tyr ⁸]hET-1 monocyclisé et B) [Tyr ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclisé obtenu selon le protocole 3 de phosphorylation.....	35

Liste des tableaux

Tableau I : Quantités de résine, d'acide aminé, de réactifs utilisés et temps de réaction exigé pour de la fixation du premier acide aminé.....	16
Tableau II: Protocole suivi pour un cycle de synthèse peptidique.....	18
Tableau III: Rendement de synthèse peptidique en phase solide selon un protocole de chimie Fmoc des analogues bruts de ET-1.....	27
Tableau IV. Pureté des analogues de ET-1 selon les données de caractérisation par CLHP analytique avec leur rendement final correspondant.....	30
Tableau V. Résultats des analyses en spectrométrie de masse des analogues synthétiques de ET-1.....	36

Abréviations utilisées

Acm	acétamidométhyle
ACN	acétonitrile
Boc	t-butyloxycarbonyle
BOP	hexafluorophosphate de benzotriazolyl-tris-diméthylaminophosphonium
Bzl	benzyle
CLHP	chromatographie en phase liquide à haute performance
Da	Dalton
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DCM	dichlorométhane
DIEA	diisopropyléthylamine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMSO	diméthylsulfoxyde
ECE	enzyme de conversion de l'endothéline
EDT	éthanedithiol
ESP-MS	electrospray mass spectrometry
ET	endothéline
Fmoc	9-fluorènylméthylloxycarbonyle
HBTU	hexafluorophosphate de 2-(1-H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium
HOBt	1-hydroxybenzotriazole monohydraté
HMP	hydroxyméthyle polystyrène
MCPBA	acide 3-chloroperoxybenzoïque
Mmt	méthoxytriphénylméthyle
Msib	p-(méthylsulphinyle)benzyle
Msz	p-(méthylesulphinyle)benzyloxycarbonyle
Mtb	p-(méthylthio)benzyle
Mtz	p-(méthylthio)benzyloxycarbonyle
OtBu	O-t-butyle
RMN	résonance magnétique nucléaire

SPPS	synthèse peptidique en phase solide
tBu	t-butyle
TFA	acide trifluoroacétique
TIS	triisopropylsilane
Trt	triphénylméthyle
UV	ultraviolet

Introduction

Les endothélines forment une famille d'isopeptides caractérisés par une chaîne de 21 acides aminés dont les extrémités amino et carboxy-terminales sont libres, et par la présence de deux ponts disulfures reliant les résidus cystéines des positions 3 et 11, ainsi que 1 et 15 (Masaki et Yanagisawa, 1992). Les propriétés physiologiques de ces peptides sont multiples. Ils produisent une vasoconstriction de longue durée sur les cellules musculaires vasculaires et une vasodilatation médiée par l'oxyde nitrique de l'endothélium vasculaire. De plus, ils favorisent la prolifération des cellules endothéliales, musculaires lisses et des fibroblastes (Mateo et De Artiñano, 1997) et participent à la régulation de la sécrétion de médiateurs neurohumoraux (Oriji et Keiser, 1996) et de corticostéroïdes (Cartier *et al.*, 1997). Finalement, ils peuvent engendrer la dispersion des pigments de mélanophores chez *Xenopus laevis* (Karne *et al.*, 1993). Étant donné leurs actions physiologiques, les peptides de la famille de l'endothéline sont associés à plusieurs pathophysiologies. En effet, l'endothéline pourrait jouer un rôle dans le développement de l'hypertension, de l'ischémie, y compris l'infarction du myocarde et d'une insuffisance rénale aiguë (Mateo et De Artiñano, 1997). De plus, des taux élevés d'endothéline ont été notés chez les patients souffrant d'asthme (Uchida *et al.*, 1996) ou d'athérosclérose (Bacon *et al.*, 1996). Afin d'obtenir de nouveaux outils pour lutter contre ces pathophysiologies, il est donc nécessaire de poursuivre les recherches pharmacologiques déjà entamées.

D'ailleurs, l'idée d'une implication directe de l'endothélium des vaisseaux sanguins dans la régulation physiologique de la tension artérielle remonte au début des années 1980. Des recherches expérimentales menées par Holden et McCall (1984) montrent qu'un endothélium intact est nécessaire pour obtenir une vasoconstriction. Les résultats d'autres expériences effectuées au cours de la même année semblent indiquer que l'endothélium libère une substance qui provoque la vasoconstriction (O'Brien et McMurtry, 1984). Un traitement à la trypsine de cette substance, nommée EDCF (Endothelium Derived Constricting Factor), provoque la perte des propriétés vasoconstrictrices. L'EDCF est donc de nature protéique (Gillespie *et al.*, 1986). Enfin, l'équipe de Yanagisawa isole un

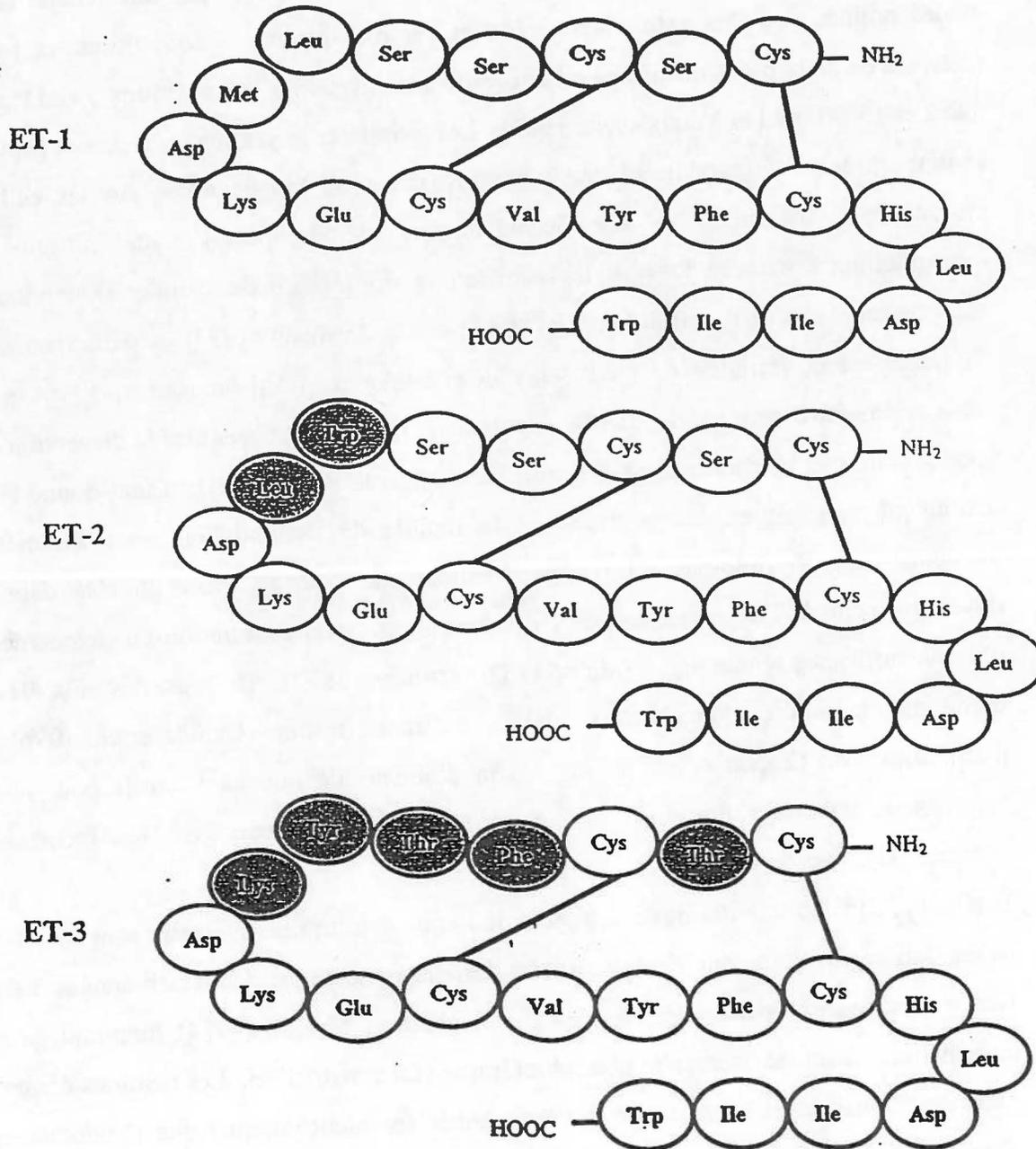


Figure 1 : Les trois isoformes de l'endothéline chez l'être humain

puissant vasoconstricteur à effet prolongé à partir du surnageant de cellules aortiques porcines en culture. Ce vasoconstricteur, de nature peptidique, mais n'appartenant à aucune famille déjà connue, a donc été appelé endothéline (Yanagisawa *et al.*, 1988). Aujourd'hui, ce peptide est connu sous le nom de endothéline-1 (ET-1) car il appartient à une famille de trois isopeptides composée de ET-1, ET-2 et ET-3 (Figure 1) (Inoue *et al.*, 1989).

Malgré le fait que chacun de ces peptides soit codé par un gène différent, leur biosynthèse est en fait très similaire (Figure 2). L'expression du gène qui est provoquée par divers facteurs incluant l'adrénaline, la vasopressine, l'angiotensine II, l'insuline, des cytokines, des facteurs de croissance, des stimuli physiques, etc. engendre la formation d'une protéine de 160 à 238 acides aminés nommée préproendothéline (Mateo et De Artiñano, 1997). Cette protéine contient un site de reconnaissance de la furine encadrant quelque 37 à 41 acides aminés. Le polypeptide obtenu, nommé Big-ET, est ensuite clivé entre les résidus tryptophane et valine (ou isoleucine pour ET-3) par une métalloendopeptidase (D'orléans-Juste *et al.*, 1996). Il existe trois isoformes de cette enzyme de conversion de l'endothéline, soit l'ECE-1a, l'ECE-1b et l'ECE-2. Ces enzymes sont caractérisées par leur sensibilité au phosphoramidon mais non au thiorphan et se différencient par leur localisation cellulaire, leur structure moléculaire et leur affinité pour chacune des Big-ET (Mateo et De Artiñano, 1997; D'orléans-Juste *et al.*, 1996).

Les peptides de la famille de l'endothéline produisent leurs effets physiologiques par le biais de deux récepteurs. Le récepteur de type ET_A possède une affinité plus grande pour les peptides ET-1 et ET-2 que pour ET-3. Le récepteur de type ET_B, pour sa part, a une affinité égale pour les trois isopeptides (Masaki et Yanagisawa, 1992). Un troisième récepteur, nommé ET_C, a été trouvé et cloné chez les amphibiens seulement. Ce récepteur possède une plus grande affinité pour le peptide ET-3 (Karne *et al.*, 1993). Les récepteurs de l'endothéline sont formés d'une seule chaîne d'acides aminés comprenant sept segments comptant chacun de 20 à 27 acides aminés hydrophobes. Ces segments constituent les domaines transmembranaires des récepteurs. Cette structure est caractéristique des récepteurs couplés à une protéine G et appartenant à la famille des rhodopsines (Mateo et De Artiñano, 1997) (Figure 3). Des études permettent de croire qu'il y aurait au moins deux sous-domaines de liaison au sein de chaque récepteur. En

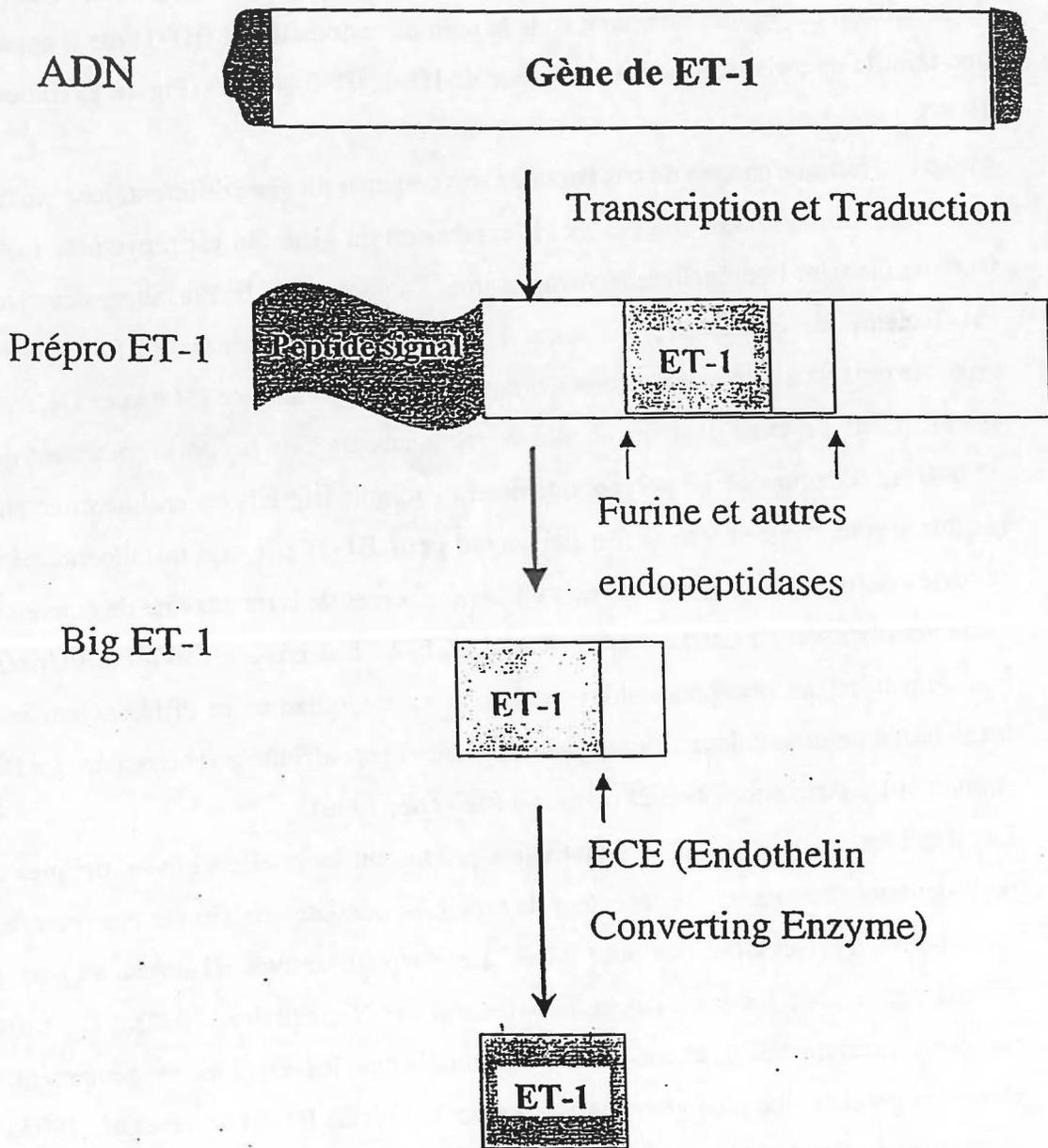


Figure 2 : Biosynthèse de l'endothéline-1

effet les segments transmembranaires IV à VI attribueraient la sélectivité de type ET_B alors que les segments I à III ainsi que VII auraient cette fonction pour la sélectivité ET_A . Les récepteurs de type ET_A se trouvent principalement sur les cellules vasculaires musculaires lisses et leur stimulation engendre une vasoconstriction prolongée. Les récepteurs ET_B , quant à eux, qui sont majoritairement localisés sur les cellules endothéliales, provoquent une vasodilatation suite à la libération d'oxide nitrique (NO) (Bacon *et al.*, 1996; De Nucci *et al.*, 1988).

Plusieurs études ont tenté d'établir la structure tridimensionnelle favorisant une interaction avec le récepteur. Les méthodes de dichroïsme circulaire, de résonance magnétique nucléaire (RMN), de cristallographie et de modélisation moléculaire ont été utilisées à cette fin. La structure cristalline de ET-1 consisterait en un feuillet β à l'extrémité amino-terminale avec un renflement entre les résidus 5 et 7, suivi d'une boucle liée par des ponts hydrogènes entre les résidus 7 et 11 et finalement, d'une hélice

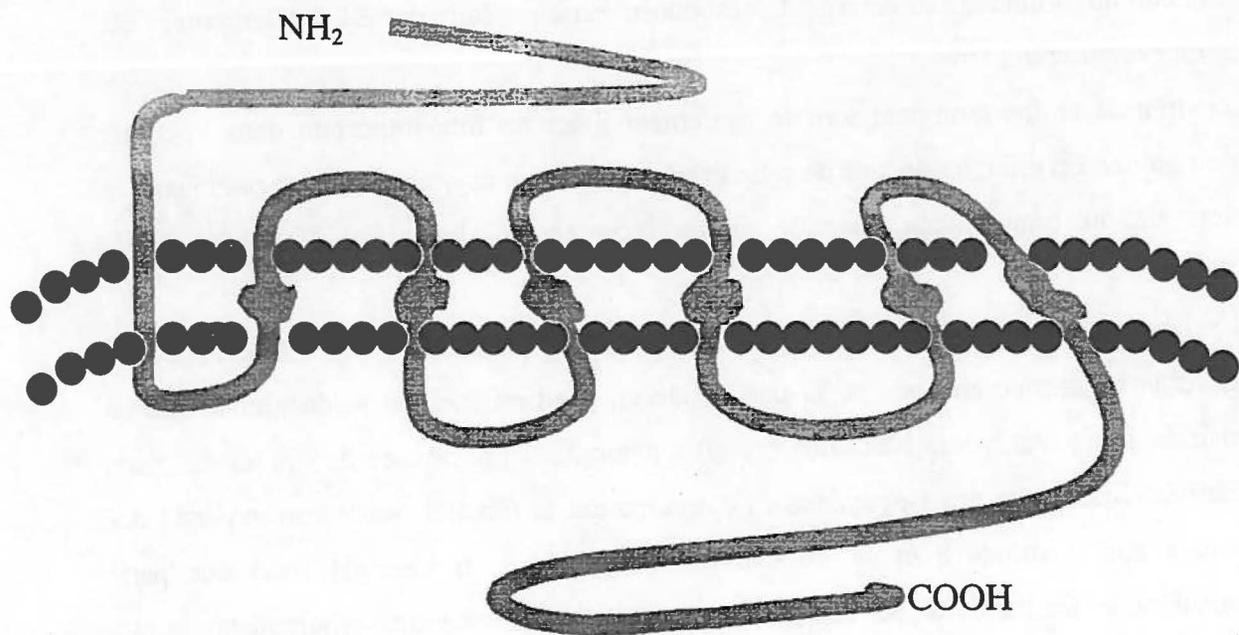


Figure 3 : Représentation schématique de la structure des récepteurs de l'endothéline.

irrégulière s'étendant jusqu'à l'autre extrémité (Wallace et Janes, 1995). Par contre, les résultats obtenus en RMN et en dichroïsme circulaire varient considérablement. Ces différences peuvent s'expliquer par l'action des solvants utilisés dans ces méthodes (Wallace et Janes, 1995). Les exigences par rapport à la liaison du peptide avec le récepteur varient selon le type de récepteur. En effet, la structure en forme de boucle à l'extrémité amino-terminale de même que le segment hydrophobe linéaire à l'extrémité carboxy-terminale (acides aminés 17 à 21) sont nécessaires à la liaison avec ET_A (Mateo et De Artiñano, 1997). De plus, le pont disulfure externe formé par les résidus cystéines en position 1 et 15 semble essentiel pour la liaison et l'activité dans les tissus riches en ET_A (Spinella *et al.*, 1991; Doherty, 1992). Par contre, seule la chaîne d'acides aminés hydrophobes à l'extrémité carboxy-terminale, incluant le tryptophane en position 21, est exigée pour obtenir une liaison de haute affinité aux récepteurs de type ET_B (Panek *et al.*, 1992). La suppression ou l'inversion de la stéréochimie du résidu tryptophane abolit l'activité vasoconstrictrice de l'ET-1 (Kimura *et al.*, 1989). Néanmoins, la formylation de ce résidu ne diminue pas l'activité de vasoconstriction produite par ET-1 (Germain *et al.*, 1993; Forget *et al.*, 1996).

L'extrémité amino-terminale semble également jouer un rôle important dans l'activité biologique. En effet, le blocage de cette extrémité par une acylation élimine pratiquement toute activité biologique du peptide sur les récepteurs de type ET_A (Nakajima *et al.*, 1989).

Il existe une région chargée, formée par les résidus aux positions 8, 9 et 10. On retrouve un acide aspartique en position 8, une lysine en position 9 et un acide glutamique en position 10. L'équipe de Nakajima (1989) a démontré l'importance de ces résidus dans l'activité biologique des isopeptides en convertissant la fonction acide carboxylique des résidus aux positions 8 et 10 en une fonction amide. Il s'en est suivi une perte considérable de l'activité de vasoconstriction. L'importance des groupements acides carboxyliques est également démontrée par la nécessité d'incorporer des fonctions acides dans plusieurs antagonistes de la famille de l'endothéline (Opgenorth, 1995; Jae *et al.*, 1997).

Afin de déterminer le rôle joué par les acides aminés des positions 8 et 10 dans la formation postulée d'un lien ionique intra ou intermoléculaire, un groupe possédant une densité de charge supérieure à celle de l'acide aminé de départ pourrait être incorporer

afin de fortifier ce lien encore hypothétique. Par exemple, l'incorporation d'un groupe sulfate ou phosphate à ces positions pourrait donner un peptide davantage «stabilisé» dans sa structure tridimensionnelle. De plus, ce type de modification pourrait également intensifier l'interaction peptide-récepteur indiquant ainsi l'importance de la charge négative pour une liaison de haute affinité. La construction de tels analogues de l'endothéline semble donc constituer un outil supplémentaire pour l'étude des pharmacophores du peptide. Bien que ce type de modification ait été appliqué sur différents peptides, l'incorporation de sulfate ou de phosphate aux peptides de la famille de l'endothéline n'a pas encore été effectuée.

Actuellement, deux méthodes sont favorisées pour obtenir des peptides phosphorylés par synthèse peptidique en phase solide (SPPS) : la phosphorylation globale des groupements hydroxyles libres suite à la synthèse complète du peptide (Hoffman *et al.*, 1995 et 1997; Mostafavi *et al.*, 1996; Bernhardt *et al.*, 1997) et l'incorporation d'acides aminés phosphorylés durant la synthèse peptidique (Ottinger *et al.*, 1996; Shapiro *et al.*, 1996; Ueno *et al.*, 1995; Vorherr et Bannwarth, 1995). Ces deux méthodes, soient la phosphorylation globale et l'incorporation de résidus phosphorylés, peuvent être utilisées en chimie Boc (t-butyloxycarbonyle) ou Fmoc (9-fluorènylméthylloxycarbonyle) dans des protocoles de synthèse peptidique. Malheureusement, ce type de modification est accompagné de réactions secondaires. En effet, dans un protocole de synthèse en chimie Boc, le clivage du peptide par un traitement usuel à l'acide fluorhydrique (HF) se complique par la sensibilité de l'acide aminé phosphorylé à ces conditions (Perich *et al.*, 1994). Par contre, dans la chimie dite Fmoc, caractérisée par l'usage de conditions basiques pour les étapes successives de déprotection de l'amine- α , les alkylphosphates peuvent subir une réaction de β -élimination lorsque le peptide est dans des conditions de déprotection. Cette réaction mène évidemment à la perte du groupe phosphate lorsque le protocole utilise des résidus sérine et thréonine phosphorylés (Andrews *et al.*, 1991). De plus, la phosphorylation globale peut être gênée par une O-acylation des groupements hydroxyles libres sur les chaînes latérales des acides aminés devant recevoir le groupe phosphate, surtout si ces résidus se trouvent dans la région carboxy-terminale du peptide (Otake *et al.*, 1995). Finalement, l'encombrement stérique peut nuire à la réaction de

phosphorylation en bloquant l'accès aux réactifs du site même de phosphorylation (Johnson *et al.*, 1996).

Tout comme pour la phosphorylation, il existe plus d'une méthode pour obtenir des peptides sulfatés en SPPS : la sulfatation globale des groupements hydroxyles libres du peptide-résine (Nakahara *et al.*, 1986; Borin *et al.*, 1987; Fournier *et al.*, 1989; Payne *et al.*, 1991; Matsubayashi *et al.*, 1996), l'incorporation de résidus sulfatés pendant la construction de la chaîne peptidique (Futaki *et al.*, 1992; Yagami *et al.*, 1993; Kitagawa *et al.*, 1994) ou la sulfatation enzymatique des résidus tyrosines du peptide (Niehrs *et al.*, 1994; Delhom *et al.*, 1996; Muramatsu *et al.*, 1996). Cette dernière méthode permet une sulfatation en un endroit précis sur le peptide s'il n'existe qu'un seul résidu tyrosine dans la chaîne peptidique. Le lien ester reliant le groupe sulfate à l'acide aminé est particulièrement labile en condition acide (Marseigne et Roques, 1988). La sulfatation globale d'un peptide-résine synthétisé en chimie Boc est donc compliquée par le clivage du peptide de son support solide par traitement au HF. Néanmoins, pour un peptide ayant une fonction carboxy-terminale amidée et composé uniquement d'acides aminés à chaînes latérales non-réactives, le clivage peut être effectué avec de l'ammoniaque liquide, ce qui permet d'éviter une désulfatation du peptide (Fournier *et al.*, 1989). Un peptide sulfaté obtenu en SPPS en chimie Fmoc doit également subir un clivage en milieu acide. Bien que les conditions de clivage soient moins puissantes avec l'acide trifluoroacétique (TFA) qu'avec le HF, des pertes de 10% à 15% du groupe sulfate ont été relevées pour un clivage d'une heure (Futaki *et al.*, 1992). De plus, l'utilisation de composés sulfurés à titre de capteurs de carbocations durant le clivage accélère la dégradation du peptide sulfaté (Kitagawa *et al.*, 1994). Deux méthodes ont été explorées pour surmonter cette difficulté. La première, qui consiste à incorporer un résidu tyrosine-sulfaté sous la forme d'un sel (par exemple le sodium ou le barium), élimine pratiquement toute dégradation du sulfate durant le clivage (Yagami *et al.*, 1993); par contre, des rendements plus faibles ont été enregistrés à cause d'un clivage partiel (Kitagawa *et al.*, 1994). Selon la seconde méthode, les chaînes latérales des acides aminés pouvant subir des réactions secondaires au cours de la sulfatation chimique sont protégées par des groupes p-(méthylsulphinyle)benzyle (Msib) ou p-(méthylsulphinyle)benzyloxycarbone (Msz) qui sont stables dans les conditions de clivage avec le TFA. Le peptide partiellement protégé est alors sulfaté chimiquement et les groupes Msib et Msz sont réduits simultanément en

Mtb [p-(méthylthio)benzyle] et Mtz [p-(méthylthio)benzyloxy-carbonyle], respectivement. Ces derniers sont labiles en conditions acides et le peptide sulfaté est obtenu par un court traitement au TFA (Futaki *et al.*, 1992). La première méthode comporte l'avantage que les résidus tyrosines-sulfatés sont accessibles commercialement. Enfin, la sulfatation chimique a ses inconvénients. En effet, des réactions secondaires ont été observées avec les acides aminés méthionine, tryptophane, cystéine, asparagine et glutamine lorsque l'acide sulfurique (H_2SO_4) est utilisé (Nakahara *et al.*, 1986; Delhom *et al.*, 1996). De plus, le taux de sulfatation est plus élevé pour les fonctions hydroxyles de sérine et thréonine que pour un résidu tyrosine (Borin *et al.*, 1987).

Étant donné que la synthèse d'un dérivé phosphaté ou sulfaté de l'endothéline n'a pas encore été tentée, nous avons évalué divers protocoles de synthèse d'analogues de l'endothéline-1. Pour tous les analogues synthétisés, le site d'incorporation du groupe phosphate ou sulfate a été la position 8 correspondant à un acide aspartique. De plus, la synthèse d'un analogue de l'endothéline-1 nécessite la formation de deux ponts disulfures. Les méthodes de cyclisation du peptide ont donc été étudiées de front avec la recherche d'un protocole optimal pour obtenir des analogues phosphatés ou sulfatés de ET-1.

Matériel et méthodologies

1. Synthèse des analogues de ET-1

1.1 Stratégies de synthèse

1.1.1 Choix de la méthode chimique de synthèse

La synthèse peptidique peut s'effectuer en phase liquide ou en phase solide. Étant donné que le peptide à synthétiser, soit ET-1, constitue une chaîne d'acides aminés relativement longue, la synthèse en phase solide permet d'obtenir le peptide plus rapidement. En effet, cette méthode facilite le changement des solvants et simplifie l'isolation des peptides de leur support solide.

La synthèse peptidique en phase solide (SPPS) permet l'utilisation de différents groupes protecteurs pour l'amine- α des dérivés servant de blocs de construction des peptides. Le groupe Boc est labile en milieu acide, par exemple en présence de TFA, alors que le clivage du peptide de son support solide nécessite un acide plus fort, tel que l'acide fluorhydrique (HF) (Merrifield, 1986). Le groupe Fmoc pour sa part, est labile en milieu basique et le clivage du peptide de son support solide s'effectue en milieu acide au moyen du TFA (King *et al.*, 1990).

Étant donné la présence de groupes phosphate et sulfate sur les analogues de ET-1 désirés ainsi que la grande sensibilité de ces groupes fonctionnels aux conditions fortement acides (Perich *et al.*, 1994), un protocole utilisant des acides aminés dont l'amine- α est protégée par un groupe Fmoc semble préférable.

1.1.2 Choix du support solide

Les extrémités amino et carboxy terminales de ET-1 sont libres dans le peptide natif (Masaki et Yanagisawa, 1992). Pour obtenir des peptides avec un groupement carboxy-terminal libre suite au clivage et suivant un protocole de synthèse utilisant des Fmoc-acides aminés, le type de support solide le plus couramment utilisé est la résine dite de Wang. Ce type de résine consiste en un polymère de styrène ponté avec des groupements

divinylbenzènes, auquel sont attachés des groupes hydroxyméthyles. Le taux de substitution de ces groupements fonctionnels est généralement assez élevé, ce qui permet d'utiliser une quantité réduite de résine pour obtenir une même quantité de peptide. De plus, les propriétés physiques de cette résine sont bien adaptées aux conditions de synthèse utilisant des Fmoc-acides aminés.

1.1.3 Choix des groupements protecteurs

Les acides aminés possédant une chaîne latérale aliphatique ne nécessitent aucun groupement protecteur autre que le groupe Fmoc pour l'amine- α . Ainsi, pour la séquence de ET-1, la leucine, l'isoleucine et la valine sont incorporées sans protection sur la chaîne latérale. La phénylalanine et la méthionine sont également introduites de cette façon dans la chaîne peptidique malgré la possibilité que cette dernière puisse s'oxyder. En effet, la réaction d'oxydation, qui produit un sulfoxyde, est réversible par l'utilisation d'un réducteur tel que le NaBH_4 .

Les acides aminés possédant une 2^e fonction acide sur leur chaîne latérale, tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique, sont normalement protégés grâce à un groupement O-t-butyle (OtBu). Cette protection permet d'éviter entre autres une lactamisation du résidu ce qui mettrait fin à la chaîne peptidique. Un groupe protecteur à toutes fins utiles identique, soit le t-butyle (tBu), est utilisé pour les acides aminés ayant un groupement hydroxyle sur leur chaîne latérale, c'est-à-dire la sérine, la thréonine et la tyrosine. On évite ainsi l'acylation de ces dérivés pouvant se produire en présence d'un excès de réactif de couplage.

La lysine possède une 2^e fonction basique sur sa chaîne latérale qui peut concurrencer l'amine- α pour la formation du lien peptidique. L'ajout d'un groupe Boc sur l'amine supplémentaire assure la formation du lien peptidique approprié.

Le noyau imidazole de l'histidine est légèrement basique; il peut donc subir une acylation durant les couplages subséquents si la protection est inadéquate. De plus, la basicité du noyau imidazole peut causer la racémisation via un phénomène de déprotonation et de reprotonation du carbone- α , un site chiral. La racémisation peut être évitée si l'azote du noyau imidazole est bloquée au niveau de l'orbitale π . Malheureusement, la préparation

de tels dérivés est particulièrement ardue et leur disponibilité commerciale est limitée compte tenu de leur prix élevé. Nous avons donc choisi un dérivé d'histidine dont la chaîne latérale est protégée par un groupe triphénylméthyle (Trt), sans distinction de l'atome d'azote (π ou δ) de l'imidazole qui en est porteur. Le groupement protecteur Trt réduit le caractère basique du noyau imidazole et crée un encombrement stérique rendant difficile la racémisation de l'histidine.

L'acide aminé tryptophane peut s'oxyder durant les couplages et l'indole peut subir une alkylation par un carbocation généré pendant le clivage. L'ajout d'un groupement Boc sur l'azote de l'indole permet d'éliminer ces réactions indésirables.

Afin de s'assurer que les ponts disulfures ne seront pas formés aléatoirement, les paires de résidus cystéines nécessitent une protection orthogonale. Le groupe Trt protège le groupe thiol durant la synthèse et est clivé en milieu acide, c'est-à-dire au moment du clivage au TFA. Pour sa part, le groupe acétamidométhyle (Acm) est stable aux conditions du clivage du peptide de la résine. Une oxydation à l'iode permet simultanément la déprotection des groupes thiols et la formation du pont disulfure. Enfin, le groupe protecteur méthoxytriphénylméthyle (Mmt) est très labile aux acides de sorte qu'une faible concentration d'acide et un court temps de réaction suffisent. Il est donc possible d'obtenir des résidus cystéines libres sans déprotéger le reste des acides aminés et de former le pont disulfure alors que le peptide est toujours ancré au support solide. En combinant le groupe Trt avec le groupe Acm ou Mmt, on obtient une formation sélective des ponts disulfures par des cheminements différents.

À cause de la présence de groupes phosphates et sulfates sur les peptides, l'amine terminale ne peut être déprotégée dans les conditions habituelles avec de la pipéridine. En effet, les groupes phosphates et sulfates sont clivés en milieu basique. Par contre, en incorporant l'acide aminé N-terminal avec le groupe Boc protégeant l'amine- α , ce problème est évité, car la déprotection finale s'effectuera en même temps que le clivage du peptide de la résine.

1.1.4 Choix de la méthode de phosphorylation

L'approche globale de phosphorylation offre la possibilité d'obtenir simultanément des analogues phosphatés et non-phosphatés de ET-1. De plus, l'incorporation de résidus sérine et thréonine déjà phosphorylés pourrait résulter en la perte de la partie phosphate suite à une réaction de β -élimination (Andrews *et al.*, 1991). Les résidus sérine, thréonine et tyrosine seront donc intégrés à la chaîne peptidique sans protection au niveau de leur chaîne latérale. Les réactions d'acylation de ces dérivés ne devraient pas être majoritaires étant donné que nous utilisons le réactif HBTU (hexafluorophosphate de 2-(1-H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium) comme agent de condensation et que sept couplages seulement sont effectués après leur incorporation à la chaîne peptidique (Fournier *et al.*, 1989). Lorsque la synthèse des analogues sera complétée, trois réactifs de phosphorylation seront utilisés afin de déterminer l'efficacité de chacun.

1.1.5 Choix de la méthode de sulfatation

Les groupes sulfates non-protégés sont particulièrement labiles en milieu acide (Futaki *et al.*, 1992). Cependant, leur stabilité en milieu acide est augmentée lorsque le sulfate est sous la forme d'un sel (Yagami *et al.*, 1993). Néanmoins, les réactifs de sulfatation existant produisent un groupe sulfate non-protégé. De plus, l'utilisation de dérivés sérine et thréonine déjà sulfatés résulterait en la perte du groupe sulfate pendant les étapes de déprotection ultérieures suite à une réaction de β -élimination. La synthèse d'analogues sulfatés de ET-1 a donc été limitée à l'incorporation d'un résidu tyrosine possédant un groupe sulfate sous la forme d'un sel dans la chaîne peptidique.

1.2 Réactifs et solvants utilisés

Des billes de résine Wang, formées de polystyrène ponté avec 1% de divinylbenzène et fonctionnalisées avec des groupements hydroxyles à raison de 1,12 méq/g, ont été utilisées pour effectuer les synthèses peptidiques. Ces billes de résine ainsi que les réactifs de couplage, à savoir le HBTU et le HOBt (1-hydroxybenzotriazole

monohydraté), ont été obtenus chez Richelieu Biotechnologies inc. (Montréal, QC, Canada). Les acides aminés aspartate, leucine, valine, méthionine, thréonine et sérine dont la fonction amine- α est protégée par un groupe Fmoc provenaient également de Richelieu Biotechnologies inc. Tous les autres acides aminés ont été obtenus de Chem-Impex International (Woodale, IL, USA). Le dichlorométhane (DCM) de qualité ACS, le phénol, le toluène et l'alcool éthylique dénaturé ont tous été achetés chez Anachemia Canada (Ville St-Pierre, QC, Canada). Le N,N-diméthylformamide (DMF) de qualité ACS, le méthanol, l'éther éthylique, le tétrazole-1H, le diméthylsulfoxyde (DMSO), le ferricyanure de potassium et l'acétonitrile (ACN) pour leur part, provenaient de Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). L'acide trifluoroacétique Biograde (TFA) a été fourni par Halocarbon (Hackensack, NJ, USA) tandis que la solution aqueuse de 70% t-butylhydroperoxyde a été obtenue de Acros Organics (Nepean, ON, Canada). Enfin, le N,N-diisopropylphosphoramidite, l'éthadithiol, le di-t-butyle N,N-diethylphosphoramidite, le dibenzyle N,N-diisopropylphosphoramidite, la pyridine, la pipéridine, le chlorure de benzoyle, le chlorure de dichlorobenzoyle, le dibenzylphosphite, le N-chlorosuccinimide et la solution 5M de t-butylhydroperoxyde dans du décane ont été achetés chez Aldrich Chemical Company inc. (Milwaukee, WI, USA).

1.3 Synthèse du résidu sulfaté

Le point de départ de la synthèse du résidu sulfaté a été l'acide aminé Fmoc-Tyr-OH acheté chez Richelieu Biotechnologies inc. Une quantité de 2 g, soit 4,96 mmoles, a été dissoute dans environ 100 mL de pyridine asséchée sur pastilles de KOH. À cette solution, 10 éq. du réactif DMF-SO₃ (7,6 g) ont été ajoutés et la réaction s'est déroulée à 50°C sous agitation pendant 1 h. Le volume réactionnel a ensuite été filtré et lavé avec de la pyridine. Le filtrat a été évaporé *in vacuo* puis solubilisé dans une solution de bicarbonate d'ammonium à une concentration de 0,01M. Après lyophilisation, le solide obtenu a été mis en solution dans de l'eau distillée contenant 3% d'acétonitrile (ACN) et lyophilisé à nouveau. L'acide aminé Fmoc-Tyr(SO₄NH₄) a été purifié par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) préparative en phase inverse avec

un système Prep LC 500A de Waters comprenant un module PrepPak 1000, un détecteur d'absorbance modèle 441 et une colonne Delta Pak C₁₈ (15 µm, 300Å, 47 mm x 30 cm). Le solide a été dissous dans un volume de 1,2 L de tampon acétate d'ammonium 0,1 M à un pH de 6,5 et contenant 5% de ACN. Ce volume a été injecté sur la colonne et l'élution s'est effectuée selon un gradient linéaire de (A) vers (B) en 1h30 où (A) est une solution tamponnée d'acétate d'ammonium 0,1M à un pH de 6,5 et (B) se compose de 60% ACN / (A). Le débit a été fixé à 40 mL/min et la densité optique de l'éluat a été mesurée à 230 nm. Les fractions recueillies ont été vérifiées sur un système CLHP analytique muni d'un échantillonneur automatisé de marque Beckman System Gold 507E, d'un contrôleur automatisé de gradient de modèle 128 et d'un spectrophotomètre de modèle 168. Une colonne Vydac C18 (10 µm, 300Å, 30 cm x 39 mm) a servi à l'analyse des fractions recueillies. Le débit a été maintenu à 1,5 mL/min et l'élution s'est effectuée selon un gradient linéaire de 20 min allant de 20% à 60 % d'ACN; l'autre éluant étant de l'eau distillée contenant 0,06% de TFA. Enfin, la densité optique de l'éluat a été mesurée à 230 nm. Les fractions correspondant à l'acide aminé désiré ont été évaporées *in vacuo* et lyophilisées à quatre reprises, soit jusqu'à ce que le poids du solide obtenu reste stable, afin d'éliminer l'excédent de sels produit par l'utilisation d'un tampon pour la purification. La caractérisation de l'acide aminé obtenu a été effectuée par spectrométrie de masse utilisant un spectromètre Quattro II à triple quadrupole et un système informatique d'analyse de type Mass Lynx. Le voltage du cône extracteur a été ajusté à 3,5 kV et l'appareil a été calibré avec un échantillon de myoglobine de cheval. Le balayage a été effectué pour des valeurs de *m/z* de 800 à 1700 et à une vitesse de 100 uma/sec.

1.4 Protocole de synthèse des peptides

1.4.1 Fixation du premier acide aminé

La fixation du premier acide aminé s'est effectuée selon le protocole établi par Sieber (1987). La réaction a été réalisée en deux lots afin d'obtenir des taux de substitution faible et élevé. En effet, un taux de substitution faible est nécessaire pour permettre une

cyclisation du peptide sur la résine et pour minimiser une polymérisation causée par la formation de ponts disulfures intermoléculaires (Kellenberger *et al.*, 1995). Les quantités de résine, d'acide aminé, de réactifs utilisés ainsi que les temps de réaction exigés pour cette étape sont précisés au Tableau I.

Tableau I. Quantités de résine, d'acide aminé, de réactifs utilisés et temps de réaction exigés pour la fixation du premier acide aminé.

Composés et temps de réaction	Lot 1	Lot 2
résine Wang (substitution : 1,12 méq/g)	5 g	5 g
Fmoc-Trp(Boc)	5,9 g (2éq)	4,5 g (1,5 éq)
pyridine	1,5 mL (3,3 éq)	1,1 mL (2,3 éq)
chlorure de 2,6 dichlorobenzoyl	1,6 mL (2 éq)	1,2 mL (1,5 éq)
temps de réaction pour la fixation du premier acide aminé	20h	15h

Le premier acide aminé à fixer à la résine est le tryptophane dans le cas de ET-1. Donc, le Fmoc-Trp(Boc) a été dissous dans un volume minimal de DMF et agité mécaniquement pendant 10 min. Puis, la résine Wang a été ajoutée à la solution d'acide aminé et agitée mécaniquement pour un autre 10 min permettant une bonne pénétration de l'acide aminé dans le support polymérique. Ensuite, la pyridine et le chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl ont été ajoutés et la réaction, faite avec agitation mécanique, s'est déroulée sous atmosphère d'argon. Trois lavages de la résine au DMF ont été effectués avant de poursuivre avec le blocage des sites ne s'étant pas couplés à l'acide aminé. Pour ce faire, un excès (3 mL) de pyridine et de chlorure de benzoyl a été ajouté et la réaction s'est déroulée sous atmosphère d'argon, avec une agitation mécanique, pour une période de 2h. Une fois cette réaction terminée, la résine a été lavée (trois fois avec du DMF, deux fois avec du méthanol, deux fois avec du DCM et une fois avec du méthanol) et séchée sous vide dans un dessiccateur.

Afin d'évaluer le taux de substitution obtenu pour cette réaction, 10 mg de résine séchée ont été prélevés et mis en suspension dans 3 mL d'une solution 20% (v/v) pipéridine/DMF. Après une forte agitation d'une durée de 3 min, la densité optique a été

mesurée à 290 nm. Une densité optique de 1,0 mesurée sur un échantillon de la solution dilué 10 fois correspond à un taux de substitution de 0,54 mmoles/g.

1.4.2 Fixation des autres acides aminés

Le couplage des acides aminés subséquents s'est effectué au moyen d'un synthétiseur manuel à multiréacteurs permettant la synthèse simultanée de six peptides. Le cycle de couplage d'un acide aminé se compose des étapes suivantes : déprotection, lavages, couplage, lavages et vérification. Le détail de chacune de ces étapes est résumé dans le Tableau II. Le drainage et l'agitation des réactifs se sont faits par des jets d'azote. Pendant la déprotection, le caractère basique de la pipéridine permet d'arracher un proton au groupement Fmoc et, suite à des déplacements d'électrons, on obtient la libération de dioxyde de carbone et de 9-fluorènylméthylène. Au couplage, l'addition d'une amine tertiaire comme la diisopropyléthylamine (DIEA) permet d'obtenir une charge négative sur le groupe α -carboxyle de l'acide aminé à coupler. La charge négative du carboxylate peut ensuite attaquer l'atome central C⁺ du HBTU pour former un dérivé d'acyloxyuronium avec le Fmoc-acide aminé. Ce dernier peut être directement attaqué par l'amine déprotégée du peptide ou subir l'attaque de l'hydroxybenzotriazolite, formé à partir du HOBt en milieu basique, pour donner un ester activé. Ce dernier composé possède également la capacité d'interagir avec l'amine libre de la chaîne peptidique. Étant donné que les résidus Fmoc-Cys(Trt) et Fmoc-Cys(Mmt) se racémisent lorsque le couplage est effectué selon ce protocole, ils doivent être incorporés à la chaîne peptidique sous la forme d'anhydrides symétriques (Kaiser *et al.*, 1996). Pour ce faire, 4 éq. de l'acide aminé et 2 éq. de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) sont dissous dans environ 20 mL de DCM. La réaction se déroule pendant 5 min à 0°C, sous atmosphère d'azote et avec une agitation produite par un barreau magnétique. Le précipité formé est écarté par filtration et le filtrat constitue la solution à utiliser pour effectuer le couplage. La vérification du couplage s'effectue par un test qualitatif décrit par Kaiser *et al.* (1970).

Tableau II. Protocole utilisé pour un cycle de synthèse peptidique.

Étapes	Réactifs	Temps
déprotection du groupement N- α -Fmoc	20% (v/v) pipéridine/DMF	1 X 2 min 1 X 15 min
	Pour Glu : 50% (v/v) pipéridine/DMF	1 X 10 min
lavages	DMF	2 X 2 min
lavage	Éthanol	1 X 2 min
lavages	DMF	2 X 2 min
couplage	3 éq. Fmoc-AA-COOH 3 éq. HBTU 1 éq. HOBt 3 éq. DIEA dans du DMF	1 X 30 min
lavages	DMF	2 X 2 min
lavages	DCM	2 X 2 min
vérification du couplage	Ninhydrine (réactif de Kaiser)	1 X 5 min
lavages	DMF	2 X 2 min

Ce test exploite le fait que la ninhydrine se lie avec les amines pour former le complexe de Ruhemann qui est de couleur bleue; dans le cas où le couplage est complété, la ninhydrine ne réagit pas et conserve donc sa couleur originale, soit le jaune.

Ces étapes sont répétées pour chacun des acides aminés, jusqu'à la terminaison du peptide.

1.4.3 Cyclisation sur résine

Les analogues de ET-1 cyclisés sur résine ont été synthétisés en utilisant les résidus Cys(Mmt) pour les positions 3 et 11, et les résidus Cys(Trt) pour les positions 1 et 15. La déprotection sélective des groupes protecteurs Mmt a été effectuée par quatre traitements de 2 min avec une solution de 1% TFA/ 5 % triisopropylsilane (TIS) dans du DCM.

La formation du pont disulfure entre les positions 3 et 11 des analogues de ET-1 a été obtenue par une oxydation à température de la pièce au ferricyanure de potassium dans une solution 50% (v/v) DMSO/ eau distillée. Pour les analogues ayant la chaîne latérale du résidu en position 8 non-protégée, 20 éq. de ferricyanure de potassium et un temps de réaction de 1h ont suffi. Par contre, l'analogue possédant le résidu tyrosine sulfaté en position 8 a nécessité 150 éq. de ferricyanure de potassium pendant 20h pour que la cyclisation soit complète. La résine a ensuite été lavée à fond avec du DMSO, du méthanol, du DMF et du DCM.

La cyclisation a été vérifiée au moyen de l'électrophorèse capillaire et de la CLHP analytique par des analyses, après clivage, d'un petit échantillon de peptide-résine.

1.4.4 Méthodes de phosphorylation

1.4.4.1 Protocole 1

Durant la synthèse, les résidus cystéines en position 3 et 11 ont été introduits à la chaîne peptidique avec le groupe protecteur Trt, alors que des Cys(Acm) ont été utilisés pour les positions 1 et 15. La phosphitylation s'est effectuée sur le peptide-résine avec une solution de 4 éq. de tétrazole-1H et de 1,25 éq. de di-t-butyle N,N-diéthylphosphoramidite dans du DMF (Perich, 1992). Suite à une réaction de 3h sous atmosphère d'azote et avec une agitation mécanique, le peptide-résine a été lavé et resuspendu dans du DMF. Puis, 100 éq. de t-butylhydroperoxide (solution aqueuse de 70%) ont été ajoutés pour réaliser l'oxydation nécessaire à l'obtention d'un groupe phosphate. Cette dernière étape, faite sous agitation mécanique, s'est déroulée pendant 1h (Andrews *et al.*, 1991).

1.4.4.2 Protocole 2

Les résidus cystéines ont été incorporés à la chaîne peptidique de la même manière que décrit au protocole 1. Suite à la conclusion de la synthèse peptidique, les peptides-résines ont été séchés *in vacuo* à 40°C pendant toute une nuit. Puis, une solution de 50 éq. de tétrazole-1H et de 20 éq. de dibenzyle N,N-diisopropylphosphoramidite préparée dans du DMF a été ajoutée aux peptides-résines. La réaction s'est déroulée pendant 1h sous

atmosphère d'argon et avec agitation mécanique. Les peptides-résines ont ensuite été lavés et resuspendus dans du DMF pour permettre l'étape d'oxydation qui s'est effectuée avec 100 éq. de t-butylhydroperoxide (solution 5M dans du décane) pendant 30 min.

1.4.4.3 Protocole 3

Les résidus cystéines occupant les positions 3 et 11 ont été introduits dans la chaîne peptidique avec le groupe protecteur Mmt. Des dérivés Cys(Trt) ont été utilisés pour les résidus en position 1 et 15. Suite à la conclusion de la synthèse peptidique et à la cyclisation entre les résidus 3 et 11, le peptide-résine (0,12 mmoles de peptide) a été suspendu dans 667 μ L de toluène séché sur pastilles de KOH et 1,33 mL de pyridine fraîchement distillée. Cette solution a été amenée à -20°C et 667 μ L d'une solution 1,2M de dibenzylphosphochloridate, préparée *in situ* à partir de N-chlorosuccinimide et de dibenzylphosphite (Kenner *et al.*, 1952), a été ajoutée. La réaction s'est déroulée à -20°C , sous argon, pour une durée de 3h et avec une agitation. Puis, une même quantité de dibenzylphosphochloridate a été ajoutée et la réaction s'est poursuivie toute la nuit à température ambiante. Enfin, cette procédure a été répétée pour une durée de 2h (Otvos *et al.*, 1989) et le peptide-résine a été lavé avec de la pyridine, du toluène, du DCM, du t-amyl-alcool, de l'acide acétique glacial et de l'éther avant d'être clivé.

1.5 Clivage des peptides du support solide polymérique

La liaison entre la chaîne peptidique et la résine dite de Wang est sensible aux conditions acides. Le TFA Biograde est utilisé pour séparer le peptide de son support solide. De plus, ces conditions permettent en outre de retirer les groupes protecteurs des chaînes latérales des acides aminés et de la fonction phosphate (Trt, tBu, Boc, Bzl) à l'exception des groupes Acn des cystéines. Au cours du clivage utilisant le TFA, le résidu Trp(Boc) forme un intermédiaire N-in-carboxylé ayant un temps de demi-vie ($t_{1/2}$) d'environ 24h. Ainsi, le Trp est protégé des réactions d'alkylation et de sulfonation qui pourraient se produire dans ces conditions. Le Trp est décarboxylé durant les étapes subséquentes en milieu aqueux (King *et al.*, 1990).

Le peptide-résine est d'abord lavé avec du t-amyl alcool, de l'acide acétique glacial et de l'éther éthylique et séché *in vacuo*. Il est ensuite placé dans un ballon contenant un barreau magnétique et une solution de TFA additionnée de capteurs de carbocations est ajoutée. La réaction s'effectue sous atmosphère d'argon et un temps de réaction de 2h est nécessaire pour compléter le clivage. La résine est alors séparée de la solution par une filtration et plusieurs lavages avec du TFA permettent de s'assurer que l'extraction du peptide est complète. Suite à l'évaporation *in vacuo* du TFA, le peptide est précipité et trituré à l'éther éthylique, séché et conservé à -20°C jusqu'à la purification.

Pour les analogues phosphatés de l'endothéline formés en utilisant les protocoles 1 et 2, la solution de clivage utilisée était composée de 92% TFA, 3% phénol, 2,5% eau et 2,5% éthanedithiol (EDT) et la réaction s'est effectuée à température ambiante.

Pour ce qui est des peptides-résines cyclisés en position 3 et 11, une solution composée de 84% TFA, 10% eau, 6% triisopropylsilane(TIS), 5% DL-Méthionine et 15% phénol (Kellenberger *et al.*, 1995) a été utilisée; la réaction de clivage se déroulant à 0°C.

2. Purification et cyclisation des analogues de ET-1

2.1 Purification des analogues phosphatés

Les analogues phosphatés de ET-1 ont été purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) préparative en phase inverse. Un système Waters Prep LC500A comprenant un module Waters 1000 PrepPak et couplé à un détecteur d'absorbance de modèle 441 a été utilisé. Le matériel à purifier (200 mg) a été dissous dans 2mL de TFA Biograde puis incorporé goutte-à-goutte à un volume de 2L d'eau distillée contenant 10% d'ACN préalablement déoxygené par le barbotement d'un jet d'azote. Cette solution peptidique a été injectée sur une colonne DeltaPak C₁₈ (15µm; 300Å) et éluée selon un gradient linéaire de (A) vers (B) en 90 min, A étant de l'eau contenant 0,06% de TFA et B étant une solution 50% (v/v) ACN/ (A). Le débit a été maintenu à 40mL/min et la densité optique de l'éluat a été mesurée à 230 nm. Les fractions recueillies ont ensuite été analysées par un système CLHP analytique utilisant un échantillonneur automatisé Beckman System Gold 507E, un contrôleur de gradient de

modèle 128 et un détecteur d'absorbance de modèle 168. Une colonne Vydac C₁₈ (10µm; 300Å) éluée à un débit de 1,5 mL/min selon un gradient linéaire de 20 min allant de 20% à 60% ACN dans de l'eau contenant 0,06% de TFA a permis d'analyser les fractions recueillies; la détection s'est effectuée à 230 nm. Enfin, les fractions correspondant au produit majoritaire ont été regroupées, évaporées et lyophilisées.

2.2 Purification de l'analogue sulfaté

La purification de l'analogue sulfaté s'est effectuée en utilisant le même système CLHP préparatif que pour les peptides phosphatés. Par contre, le matériel à purifier (170mg) a été dissous dans 5mL de DMSO et incorporé goutte-à-goutte à un volume de 2,5L d'une solution tamponnée d'acétate d'ammonium 0,05M d'un pH de 6,5 et contenant 15% d'ACN. L'élution de la colonne DeltaPak C₁₈ (15µm;300Å) a été effectuée par un gradient linéaire de (A) vers (B) en 2h; A étant une solution de 15% ACN dans une solution tamponnée d'acétate d'ammonium 0,05M pH6,5 et B étant une solution de 50% ACN dans la même solution tamponnée. Le débit a été maintenu à 40mL/min durant l'élution et la densité optique de l'éluat a été mesurée à 230 nm. Les fractions recueillies ont ensuite été analysées selon le même protocole que celui décrit pour les analogues phosphatés. Les fractions correspondant au peptide désiré ont été regroupées, évaporées et lyophilisées.

2.3 Cyclisation par la formation du pont disulfure entre les cystéines des positions 3 et 11

La formation du pont disulfure entre les cystéines des positions 3 et 11 a été accomplie en dissolvant d'abord le peptide dans une solution aqueuse avec 0,06% TFA de façon à obtenir une concentration de 0,1mg/mL. Le pH est ensuite ajusté à 8,0 avec du NH₄OH concentré. Puis, 20 éq. de ferricyanure de potassium ont été ajoutés, la réaction de cyclisation se poursuivant durant 45 min, sans agitation, à température ambiante. Le pH de la solution a alors été ramené à une valeur située entre 2 et 5 avec du TFA Biograde et

la solution obtenue a été injectée sur le système CLHP préparatif décrit plus haut. Le peptide a été purifié selon le protocole détaillé pour les analogues phosphatés de ET-1.

2.4 Cyclisation par la formation du pont disulfure entre les cystéines des positions 1 et 15

La formation du pont disulfure entre les cystéines 1 et 15 a été effectuée par une oxydation à l'iode. Cette étape permet de retirer les groupes protecteurs Acm des cystéines de concert avec la cyclisation. Les peptides ont d'abord été dissous dans une solution dégazée d'acide acétique et d'eau (4 :1) de façon à obtenir une concentration d'environ 5mg/mL. Puis, 50 éq. d'iode, dissous dans un volume minimal de méthanol, y ont été incorporés pour démarrer la réaction. La réaction s'est poursuivie pendant 20h sans agitation. Afin de neutraliser la réaction, une solution aqueuse d'acide ascorbique a été ajoutée jusqu'à décoloration du milieu réactionnel. Enfin, la solution a été diluée 10 fois avec de l'eau contenant 0,06% de TFA pour permettre la purification du peptide selon le protocole décrit pour les analogues phosphatés.

Les analogues phosphatés de ET-1 ayant subi une cyclisation entre les cystéines 3 et 11 sur résine ont été soumis à un protocole de formation du deuxième pont disulfure semblable à celui utilisé pour les cystéines des positions 3 et 11. En effet, les analogues monocycliques ont été dissous dans une solution de 50% (v/v) DMSO/ eau distillée à raison de 25 mg/mL. Un excès de ferricyanure de potassium (50éq.) a été ajouté à la solution peptidique, la réaction se déroulant à la température de la pièce et sans agitation. Le déroulement de la cyclisation a été suivi par CLHP analytique. Une fois la cyclisation terminée, le volume réactionnel a été dilué 200 fois avec une solution de 10% ACN/H₂O contenant 0,06% de TFA. Cette dernière solution a ensuite été purifiée selon le protocole décrit pour les analogues phosphatés de ET-1.

Pour ce qui est de l'analogue sulfaté de ET-1, la formation du pont disulfure entre les cystéines 1 et 15 s'est effectuée simultanément avec la purification du peptide, étant donné que la solution peptidique utilisée contenait un agent oxydant (DMSO) et que le pH a été maintenu à une valeur favorisant la cyclisation.

3. Caractérisation des analogues de ET-1

3.1 CLHP analytique

La caractérisation par CLHP des analogues peptidiques obtenus fournit une évaluation de leur pureté. Un échantillonneur automatisé Beckman System Gold 507E, un contrôleur de gradient de modèle 128 et un détecteur d'absorbance de modèle 168 ont été utilisés. Une colonne Vydac C₁₈ (5µm; 300Å) éluée à un débit de 1 mL/min selon un gradient linéaire de 20 min allant de 20% à 60% ACN dans de l'eau contenant 0,06% de TFA a permis d'effectuer les analyses. La détection s'est effectuée à 230 nm.

3.2 Électrophorèse capillaire

Les analyses d'électrophorèse capillaire ont été effectuées sur un appareil Applied Biosystem, modèle 270A. Une quantité d'environ 0,05mg de chaque analogue peptidique a été dissoute dans 1 mL de tampon citrate 20mM à pH2,5 ou de tampon phosphate 20mM à pH 8,3. Ces solutions peptidiques ont été injectées au moyen d'un vacuum de 2 secondes sur un capillaire dont les dimensions sont de 35 cm x 50 µm. Un voltage de 15 kV a été appliqué aux bornes du capillaire et la température a été maintenue à 30°C durant l'analyse. La détection s'est effectuée à 200 nm.

3.3 Spectrométrie de masse

La caractérisation des peptides a été obtenue par la méthode de ESP-MS (electrospray mass spectrometry). Un spectromètre VG Quattro II à triple quadrupole a été utilisé et les données ont été analysées par un logiciel Mass Lynx. Le voltage du cône extracteur a été ajusté à 3,5 kV et le balayage a été effectué pour des valeurs allant de $m/z= 800$ à 1700 à une vitesse de 100 uma/sec. La calibration de l'appareil a été obtenue avec de la myoglobine de cheval et la résolution massive (basse/haute) a été fixée à 14.

Résultats

4. Synthèse, purification et caractérisation du dérivé sulfaté

4.1 Synthèse du dérivé tyrosine sulfaté

Le déroulement de la sulfatation chimique du dérivé Fmoc-Tyr-OH par le complexe DMF-SO₃ a pu être suivi par CLHP analytique. Suite à un traitement de 1h, un seul produit majoritaire a été obtenu sans l'apparition de produits secondaires importants. Par contre, une perte de 15% de la fonction sulfate a été enregistrée par suite de la lyophilisation nécessaire à l'obtention du dérivé sulfaté sous forme d'un sel d'ammonium (Figure 4).

4.2 Purification de l'acide aminé sulfaté

La purification par CLHP préparatif du dérivé Fmoc-Tyr(SO₄NH₄) brut a permis d'obtenir un acide aminé sulfaté dont la pureté a été évaluée à 90% par CLHP analytique dans les conditions suivantes : colonne Vydac C₁₈ (10 μm, 300Å, 30 cm x 39 mm), débit de 1,5 mL/min, détection à 230 nm et gradient allant de 20% à 60% ACN dans de l'eau contenant 0,06% de TFA. Les fractions correspondant au produit désiré ont été lyophilisées à quatre reprises pour éliminer l'excès d'acétate d'ammonium engendré par les conditions de purification. Une quantité de 1,45g du dérivé d'acide aminé sulfaté a été obtenue, ce qui correspond à un rendement final de 75%.

4.3 Caractérisation du dérivé sulfaté

Une analyse par chromatographie sur couche mince a été effectuée sur la poudre blanche correspondant au dérivé Fmoc-Tyr(SO₄NH₄) purifié. L'acide aminé a été dissous dans du méthanol, le solvant de migration étant composé de 9 mL de chloroforme, de 3mL de méthanol et de 0,5mL d'acide acétique glacial. Le produit a été révélé par illumination à

l'UV et par réaction à la ninhydrine. Un seul produit, dont le Rf est de 0,18, est apparu sur la plaque. De plus, l'analyse par spectrométrie de masse a précisé que la masse du dérivé d'acide aminé sulfaté obtenu était de $m/z = 501,3$; la masse attendue pour le dérivé Fmoc-Tyr(SO₄NH₄) étant de $m/z = 500,5$.

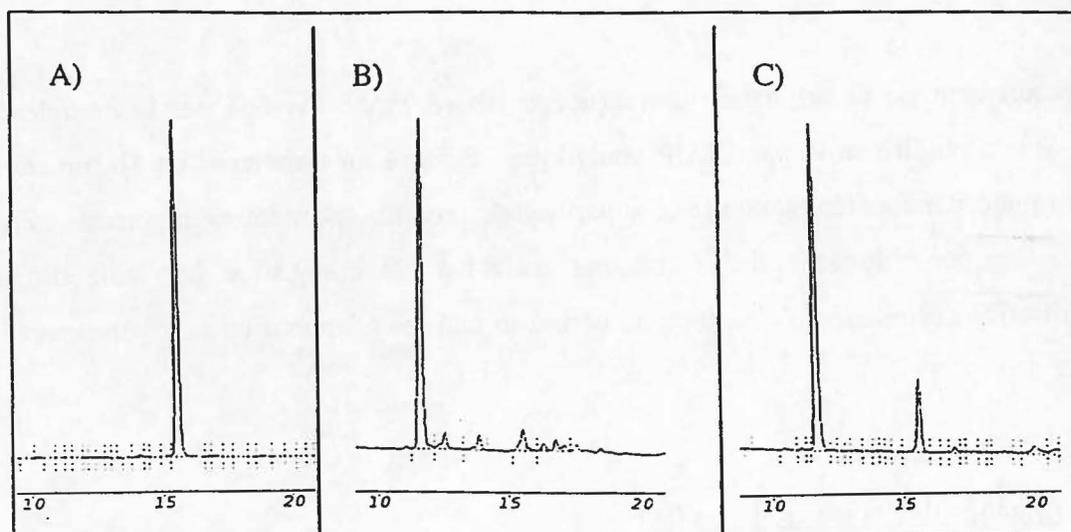


Figure 4 : Profils CLHP analytiques A) du Fmoc-Tyr-OH provenant de Richelieu Biotechnologies inc. au départ, B) après sulfatation avec le complexe DMF-SO₃ selon le protocole décrit à la page 16 et C) suite à l'obtention du dérivé Fmoc-Tyr(SO₄NH₄) par lyophilisation.

5. Synthèse, purification et cyclisation des analogues de ET-1

5.1 Synthèse des dérivés peptidiques

La liaison du tryptophane avec la résine de Wang par le protocole de Sieber a permis d'obtenir des taux de substitution de 0,78 mmole/g pour le lot 1 et 0,40 mmole/g pour le lot 2. Une quantité de 0,95g de résine a été utilisée pour la synthèse des analogues [Cys(Acm)^{1,15}, Ser⁸]hET-1, [Cys(Acm)^{1,15}, Thr⁸]hET-1 et [Cys(Acm)^{1,15}, Tyr⁸]hET-1 selon une échelle de 0,74 mmole. Quant aux analogues [Ser⁸]hET-1, [Thr⁸]hET-1, [Tyr⁸]hET-1 et [Tyr⁸SO₄NH₄]hET-1, 1,44g de résine a été utilisé pour chacun (échelle de

Tableau III. Rendement de synthèse peptidique en phase solide selon un protocole de chimie Fmoc des analogues bruts de ET-1

Analogues de ET-1	Rendement de synthèse peptidique
[Cys(Acm) ^{1,15} ,Ser ⁸]hET-1	73%
[Ser ⁸]hET-1	84%
[Cys(Acm) ^{1,15} ,Thr ⁸]hET-1	74%
[Thr ⁸]hET-1	82%
[Cys(Acm) ^{1,15} ,Tyr ⁸]hET-1	74%
[Tyr ⁸]hET-1	64%
[Tyr ⁸ SO ₄ NH ₄]hET-1	68%

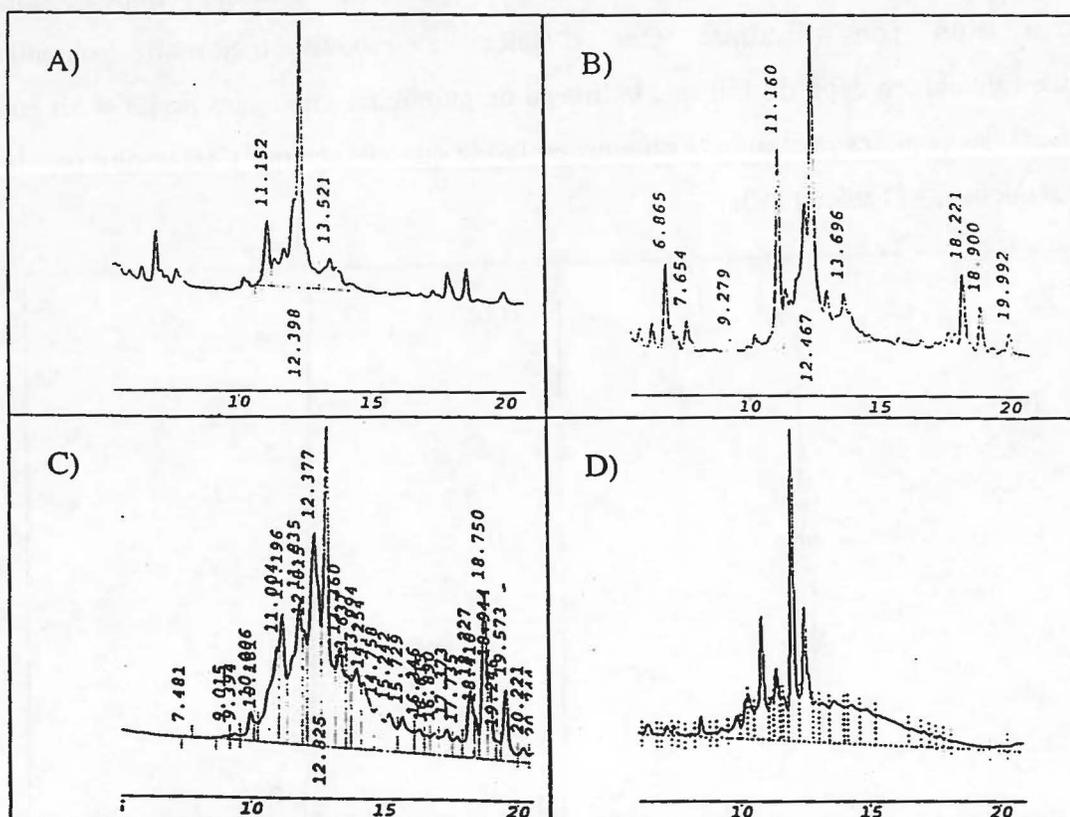


Figure 5 : Profils CLHP analytiques des analogues bruts de ET-1. A) (Ser⁸)hET-1; B) (Thr⁸)hET-1; C) (Tyr⁸)hET-1 et D) (Tyr⁸SO₄NH₄)hET-1.

synthèse de 0,58 mmole). La synthèse peptidique en phase solide des analogues de l'endothéline-1 humaine, selon un protocole utilisant des acides aminés dont l'amine- α est protégée par un groupe Fmoc, a fourni un seul produit majoritaire brut tel qu'établi par CLHP analytique sur phase inverse (Figure 5). De plus, ces analogues bruts ont été obtenus dans des rendements variant de 64% à 84% (Tableau III).

5.2 Purification des analogues de ET-1

La purification par CHLP préparative a permis d'isoler le produit majoritaire obtenu par la synthèse peptidique de chacun des analogues de ET-1. La figure 6 montre les profils CLHP analytiques de l'analogue [Cys(Acm)^{1,15}, Ser⁸PO₄]hET-1 linéaire brut et après une première purification. Une étape de purification a également été réalisée après chaque formation d'un pont disulfure afin d'isoler le produit majoritaire obtenu. Malheureusement, en dépit du fait que le niveau de pureté des analogues de ET-1 ait été satisfaisant, les peptides purs ont été obtenus en faible quantité, ce qui s'est traduit par de faibles rendements (Tableau IV).

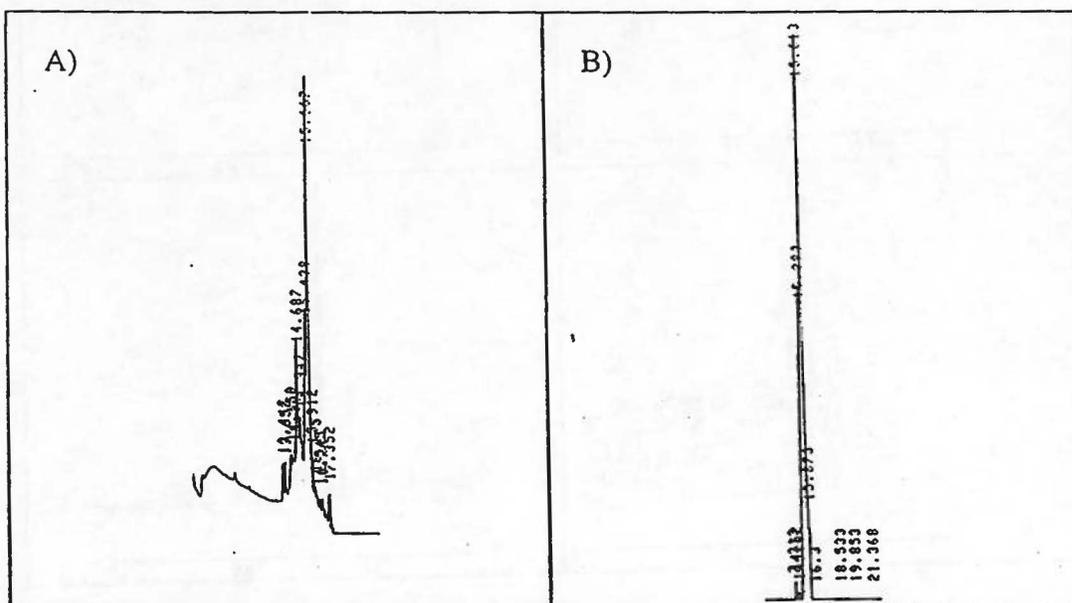


Figure 6 : Profils CLHP analytiques A) de l'analogue [Cys(Acm)^{1,15}, Ser⁸PO₄]hET-1 linéaire brut et B) après purification par un système CLHP préparatif.

5.3 Cyclisations des dérivés peptidiques en solution et sur résine

La formation du pont disulfure entre les cystéines des positions 3 et 11 par une oxydation au ferricyanure de potassium a été complétée en moins de 1h sans apparition de nouveaux pics sur le profil CLHP analytique du peptide qui résulteraient de réactions secondaires. De plus, le déroulement de la réaction a pu facilement être suivi par CLHP analytique, car le pic correspondant au produit majoritaire s'est déplacé vers la gauche avec la formation du pont disulfure (Figure 7). La formation de ce même pont, alors que le peptide avait encore ses groupes protecteurs sur les chaînes latérales de ses acides aminés et se trouvait ancré à la résine, s'est effectuée plus difficilement lorsqu'un groupement fonctionnel était placé sur le résidu en position 8. En effet, un très grand excès de ferricyanure de potassium (150 éq.) et un temps de réaction prolongé (environ 20h) ont été nécessaires pour compléter la cyclisation de l'analogue [Tyr⁸SO₄NH₄]hET-1. Par contre, pour les analogues phosphatés de ET-1, la phosphorylation s'est effectuée après la cyclisation. La chaîne latérale du résidu en position 8 était donc libre pendant la formation du pont disulfure; un traitement avec 20 éq. de ferricyanure de potassium pendant 1 h a suffi pour compléter cette cyclisation.

Dans le cas où les résidus cystéines des positions 1 et 15 étaient protégés latéralement par des groupes AcM, la formation du pont disulfure a été ardue à effectuer. Le tout a exigé un oxydant plus puissant que le ferricyanure de potassium, c'est-à-dire l'iode, et un temps de réaction prolongé (20h). Ces conditions de réaction ont malheureusement généré des produits secondaires constatables par la transformation du profil CLHP analytique (Figure 8).

Tableau IV. Pureté des analogues de ET-1 selon les données de caractérisation par CLHP analytique avec leur rendement final correspondant.

Peptides	Pureté en % déterminée par CLHP analytique	Rendement final en %
[Ser ⁸ PO ₄]hET-1 bicyclique (protocole 1 de phosphorylation)	85%	0,05%
[Thr ⁸ PO ₄]hET-1 bicyclique (protocole 1 de phosphorylation)	75%	0,10%
[Tyr ⁸ PO ₄]hET-1 bicyclique (protocole 1 de phosphorylation)	65%	0,02%
[Cys(Acm) ^{1,15} , Ser ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 2 de phosphorylation)	35%	2,0%
[Cys(Acm) ^{1,15} , Thr ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 2 de phosphorylation)	40%	2,1%
[Cys(Acm) ^{1,15} , Tyr ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 2 de phosphorylation)	N/D	N/D
[Ser ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 3 de phosphorylation)	78%	0,9%
[[Thr ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 3 de phosphorylation)	76%	1,39%
[[Tyr ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 3 de phosphorylation)	81%	0,23%
[Tyr ⁸ SO ₄]hET-1 linéaire	49%	0,33%
[Tyr ⁸ SO ₄]hET-1 bicyclique	51%	0,62%

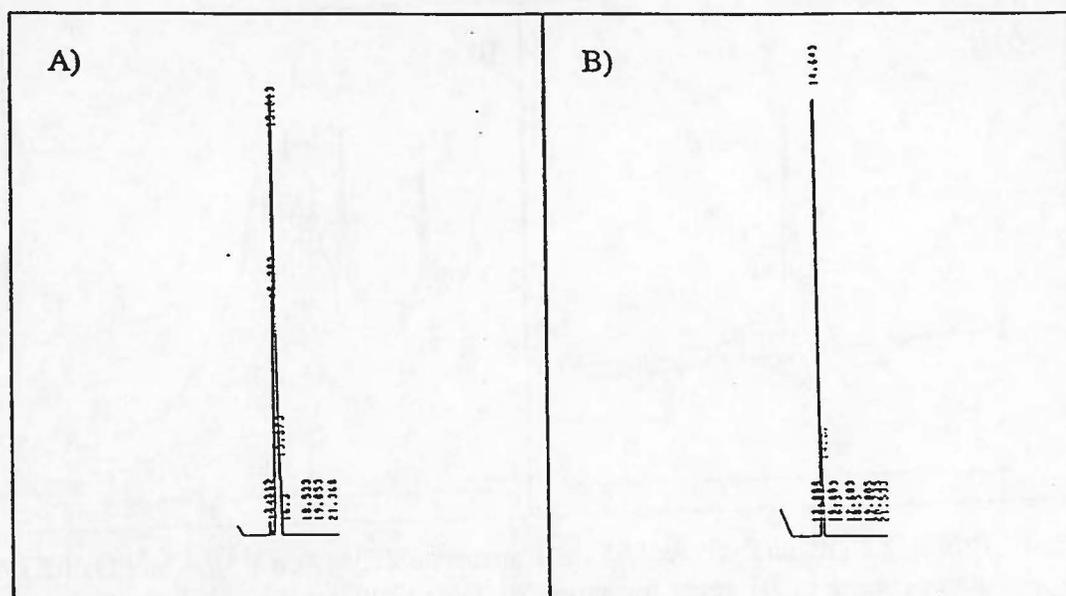


Figure 7 : Profils CLHP analytiques A) de l'analogue $[\text{Cys}(\text{Acm})^{1,15}, \text{Ser}^8\text{PO}_4]\text{hET-1}$ linéaire et B) après formation du pont disulfure entre les cystéines 3 et 11 par oxydation au ferricyanure de potassium.

La formation du pont disulfure entre les cystéines des positions 1 et 15 de l'analogue sulfaté a été effectuée au cours de la purification du peptide. La cyclisation n'a pas provoqué de changements notables sur le profil CLHP analytique du peptide. Par contre, un changement de temps de migration a pu être constaté par électrophorèse capillaire (Figure 9).

Pour ce qui est des analogues phosphatés, le protocole décrit à la section 2.4 a été appliqué sur un échantillon de $[\text{Ser}8]\text{hET-1}$ monocyclique afin d'en vérifier l'efficacité. La cyclisation a été réalisée en moins de 1h tel qu'observé par un déplacement vers la gauche du pic correspondant au produit majoritaire sur CLHP analytique. De plus, la cyclisation s'est effectuée sans produire de réactions secondaires (Figure 10).

5.4 Phosphorylation des analogues de ET-1

La phosphorylation des peptides-résines linéaires avec le di-t-butyle N,N-diéthylphosphoramidite (protocole 1) a été complétée en 1h tel que confirmé par un déplacement vers la gauche du pic correspondant au produit majoritaire sur le profil

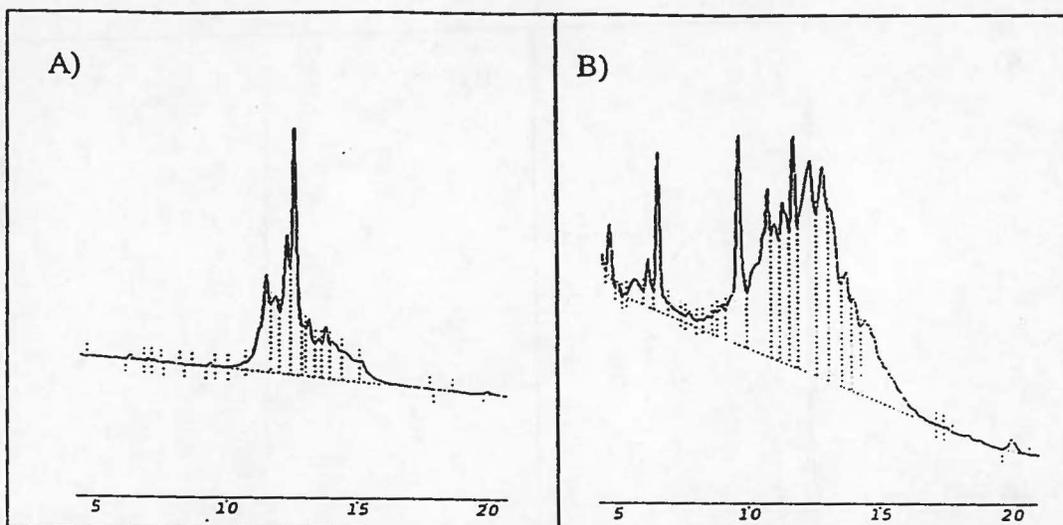


Figure 8 : Profils CLHP analytiques A) de l'analogue $[\text{Cys}(\text{Acm})^{1,15}, \text{Thr}^8\text{PO}_4]\text{hET-1}$ monocyclisé et B) après formation du pont disulfure entre les cystéines 1 et 15 par oxydation à l'iode.

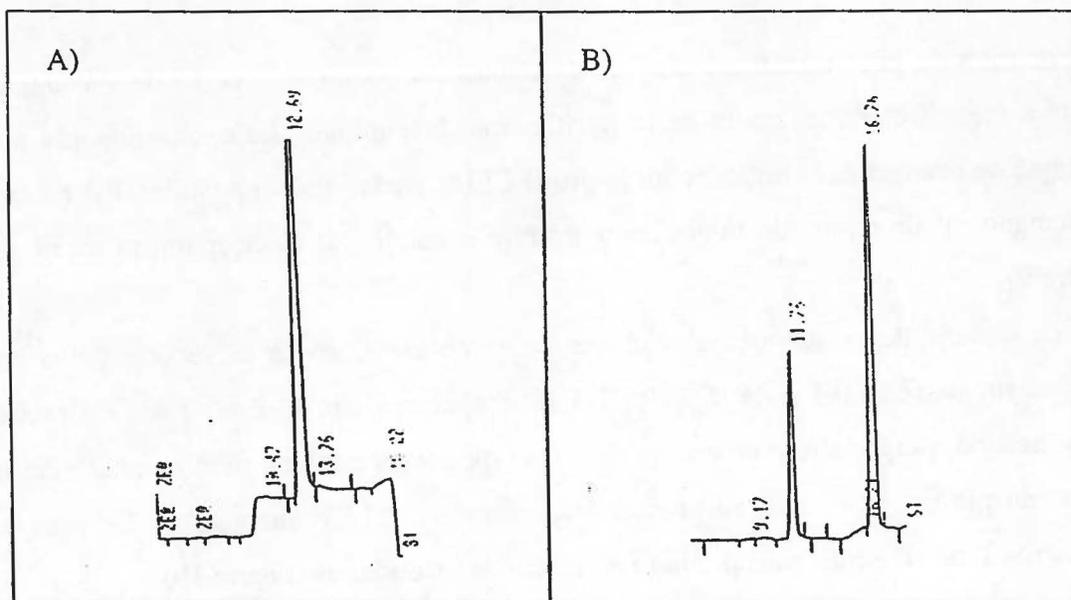


Figure 9 : Profils obtenus par électrophorèse capillaire utilisant une solution tamponnée d'acide citrique à un pH de 2,5 de l'analogue $[\text{Tyr}^8\text{SO}_4]\text{hET-1}$ A) linéaire et B) bicyclique.

CLHP analytique. Par contre, l'étape suivante, à savoir l'oxydation au t-butylhydroperoxide, n'a pu être suivie par CLHP analytique. En effet, ce type d'oxydation de même qu'une oxydation avec un autre agent puissant (1,5 éq. de MCPBA dans du DCM) sur un échantillon d'un peptide-résine phosphitylé n'a engendré aucun changement du profil CLHP analytique du peptide.

La phosphorylation des peptides-résines par le protocole 2 a produit des résultats comparables sur CLHP analytique au protocole 1. Toutefois, les profils d'élution des analogues [Cys(Acm)^{1,15}, Thr⁸PO₄]hET-1 et [Cys(Acm)^{1,15}, Tyr⁸PO₄]hET-1 indiquent que ces analogues ont subi une certaine dégradation au cours de l'oxydation au t-butylhydroperoxide (Figure 11).

La phosphorylation des peptides-résines monocycliques selon le protocole 3 a fait appel à un agent plus réactif que ceux utilisés dans les protocoles 1 et 2. En effet, la phosphorylation des peptides-résines monocycliques a été tentée selon le protocole 2, mais sans succès. La phosphorylation par le dibenzylphosphochloridate a produit un déplacement vers la droite du pic correspondant au produit majoritaire sur le profil obtenu

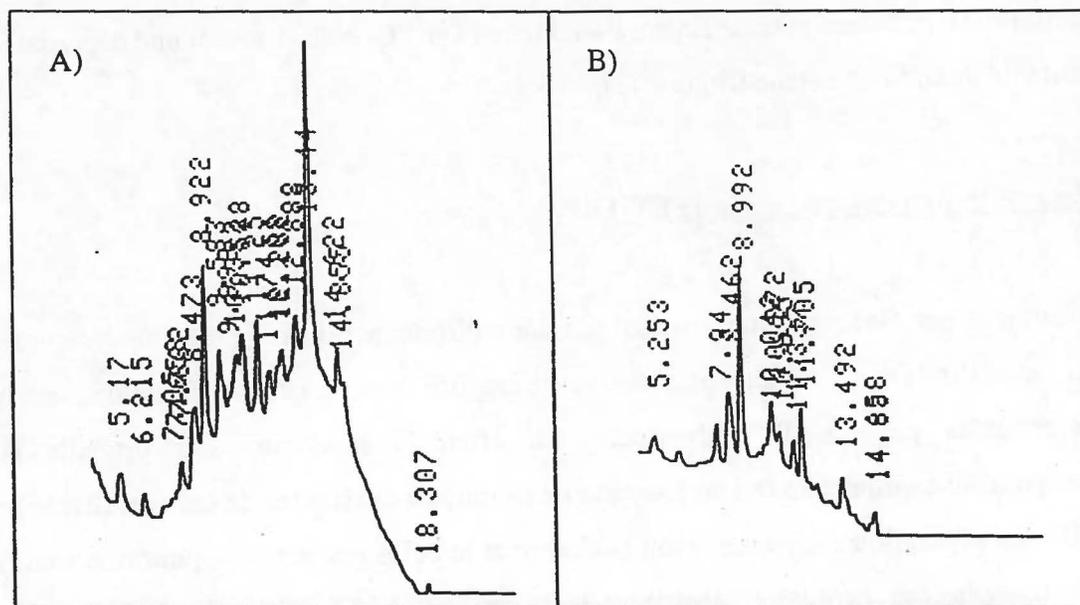


Figure 10 : Profils CLHP analytiques A) de l'analogue [Ser⁸]hET-1 monocyclisé et B) après formation du pont disulfure entre les cystéines 1 et 15 par oxydation au DMSO et au ferricyanure de potassium.

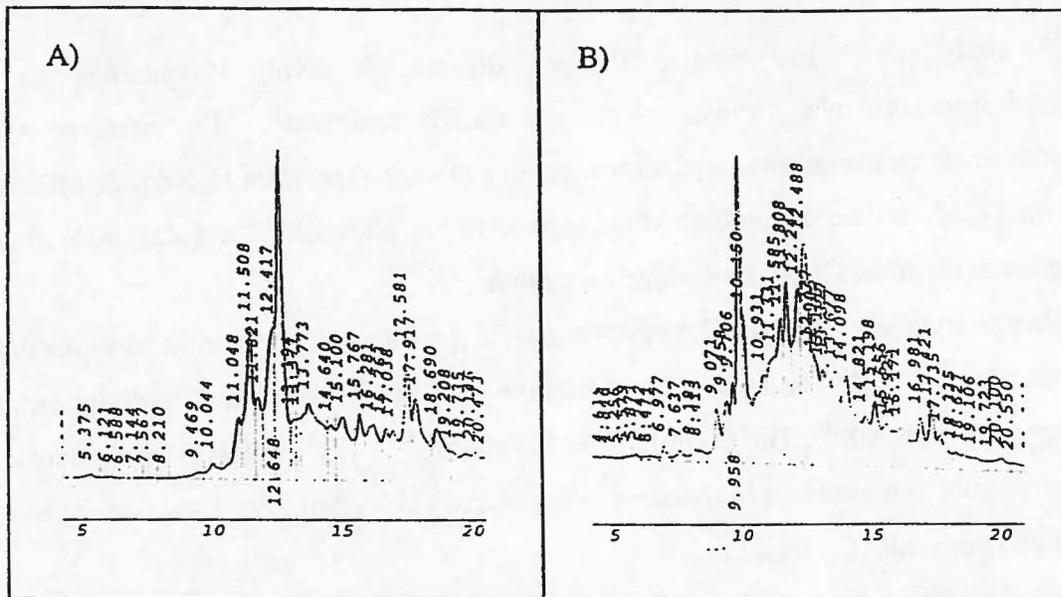


Figure 11: Profils CLHP analytiques A) de $[\text{Cys}(\text{Acm})^{1,15}, \text{Tyr}^8\text{PO}_3]\text{hET-1}$ et B) $[\text{Cys}(\text{Acm})^{1,15}, \text{Tyr}^8\text{PO}_4]\text{hET-1}$.

par CLHP analytique. Ce résultat est surprenant étant donné l'effet inverse obtenu par phosphorylation en suivant les protocoles 1 et 2. De plus, l'ajout d'un groupe phosphate sur le peptide devrait augmenter son caractère hydrophile et ainsi diminuer le temps de rétention sur CLHP analytique. Enfin, l'analogue $[\text{Tyr}^8\text{PO}_4]\text{hET-1}$ a subi une dégradation importante durant cette étape (Figure 12).

6. Caractérisation des analogues de ET-1

Des analyses par électrophorèse capillaire à deux différents pH ont permis de déterminer l'état de cyclisation ou de phosphorylation du peptide lorsque ces modifications étaient imperceptibles par CLHP analytique. En effet, la séparation des produits par électrophorèse capillaire se fait en fonction de propriétés différentes de celles utilisées par CLHP. La séparation s'effectue selon la charge et le poids des peptides pour une analyse par électrophorèse capillaire alors que la technique de CLHP utilise les propriétés d'hydrophobicité des peptides. De plus, l'utilisation de solvants de migration à divers pH permet d'effectuer la séparation selon un critère supplémentaire. À pH élevé, un flux électro-endo-osmotique est provoqué par le déplacement de la solution tamponnée créé

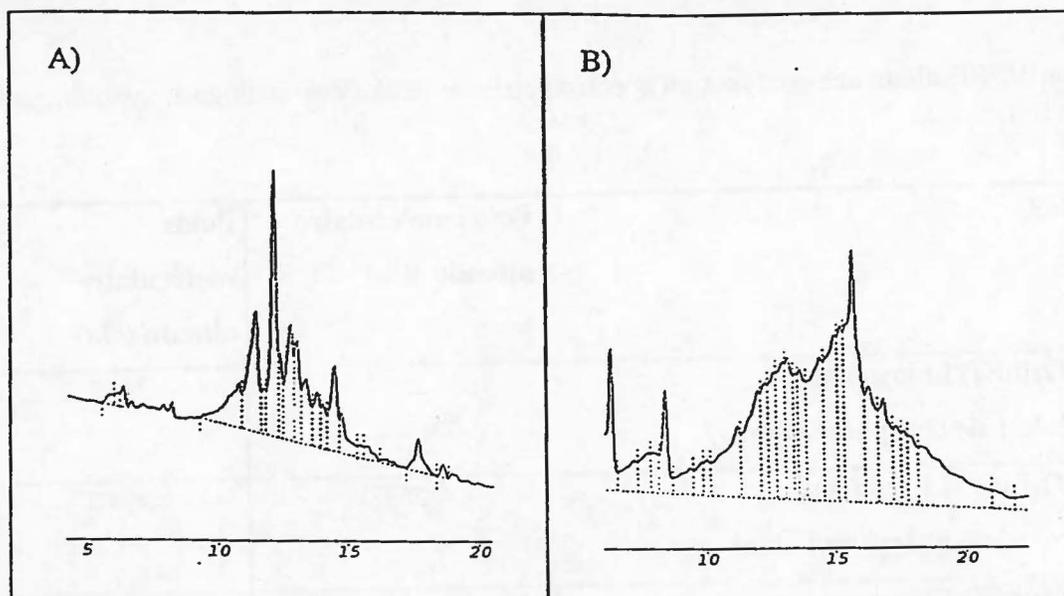


Figure 12 : Profils CLHP analytiques A) de $[\text{Tyr}^8]\text{hET-1}$ monocyclisé et B) $[\text{Tyr}^8\text{PO}_4]\text{hET-1}$ monocyclisé obtenu selon le protocole 3 de phosphorylation.

par l'effet du voltage sur la double couche électrique adjacente à la surface du capillaire. La séparation des molécules s'effectue alors selon leur résistance au flux électro-osmotique (Pairaud, 1989).

La pureté des analogues de ET-1 a été évaluée par CLHP analytique en utilisant une colonne de particules de $5\mu\text{m}$. L'efficacité de séparation de différents produits par CLHP est inversement proportionnelle à la grandeur des particules, car la surface capable d'interagir avec le produit injecté augmente avec des particules de gabarit réduit. Une analyse sur une colonne de particules de $5\mu\text{m}$ forme donc un critère assez rigoureux pour évaluer la pureté des analogues peptidiques obtenus. Les résultats de cette analyse sont énumérés au Tableau IV.

Tableau V. Résultats des analyses en spectrométrie de masse des analogues synthétiques de ET-1.

Peptides	Poids moléculaire attendu (Da)	Poids moléculaire obtenu (Da)
[Ser ⁸ PO ₄]hET-1 bicyclique (protocole 1 de phosphorylation)	2544	2477
[Thr ⁸ PO ₄]hET-1 bicyclique (protocole 1 de phosphorylation)	2558	2510
[Tyr ⁸ PO ₄]hET-1 bicyclique (protocole 1 de phosphorylation)	2620	2367
[Cys(Acm) ^{1,15} , Ser ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 2 de phosphorylation)	2690	2682
[Cys(Acm) ^{1,15} , Thr ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 2 de phosphorylation)	2704	2621
[Cys(Acm) ^{1,15} , Tyr ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 2 de phosphorylation)	2766	2682
[Ser ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 3 de phosphorylation)	2546	2716
[[Thr ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 3 de phosphorylation)	2560	2720
[[Tyr ⁸ PO ₄]hET-1 monocyclique (protocole 3 de phosphorylation)	2622	2712
[Tyr ⁸ SO ₄]hET-1 linéaire	2624	2648
[Tyr ⁸ SO ₄]hET-1 bicyclique	2620	2620

Enfin, des analyses en spectrométrie de masse selon la technique de ESP-MS ont permis de déterminer le poids moléculaire de chacun des analogues de ET-1 synthétisés pour ainsi vérifier si le peptide obtenu correspond au produit désiré. On peut remarquer (Tableau V) que seul l'analogue sulfaté de ET-1 possède un poids moléculaire correspondant à celui du peptide désiré. Pour ce qui est des analogues phosphatés de ET-1, les analogues obtenus par une phosphorylation utilisant les protocoles 1 ou 2 ont des poids moléculaires inférieurs à ceux attendus. Les poids moléculaires des peptides phosphorylés selon le protocole 3, sont, pour leur part, supérieurs à ceux des peptides désirés.

Discussion

7. Synthèse du dérivé tyrosine sulfaté

7.1 Évaluation de la synthèse et de la méthode choisie

La sulfatation du dérivé Fmoc-Tyr-OH au moyen d'un traitement au DMF-SO₃ s'est complétée en 1h sans l'apparition de réactions secondaires majeures (Figure 4). Par contre, la lyophilisation a provoqué une perte du groupement sulfate. En effet, le pH de l'eau utilisée pour dissoudre l'acide aminé avant la lyophilisation était légèrement acide. Or, lorsque des solutions acides de peptide sulfaté sont lyophilisées, une hydrolyse significative du groupe sulfate est observée (Payne *et al.*, 1991). La dissolution du dérivé sulfaté dans une solution tamponnée à faible concentration aurait probablement diminué la quantité de dérivé désulfaté obtenue.

L'équipe de Yagami (1993) a mis au point un protocole de synthèse d'un dérivé Fmoc-Tyr(SO₃Na). Ce protocole nécessite plusieurs étapes de dissolution, d'évaporation, de lyophilisation et de filtration se déroulant sur plusieurs jours. La multitude d'étapes à franchir augmente les pertes de produit. Le rendement de ce protocole est donc significativement diminué. Le protocole décrit à la section 1.3 est simple et permet donc d'obtenir un meilleur rendement. Bien que des dérivés sulfatés sous forme d'un sel soient accessibles commercialement, la méthode décrite ici offre un procédé de rechange facile et peu coûteux.

7.2 Identification et pureté de l'acide aminé

Le dérivé Fmoc-Tyr(SO₄NH₄) a été obtenu avec un bon rendement de synthèse et un degré de pureté très satisfaisant qui a permis de minimiser la quantité de chaînes peptidiques contenant un résidu aberrant. Par ailleurs, la caractérisation à l'aide de la chromatographie par couche mince a permis de confirmer que le produit solide obtenu n'était constitué que d'un composant majeur. Les différents composants se répartissent entre une phase stationnaire (une mince couche de silice) et une phase mobile (le solvant

organique de migration). Au fur et à mesure que le solvant organique progresse par capillarité sur la couche de silice, les composants hydrophobes sont entraînés par le déplacement de la phase mobile. Quant aux composants n'ayant pas une grande prédilection pour le solvant organique, ils se déplacent plus lentement à l'intérieur de la phase stationnaire (Rawn, 1990). Suite à la migration, la présence des différents composés peut être révélée de plusieurs façons. Les acides aminés, ainsi que les groupements aromatiques absorbent la lumière dans la plage de 200 à 350 nm du spectre (Hart et Conia, 1987). Donc, en soumettant la plaque de silice à des rayons UV, il est possible de visualiser leur présence.

Au cours de la caractérisation du dérivé Fmoc-Tyr(SO₄NH₄) par chromatographie en couche mince, la révélation des différents composés a également été effectuée par de la ninhydrine. Cette dernière réagit avec les groupes amines libres pour former un produit de couleur bleue. Le dérivé d'acide aminé étant sous la forme d'un sel d'ammonium, sa présence doit provoquer l'apparition d'une coloration bleue sans une déprotection préalable de l'amine- α . De plus, cette étape a permis de détecter la présence d'amines libres engendrées par les conditions de purification du dérivé sulfaté. Or, une seule coloration bleue est apparue, ce qui a permis de conclure que les multiples lyophilisations avaient éliminé l'excès d'amines libres et que le dérivé se trouvait sous la forme désirée.

Finalement, les résultats de l'analyse par spectrométrie de masse ont confirmé que le produit obtenu a une masse correspondant à celle du dérivé sulfaté désiré.

Ces résultats semblent donc indiquer que la méthode de synthèse décrite à la section 1.3 a conduit à la production du dérivé Fmoc-Tyr(SO₄NH₄) nécessaire à la synthèse de l'analogue [Tyr⁸SO₄]hET-1.

8. Synthèse des analogues de ET-1

8.1 Évaluation de la synthèse

La synthèse des analogues peptidiques de ET-1 a été effectuée en phase solide en utilisant des acides aminés dont l'amine- α est protégée par un groupe Fmoc. Ce mode de synthèse, contrairement à celui utilisant des groupes protecteurs Boc, permet d'éviter de

soumettre la chaîne peptidique à des traitements répétitifs au TFA pouvant favoriser des réactions secondaires catalysées en milieu acide. En effet, les résidus méthionine et tryptophane peuvent être oxydés en milieu acide et il peut y avoir formation de dérivés amino-succinimides à partir de résidus d'acide aspartique. Par contre, des réactions secondaires peuvent survenir pendant la synthèse peptidique utilisant des groupes Fmoc. La formation d'un résidu pyroglutamate peut se produire pendant la déprotection de l'amine- α de l'acide glutamique et provoquer la terminaison de la chaîne peptidique. De plus, une réaction de β -élimination peut engendrer la formation d'un lien double dans la chaîne peptidique par déshydratation d'un résidu sérine. Or, un seul produit majoritaire a été obtenu par synthèse peptidique des analogues de ET-1. Ce résultat laisse supposer que les réactions secondaires décrites ont été minimisées. Par ailleurs, les couplages des acides aminés ont été effectués avec le HBTU et le HOBt. La combinaison de ces réactifs avec le dérivé d'acide aminé engendre la formation d'un ester activé tout comme dans le cas de l'utilisation du BOP (hexafluorophosphate de benzotriazolyl-tris-diméthylaminophosphonium). Or, il a été démontré que les couplages effectués avec ce dernier réactif de couplage minimisent les réactions secondaires (Fournier *et al.*, 1989). Néanmoins, cette méthode de couplage peut provoquer jusqu'à 30% de racémisation des résidus cystéines protégés par le groupe Trt (Han *et al.*, 1997). Le processus de racémisation est en fait une compétition entre différents phénomènes moléculaires : l'activation du dérivé, le réarrangement du dérivé pour former un oxazolone, l'énolisation et l'acylation du dérivé activé ou de l'oxazolone (Han *et al.*, 1997). La racémisation est d'autant plus prononcée en présence d'un solvant polaire, d'une base et d'espèces favorisant un couplage rapide (Han *et al.*, 1997). C'est pourquoi ces résidus et les résidus cystéines ayant un groupe protecteur Mmt ont été incorporés à la chaîne peptidique par la méthode des anhydrides symétriques.

La liaison entre le support solide utilisé et la chaîne peptidique est sensible aux conditions acides. En effet, la résine dite de Wang est fonctionnalisée au moyen d'un groupe hydroxyméthylphénoxy-méthyle (HMP). Étant donné que cette fonction augmente la densité électronique au site de liaison avec l'acide aminé en position carboxy-terminale, les protons libérés par la dissociation d'un acide sont captés par ce lien. Ainsi, la chaîne peptidique est séparée de son support solide et la fonction acide carboxy-terminale est

regénérée. Durant le clivage, plusieurs réactions secondaires peuvent se produire. L'ajout de capteurs de carbocations permet de réduire substantiellement ces réactions indésirables. En effet, l'éthanedithiol (EDT) et le triisopropylsilane (TIS) préviennent la réalkylation des résidus cystéines par leur groupe protecteur Trt et l'oxydation des résidus méthionine est évitée par l'utilisation de substances soufrées. L'eau est un additif efficace pour capter les groupes tBu libérés et le phénol est utilisé pour conserver l'intégrité des peptides contenant à la fois des résidus Trp et Tyr (King *et al.*, 1990). Encore une fois, étant donné les rendements de synthèse satisfaisants et la production d'un seul produit majoritaire brut pour tous les analogues peptidiques de ET-1, les solutions de clivage utilisées semblent adéquates.

Finalement, malgré la grande sensibilité des sulfates aux conditions acides, le dérivé tyrosine sulfaté, sous la forme d'un sel d'ammonium, a résisté au clivage peptidique. D'ailleurs, une étude précédente avait souligné que le TFA n'est pas un acide destructif pour les résidus Tyr(SO₃Na) (Yagami *et al.*, 1993). Une solution de clivage composée de 90% TFA aqueux et additionnée de m-crésol et de 2-méthylindole avait été suggérée pour préserver l'intégrité du groupe sulfate des peptides contenant un résidu tryptophane. Malheureusement, le rendement de clivage n'était que de 35%. C'est pourquoi l'équipe de Kitagawa soutenait qu'une sulfatation globale d'un peptide, conjointement avec l'utilisation des groupes protecteurs orthogonaux Msib et Mtb, formaient une approche de synthèse plus avantageuse que celle qui a été employée ici (Kitagawa *et al.*, 1994; Futaki *et al.*, 1992). Pourtant, nous avons obtenu un rendement de synthèse (70%) semblable à ceux rapportés par l'équipe de Kitagawa au moyen d'une sulfatation globale. L'utilisation du TIS pour remplacer l'EDT en tant que capteur de carbocations pendant le clivage au TFA s'est avérée très efficace pour protéger le peptide d'une dégradation suite à des réactions secondaires. Cette amélioration du rendement de synthèse comparativement à ceux obtenus par d'autres protocoles ayant fait l'utilisation de dérivés tyrosines sulfatés est donc probablement associée à de meilleures conditions de clivage.

8.2 Étude des méthodes de cyclisation

Les peptides de la famille de l'endothéline possèdent deux ponts disulfures. Deux approches de cyclisation ont été utilisées pour obtenir les analogues phosphatés et sulfatés de ET-1. Une première série d'analogues a subi une cyclisation en solution. La formation du pont disulfure entre les cystéines 3 et 11 s'est effectuée rapidement et sans engendrer de réactions secondaires. De plus, la formation du pont disulfure diminue les propriétés hydrophobes du peptide. En effet, les groupes sulfhydryles ont la capacité de former des liaisons hydrogènes, mais de force moindre que les groupes hydroxyles, ce qui les rend relativement insolubles dans l'eau (Rawn, 1991). La grosseur de l'atome de soufre et son électronégativité plus faible que celle de l'oxygène expliquent les propriétés du groupe sulfhydryle (Hart et Conia, 1987).

Au cours de la formation du pont disulfure par le ferricyanure de potassium, l'atome de fer est réduit et un lien de coordination est temporairement formé entre ce dernier et un groupe sulfhydryle d'un résidu cystéine. Puis, le fer cède sa place pour que le pont disulfure se forme entre les deux cystéines. Ces conditions de cyclisation sont beaucoup plus douces que celles rencontrées pendant la formation du second pont disulfure, c'est-à-dire entre les cystéines des positions 1 et 15. Ces résidus ont conservé leur groupe protecteur (Acm) après le clivage du peptide de son support solide. Au moment de former ce pont disulfure, le peptide est soumis à une oxydation à l'iode. L'agent oxydant de cette réaction est I^+ , une espèce très réactive. Cet ion se lie à l'atome de soufre d'un résidu cystéine, ce qui confère une charge positive au soufre. Enfin, une attaque nucléophile est effectuée par le second résidu cystéine pour que se forme le pont disulfure. Or, l'ion I^+ étant très réactif, il a la capacité d'oxyder d'autres résidus tels que la méthionine et le tryptophane. Pour ce qui est de la méthionine, une oxydation amenant la formation d'un sulfoxyde est réversible par l'action d'un réducteur comme le $NaBH_4$. Par contre, une oxydation plus poussée peut engendrer la transformation irréversible du résidu méthionine en un sulfone. Pour ce qui est du tryptophane, son oxydation est automatiquement irrémédiable. Il faut noter que l'oxydation du tryptophane est facilitée en milieu acide. Or, la cyclisation à l'iode s'effectue dans une solution de 80% d'acide

acétique. Les dégradations observées après la formation du pont disulfure entre les cystéines 1 et 15 (Figure 8) pourraient donc avoir été causées par ces réactions secondaires et expliquer les faibles rendements d'analogues peptidiques purifiés obtenus. La cyclisation entre les cystéines des positions 3 et 11 alors que la chaîne peptidique était encore ancrée à son support solide, s'est effectuée plus facilement pour les analogues n'ayant pas de groupes fonctionnels sur la chaîne latérale du résidu en position 8. En effet, un excès de ferricyanure de potassium sept fois supérieur à celui utilisé pour les analogues peptidiques à être phosphorylés et un temps de réaction prolongé ont été nécessaires pour compléter la cyclisation de l'analogue [Tyr⁸(SO₄NH₄)]hET-1. Le groupe sulfate pourrait donc causer un encombrement stérique empêchant le repliement de la chaîne peptidique. Toutefois, malgré ces quantités importantes d'oxydant pendant un long temps de réaction, aucune réaction secondaire n'a été observée. Cette cyclisation s'est effectuée dans 50% de DMSO aqueux pour permettre la dissolution de l'oxydant (le ferricyanure de potassium) et du peptide protégé. Or, les propriétés de solvation du DMSO favorisent une conformation de coude renversé (reverse turn) ce qui facilite le repliement pour former le pont disulfure (Tam *et al.*, 1991). De plus, le DMSO est un oxydant faible qui peut former un pont disulfure en se liant d'abord de façon instable avec le groupe sulfhydryle d'une cystéine par le biais de son atome d'oxygène. Le deuxième résidu cystéine effectue alors une attaque nucléophile ce qui libère simultanément de l'eau et du diméthylsulfure avec la formation du pont disulfure (Tam *et al.*, 1991). Ces conditions de cyclisation plus douces ainsi qu'une étape de purification de moins favorisent l'obtention de meilleurs rendements finaux. De plus, la formation du second pont disulfure est beaucoup plus facile car les résidus cystéines des positions 1 et 15 ont leur chaîne latérale libre et le repliement causé par le premier pont disulfure provoque le rapprochement des groupes sulfhydryles. Néanmoins, les résultats obtenus pour les analogues phosphatés et sulfatés de ET-1 (Tableau IV) ne correspondent pas à ces inférences. L'incorporation de fonctions phosphates ou sulfates sur les analogues de ET-1 engendre probablement une diminution du rendement de peptide purifié obtenu. Les résultats obtenus ne sont donc pas nécessairement représentatifs de l'efficacité de ce dernier protocole de cyclisation de ET-1.

8.3 Étude des méthodes de phosphorylation

Les protocoles 1 et 2 de phosphorylation étaient constitués de deux étapes : une phosphitylation suivie d'une oxydation. La différence entre ces deux protocoles s'est révélée principalement par rapport à l'agent de phosphitylation. En effet, la différence se trouve dans les groupes protecteurs des atomes d'oxygène constituant le phosphite. Les groupes protecteurs utilisés pour le protocole 1 sont des tBu alors que pour le protocole 2 des groupes benzyles (Bzl) sont attachés aux atomes d'oxygène. Par contre, la réaction de phosphorylation s'effectue d'une façon similaire dans les deux cas. Dans un premier temps, le groupe hydroxyle libre de la chaîne latérale du résidu en position 8 procède à une attaque nucléophile sur l'atome de phosphate du réactif de phosphitylation. La liaison avec l'atome d'azote est alors rompue et un groupement phosphite se trouve donc lié au résidu en position 8. Cette première étape provoque une augmentation des caractéristiques hydrophiles du peptide que révèle une diminution du temps de rétention du peptide sur CLHP analytique. L'oxydation du phosphite pour obtenir le phosphate s'effectue par une réaction avec le t-butylhydroperoxyde selon un mécanisme radicalaire. Avec les réactifs du protocole 1, les groupes protecteurs des atomes d'oxygène de l'agent de phosphitylation et la chaîne alkyle de l'oxydant sont identiques. Or, le groupe tBu est volumineux; cette situation engendre donc un encombrement stérique pouvant gêner l'oxydation du phosphite pour former le phosphate. Malheureusement, l'oxydation ne provoque aucun changement perceptible sur le profil CLHP analytique ou sur le temps de migration obtenu par électrophorèse capillaire. Il est donc impossible par ces moyens techniques de suivre le déroulement de cette étape et de déterminer si l'oxydation est complète. Le suivi pourrait être effectué grâce à une analyse par spectrométrie de masse. En outre, un temps de réaction trop long pourrait engendrer la formation d'un sulfoxyde sur le résidu méthionine, car cet acide aminé n'est pas protégé à cette étape. En effet, le dérivé Fmoc-Met a été soumis au t-butylhydroperoxyde dans les conditions de réaction et son oxydation a été suivie par CLHP analytique. Une oxydation de 45 min a produit 25% de résidu méthionine sous la forme d'un sulfoxyde.

Étant donné que le réactif de phosphitylation utilisé dans le protocole 2 possède des groupes protecteurs différents et moins encombrants, on peut croire que l'oxydation

s'effectue plus facilement. Par contre, une dégradation du profil CLHP analytique des analogues $[\text{Thr}^8\text{PO}_4]\text{hET-1}$ et $[\text{Tyr}^8\text{PO}_4]\text{hET-1}$ a été observée suite à la phosphorylation (Figure 11). Hoffmann et ses associés (1995) avaient d'ailleurs remarqué que la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine était plus difficile à accomplir qu'avec les résidus sérines. Un temps de réaction prolongé pourrait favoriser l'obtention des analogues phosphatés en tant que produit majoritaire. De plus, l'utilisation d'une résine ayant un taux de substitution plus faible pourrait faciliter la pénétration des réactifs à leur site d'action.

La phosphorylation des analogues de ET-1 selon le protocole 3 s'est effectuée en une seule étape grâce au dibenzylphosphochloridate. Ce réactif possède les mêmes groupes protecteurs sur les atomes d'oxygène du phosphate que ceux se trouvant sur le réactif de phosphitylation utilisé au protocole 2. L'encombrement stérique est donc minimisé. De plus, le phosphate est activé par un chlore, un élément assez réactif et plus petit que la chaîne amide utilisée pour les réactifs des protocoles 1 et 2. C'est pourquoi ce réactif a plus de facilité à se rendre au site de phosphorylation. Les analogues synthétisés selon le protocole 3 ont été cyclisés en position 3 et 11 sur résine avant que le phosphate ne soit inséré en position 8. Le repliement de la chaîne peptidique rend le site de phosphorylation difficile d'accès. En effet, la phosphorylation de ces analogues monocycliques a été tentée avec les réactifs utilisés pour les protocoles 1 et 2, mais sans succès. La phosphorylation des résidus en position 8 a été possible par l'action du dibenzylphosphochloridate. Le groupe hydroxyle libre sur la chaîne de peptide protégé effectue d'abord une attaque nucléophile sur l'atome de phosphate. L'atome de chlore est alors libéré. La combinaison de ce dernier avec l'hydrogène du groupe hydroxyle forme du HCl. La chute du pH est contrôlée par la présence de pyridine dans le milieu réactionnel. Toutefois, le temps de rétention sur CLHP analytique des analogues phosphatés obtenus avec ce protocole a augmenté contrairement aux résultats obtenus selon les protocoles 1 et 2. Les résultats de l'analyse par spectrométrie de masse ont d'ailleurs montré que les analogues phosphatés de ET-1 avaient une masse supérieure à celle attendue. Une déprotection incomplète ou des modifications des résidus par des réactions secondaires pourraient expliquer ce résultat inattendu.

8.4 Identification des analogues de ET-1

Les analyses par spectrométrie de masse ont indiqués que les analogues phosphatés de ET-1 synthétisés suivant le protocole 1 possédaient une masse inférieure à celle attendue (Tableau V). Des éléments de la chaîne peptidique sont donc manquants. Par contre, la valeur de masse manquante est différente pour chaque analogue ce qui signifie que leur structure respective n'a pas nécessairement été modifiée d'une façon similaire. L'analogue [Ser⁸PO₄]hET-1 bicyclisé possède une masse dont la valeur est inférieure de 67 Da à la masse calculée. L'ajout d'un groupe phosphate sur un peptide provoque une augmentation de 81 Da sur sa masse. Néanmoins, la perte de ce même groupe fonctionnel engendre la libération d'une molécule de H₃PO₄ dont la masse est de 98 Da. Étant donné la sensibilité des groupes phosphates aux conditions acides, il est possible qu'il y ait eu clivage du lien joignant ce groupe fonctionnel et le résidu de la chaîne peptidique pendant la cyclisation à l'iode. En effet, il a déjà été mentionné à la section 2.4 que cette étape s'est réalisée dans de l'acide acétique pour une durée de 20h. De plus, il a été question à la section 8.2 que cette méthode de cyclisation pouvait favoriser l'oxydation des résidus Met et Trp. En tenant compte de ces possibilités, le résultat obtenu pour l'analogue [Ser⁸PO₄]hET-1 bicyclisé (protocole 1 de phosphorylation) pourrait s'expliquer par la perte du groupe phosphate de concert avec l'oxydation des résidus Met et Trp.

De même, l'analogue [Thr⁸PO₄]hET-1 bicyclisé, obtenu toujours selon le protocole 1, possède une masse dont la valeur est de 48 Da trop petite (Tableau V). Cette différence peut s'expliquer, encore une fois, par la perte du groupe phosphate et une oxydation des résidus Met et Trp. Par contre, l'oxydation du résidu Met se serait poursuivie jusqu'à la formation d'un sulfone. Ainsi, une perte de 98 Da conjointement avec le gain de trois atomes d'oxygène (48 Da) correspond au résultat enregistré pour cet analogue de ET-1.

Le résultat de spectrométrie de masse obtenu pour l'analogue [Tyr⁸PO₄]hET-1 bicyclisé est inférieur à celui attendu par une valeur de 253 Da. Une différence si importante ne peut s'expliquer que par l'isolation d'une chaîne peptidique dont certains résidus sont manquants. Étant donné que la difficulté de coupler les dérivés d'acide aminé s'accroît avec l'élongation de la chaîne peptidique, les résidus à l'extrémité amino-terminale sont plus susceptibles d'être manquants. En prenant pour acquis que le groupe phosphate a

également été clivé sur cet analogue et que les résidus Met et Trp sont oxydés, l'élimination des résidus en position 1 et 2 de la chaîne peptidique, c'est-à-dire une cystéine et une sérine, pourrait expliquer le résultat obtenu.

Le protocole 2 de phosphorylation a également produit des analogues dont la masse obtenue par une analyse en spectrométrie de masse était inférieure à celle attendue (Tableau V). De plus, la différence enregistrée pour les analogues [Cys(Acm)^{1,15}, Thr⁸PO₄]hET-1 monocyclisé et [Cys(Acm)^{1,15}, Tyr⁸PO₄]hET-1 monocyclisé est identique. Or, les masses obtenues correspondent aux valeurs pour les analogues peptidiques avant phosphorylation. La phosphorylation n'aurait donc pas eu lieu sur ces analogues. Il a été mentionné à la section 8.3 qu'une dégradation de leur profil CLHP analytique respectif avait été remarquée suite à la phosphorylation. Cette modification du profil CLHP analytique a pu mener à la conclusion que la phosphorylation de ces analogues était complétée alors que la chaîne peptidique était inchangée. De plus, les études sur la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine suggèrent que cette modification chimique est difficile à accomplir (Hoffmann *et al.*, 1995).

L'analyse par spectrométrie de masse de l'analogue [Cys(Acm)^{1,15}, Ser⁸PO₄]hET-1 monocyclisé a révélé une masse dont la valeur est de 8 Da inférieure à celle du peptide désiré. Toutefois, la pureté de l'échantillon soumis à cette analyse n'était pas très élevée. Étant donné que la valeur obtenue est voisine de la valeur attendue, il est possible de croire que l'analogue [Cys(Acm)^{1,15}, Ser⁸PO₄]hET-1 monocyclisé obtenu en suivant le protocole 2 de phosphorylation correspond au peptide désiré.

Contrairement aux résultats précédents, les analogues phosphatés de ET-1 obtenus selon le protocole 3 possèdent des masses supérieures à celles attendues (Tableau V). Comme il a été stipulé à la section 8.3, une déprotection incomplète pourrait être à l'origine de tels résultats. L'agent de phosphorylation utilisé pour ce protocole avait des groupes Bzl protégeant le noyau phosphate. Chacun de ces groupes possède une masse de 91 Da. Or, l'analyse de l'analogue [Tyr⁸PO₄]hET-1 monocyclique a enregistré une masse de 90 Da supérieure à celle attendue; un groupe protecteur Bzl serait donc encore ancré au groupe phosphate de ce peptide. Un clivage d'une durée prolongée pourrait permettre l'obtention de l'analogue désiré.

Les analogues [Thr⁸PO₄]hET-1 et [Ser⁸PO₄]hET-1 monocyclisés ont obtenus, pour leur part, des masses supérieures de 160 Da et 170 Da respectivement. La présence de groupes protecteurs Bzl ne peut expliquer à elle seule les résultats obtenus. L'agent de phosphorylation utilisé pour ce protocole, soit le dibenzylphosphochloridate, est plus puissant que ceux utilisés pour les protocoles 1 et 2. De plus, il faut tenir compte du fait qu'au moment de la phosphorylation, le pont disulfure entre les cystéines 3 et 11 était formé. Ces résidus se trouvaient donc déprotégés. Or, l'ajout d'un groupe phosphate peut s'effectuer également sur un groupe fonctionnel sulfhydryle et ainsi former un thiophosphate (Kitas *et al.*, 1994). On peut donc penser qu'il y ait pu avoir formation de résidus cystéines thiophosphatés. Le résultat obtenu pour l'analogue [Ser⁸PO₄]hET-1 monocyclisé pourrait donc s'expliquer par la présence d'un phosphate sur un résidu cystéine et d'un groupe protecteur Bzl non-clivé. Quant à l'analogue [Thr⁸PO₄]hET-1 monocyclisé, la phosphorylation des deux résidus cystéines engendrerait un peptide ayant une masse correspondant à celle obtenue. La présence de diverses chaînes latérales sur le résidu en position 8 pourrait provoquer une conformation plus ou moins favorable à une interaction entre l'agent de phosphorylation et les résidus cystéines. Ceci expliquerait que l'analogue [Tyr⁸PO₄]hET-1 monocyclique n'a pas subi cette réaction secondaire. Enfin, le résultat de spectrométrie de masse de l'analogue [Tyr⁸SO₄]hET-1 bicyclique concorde avec la masse calculée du peptide. Par contre, le résultat obtenu pour ce même analogue avant cyclisation diffère de la valeur attendue par 24 Da. Étant donné que le peptide cyclisé et purifié semble correspondre à l'analogue de ET-1 désiré, seule la pauvre pureté de l'échantillon linéaire analysé pourrait expliquer ce résultat inattendu.

9. Évaluation pharmacologique des analogues phosphatés et sulfatés de ET-1

Étant donné que seule la synthèse de l'analogue (Tyr⁸SO₄)hET-1 bicyclique semble avoir donnée le peptide désiré, aucune évaluation pharmacologique des analogues phosphatés et sulfatés de ET-1 n'a été effectuée. Toutefois, les résultats de ces études pourraient fournir des renseignements importants sur les pharmacophores de l'endothéline-1. En effet, des résultats montrant une activité agoniste de ces analogues dans des essais biologiques en bain d'organe souligneraient l'importance de la charge

négative sur l'acide aminé en position 8 de ET-1. De plus, une variation de l'intensité de l'activité vasoconstrictrice entre les analogues (Ser8PO4)hET-1, (Thr8PO4)hET-1 et (Tyr8PO4)hET-1 indiquerait que la position relative de la charge négative par rapport à la chaîne peptidique influence la liaison entre le peptide et son récepteur. Par contre, une évaluation conjointe de la structure tridimensionnelle de ces analogues peptidiques, en utilisant les méthodes de RMN, de dichroïsme circulaire ou de cristallographie, serait nécessaire afin d'établir une relation entre la conformation du peptide et son activité biologique. Le lien ionique hypothétique formé par le résidu en position 8 pourrait s'effectuer avec la lysine adjacente, le groupe amino-terminal ou encore directement avec un élément du récepteur. Néanmoins, cette dernière possibilité ne devrait pas engendrer une variation de l'activité biologique en fonction de l'acide aminé utilisé mais plutôt entre les analogues phosphatés et sulfatés. En effet, le groupement sulfate possède une densité de charge négative plus importante que le phosphate.

Dans l'éventualité où il n'y aurait pas une activité marquée de ces analogues lors d'essais biologiques *in vitro*, des essais de liaison permettraient de vérifier l'affinité entre les analogues peptidiques et les récepteurs de la famille de l'endothéline. En effet, il est possible que l'incorporation des acides aminés phosphatés ou sulfatés ait engendré des modifications trop importantes de la structure de la chaîne peptidique pour qu'il y ait conservation à la fois de la liaison et de l'activité. Cette évaluation pourrait s'effectuer *in vitro* par une compétition de liaison avec le récepteur entre l'analogue peptidique et l'ET-1 marquée (par exemple, avec un élément radioactif). De plus, il est fort possible que la présence d'une charge négative comme un phosphate ou un sulfate sur des analogues de ET-1 provoque des résultats totalement différents en fonction du type de récepteur étudié. Ces évaluations pharmacologiques permettraient donc de préciser d'avantage les éléments déterminant l'affinité des peptides de la famille de l'endothéline face aux différents type de récepteurs.

Enfin, une évaluation pharmacologique *in vivo* des analogues phosphatés et sulfatés de ET-1 serait difficile à effectuer étant donné que les peptides sont rapidement dégradés par l'organisme. De plus, l'interprétation des résultats est laborieuse car plusieurs événements physiologiques surviennent simultanément.

Conclusion

L'étude des deux méthodes de cyclisation utilisées semble indiquer qu'une oxydation à l'iode pour former le pont disulfure entre les cystéines 1 et 15 de peptides analogues à ET-1 est incompatible avec un protocole de SPPS en chimie Fmoc. En effet, la présence d'un résidu Trp non-protégé durant cette étape augmente les chances d'oxydation du noyau indole. Étant donné que ce résidu est essentiel à l'activité biologique (Doherty,1992), toute modification pourrait mener à des conclusions erronées suite à des évaluations pharmacologiques. La formation d'un premier pont disulfure sur résine suivie d'une oxydation dans des conditions modérées (ferricyanure de potassium ou DMSO) pourrait surmonter cette difficulté. Néanmoins, la présence de groupes protecteurs des chaînes latérales des acides aminés encombrants peut défavoriser le repliement du peptide. De plus, une résine ayant un taux de substitution trop élevé peut engendrer la même difficulté. Enfin, l'utilisation d'une résine super acide labile libérerait le peptide-protégé de son support solide de concert avec la déprotection des résidus cystéines qui subiront l'oxydation. On peut donc croire que le repliement du peptide serait facilité de cette façon. La formation des ponts disulfures par une oxydation à l'iode demeure toutefois adéquate pour les peptides formés par SPPS en chimie Boc avec un groupe formyle protégeant le Trp.

Aucun des protocoles, tel que décrit dans le présent mémoire, n'a permis l'obtention des analogues phosphatés de ET-1 désirés. Néanmoins, le protocole 2 de phosphorylation semble avoir été adéquat pour former l'analogue $[Cys(Acm)^{1,15}, Ser^8PO_4]hET-1$ monocyclisé. La cyclisation à l'iode normalement prévue aurait malheureusement engendrer les réactions secondaires enregistrées pour les analogues obtenus selon le protocole 1, à savoir la perte du groupe phosphate et l'oxydation des résidus Met et Trp. La combinaison de ce protocole de phosphorylation avec une cyclisation sur résine serait par contre inappropriée car les groupes protecteurs du noyau phosphate engendreraient un encombrement empêchant le repliement de la chaîne peptidique. Pour la même raison, la cyclisation du peptide n'aurait pu être effectuée après la phosphorylation lors du protocole 3 afin d'éviter la formation de résidus cystéines thiophosphatés. L'utilisation d'un réactif pouvant cliver les groupes Acm des cystéines sans impliquer une oxydation à l'iode (par

exemple un sel d'argent) pourrait permettre la cyclisation finale du peptide dans des conditions plus douces.

Étant donné qu'un groupe phosphate sur un résidu tyrosine n'est pas assujéti à des réactions de β -élimination, l'utilisation d'un résidu tyrosine phosphaté en tant que bloc de construction de la chaîne peptidique pourrait permettre la synthèse d'un analogue [Tyr⁸PO₄]hET-1. Un dérivé Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH est d'ailleurs accessible commercialement. L'utilisation de ce dérivé selon une stratégie de SPPS en chimie Fmoc, en combinaison avec une cyclisation du peptide sur résine, pourrait permettre d'obtenir l'analogue désiré tout en minimisant la production de réactions secondaires.

Enfin, le protocole décrit pour la formation de l'analogue [Tyr⁸SO₄]hET-1 bicyclisé a permis d'obtenir le peptide désiré par une procédure simple et directe. L'optimisation de chacune des étapes permettrait d'améliorer le rendement final obtenu pour cet analogue de ET-1.

Appendice A

Exemples de calculs de rendement

Rendement de synthèse :

$$R = \frac{\acute{E} * P.M}{M_{pr}} * 100$$

où :

\acute{E} = échelle de synthèse (mmoles)
= taux de substitution * masse de résine

P.M. = poids moléculaire du peptide protégé (mg/mmoles)

M_{pr} = masse de peptide-résine obtenu (mg)

Rendement final :

$$R = \frac{M_p}{P.M * \acute{E}_a} * 100$$

où :

M_p = masse du peptide purifié (mg)

P.M. = poids moléculaire du peptide purifié (mg/mmoles)

\acute{E}_a = échelle de synthèse ajustée (mmoles)

$$= \acute{E} * \frac{M_{pr} - M_{\acute{e}}}{M_{pr}}$$

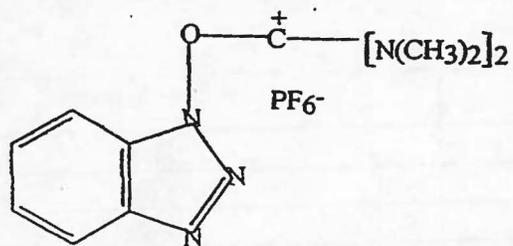
où : $M_{\acute{e}}$ = masse des échantillons de peptides-résines prélevés

Appendice BAbréviations à trois lettres des acides aminés

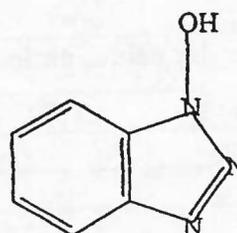
Nom des acides aminés	Abréviations
acide aspartique	Asp
acide glutamique	Glu
alanine	Ala
arginine	Arg
asparagine	Asn
cystéine	Cys
glutamine	Gln
glycine	Gly
histidine	His
isoleucine	Ile
leucine	Leu
lysine	Lys
méthionine	Met
phénylalanine	Phe
proline	Pro
sérine	Ser
thréonine	Thr
tryptophane	Trp
tyrosine	Tyr
valine	Val

Appendice C

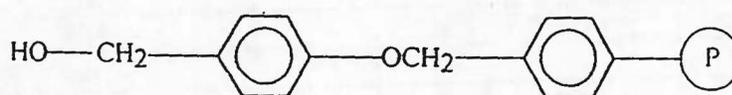
Structure des réactifs et des groupes protecteurs utilisés



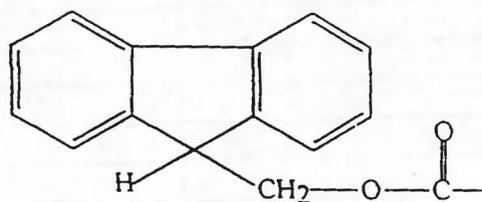
HBTU



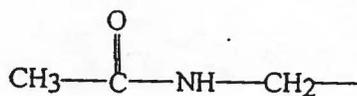
HOBT



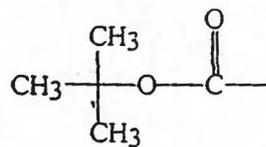
Résine Wang



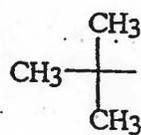
Fmoc



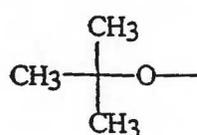
AcM



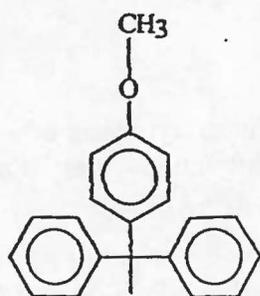
Boc



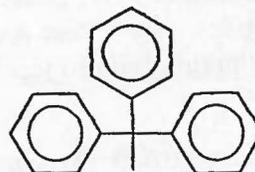
tBu



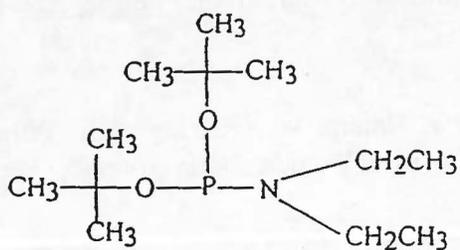
OtBu



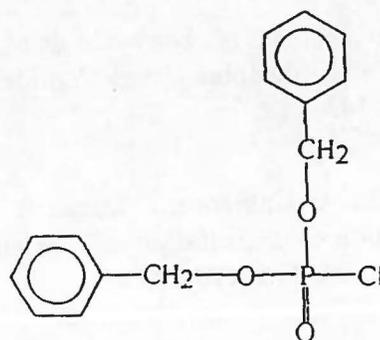
Mmt



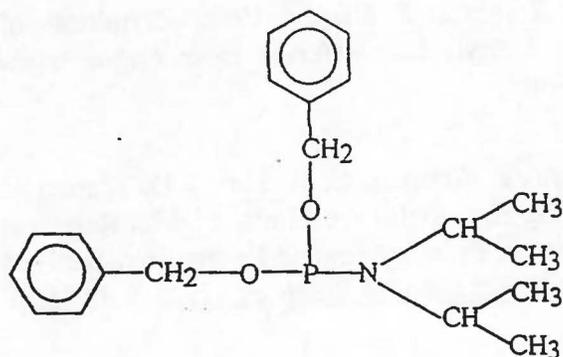
Trt



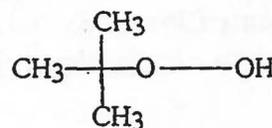
diéthyle N,N-di-t-butylphosphoramidite



dibenzylphosphochloridate



diisopropyle N,N-dibenzylphosphoramidite



t-butylhydroperoxyde

Liste des références

ANDREWS, D.M., J. Kichin et P.W. Seale. 1991. «Solid-Phase Synthesis of a Range of O-phosphorylated Peptides by Post-Assembly Phosphitylation and Oxidation». International Journal of Peptide Protein Research, vol. 38, p. 469-475.

BACON, C.R., N.R.B. Cary et A.P. Davenport. 1996. «Endothelin Peptide and Receptors in Human Atherosclerotic Coronary Artery and Aorta». Circulation Research, vol. 79, p. 794-801.

BERNHARDT, A., M. Drewello et M. Schutkowski. 1997. «The Solid-Phase Synthesis of Side-Chain-Phosphorylated Peptide-4-Nitroanilides». Journal of Peptide Research, vol. 50, p. 143-152.

BORIN, G., A. Calderan, P. Ruzza, L. Moroder, G. Knaup, W. Göhring et E. Wunsch. 1987. «Studies on Sulfation of Tyrosine and Tyrosine-Peptide Derivatives». Peptide Chemistry, vol. 1, p. 179-182.

CARTIER, F., I. Remy-Jouet, A. Fournier, H. Vaudry et C. Delarue. 1997. «Effect of Endothelin-1 on Corticosteroid Secretion by the Frog Adrenal Gland is Mediated by an Endothelin_A Receptor». Endocrinology, vol. 138, p. 4358-4363.

DELHOM, B., G. Alvaro, G. Caminal, J.L. Torres et P. Clapés. 1996. «Synthesis of Sulfated Bioactive Peptides using Immobilized Arylsulfotransferase from *Eubacterium sp.*». Biotechnology Letters, vol. 18, p. 609-614.

DE NUCCI, G., R. Thomas, P. D'Orléans-Juste, E. Antunes, C. Walder, T.D. Warner et J.R. Vane. 1988. «Pressor Effects of Circulating Endothelin are Limited by its Removal in the Pulmonary Circulation and by the Release of Prostacyclin and Endothelium-Derived Relaxing Factor». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 85, p. 9797-9800.

DOHERTY, A. 1992. «Endothelin : A New Challenge». Journal of Medicinal Chemistry, vol. 35, p. 1493-1508.

D'ORLÉANS-JUSTE, P., J-P. Gratton, R. Leduc, G. Bkaily et A. Claing. 1996. «L'endothéline : pharmacologie cardiovasculaire et considérations physiopathologiques». Médecine Sciences, vol. 12, p. 563-574.

FORGET, M-A., N. Lebel, P. Sirois, Y. Boulanger et A. Fournier. 1996. «Biological and Molecular Analyses of Structurally Reduced Analogues of Endothelin-1». Molecular Pharmacology, vol. 49, p. 1071-1079.

FOURNIER, A., W. Danho et A.M. Felix. 1989. «Applications of BOP Reagent in Solid Phase Peptide Synthesis». International Journal of Peptide Protein Research, vol. 33, p. 133-139.

FUTAKI, S., T. Taike, T. Akita et K. Kitagawa. 1992. «Syntheses of two Tyrosine-Sulphate Containing Peptides, Leucosulfakinin (LSK)-II and Cholecystokinin (CCK)-12, using the O-p-(methylsulphonyl)benzyl Serine for the Selective Sulphation of Tyrosine». Tetrahedron, vol. 48, p. 8899-8914.

GERMAIN, M., B. Battistini, J.G. Filep, P. Sirois et A. Fournier. 1993. «Endothelin Derivatives Showing Potent Effects in the Guinea Pig Trachea». Peptides, vol. 14, p. 613-619.

GILLESPIE, M.N., J.O. Owasoyo, I.F. McMurtry et R.F. O'Brien. 1986. «Sustained Coronary Vasoconstriction Provoked by a Peptidergic Substance Released from Endothelial Cells in Culture». The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 236, p. 339-343.

HAN, Y., F. Albericio et G. Barany. 1997. «Occurrence and Minimization of Cysteine Racemization during Stepwise Solid-Phase Peptide Synthesis». Journal of Organic Chemistry, vol. 62, p. 4307-4312.

HART, H. et J.-M. Conia. 1987. «Introduction à la chimie organique». InterEditions, Paris, p. 523.

HOFFMANN, R., W.O. Wachs, R.G. Berger, H.-R. Kalbitzer, D. Waidelich, E. Bayer, W. Wagner-Redeker et M. Zeppezauer. 1995. «Chemical Phosphorylation of the Peptide GGXA (S=S,T,Y) : an Evaluation of Different Chemical Approaches». International Journal of Peptide Protein Research, vol. 45, p. 26-34.

HOFFMANN, R., T. Hoffmann, A. Tholey, A.C. Schulte et H.R. Kalbitzer. 1997. «Synthesis and NMR Spectroscopy of Peptides Containing either Phosphorylated or Phosphonylated cis or trans-4-hydroxy-L-proline». Journal of Peptide Research, vol. 49, p. 163-173.

HOLDEN, W.E. et E. McCall. 1984. «Hypoxia-Induced Contractions of Porcine Pulmonary Artery Strips Depends on Intact Endothelium». Experimental Lung Research, vol.7, p. 101-112.

INOUE, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto et T. Masaki. 1989. «The Human Endothelin Family: Three Structurally and Pharmacologically Distinct Isopeptides Predicted by Three Separate Genes». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 86, p. 2863-2867.

JAE, H.-S., M. Winn, D.B. Dixon, K.C. Marsh, B. Nguyen, T.J. Opgenorth et T.W. Von Geldern. 1997. «Pyrrolidine-3-carboxylic Acids as Endothelin Antagonists. 2. Sulfonamide-Based ET_A/ET_B Mixed Antagonists». Journal of Medicinal Chemistry, vol. 40, p. 3217-3227.

JOHNSON, T., L.C. Packman, C.B. Hyde, D. Owen et M. Quibell. 1996. «Backbone Protection and its Application to the Synthesis of a Difficult Phosphopeptide Sequence». Journal of the Chemical Society Perkin Transmission, vol.1, p. 719-728.

KAISER, E., R.L. Colescott, C.D. Bossinger et P.I. Cook. 1970. «Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid Phase Synthesis of Peptides». Annales of Biochemistry, vol. 34, p. 595—598.

KAISER, T., G.J. Nicholson, H.J. Kohlbau et W. Voelter. 1996. «Racemization Studies of Fmoc-Cys(Trt)-OH during Stepwise Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis». Tetrahedron Letters, vol. 37, p. 1187-1190.

KARNE, S., C.K. Jayawickreme et M.R. Lerner. 1993. «Cloning and Characterization of an Endothelin-3 Specific Receptor (ET_C receptor) from *Xenopus laevis* Dermal Melanophores». The Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 19126-19133.

KELLENBERGER, C., H. Hietter et B. Luu. 1995. «Regioselective Formation of the Three Disulfide Bonds of a 35-Residue Insect Peptide». Peptide Research, vol. 8, p. 321-327.

KENNER, G.W., A.R. Todd et F.J. Weymouth. 1952. «N-Chloroamides as Reagents for the Chlorination of Diesters of Phosphorous Acid. A New Synthesis of Uridine-5' Pyrophosphate». Journal of the Chemical Society, p. 3675-3681.

KIMURA, S., Y. Kasuya, T. Sawamura, O. Shinmi, Y. Sugita, M. Yanagisawa, K. Goto et T. Masaki. 1989. «Conversion of Big Endothelin-1 to 21-Residue Endothelin-1 is Essential for Expression of Full Vasoconstrictor Activity: Structure-Activity Relationships of Big Endothelin-1». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13, p. S5-S7.

KING, D.S., C.G. Fields et G.B. Fields. 1990. «A Cleavage Method which Minimizes Side Reactions Following Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis». International Journal of Peptide Protein Research, vol. 36, p. 255-266.

- KITAGAWA, K., S. Futaki, T. Yagami, S. Sumi et K. Inoue. 1994. «Solid-Phase Synthesis of Cionin, a Protochordate-Derived Octapeptide Related to the Gastrin/Cholecystokinin Family of Peptides, and its Mono-Tyrosine-Sulfated-Containing Derivatives». International Journal of Peptide Protein Research, vol. 43, p. 190-200.
- KITAS, E. et al. 1994. «Chemical Synthesis of O-thiophosphotyrosyl peptides». International Journal of Peptide Protein Research, vol. 43, p.148.
- MARSEIGNE, I. et B.P. Roques. 1988. «Synthesis of New Amino Acids Mimicking Sulfated and Phosphorylated Tyrosine Residues». Journal of Organic Chemistry, vol. 53, p. 3621-3624.
- MASAKI, T. et M. Yanagisawa. 1992. «Endothelins». Essays in Biochemistry, vol. 27, p. 79-89.
- MATEO, A.O. et A.A. De Artiñano. 1997. «Highlights on Endothelins : a Review». Pharmacological Research, vol. 36, p. 339-351.
- MATSUBAYASHI, Y., H. Hanai, O. Hara et Y. Sakagami. 1996. «Active Fragments and Analogs of the Plant Growth Factor, Phytosulfokine : Structure-Activity Relationships». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 225, p. 209-214.
- MERRIFIELD, B. 1986. «Solid Phase Synthesis». Science, vol. 232, p. 341-347.
- MOSTAFAVI, H., S. Austermann, W.-G. Forssmann et K. Adermann. 1996. «Synthesis of Phospho-Urodilatin by Combination of Global Phosphorylation with the Segment Coupling Approach». International Journal of Peptide Protein Research, vol. 48, p. 200-207.
- MURAMATSU, R., Y. Komatsu, E. Nukui, T. Okayama, T. Morikawa, K. Kobashi et H. Hayashi. 1996. «Structure-Activity Studies on C-Terminal Hirudin Peptides Containing Sulfated Tyrosine Residues». International Journal of Peptide Protein Research, vol. 48, p. 167-173.
- NAKAHARA, T., M. Waki, H. Uchimura, M. Hirano, J.S. Kim, T. Matsumoto, K. Nakamura, K. Ishibashi, H. Hirano et A. Shiraishi. 1986. «Preparation of Tyrosine-O-(³⁵S)Sulfated Cholecystokinin Octapeptide from a Nonsulfated Precursor Peptide». Analytical Biochemistry, vol. 154, p. 194-199.

- NAKAJIMA, K., S. Kubo, S.-I. Kumagaye, H. Nishio, M. Tsunemi, T. Inui, H. Kuroda, N. Chino, T.X. Watanabe, T. Kimura et S. Sakakibara. 1989. «Structure-Activity Relationship of Endothelin: Importance of Charged Groups». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 163, p. 424-429.
- NIEHRS, C., R. Beißwanger et W.B. Huttner. 1994. «Protein Tyrosine Sulfation, 1993-an Update». Chemico-Biological Interactions, vol. 92, p. 257-271.
- O'BRIEN, R.F. et I.F. McMurtry. 1984. «Endothelial Cell (EC) Supernates Contract Bovine Pulmonary Artery (PA) Rings». American Review of Respiratory Disease, vol.129, p. A337.
- OPGENORTH, T.J. 1995. «Endothelin Receptor Antagonism». Advances in Pharmacology, vol. 33, p. 1-65.
- ORJI, G.K et H.R. Keiser. 1996. «Action of Protein Kinase C in Endothelin-Induced Contractions in Rat Aortic Rings». American Journal of Physiology, vol. 271, p. C398-C404.
- OTAKA, A., K. Miyoshi, M. Kaneko, H. Tamamura et N. Fujii. 1995. «Development of Efficient Two-Step Deprotection Methodology for Dimethyl-Protected Phosphoamino Acid Containing Peptide Resins and its Application to the Practical Synthesis of Phosphopeptides». Journal of Organic Chemistry, vol.60, p. 3967-3974.
- OTTINGER, E.A., Q. Xu et G. Barany. 1996. «Intramolecular Pyrophosphate Formation During N α -Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) Solid-Phase Synthesis of Peptides Containing Adjacent Phosphotyrosine Residues». Peptide Research, vol. 9, p. 223-228.
- OTVOS, L. Jr., I. Elekes et V.M-Y. Lee. 1989. «Solid-Phase Synthesis of Phosphopeptides». International Journal of Peptide Protein Research, vol. 34, p. 129-133.
- PAIRAUD, C. 1989. «L'électrophorèse capillaire». Biofutur, vol. 82, p.7-11.
- PANEK, R.L., T.C. Major, G.P. Hingorani, A.M. Doherty, D.G. Taylor et S.T. Rapundalo. 1992. «Endothelin and Structurally Related Analogs Distinguish between Endothelin Receptor Subtypes». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 183, p.566-571.
- PAYNE, M.H., J.L. Krstenansky, M.T. Yates et S.J.T. Mao. 1991. «Positional Effects of Sulfation in Hirudin and Hirudin·PA Related Anticoagulant Peptides». Journal of Medicinal Chemistry, vol. 34, p. 1184-1187.

- PERICH, J.W. 1992. «Efficient Solid Phase Synthesis of Mixed Thr(P)-, Ser(P)- and Tyr(P)-Containing Phosphopeptides by ``Global`` ``Phosphite-Triester`` Phosphorylation». International Journal of Peptide Protein Research, vol. 40, p. 134-140.
- PERICH, J.W., M. Ruzzene, L.A. Pinna, et E.C. Reynolds. 1994. «Efficient Fmoc/Solid-Phase Peptide Synthesis of O-Phosphotyrosyl-Containing Peptides and their use as Phosphatase Substrates». International Journal of Peptide Protein Research, vol. 43, p. 39-46.
- RAWN, J.D. 1990. «Traité de biochimie». Éditions du renouveau pédagogique, Montréal, p.63.
- SHAPIRO, G., D. Büchler, C. Dalvit, M. del C. Fernandez, B. Gomez-Lor, E. Pombo-Villar, U. Stauss et R. Swoboda. 1996. «Combined Fmoc-Alloc Strategy for a General Solid-Phase Synthesis of Phosphoserine Peptides». Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 6, p. 409-414.
- SIEBER, P. 1987. «An Improved Method for Anchoring of 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Amino Acids to 4-Alkoxybenzyl Alcohol Resins». Tetrahedron Letters, vol. 49, p. 6147-6150.
- SPINELLA, M.J., A.B. Malik, J. Everitt et T.T. Andersen. 1991. «Design and Synthesis of a Specific Endothelin 1 Antagonist: Effects on Pulmonary Vasoconstriction». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 88, p. 7443-7446.
- UCHIDA, Y., T. Jun, H. Ninomiya, H. Ohse, S. Hasegawa, A. Nomura, T. Sakamoto, M.S. Sardesai et F. Hirata. 1996. «Involvement of Endothelins in Immediate and Late Asthmatic Responses of Guinea Pigs». The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 277, p. 1622-1629.
- UENO, Y., F. Suda, Y. Taya, R. Noyori, Y. Hayakawa et T. Hata. 1995. «Solid-Phase Synthesis of Peptides Containing O-Phosphoryl Serine and O-Phosphoryl Threonine Using Allyl Group for Phosphate Protection». Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 5, p. 823-826.
- VORHERR, T. et W. Bannwarth. 1995. «Phospho-Serine and Phospho-Threonine Building Blocks for the Synthesis of Phosphorylated Peptides by the Fmoc Solid-Phase Strategy». Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 5, p. 2661-2664.
- WALLACE, B.A. et R.W. Janes. 1995 «The Crystal Structure of Human Endothelin-1 and How it Relates to Receptor Binding». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 26, p. S250-S253.

YAGAMI, T, S. Shiwa, S. Futaki et K. Kitagawa. 1993. «Evaluation of the Final Deprotection System for the Solid-Phase Synthesis of Tyr(SO₃H)-Containing Peptides with 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-Strategy and its Application to the Synthesis of Cholecystokinin (CCK)-12». Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol. 41, p. 376-380.

YANAGISAWA, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto et T. Masaki. 1988. «A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells». Nature, vol. 332, p. 411-415.