

Université du Québec

INRS- Santé

**Étude de l'enzyme de conversion de l'endothéline
et synthèse de fragments de la Big endothéline**

par

Julie Carette

Mémoire

présenté

pour l'obtention

du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

en sciences expérimentales de la santé

Septembre 1996

Résumé

L'endothéline est un peptide de 21 acides aminés, principalement impliqué dans le contrôle de la pression sanguine. Elle est un des facteurs proposés pour engendrer l'hypertension et les vasospasmes. La formation de l'endothéline est médiée par l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) sur la Big-endothéline (Big-ET). Ainsi la ECE clive le lien Trp²¹-Val²² de la Big-endothéline pour libérer l'endothéline mature. Au niveau vasculaire, la Big-endothéline est 100 fois moins active que l'endothéline. Il a été déterminé que l'enzyme de conversion de l'endothéline est une métalloprotéase sensible au phosphoramidon. Notre étude tente donc d'élucider certains aspects moléculaires du mécanisme d'action de cette ECE. Pour ce faire, nous devons commencer par déterminer le plus court substrat pouvant être clivé par l'enzyme de conversion.

La synthèse de la Big-endothéline-1 a été réalisée sur phase solide selon une méthodologie assurant, entre autres, la stabilité chimique du tryptophane-21. Les travaux ont permis de démontrer que le clivage à l'acide fluorhydrique est plus efficace que celui au trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf), pour ce qui est de la Big-endothéline. Les purifications ont été réalisées sur un système HPLC préparatif avec un gradient d'acétonitrile. Le peptide linéaire a ensuite été cyclisé, premièrement au $K_3Fe(CN)_6$ pour le pont disulfure entre les résidus 3 et 11 et deuxièmement à l'iode, pour les résidus 1 et 15. Le peptide a subi une étape finale de déformylation du tryptophane-21 afin d'obtenir une Big-endothéline équivalente à celle d'origine naturelle.

Les analyses de la transformation enzymatique de la Big-endothéline synthétique ont été exécutées au moyen de la ECE extraite de poumon de boeuf et purifiée par centrifugations différentielles. Les conditions de cinétique enzymatique ont aussi été déterminées. Les cinétiques réalisées à 37 °C ont toutes donné les mêmes profils. Ainsi, nous avons observé dès le temps initial ($t = 0$) une transformation d'environ 50% de la Big-endothéline. Ce niveau reste ensuite constant. Deux explications ont été avancées pour expliquer ce

phénomène au temps initial. Premièrement, il a été soupçonné que l'endothéline observée au niveau des membranes était d'origine endogène et non issue de la transformation de la Big-ET. Deuxièmement, nous avons aussi évalué la possibilité que le clivage enzymatique s'effectuerait extrêmement rapidement de sorte que l'évolution de la production de ET-1 ne pourrait être mesurée adéquatement avec la méthodologie retenue. La présence d'endothéline endogène a donc été testée. Ainsi, l'utilisation de phosphoramidon, principal inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'endothéline, a permis d'éliminer cette hypothèse car nous n'observons pas de présence de ET-1. Ce qui a aussi été confirmé par une cinétique à 4 °C. Donc nous avons conclu que la réaction à 37°C était instantanée et que notre enzyme était active. L'arrêt de la réaction pour atteindre un plateau de Big-ET-1 restant (50%) peut s'expliquer par un manque ou une diminution d'un ou plusieurs co-facteurs qui seraient nécessaire à la réaction complète. On sait déjà que le zinc serait impliqué dans la liaison de la Big-ET-1 à l'enzyme mais d'autres co-facteurs pourraient aussi être nécessaires au processus de clivage. Une rétroinhibition par l'ET-1 produite peut aussi être envisagée pour expliquer le phénomène. Dans la rétroinhibition, l'accumulation de produit final diminue ou arrête l'activité de l'enzyme.

Nous avons donc poursuivi avec la synthèse des fragments de la Big-ET-1 selon la méthode précédente. D'autres études devront être entreprises pour déterminer lequel de ces fragments est reconnu par ECE. Il sera alors possible de remplacer le lien Trp²¹-Val²² par un lien pseudopeptidique non scissile par l'enzyme. Ultiment, le peptide sera évalué pour ses pouvoirs inhibiteurs sur ECE.

Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer ma gratitude au directeur de mes recherches, le Dr Alain Fournier, pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée.

Je ne puis déposer ce mémoire sans remercier également:

les membres du laboratoire de l'INRS-Santé, plus particulièrement M. Patrick Sabourin,

Mme Diane Lacoste et M. Gilbert Leblanc pour leur aide appréciable,

M. André Brazeau pour le support technique et moral tout au long de ma maîtrise ainsi que pour son excellent travail de révision.

l'INRS-Santé pour son support financier.

Table des matières

Résumé	iii
Remerciements	v
Liste des figures et tableaux	x
Liste des abréviations	xiv
Introduction	1
Matériels et méthodes	
1. Synthèse et purification d'analogues de la Big ET-1	27
1.1 Réactifs et solvants utilisés	27
1.2 Sélection de la résine et des groupements protecteurs des acides aminés	27
1.3 Protocole de synthèse des peptides	28
1.3.1 Déprotection des acides aminés.	28
1.3.2 Le couplage	31
1.4 Protocole de clivage	32
1.4.1 Clivage à l'acide fluorhydrique	32
1.4.2 Clivage au TMSOTf dans le TFA	32
1.5 Purification des peptides bruts	33
1.6 Formation des ponts disulfures	33
1.6.1 Cyclisation au K_3FeCN_6	33
1.6.2 Cyclisation à l'iode	34

1.7 Déformylation du Trp ²¹ de Big-ET-1	34
1.8 Test de réduction par NH ₄ I	35
2. Caractérisation des analogues	35
2.1 Test de Kaiser	35
2.2 Méthodes sur HPLC analytique	35
3. Evaluation enzymatique de la Big-ET et de ses analogues	36
3.1 Solvants et réactifs	36
3.2 Extraction de ECE membranaire	36
3.3 Dosage des protéines totales	37
3.4 Dosage de l'activité de ECE	37
3.5 Analyse de la durée de l'arrêt de la réaction enzymatique	37
3.6 Analyse de l'effet du détergent CHAPS	38
3.7 Analyse de l'effet du phosphoramidon	38
3.8 Méthode d'analyse sur le système HPLC	39

Résultats

4. La synthèse et la purification de la Big-ET-1 et ses analogues	41
5. Évaluation enzymatique	50
6. Synthèse et purification des analogues de la Big-ET-1	61

Discussion

7. Élaboration de la Big-ET-1	69
7.1 Choix des résines et des groupements protecteurs	69

7.2 Méthode de couplage	70
7.3 Méthodes de clivage	72
7.4 Méthode de purification	73
7.5 Méthodes de cyclisation	73
7.6 Réactions secondaires	75
7.7 Améliorations au processus de synthèse	76
7.7.1 Procédures de synthèse et de purification	76
7.7.2 Méthodes de cyclisation	77
8. Evaluation des peptides	78
8.1 Méthodes sur HPLC analytique	78
8.2 Test de réduction au NH_4I	79
9. Cinétiques enzymatiques	79
9.1 Analyses enzymatiques	79
9.2 Analyse de l'effet du phosphoramidon	81
10. Analogues de la Big-ET-1 (1-39)	82
10.1 Choix des analogues synthétisés	82
10.2 Synthèse et purification des analogues	82
Conclusion	85
Appendice A	
Abréviations et structures des acides aminés	87
Liste des références	90

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1:	Séquence peptidique de la famille des endothélines.	2
Figure 2:	Mécanismes d'action de l'endothéline	7
Figure 3:	Description du gène de l'endothéline	10
Figure 4:	Étapes de maturation de l'endothéline	11
Figure 5:	Séquence peptidique de la Big-endothéline	13
Figure 6:	Résultats de l'étude d'hydropathie	15
Figure 7:	Séquence d'acides aminés de l'enzyme ECE	19
Figure 8:	Comparaison de structure entre ECE, NEP et Kell	21
Figure 9:	Classification de la famille des ECE	23
Figure 10:	Structures des inhibiteurs de ECE	26
Figure 11:	Analyse sur HPLC de la pureté de la Big-ET-1 (1-39) après clivage au HF.	42
Figure 12:	Analyse de la pureté de la Big-ET-1 (1-39) linéaire	43

Figure 13:	Chromatogramme suite à la cyclisation au $K_3Fe(CN)_6$ des Cys 3 et 11	44
Figure 14:	Analyse de la cyclisation à l'iode des Cys 1 et 15	45
Figure 15:	Analyse de la purification finale de la Big-ET-1 (1-39) bicyclique	46
Figure 16:	Chromatogramme après clivage au HF de la Big-ET-1(1-39)(Trp ^{FOR})	47
Figure 17:	Analyse du clivage au TMSOTf de la Big-ET-1(1-39)(Trp ^{FOR})	48
Figure 18:	Purification de la Big-ET-1(1-39)(Trp ^{FOR}) linéaire	49
Figure 19:	Analyse sur HPLC de la cyclisation au $K_3Fe(CN)_6$ de la Big-ET-1(1-39)(Trp ^{FOR})	51
Figure 20:	Analyse de la cyclisation à l'iode de la Big-ET-1(1-39)(Trp ^{FOR}) monocyclique.	52
Figure 21:	Analyse de la déformylation de la Big-ET-1(1-39) (Trp ^{FOR}) bicyclique	53
Figure 22:	Courbe standard du dosage de Bradford	55
Figure 23:	Analyse des composantes de la cinétique enzymatique	56

Figure 24:	Co-injection de la Big-ET-1 (1-39) et de l'endothéline (1-21)	57
Figure 25:	Analyse de la cinétique du temps d'arrêt	58
Figure 26:	Analyse de la transformation de la Big-ET-1 en ET-1 au temps 0 de la cinétique	59
Figure 27:	Cinétique enzymatique à 37°C de la scission de la Big-ET-1 par ECE	60
Figure 28:	Résultats de l'élution des colonnes "Sep-Pak"	61
Figure 29:	Cinétique par l'enzyme libérée des membranes au moyen du CHAPS	63
Figure 30:	Analyse de l'effet du phosphoramidon	64
Figure 31:	Caractérisation de la formation de l'endothéline à 4°C	65
Figure 32:	Analyse de la pureté de la Big-ET-1(20-23)	68

Liste des tableaux

Tableau 1:	Effets physiologiques impliquant l'endothéline	4
Tableau 2:	Pathologies imputables à l'endothéline	5
Tableau 3:	Description des groupements protecteurs des acides aminés multifonctionnels	29
Tableau 4:	Étapes du protocole de synthèse sur phase solide	30
Tableau 5:	Séquences des analogues synthétiques de la Big-ET-1	66
Tableau 6:	Pureté des analogues de la Big-ET-1	67

Liste des abréviations employées

ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
Big-ET	Big-endothéline
CAP	Aspartyl protéinase
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
ET	Endothéline
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
NEM	N-éthyle maléimide
NEP	Endopeptidase neutre
PA	Phosphoramidon
PC	Prohormone convertase
PPET	Prépro-endothéline
RMN	Résonance magnétique nucléaire
VIC	Contracteur vasoactif de l'intestin

Introduction

L'endothéline est un peptide vasoactif bicyclique de 21 acides aminés découvert en 1988 par Yanagisawa et son équipe. Leurs études au moyen de l'aorte de porc permirent de déterminer que l'endothéline intervient au niveau des facteurs relaxants libérés par l'endothélium (*endothelium-derived relaxing factor* ou EDRF) (Yanagisawa et al., 1988). D'autres recherches ont indiqué que l'endothéline est produite par plusieurs autres types cellulaires soit les cellules mésangiales, les macrophages et certaines lignées cellulaires cancéreuses, de même que les neurones et les astrocytes du système nerveux central, les cellules endométriales, les hépatocytes et les cellules de Sertoli (La et Reid, 1995; Levin, 1995).

Par la suite, de nombreuses études ont permis de découvrir successivement quatre (4) isotypes d'endothéline qui diffèrent par leur séquence peptidique. (figure 1) Les isoformes de l'endothéline de type 1, 2 et 3 (ET-1, ET-2 et ET-3) se retrouvent chez l'homme et certains mammifères, tandis que le VIC (*vasoactive intestinal contractor*) a été isolé chez la souris. Certaines hypothèses laissent croire que le VIC serait simplement la forme ET-2 ou β -endothéline se trouvant chez la souris (Simonson, 1994; Rubanyl, 1991). ET-1 serait la seule isoforme libérée constitutivement à partir des cellules endothéliales et l'on croit qu'elle jouerait un rôle dans la fonction de régulation vasculaire (Pollock, Keith et Highsmith, 1995).

En comparant les séquences d'acides aminés, on observe une homologie de séquence de 70% à 90% entre les 4 isotypes. D'autres travaux ont aussi mis en évidence d'autres familles de peptides qui présentent une homologie de séquence avec ET-1. Les sarafotoxines et les bibrotoxines sont respectivement isolées du venin des serpents *Actractaspis engaddensis* et *Actractaspis bibroni* (Janes, Peapus et Wallace, 1992; La et Reid, 1995).

Figure 1: Séquences en acides aminés des endothélines, sarafotoxines et bibrotoxines

ET1 (human)	Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
ET1 (rat)	Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
ET1 (mouse)	Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
ET1 (cow)	Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
ET1 (pig)	Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
ET2 (human)	Cys Ser Cys Ser Ser Trp Leu Asp Lys Glu Cys Val Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
ET2 (rat)	Cys Ser Cys Asn Ser Trp Leu Asp Lys Glu Cys Val Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
ET2 (mouse)	Cys Ser Cys Asn Ser Trp Leu Asp Lys Glu Cys Val Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
ET2 (dog)	Cys Ser Cys Ser Ser Trp Leu Asp Lys Glu Cys Val Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
ET3 (human)	Cys Thr Cys Phe Thr Tyr Lys Asp Lys Glu Cys Val Tyr Tyr Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
ET3 (rat)	Cys Thr Cys Phe Thr Tyr Lys Asp Lys Glu Cys Val Tyr Tyr Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
ET3 (rabbit)	Cys Thr Cys Phe Thr Tyr Lys Asp Lys Glu Cys Val Tyr Tyr Cys His Leu Asp Ile Ile Trp
SRT - 6a1	Cys Ser Cys Lys Asp Met Thr Asp Lys Glu Cys Leu Asn Phe Cys His Gln Asp Val Ile Trp
SRT - 6b	Cys Ser Cys Lys Asp Met Thr Asp Lys Glu Cys Leu Tyr Phe Cys His Gln Asp Val Ile Trp
SRT - 6c	Cys Thr Cys Asn Asp Met Thr Asp Glu Glu Cys Leu Asn Phe Cys His Gln Asp Val Ile Trp
SRT - 6d	Cys Thr Cys Lys Asp Met Thr Asp Lys Glu Cys Leu Tyr Phe Cys His Gln Asp Ile Ile Trp
BTX	Cys Ser Cys Ala Asp Met Thr Asp Lys Glu Cys Leu Tyr Phe Cys His Gln Asp Val Ile Trp

ET = Endothelin, SRT = Sarafotoxin, BTX = Bibrotoxin

Tiré de Simonson, 1994

L'endothéline-1 est produite principalement dans les cellules endothéliales vasculaires des muscles lisses mais aussi dans plusieurs autres types cellulaires. ET-2 est produite dans le foie et les intestins avec une faible production dans le myocarde, le placenta et l'utérus. ET-3 circule dans le plasma, comme ET-1, mais sa source n'est pas encore connue. ET-3 se retrouve en fortes concentrations dans le cerveau et pourrait, à ce niveau, jouer un rôle dans la régulation hormonale des neurones et des astrocytes (Levin, 1995). Ainsi plusieurs effets vasculaires, cardiaques et non-vasculaires ont été identifiés comme résultant de l'endothéline. (tableau 1) L'endothéline est probablement aussi impliquée dans certaines pathologies telles les maladies cardiovasculaires, rénales et pulmonaires. (tableau 2)

Connaissant la séquence peptidique des isotypes, des études ont tenté d'élucider les structures secondaire et tertiaire de l'endothéline. La famille des peptides endothélines possède, suite à la comparaison des séquences, un segment C-terminal hydrophobe (résidus 16 à 21) et un noyau de trois résidus chargés (résidus Asp⁸, Lys⁹ et Glu¹⁰) très fortement conservés. La plus grande variabilité de séquence se retrouve entre la boucle formée des résidus Cys³ à Cys¹¹. (Sokolovsky, 1992).

Les modèles les plus répandus évalués par analyses de résonance magnétique nucléaire (RMN) suggèrent une conformation hélicoïdale entre les résidus 9 à 15 ou 9 à 16 selon les études (Kuroda, Yamazaki et Taga, 1994; Aumelas et al., 1995). En plus, une structure en coude β (" β -turn") s'observe entre les résidus 5 à 8. Certaines études amènent toutefois des résultats différents. Ainsi, la cristallographie aux rayons X suggère plutôt que la portion C-terminale adopterait une conformation hélicoïdale irrégulière (Janes, Peapus et Wallace, 1992; Cowley et Pelton, 1995) Avec le dichroïsme circulaire, on distingue les bandes caractéristiques de l'hélice α (à 223 nm et 192 nm). Mais ces bandes peuvent subir de légères variations selon le solvant utilisé (Tamaoki et al., 1992). Les patrons de diffraction des rayons X décrivent un feuillet β en N-terminal et un renflement entre les résidus 5 à 7. D'autres résultats suggèrent la formation d'un pont hydrogène entre le carbonyle du résidu Met⁷ et le proton amide du résidu Cys¹¹ suivi d'une hélice irrégulière du résidu Lys⁹ jusqu'au

Tableau 1 : Les effets physiologiques impliquant l'endothéline

EFFETS VASCULAIRES

- Effet de pression soutenue
Goetz et al. (1988);
Yanagisawa et al. (1988)
- Libération de EDRF
de Nucci et al. (1988)
- Prolifération cellulaire
Hirata et al. (1988)

EFFETS CARDIAQUES

- Chronotropie positive et effets inotropiques
Goetz et al. (1988); Ishikawa et al. (1988)
- Vasoconstriction des artères coronaires
Ezra et al. (1989)

EFFETS NON VASCULAIRES**1- effets sur la fonction rénale**

- Diminution du taux de filtration glomérulaire et diminution du flux sanguin rénal
Goetz et al. (1988)
- Réduction de l'excrétion de sodium
Masaki et al. (1989)
- Augmentation de l'activité de la rénine dans le plasma
Pakuji et al. (1990)

2- effets sur les poumons

- Bronchoconstriction
Braquet et al. (1989)

3- effets sur le système endocrinien

- Stimulation de la libération de la substance P
Calvo et al. (1990)
- Augmentation de l'ANF
Stasch et al. (1989)
- Modulation de la sécrétion d'aldostérone médiée par l'angiotensine ou l'ACTH
Cozza et al. (1992); Zeng et al. (1992)
- Stimulation de la libération des hormones hypophysaires
Kanyicska et al. (1992)

4- autres effets

- Augmentation de la pression intraoculaire
Masaki et al. (1992)
- Constriction de l'iléum et de l'estomac
Masaki et al. (1992)

Tableau 2: Les pathologies impliquant probablement l'endothéline

Maladies cardiovasculaires

- hypertension

Coeur

- vasospasmes coronariens
- ischémie du myocarde
- arrêt cardiaque

Vaisseaux sanguins

- athérosclérose
- microangiopathie diabétique (neuropathie, néphropathie)

Chocs

- choc cardiogénique
- choc hémorragique
- choc septique

Maladies rénales

- glomérulosclérose
- syndrome hépatorénal (cirrhose du foie)

Maladies pulmonaires

- asthme
- hypertension pulmonaire

Maladies gastro-intestinales

- ulcère gastrique
- maladie de Crohn

Troubles du système reproducteur féminin

- travail prématuré lors de la grossesse
- dysménorrhée (menstruations douloureuses)

Carcinogenèse ou cancérogenèse

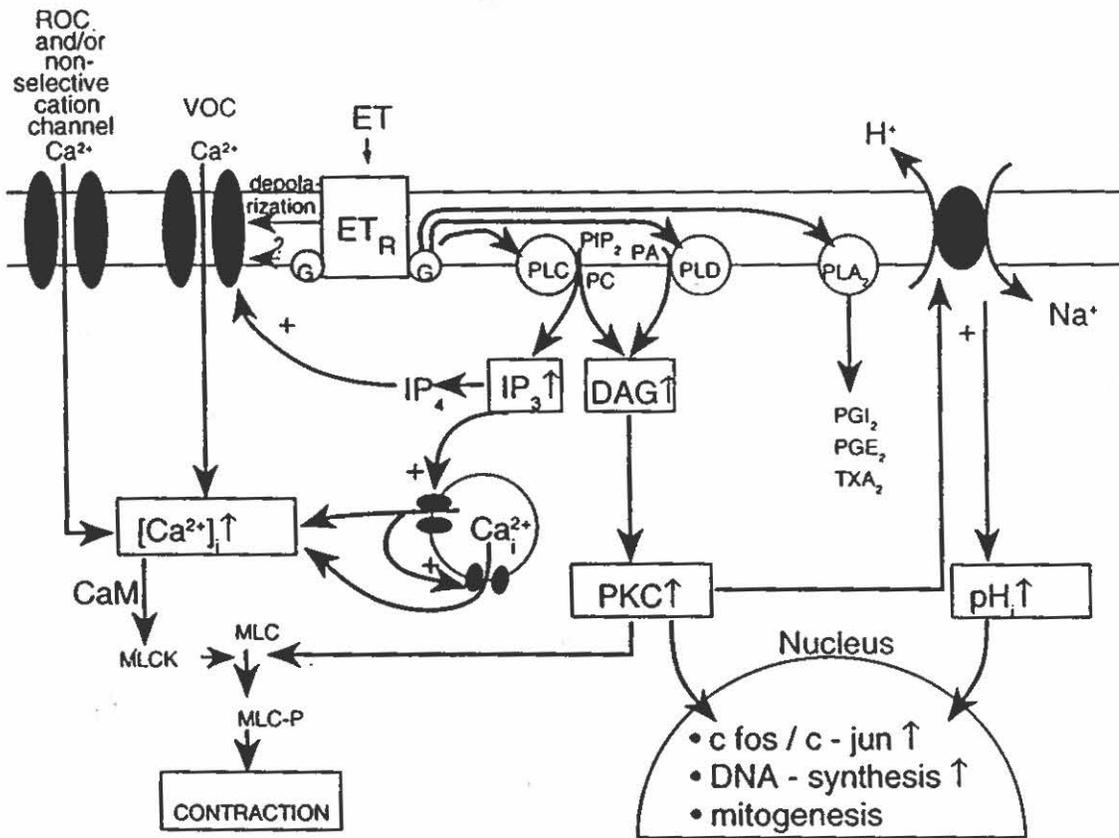
résidu C-terminal (Wallace et al., 1995). Selon Spinella et al., leurs études de RMN indiquent la présence d'une structure de feuillets plissés ou feuillets β entre les résidus 9 à 21 plutôt que la structure en hélice alpha (Spinella et al., 1989). Ils notent aussi la présence de 2 coudes β , le premier impliquant les résidus 1 à 4 et le second, les résidus 5 à 8.

Des études de structure-activité ont permis de suggérer que les résidus 2 à 7 seraient impliqués, avec l'interaction du Phe en position 14, dans la liaison aux récepteurs. Les résidus chargés 8 à 10 seraient quant à eux, impliqués dans la vasoconstriction.

Les études d'activité biologique laissent croire à l'existence de plusieurs récepteurs. En effet, on dénombre actuellement 3 types de récepteurs, ET_A , ET_B et ET_C , classés selon leur sélectivité aux différents isopeptides (Masaki et Yanagisawa, 1992; Yoneyama et al., 1995; Krystek et al., 1995). Les récepteurs de l'endothéline font partie de la super famille des récepteurs possédant 7 domaines transmembranaires (La et Reid, 1995). Ces récepteurs sont couplés aux protéines G pour leur régulation (Douglas et al., 1995; Levin, 1995). Les sous-types de récepteurs d'une même cellule peuvent agir indépendamment. (Takagi et al., 1995). La liaison aux récepteurs active la PLC via l'action des protéines G et suite à la cascade enzymatique, entraîne une activation ou une inhibition de la formation d'AMPc. (Figure 2) Donc la sécrétion de l'endothéline amène la formation de deux signaux intracellulaires, l'inositol-1,4,5-triphosphate et le diacylglycérol. Ceci entraîne une régulation de ET via la mobilisation du calcium intracellulaire, l'activation de protéines kinases C et des mécanismes de blocage au moyen de l'AMPc (La et Reid, 1995; Lazou et al., 1995).

Le récepteur ET_A montre une plus forte affinité pour ET-1 et ET-2 que pour ET-3. Il est principalement retrouvé au niveau des muscles lisses vasculaires et il est à l'origine des effets de vasoconstriction. Chez le rat, le récepteur ET_A est assigné au chromosome 19 et chez l'humain, au chromosome 4 (Cai et al., 1995). Le récepteur ET_B possède une affinité équivalente pour les isoformes de l'endothéline. Il se retrouve dans l'endothélium vasculaire

Figure 2: Mécanisme d'action de l'endothéline



Tiré de Takagi et al., 1995

et est responsable d'une relaxation via la libération de NO synthase qui cause un relargage de l'oxyde nitrique et de prostanoïdes. Les récepteurs ET_B sont subdivisés en ET_{B1} et ET_{B2} (Masaki et Yanagisawa, 1992; Roux et al., 1995). ET_{B1} et ET_{B2} se distinguent par leur localisation anatomique (endothélium vs muscle lisse), leur fonction (vasodilatation vs vasoconstriction) et leur profil pharmacologique (sensibilité ou insensibilité à l'antagoniste PD 142893) (Douglas et al., 1995). Le récepteur ET_B est localisé sur le chromosome 15 du rat et sur le chromosome 13 humain (Cai et al., 1995). Le récepteur ET_C, le moins étudié, est spécifique à ET-3. Ce récepteur a été cloné à partir des mélanophores dermaux de *Xenopus laevis* (Douglas et al., 1995). Il est actif au niveau des cellules hypophysaires, par un effet de régulation de la libération d'hormones, telles la prolactine et la gonadotropine (Masaki et Yanagisawa, 1992).

Le précurseur de l'endothéline

Yanagisawa et son équipe furent les premiers à isoler le gène de l'endothéline porcine. Chez l'homme, on a isolé 3 gènes similaires mais qui ne sont pas liés génétiquement. On a émis l'hypothèse d'une origine commune avec une séparation par l'évolution. L'assignation chromosomale des gènes pour ET-1, ET-2 et ET-3 est respectivement à 6p23-p24, 1p34 et 20q13.2-q13.3 (Rubanyl et Polokoff, 1994). La séquence du gène ET-1 a permis de connaître les précurseurs de l'endothéline et de modéliser le mécanisme de maturation de celle-ci (Opgenorth, Wu-Wong et Shiosaki, 1992). Ainsi, l'ARNm code pour une préproendothéline de 6836 paires de bases. Cette préproendothéline se déplace à travers l'appareil de Golgi où elle subit des modifications post-transcriptionnelles (Fabbrini et al., 1993; Harrison et al., 1995). Les 2026 nucléotides se distribuent sur 5 exons, synthétisant chez l'homme, une protéine de 212 résidus d'acide aminé. Chez le porc, on obtient 203 résidus (Savage et al., 1993). Le second exon correspond à la séquence de l'endothéline mature (résidus 53 à 73). La big-endothéline (Big-ET) s'étend sur le second et le troisième exon. Il est intéressant de noter que le site d'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline est situé près d'une jonction intron-exon. Le troisième exon code pour la région similaire à ET (*ET-*

like), nommée ainsi à cause de la très forte similitude pour la région codant l'endothéline. Le dernier exon possède une région 3' d'ARNm non transcrite (Masaki et Yanagisawa, 1992; Rubanyl et Polokoff, 1994; Inoue et al., 1989). (Figure 3) En comparant les séquences de la préproendothéline chez différentes espèces, on observe une forte homologie (69% d'homologie entre le porc et l'humain). De plus, on a une conservation presque parfaite de la séquence correspondant à l'endothéline mature (Itoh et al., 1988).

La préproendothéline subirait un clivage par une endopeptidase basique spécifique qui clive le précurseur entre les résidus Arg⁵²-Cys⁵³ et Arg⁹²-Ala⁹³ (Masaki et Yanagisawa, 1992). (Figure 4) Puis la carboxypeptidase H-like clive séquentiellement Arg⁹² et Lys⁹¹ pour compléter la maturation en pro-endothéline puis en Big endothéline (Denault et al., 1995; Rubanyl et Parker Boelho, 1991). La terminologie de pro-endothéline est utilisée ici pour identifier spécifiquement le peptide ayant 40 acides aminés plutôt que 39 comme la Big-ET. De façon générale, les auteurs s'entendent cependant pour dire que les termes Big-ET et pro-ET ont la même signification. Donc la transformation de la prépro-endothéline en Big-ET procède via un clivage de résidus dibasiques. L'enzyme responsable de ce processus serait de la famille des pro-hormones convertases (PCs) qui agissent du côté C-terminal des résidus dibasiques (soit Lys-Arg ou Arg-Arg) ou à des séquences consensus (Arg-X-Lys/Arg-Arg) (Beaubien et al., 1995). Plus précisément, le type de PCs qui clive la prépro-endothéline, serait la furine ou la PC5. Denault et al. ont aussi confirmé l'hypothèse que la furine permettrait néanmoins la production de Big-ET-1 (Denault et al., 1995). La furine se retrouve principalement dans les membranes de Golgi. Elle est aussi présente, en quantités minimales cependant, aux surfaces intra- et extra-cellulaires (Plumton, 1995).

La Big-endothéline

La maturation se poursuit par un processus protéolytique inhabituel du lien Trp²¹-Val²² à l'aide d'une enzyme spécifique simplement nommée l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (Tsukahara et al., 1993 ; Rubanyl et Polokoff, 1994). Par comparaison des

Figure 3: Séquence génétique de la prépro-endothéline

```

H           -252           -240           -210           -180
CTGCGCCAGGCGAACGGGTCTGCGCCTCTGCAGTCCCAGCTCTCCACCGCCGCGTGGCCCTGCAGACGCTCCG -178

H           -150           -120           -90
CTCGCTGCCTTCTCTCCTGGCAGGCGCTGCCTTTTCTCCCGTTAAAGGGCACTTGGGCTGAAGGATCGCTTTGAGATCTGAGGAACCCG -88

H           -60           -30           -1
CAGCGCTTTGAGGGACCTGAAGCTGTTTTCTCGTTTTCTTTGGGTTGAGTTG-AAAGGGAGGTTTTGATCCC--TTTTTTTCAGAA -1
P           CATTTTTCTGCCTTT-TTCCCCCGCTTTTCGGTTTAGTTTCGACAGGGGGAGGATTTGATCCTTTTTTTTTTCAGAA

!
H           30           60           90
ATGGATTATTTGCTCATGATTTTCTCTGCTGTTTGTGGCTTGCACAGGAGCTCCAGAAACAGCAGTCTTAGGGCGCTGAGCTCAGCCG 90
M D Y L L M I S L L F V A C Q G A P E T A V L G A E L S A 30
M D Y F P M I I A L L F V A F Q G I A P E T A V L G A E L S P
P           ATGGATTATTTCCCCATGATTATCGCTCTGCTGTTTGTGGCTTCCAAGGAGCTCCAGAAACAGCGGTCTGGCGCCGAGCTCAGCCG

H           120           150           180
GTGGGTGAGAACGGCGGGGAGAAACCCACTCCCAGTCCACCTGGCGGCTCCGCGGTCCAAGCGTGTCTGCTGCTCCCTGATGGAT 180
V C E N G G E K P T P S P P W R L R R S K R C S C S S E L M D 60
E A E S Q G E T P S P H A S W R P R R S K R C S C S S E L M D
P           GAAGCCGAGAGCCAAGGGGAGACGCCCTCTCCCATGCATCCTGGAGGCCCGTCCGTCGAAGCGTGTCTGCTCTTCCCTGATGGAT

H           210           240
AAAGAGTGTGTCTACTTCTGCCACCTGGACATCATTTGGGTCAACACTCCCAGCACCTTGTICCGTATGGACTTGAAGCCCT---AGG 267
K R E C V Y F C H L D I I W I V N T P E H V V P Y G L G S P - R 89
K R E C V Y F C H L D I I W I V N T P E H I V P Y G L G S P S R
P           AAAGAGTGTGTCTACTTCTGCCACCTGGACATCATCTGGGTCAACACTCCAGAACACATTGTCCCATACGGACTTGAAGCCCTTCTAGG

H           270           300           330
TCCAAGAGAGCCTTGGAGAATTTACTTCCACAAAGGCAACAGACCGTGAGAATAGATGCCAATGTGCTAGCCAAAAAGACAAGAAGTGC 357
S R A L L N L L P T K A T D R E N R C Q C A S Q K D K K C 119
S R R S L K D L F P A K A A D R R D R C Q C A S Q K D K K C
P           TCCAGCGATCCTTAAAGGATTTGTTTCTGCAAGGCAAGCAGACCGCAGGGATAGATGCCAGTGTGCCAAAAAGACAAAGAAAGTGC

H           360           390           420
TGGAATTTTTGCCAAGCAGGAAAAGAACTC---AGGGCTGAAGACATTTAGGAGAAAGACTGGAATAATCATAAAGAAAGGAAAAGACTGT 444
W N F C Q A G K E L - R A E D I M E K D W N N K K G K D C 148
W S F C Q A G K E I G R D Q D T M E K R W D N Q K K G T D C
P           TGGAGTTTCTGCCAAGCAGGAAAAGAAATCGGCAGGGACCAAGACACAATGGAGAAACGCTGGGATAACCAAAAAAGAAAGAACAGACTGT

H           450           480           510
TCCAAGCTTGGGAAAAAGTGTATTTATCAGCAGTTAGTGAGAGGAAGAAAAATCAGAAGAAGTTTCAGAGGAACACCTAAGACAAAACAGG 534
S K L G K K C I Y Q Q L V R G R K I R H S S E E H L N Q T R 178
S K L G E K C I H R Q L V M G R K I R R - - - - -
P           TCCAAGCTTGGAGAGAAGTGTATTCATCGGCAGCTGGTGTGGGAGAAAAAATAAGAAG-----

H           540           570           600
TCGGAGACCATGAGAACAGCGTCAAAATCATCTTTTATGATCCCAAGCTGAAAGGCAAGCCCTCCAGAGAGCGTTATGTGACCCAACAAC 624
S E T N R N S V K S S F H D P K L K C K P S R E H V V T H N 208
L E A I S N S I K T S F H I A K L K A E L Y R D K K V T H N
P           TTGGAGGCCATCAGCAACAGCATCAAAACATCTTTTACATCGCCAAGCTGAAAGCCGAGCTCTACAGAGATAAGAAAGTGACCCATAAC

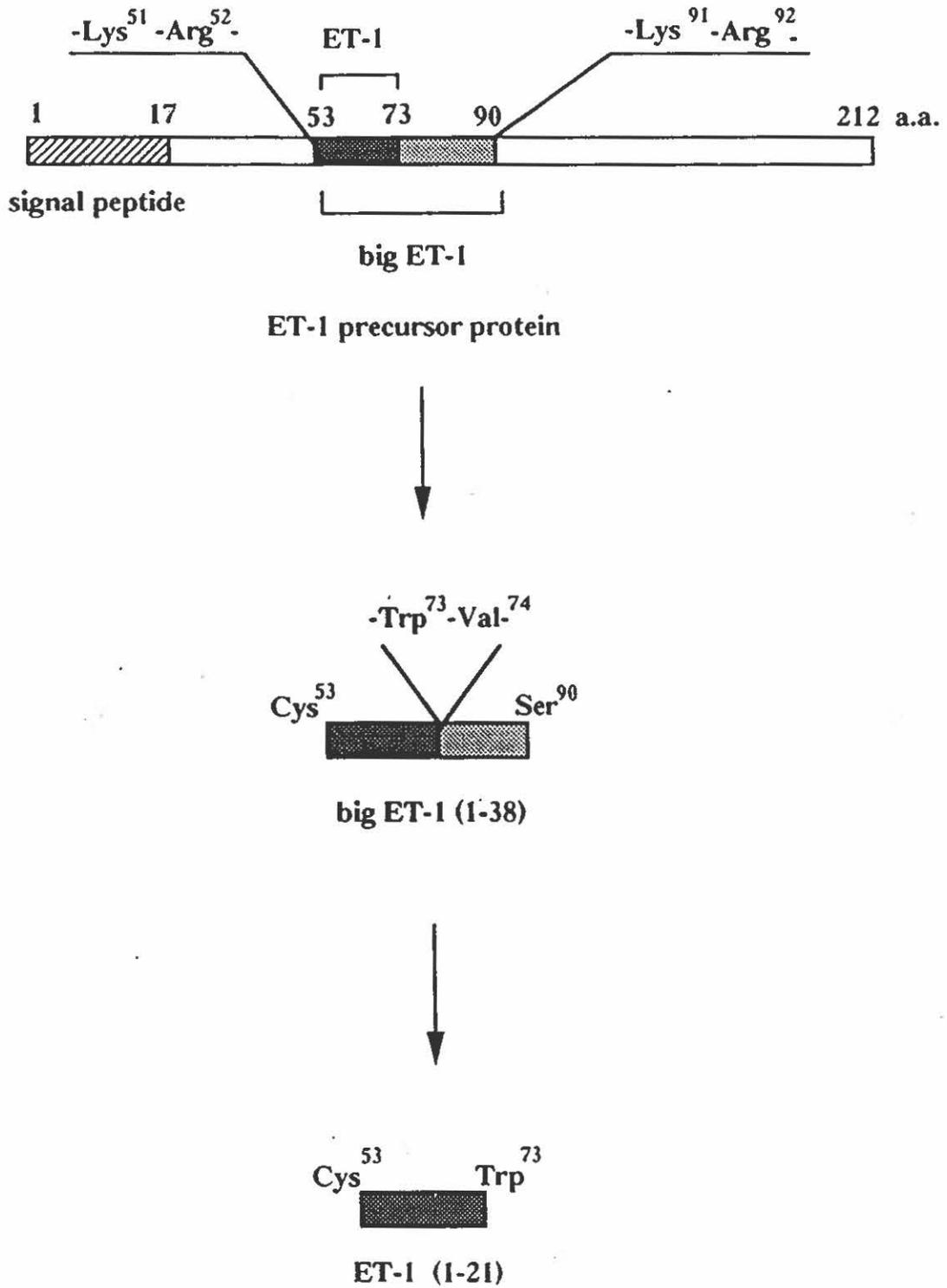
H           630           660           690
CGAGCACAATTGGTGACAGACT-TCGGGCGCTGTCTGAAGCCATAGCCTCCAGGAGAGCCCTGIGGCGGACTCTGCACT--CTCCACCT 711
R A H M *
R T H * *
P           CGAACACACTGATGACAGGTTGGCCGAGCCTGTCTGAAGCCATCTCGTCCCAGGAGCCCGGGCCGACTCTGCGCTCGTTGGCAGG

H           720           750           780
GGCTGGGATCAGAGCAGGAGCATCTCTGCT-----GGTTCCT-----GACTGGCAAGGACCAGCGTCTCGTTCAAAACATTCCAA 789
P           GGCTGAGATCAGAGCAGAAAGCCTCTCTGTTTACAGCCGTTCTTACTGCAGACTGGCACAGGACCAGCACCCCTCG-CCTGAACATTCCAG

H           810           840           870
GAAAGG-TTAAGGAGTICCCCAACCA-TCTTCACTGGCITCCATCAGTGGTAACTGCTTIGGCTCTCTCTTTCATC--TGGGATGACA 875
P           AAAAGGCTTAAGGAGTCCCCCAGCCGGTCTTCATTGGCCTCCATCAGTGTCTAAGCGCGGCGCTGTGT-CTCTCCTCTTTGGCGGTGATG

H           900           915
ATGGACCTCTCAGCAGAAA-CACACAGTACATTCGAATTC
P           ATGGGCCACTCGA-AGAAAGCAGAGAGAGACA--CGGATGC--( 837 bp )--AATAAA--( 15 bp )--AAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

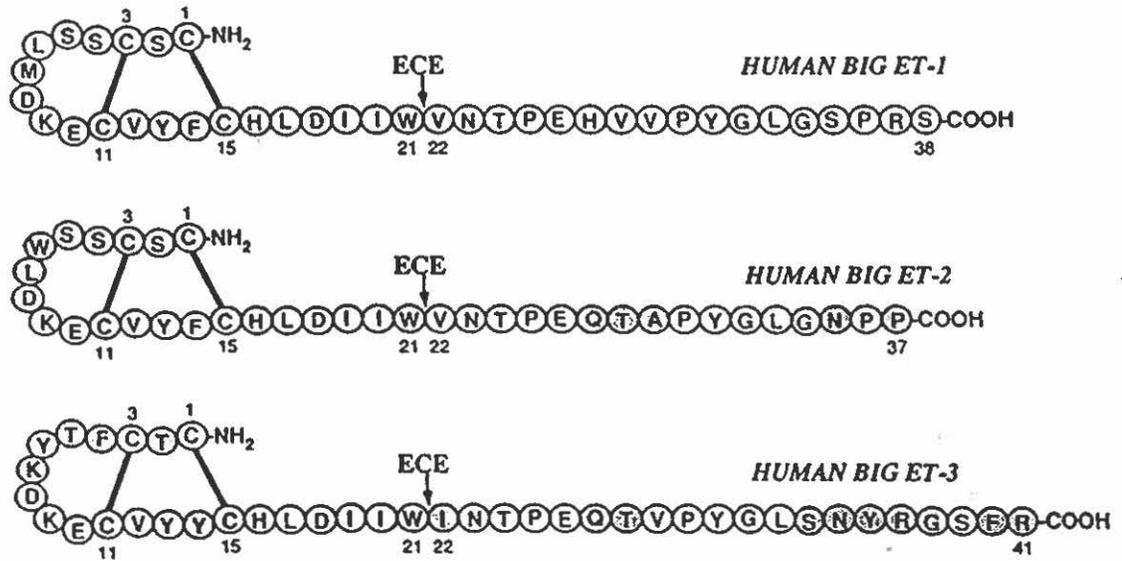
Figure 4: Étapes de maturation de l'endothéline



séquences, Fabbrini et son équipe ont trouvé que la séquence Trp-Val n'est pas essentielle à l'action enzymatique (Fabbrini et al., 1993). (Figure 5) Pour le clivage de la Big endothéline-3 (Big-ET-3), l'enzyme agit sur un lien Trp-Ile plutôt que Trp-Val (Rubanyl et Parker Boelho, 1991). On suggère alors que le site dibasique (16 à 18) permettrait la restriction de l'enzyme. Ce clivage par l'ECE est un facteur de régulation très important car ET-1 est environ 100 fois plus efficace que Big-ET-1 au niveau de son pouvoir vasoconstricteur. Par contre, leur activité réciproque sur la pression demeure comparable (Von Geldern, Holleman et Opgenorth, 1991). Comme les cellules endothéliales ne contiennent pas de granules d'entreposage, ni de granules de maturation pour la Big ET ou l'endothéline, la maturation serait probablement réalisée lors du déplacement extracellulaire de la Big endothéline. L'hypothèse a aussi été émise que cela aurait lieu au niveau de la membrane basale des cellules endothéliales (Corvol, Alhenc-Gelas et Soubrier, 1993). Certains auteurs suggèrent que le site majeur de la conversion serait au niveau du sang (Webb, 1991). Contrairement à l'énoncé précédent, Harrison et al., ont localisé la Big-ET-1 dans de petites vésicules intracellulaires des cellules endothéliales de l'aorte de boeuf, suggérant que ces compartiments subcellulaires seraient un site important de conversion par ECE (Harrison et al., 1995). Ainsi le processus initial du clivage de la prépro-ET (PPET) aurait lieu dans le complexe golgien. Le clivage final de la Big-ET en ET serait réalisé au niveau des vésicules sécrétrices (Ergul et Puett, 1995).

Il est aussi important d'approfondir les connaissances concernant ECE et le précurseur de l'endothéline afin d'élucider son mécanisme d'action. ECE reconnaîtrait certaines séquences spécifiques car elle présente des taux de clivage respectifs de 4:1:2 pour Big-ET-1, Big-ET-2 et Big-ET-3 (Shimada, Takahashi et Tanzawa, 1994; Takahashi et al., 1993). Lawrence et son équipe ont aussi étudié le fragment C-terminal de la Big-ET-1 (résidus 22 à 38). Ces études démontrent que ce fragment ne possède aucune vasoactivité, donc seule l'endothéline (résidus 1 à 21) est active (Lawrence et Brain, 1993) . De plus, le fragment 22 à 38 de la Big-ET est rapidement dégradé par l'organisme (Hensen, 1995). Les

Figure 5: Séquences des isotypes de la Big-ET



Tiré de Fabbrini et al., 1993

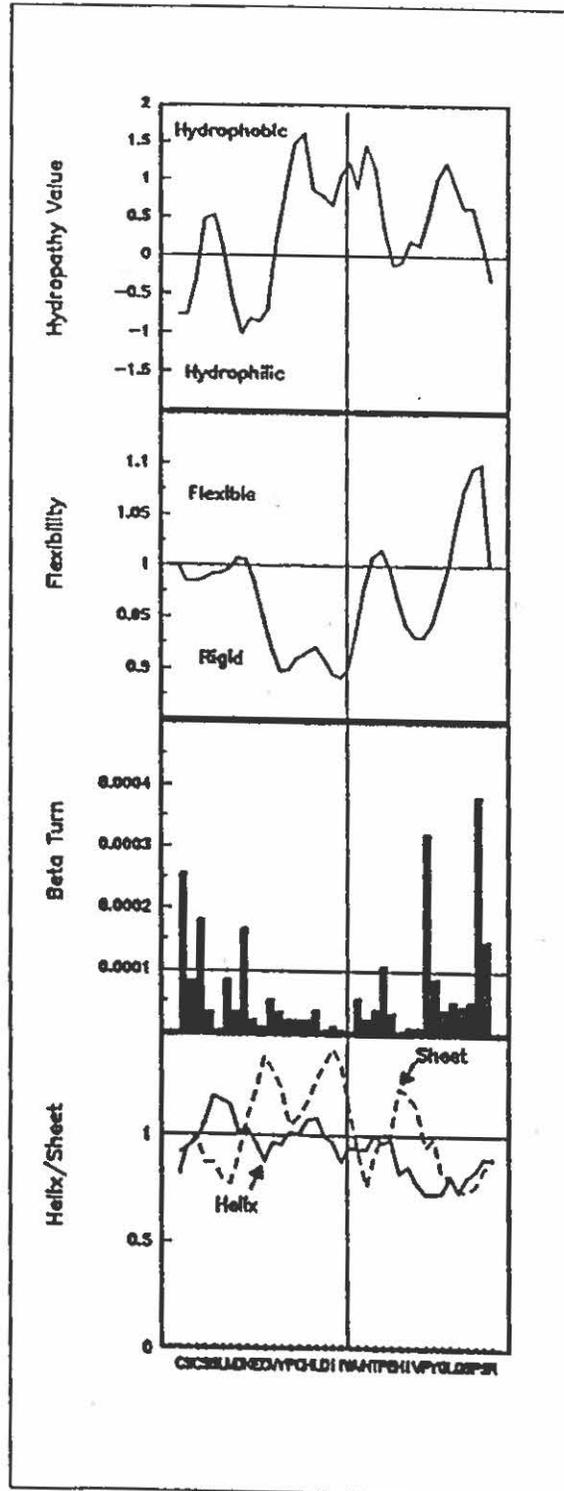
aspartyl protéases (CAP) pourraient être impliquées dans la dégradation de l'enzyme, de même que dans celle de la Big-ET et de l'endothéline (Ergul et Puett, 1995).

Des études structurales ont démontré que la région des résidus 32 à 37 de la Big-ET jouerait un rôle important dans la reconnaissance par ECE (Zaid, 1993). Okada suggère 2 hypothèses de mécanismes: soit que les résidus 32 à 37 forment un site direct d'affinité reconnu par ECE ou que cette région interagit avec un autre site de la Big-ET favorisant une structure tertiaire plus facilement scissile par ECE. Les résidus 27 à 29 joueraient aussi un rôle pour la reconnaissance par ECE (Okada et al., 1992; Takahashi et al., 1993). Selon Okada et son équipe, le segment 27 à 34, étant un site de reconnaissance, permettrait la conversion par ECE (Okada et al., 1992; Morita et al., 1994). De plus, la portion N-terminale cause une interférence pour l'accessibilité de ECE. Finalement, il semble que le Trp²¹ jouerait un rôle important pour la sécrétion et le clivage de Big-ET-1 alors que Ile²⁰ n'aurait pas d'effet significatif (Ergul et Puett, 1995).

ECE agit sur la Big-ET de façon relativement spécifique. Par conséquent, la structure de Big-ET fournit des indications sur l'action de ECE. Le précurseur, la Big-ET, montre selon des études d'hydropathie et de flexibilité, une portion N-terminale rigidifiée à l'aide des ponts cystines et des deux coudes β en N-terminal. (Figure 6) Le feuillet β hydrophobe se déploie en C-terminal avec la présence de deux autres coudes β très prononcés (Spinella et al., 1989).

Donlan et ses collègues ont obtenu des informations structurales au moyen d'analyses NOESY de RMN. Ainsi, il semble que les résidus 5 à 8 ont une structure en coude β de type II et les résidus 9 à 15 optent pour une structure en hélice α , tout comme l'endothéline (Donlan, Brown et Jeffs, 1992). Par la suite, les résidus forment une structure nommée variable ou aléatoire. Les résidus 36 à 38 restent extrêmement mobiles. Ils ont émis l'hypothèse que la Big endothéline se modifierait lors de sa liaison à la ECE par l'intermédiaire de son extrémité C-terminale.

Figure 6: Résultats de l'étude d'hydropathie et de flexibilité pour la Big-endothéline



Finalement, la Big-ET est transformée en ET. Cette endothéline se lie aux récepteurs et est par la suite éliminée dans le milieu environnant. La demi-vie plasmatique de ET-1 est d'environ 4 à 7 minutes. L'endothéline-1 dans le plasma est éliminée majoritairement par le poumon (80 à 90%) durant son premier passage (Levin, 1995). L'endothéline-1 qui se retrouve dans la circulation pourra être éliminée de 3 façons: (La et Reid, 1995)

- 1- Dégradation hydrolytique par les endopeptidases neutres
- 2- Relocalisation, médiée par des récepteurs de ET dans le système circulatoire vers des tissus spécifiques (via les récepteurs ET_B)
- 3- Dégradation par des lysozymes (ex.: dans les cellules endothéliales)

L'enzyme de conversion de l'endothéline

Pour mieux comprendre le mécanisme de formation de l'endothéline, il est essentiel de mieux connaître l'enzyme qui est responsable du clivage de la Big-ET. Initialement, en 1989, Yanagisawa et al. avaient suggéré que ECE pourrait être une enzyme semblable à la chymotrypsine car la chymotrypsine clive la Big-ET (Yanagisawa et al., 1989). Toutefois, comme McMahon et al. l'indiquent, la chymotrypsine clive le lien Trp²¹-Val²² mais aussi Tyr³¹-Gly³² alors que selon les observations, le clivage de la Big endothéline aboutit seulement à 2 fragments (1-21 et 22-39). Par la suite, Takaoka et al. en 1990, ont suggéré que ECE pourrait être une aspartyl protéase avec une activité semblable à la pepsine car ECE est spécifiquement inhibée par la pepstatine A (Takada et al., 1991; Matsumura et al., 1992b). Par contre, les inhibiteurs de l'aspartyl protéase n'ont pas l'effet escompté sur la formation de l'endothéline-1 (Takada et al., 1991). Ainsi, l'aspartyl protéase clive le lien peptidique du côté C-terminal d'un acide aminé aromatique (Opgenorth, Kimura et Wu-Wong, 1995). Ohnaka et al., trouvèrent une activité endopeptidase métallo-dépendante à un pH neutre et ils suggérèrent que ECE serait une NEP (endopeptidase neutre) (Ohnaka et al., 1990). Ceci fut contredit par le fait que ECE n'est pas inhibée par le thiorphan, un inhibiteur de NEP (Shimada, Takahashi et Tanzawa, 1994; Zaid et al., 1993). Par la suite, il a été suggéré que

le cytosol contiendrait une enzyme non sensible au phosphoramidon. Des études avec la NEM (N-éthylmaléimide) démontrent la présence d'une seconde ECE qui, elle, serait une métalloprotéase soluble et thiol-dépendante. Le NEM est un bloqueur du groupement sulphydyle. Avec les études sur l'inhibition, il a été conclu que ECE ne serait pas une NEP, ni une ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine) et encore moins une sérine ou cystéine-protéase (Opgenorth, Wu-Wong et Shiosaki, 1992).

On s'entend actuellement pour dire qu'il y aurait 3 types de ECE. La première, inhibée par la pepstatine A, serait une aspartyl protéase semblable à la cathepsine ayant un pH d'activité optimale entre 3 et 4. Des études ont démontré que cette cathepsine agit seulement dans des conditions sélectives et inhabituelles (Knap et al., 1993: Chiou et al., 1994: Fawsi, Cleven et Wright, 1994: Shiosaki et al., 1993: Opgenorth, Kimura et Wu-Wong, 1995). Elle ne serait donc pas la candidate idéale pour l'action biologique. La seconde ECE, une métalloprotéase liée à la membrane, est sensible à l' EDTA et au phosphoramidon, avec un pH d'activité optimale entre 6,6 et 7,6. Finalement, la troisième est une thiol protéase avec un pH d'action se situant entre 7 à 7,5 (Rubanyl et Parker Boelho, 1991: Hisaki et al., 1994). On s'entend actuellement pour dire que la métalloprotéase sensible au phosphoramidon serait responsable de l'action biologique.

Le fait que diverses enzymes réagissent avec la Big-ET s'explique par la nature des acides aminés voisins au site de clivage. En effet, les acides aminés Ile¹⁹, Ile²⁰, Asn²³ et Thr²⁴ sont non polaires ou polaires mais non chargés. Ils ne contrecarrent donc pas les forces répulsives des différents centres catalytiques. Une autre hypothèse émise est que le lien scissile Trp²¹-Val²² serait très exposé et en plus, la poche du site actif de l'enzyme pour le clivage de la Big-ET se trouverait en surface. Sous ces conditions, l'énergie libre requise pour l'hydrolyse serait minimisée (Savage et al., 1993).

Donc l'enzyme principale responsable de la conversion de la Big-ET est une métalloprotéase (Ashizawa et al., 1994a: Bigaud et al., 1994: Deng et al., 1992: Matsumura

et al., 1992a). ECE est définie comme étant une endopeptidase, inhibée par le phosphoramidon. Elle clive la Big ET-1 entre les résidus Trp²¹ et Val²². ECE est sous forme liée à la membrane et se trouve aussi librement dans le cytosol avec un ratio de 5:1 (Gui et al., 1993; Kundu et Wilson, 1992; Ahn et al., 1992; Opgenorth, Wu-Wong et Shiosaki, 1992). ECE aurait un pH d'activité optimal d'environ 6,5 à 7,0 (Ahn et al., 1992; Tsukahara et al., 1993; Matsumura et al., 1992b).

De plus, on s'entend actuellement pour affirmer qu'elle contient du zinc (Ashisawa et al., 1994b; Tsurumi et al., 1994; Ohnaka et al., 1993). Selon Kundu et al., le zinc jouerait seulement un rôle transitoire pour ECE. Il faut par contre noter qu'à de fortes concentrations de zinc, il peut y avoir inhibition des métalloprotéases. Cette inhibition est due à la formation de monohydroxyde de zinc qui lie l'ion catalytique zinc à une chaîne latérale du site actif de l'enzyme (Kundu et Wilson, 1993).

ECE peut être fortement glycosylée, ce qui explique la variation de son poids moléculaire de 80 à 350 kDa dépendamment de son état de glycosylation. Il existe 10 sites potentiels de N-glycosylation sur ECE (Schmidt et al., 1994). Cette glycosylation entraîne aussi une différence de mobilité électrostatique et jouerait un rôle probable au niveau de son activité (Shimada et al., 1995a; Shimada, Takahashi et Tanzawa, 1994).

La séquence d'acides aminés de ECE a permis d'isoler un site actif à motif doigt de zinc (HEXXH), ce qui est une indication d'une métalloprotéase. Le motif du doigt de zinc et le site actif possible débutent à l'acide aminé 590 (bovin 591). La séquence d'acides aminés entre 52 (53) et 72 (73) contient une série d'acides aminés hydrophobes qui représente possiblement le site d'ancrage à la membrane (Shimada et al., 1995a; Schmidt et al., 1994; Ikura et al., 1994; Shimada, Takahashi et Tanzawa, 1994). (Figure 7) Les ADNc humain et bovin de ECE codent pour 753 et 754 acides aminés respectivement; ce qui correspond environ à 85 kDa. Le degré d'homologie entre les deux types est de 94%.

Figure 7: Comparaison des séquences d'acides aminés des ECE bovine et humaine

ECE1	MSPRGQDLLRSPLLLGSEA	19
ECE2	MRARYAHVPTLRWETMDVRALGFPSGSFDDVLEKGTLDALLTGEQDPWT	49
ECE1	PGLTSSPFRLPPLSLQVNFGRPRNGQRCWAARTPVEKRLVVLVALLAAALV	69
ECE2	VSSEGVHTVDQVLNEAG..-K.TS-.LLGLH.QL.LV.AGVSL....L.L	97
ECE1	<u>ACLAVLGIQYQ-TRTPSVCLSEGQISVTSSILSSMDPTVDPQDFFTYAC</u>	118
ECE2	<u>G..VA..V..HRDPSH.T..T.A..R.AGK..E.L.RG.S..E..YQFS.</u>	147
ECE1	GGWIKANPVPDGHRSRWGTFNSNLWEHNQAIKHLLENST-ASVSEAERKAQ	167
ECE2RR..L...R...NNSNS..DQ....L.....[T.FN].S.....T.	197
ECE1	VYRACMNETRIEELKAKPLMELIEKLGWNTGPDWKNDFQDTLQVVTS	217
ECE2	RF.LS.LQVE.....G.HA.RD..D.I...[V].....Q...MEV.KA.AG	247
ECE1	HYHTSPFFSVYVSADSKNSNSNVIQVDQSGGLPSRDYLLNKTENEKVLIT	267
ECE2	T.RAT...T.....S....I.....F.....[R.A].....	297
ECE1	GYLNYMVQLGKLLGGGAEDTIRPQMQQILDFETALANITIPQEKRRDEEL	317
ECE2	A..D..EE..M....QPTS--E..R.V.EL.IQ...[I].V..DQ.....K	346
ECE1	IYHKVTAELQTLAPAINWLPFLNTIFYPVEINSEPIVIYDKEYLSKVS	367
ECE2MSI....A...SMD..E..SFLLS.L.LGD...V.V.GTD..QQ..	396
ECE1	TLINSTDKCLLNMIWNLVVRKTSFFLDQRFQDADEKFMVEMYGTRKKTCL	417
ECE2	E...[R].EPSV....L.....Q..T.S..H..ES.Q..LL.TL.....S.T	446
ECE1	PRWKFCVSDTENTLGFALGPMFVKATFAEDSKNIASEIILEIKKAFEEESL	467
ECE2	...QT.I.N.DDA.....SL.....DRQ..E..EGM.S..RV....A.	496
ECE1	STLKWMDDEDTRKSAKEKADAIYNMIGYPNFMIDPKELDKVFNDYTAVPDL	517
ECE2	GH:V....K..QA.....D...F.D..LE.....D.YDG.EVSE.S	546
ECE1	YFENAMRFFNFSWRVTADQLRKAPNRDQWSMTPPMVNAYYSPTKNEIVFP	567
ECE2	F.Q.MLNLY.[I].AK.M.....P.S.....QT.....L.....	596
ECE1	<u>AGILOAPFYTRSSPNALNFGGIGVVVGH[ELTHAF]DDQGREYDKDGNLRPW</u>	617
ECE2CNH.Q.....[M].....E.....	646
ECE1	WKNSSVEAFKQQTACMVEQYGNYSVNGEPVNGRHTLGENIADNGGLKAAY	667
ECE2	.Q.[E].LA..RNH...IE...SQ.Q...KL...Q.....	696
ECE1	RAYQNWVKKNGAEQTLPTLGLTNNQLFFLSFGQVWCSVRTPESSHEGLIT	717
ECE2	N..KA.LR.H.E..Q..AV....H....VG.A.....V.	746
ECE1	DPHSPSRFRVIGSISNSKEFSEHFHCPPGSPMNPCHKCEVW	758
ECE2A....L.TL...RD.LR..G..V.....SGQL....	787

Tiré de Shimada et al., 1995a

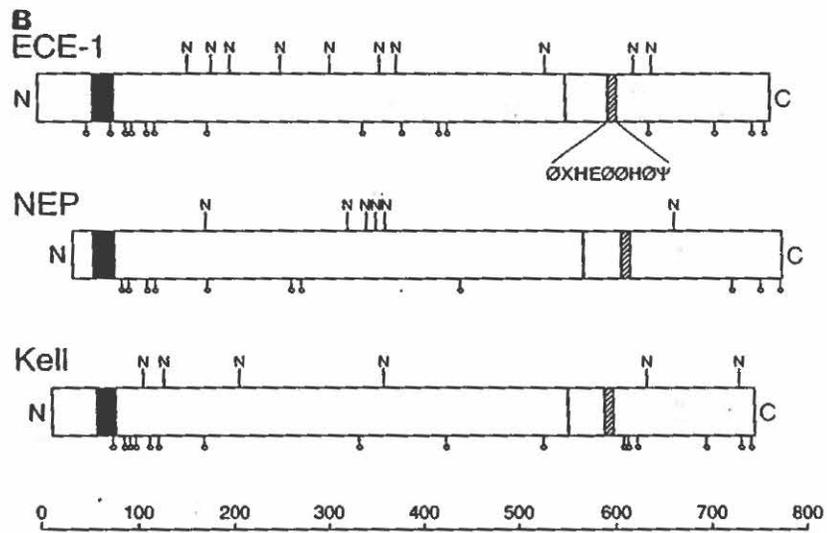
le carré noir indique le motif de doigt de zinc
la séquence doublement soulignée indique le domaine transmembranaire

Selon Xu et al., ECE a une structure similaire à celle de NEP 24.11. Plus précisément, selon De Lombaert, ECE est une métalloprotéase de zinc ayant des similarités structurales et des homologies de séquence avec NEP et les protéines sanguines Kell, soit respectivement de 37% et 31% (De Lombaert et al., 1994). (Figure 8) Ainsi la ECE bovine possède un seul domaine hélicoïdal transmembranaire de 21 acides aminés (résidus 53 à 73) (Shimada et al., 1995a). Elle possède un segment N-terminal de 56 résidus d'acides aminés dans le cytoplasme et une portion C-terminale extracellulaire de 681 acides aminés qui contiendrait le domaine catalytique. On observe le motif de zinc des résidus 593 à 601. Les 10 sites de glycosylation se retrouvent dans le domaine extracellulaire. Sur les 14 cystéines de ECE, 10 se retrouvent aussi dans le séquence de NEP et de Kell indiquant une structure tertiaire similaire. Il y aurait aussi 4 résidus Cys dans le domaine extracellulaire près de l'hélice transmembranaire qui sont hautement conservés pour les protéines membranaires (Xu et al., 1994; Shimada, Takahashi et Tanzawa, 1994). Il y aurait un site potentiel de phosphorylation à thréonine dans le domaine cytosolique (Yorimistu et al., 1995). Pour les NEP, le grand domaine catalytique en C-terminal fait face à l'extérieur de la membrane plasmatique alors que la partie N-terminale se cache dans le cytoplasme. Si c'est aussi le cas pour ECE, la Big-ET-1 serait convertie en ET-1 à la surface de la membrane après sa sécrétion par la cellule (Shimada, Takahashi et Tanzawa, 1994).

Le fragment 1-31 de la Big-endothéline-1 ne serait pas reconnu par ECE-1 ce qui indique la nécessité de la structure C-terminale pour la reconnaissance de l'enzyme (Rubanyl et Polokoff, 1994; Xu et al., 1994). Cela indique une possibilité de reconnaissance non seulement de la structure primaire mais aussi de la structure tertiaire par ECE. Okada trouva d'ailleurs que seule Big-ET-1 (1-38) était clivée par ECE (Okada et al., 1991).

Des études ont déterminé que la transformation des différents isotypes de Big-ET dépend du pH; Big-ET-1 a un pH optimal de 6,8 à 7,0 alors que Big-ET-2 et Big-ET-3 auraient un pH de 6,4 à 6,6. Cette étude vient contredire les récentes suggestions en

Figure 8 : Comparaison structurale de ECE par rapport aux protéines NEP et Kell



Tiré de De Lombaert et al., 1994

suggérant qu'une seule ECE réalise toutes les conversions (Oppenorth, Kimura et Wu-Wong, 1995).

Ainsi, les plus récentes études suggèrent non pas une seule ECE mais une famille composée des ECE-1a, ECE-1b et ECE-2 qui auraient des préférences respectives pour les substrats Big-ET-1, Big-ET-2 et Big-ET-3. Shimada a suggéré l'existence des deux isoformes de ECE-1 par la déduction de la séquence des acides aminés. La différence entre les isoformes serait dans la séquence en N-terminal. ECE-1a est plus abondante que ECE-1b et le ratio se conserve dans les divers organes (Shimada et al., 1995b). Il est aussi possible que les ECE-1 se retrouvent sous forme de dimères et que les isoformes soient les composantes du dimère. L'enzyme ECE-1a a été localisée dans les cellules endothéliales vasculaires des organes et dans les cellules épithéliales des voies respiratoires, gastro-intestinales et urinaires. ECE-1b est présente dans les cellules adénocarcinomiales de rein humain, où elle produirait ET-2. Elle se retrouve dans les cellules endothéliales du cortex surrénalien et de l'aorte bovin, ainsi que dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (Battistini, Botting et Warner, 1995). On a isolé ECE-2 qui clive la Big-ET-1 in vitro et dans les cellules transfectées (Emoto et Yanagisawa, 1995). ECE-2 est similaire à ECE-1 avec 59% d'homologie mais elle est 250 fois plus sensible au phosphoramidon. ECE-2 est active à un pH optimal de 5,5. On suggère donc que ECE-2 est une enzyme intracellulaire responsable de la conversion de Big-ET-1 endogène dans l'appareil de Golgi où les fluides sont acides. (Figure 9)

L'inhibition de ECE peut devenir une stratégie thérapeutique importante car la surproduction de l'endothéline est impliquée comme décrit précédemment dans des maladies telles l'hypertension et le vasospasme coronarien (Fassina et Cassani, 1993; Bertenshaw et al., 1993). Comme l'indique Morita, un changement ponctuel d'acide aminé peut modifier le peptide de façon à obtenir une inhibition de la conversion (Morita et al., 1994). Ainsi en remplaçant la L-Val²² de la Big-ET-1 par une D-Val²², il obtint une inhibition de l'activité de ECE. Son étude indique que cet analogue pourrait lier ECE via des interactions spécifiques

Figure 9: Tableau de classification des divers types de ECE

Table 1. Classification and structural domains of the isoenzymes of endothelin converting enzyme (ECE)						
ECE isoenzymes	Sources	Other names	Domains			
			N-terminal cytosolic (Residue no.)	Single transmembrane (Residue no.)	C-terminal extracellular catalytic (Residue no.)	Zn²⁺-binding (Residue no.)
ECE-1a^a	bovine adrenal cortex	bA-ECE	1-56	57-77	78-758	593-601
	bovine aortic endothelial cells	bAE-ECE	1-56	57-77	78-758	595-599
	human umbilical vein endothelial cells	hH-ECE	1-56	57-77	78-758	595-599
	human placenta	hP-ECE	1-56	57-77	78-758	593-601
ECE-1b^a	rat lung	rE-ECE	1-52	53-73	74-754	591-595
	bovine embryo heart cells ^c	bF-ECE	1-52	53-73	74-754	591-595
	human renal adenocarcinoma	hA-ECE	1-68	69-89	90-770	607-611
	human placenta	hr-ECE	1-51	52-72	73-753	590-594
	human umbilical vein endothelial cells	hH-ECE	1-68	69-89	90-770	607-611
ECE-2^b	bovine adrenal medulla	bAM-ECE	1-82	83-105	106-787	622-630
	human adrenal gland	hAG-ECE	1-60	61-83	84-765	600-608

Tiré de Battistini, Botting et Warner, 1995

avec la chaîne peptidique et serait non hydrolysé. Ainsi ils ont choisi d'éliminer la séquence 1-15 du peptide pour éviter la formation des ponts disulfures. Ils ont procédé au remplacement systématique par des acides aminés D (20 à 23). De plus, ils ont voulu comparer ces analogues avec le fragment 16-21. Ils ont ainsi éliminé le site de clivage (21-22). Les résultats suggèrent que ECE ne parvient pas à cliver les analogues Big-ET-1 ayant des acides aminés D comparativement à la Big-ET-1. Toutefois, la [D-Val²²] Big-ET-1 est reconnue par l'enzyme et affiche une bonne inhibition (85%). Morita suggère que la liaison spécifique de l'analogue à ECE est possible via les résidus d'acides aminés 27 à 34. Par contre, cette étude est encore incomplète car Morita n'a pas évalué les changements de structure et ses effets.

Claing et al. ont démontré que (Phe²²)Big-ET-1(19-37) cause une inhibition de ECE mais seulement en co-injectant un inhibiteur de NEP; les NEP entraînant la dégradation de l'analogue (Claing et al., 1995). Ils suggèrent la présence de ECE différentes dans les poumons et au niveau systémique.

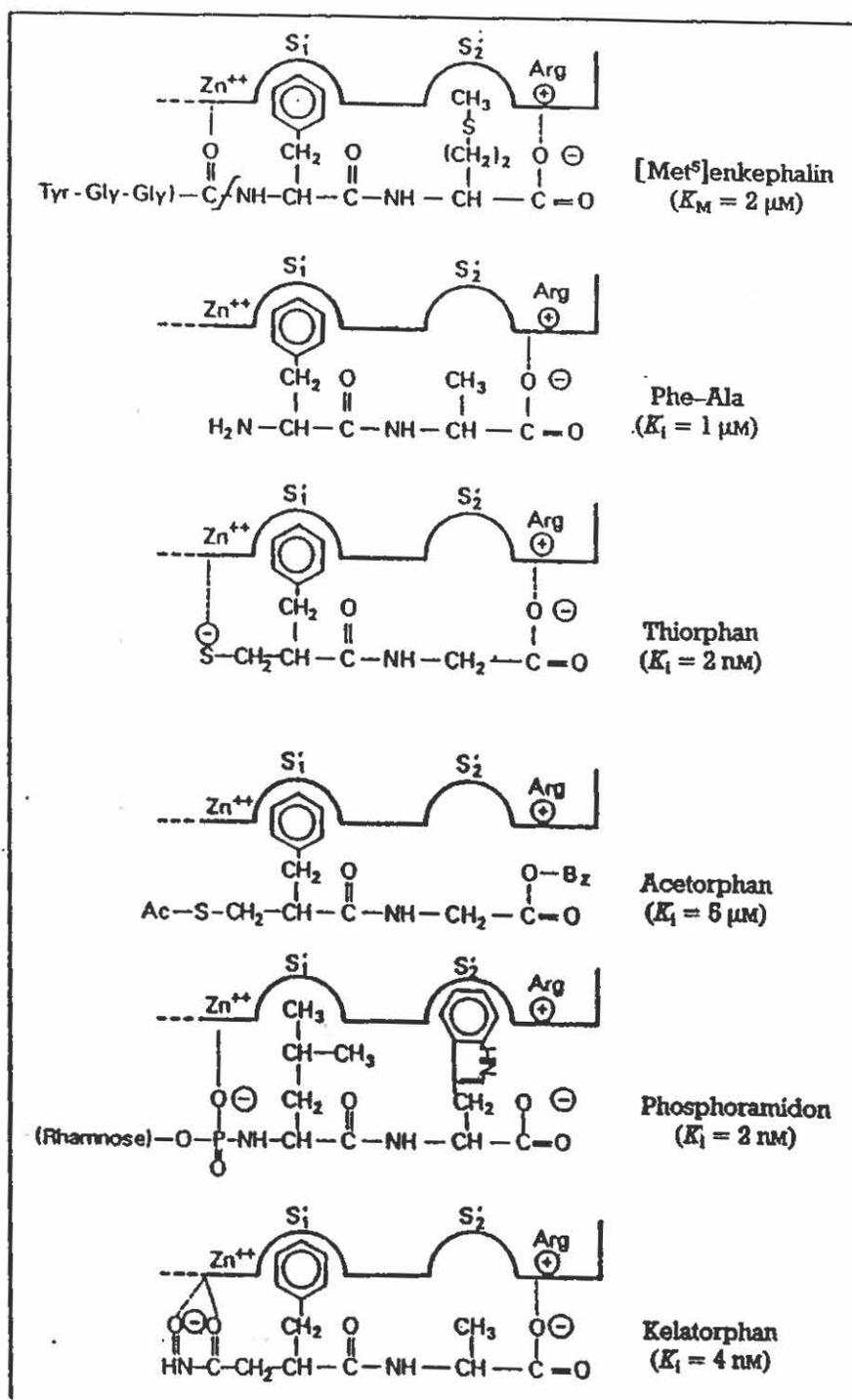
Plusieurs inhibiteurs ont été étudiés pour l'ECE. Il est important de pouvoir visualiser leur conformation afin de permettre l'étude d'éléments structuraux pouvant permettre la déduction des sites de liaison et ainsi pouvoir réussir à trouver un inhibiteur structural de ECE.

Certains inhibiteurs ont été caractérisés, tels l'EDTA qui est un agent chélateur et le phosphoramidon (Kundu et Wilson, 1993). Le phosphoramidon est un inhibiteur compétitif qui montre une faible affinité pour ECE. Donc il est facilement dissociable (Schmidt et al., 1994). Le Km de cette enzyme en présence de Big-ET-1 est de 10^{-5} M et la constante d'inhibition de 50% (IC₅₀) du phosphoramidon de 3 à 10 µM. Le phosphoramidon ou le N-alpha-L-(rhamnopyranosyl-oxyhydroxyphosphinyl)-L-leucine-L-tryptophane, peut maintenant être synthétisé chimiquement (De Nanteuil et al., 1995). Pour le phosphoramidon, un inhibiteur de métalloendopeptidases, plusieurs études ont déterminé que

la partie rhamnose de celui-ci n'est pas nécessaire pour inhiber la transformation de la Big-ET-1 (Balwerczak et al., 1995; Pollock et al., 1991). Le phosphoramidon est simplement un dipeptide Leu-Trp substitué. Celui-ci mimerait probablement le lien Trp-Val de Big-ET. Le phosphoramidon posséderait 2 sites de liaison (Balwerczak et al., 1995). La liaison de l'inhibiteur serait due à un oxygène phosphorylé qui se lie au site catalytique actif du zinc et au côté leucyle de la chaîne qui s'emboîte dans une poche hydrophobe. (figure 10)

Donc l'endothéline peut se retrouver en excès dans l'organisme et causer des dommages. Si on réussit à modifier l'action de l'enzyme de conversion sur son précurseur, on pourrait causer ainsi un ralentissement de la formation de ET-1. En créant un analogue de Big-ET-1 qui serait inhibiteur, une régulation de l'enzyme devient possible pour des traitements cliniques. Plusieurs analogues de la Big-ET-1 ont été synthétisés pour déterminer le plus court fragment reconnu par ECE. Les expériences viseront ensuite à modifier le lien de clivage Trp-Val du fragment de la Big-ET-1 afin de créer un inhibiteur non scissile reconnu par ECE.

Figure 10: Structure des différents inhibiteurs de ECE



Matériel et méthodes

1. Synthèse et purification des fragments de la Big endothéline-1

1.1 Réactifs et solvants utilisés

Les fragments ont été assemblés sur une résine BHA.HCl, soit du polystyrène ponté avec 1% de divinylbenzène, et fonctionnalisé avec des groupements benzhydrylamines (0.5 méq/g de résine) (Bio-Rad, Richmond, CA). La résine PAM, aussi de polystyrène, est fonctionnalisée par une fonction phénylacétamidométhyle. Le groupement Boc (tertbutyloxycarbonyle) se retrouve sur la fonction amine des acides aminés. Les acides aminés protégés: Asp-cyclohexyle ester (OcHex), Glu-cyclohexyle ester (OcHex), His-p-toluènesulphonyle (Tos), Ile, Leu Met et Ser- benzyle (Bzl) proviennent de Propeptide (Vert le Petit, France) alors que Cys-acétamidométhyle (Acm) et Lys-chlorobenzoyloxycarbonyle (2Cl-Z) proviennent de Bachem (Torrance , CA). Le Boc-Trp-formyle (For) a été acheté chez Advanced ChemTech (Louiseville, KY). Le BOP (hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium) a été utilisé comme réactif de couplage (Richelieu Biotechnologies, Montréal, QC). Le N,N-diméthylformamide (DMF) de qualité ACS et le DCM (dichlorométhane) proviennent de Anachemia Canada Inc (Ville St-Pierre, QC). L'acide trifluoroacétique Biograde.(TFA) a été fourni par Halocarbon (Hackensack, NJ). Le DIEA (diisopropyléthylamine) a été acheté de Pfaltz and Bauer (Waterbury, CT). L'acide fluorhydrique (HF) provient de Liquid Carbonic Inc (Scarborough, ON).

1.2 Choix des résines et des groupes protecteurs des acides aminés

L'utilisation de la synthèse en phase solide permet d'obtenir une extrémité N-terminale libre après une dernière déprotection. Les résines BHA permettent d'avoir un C-terminal amide alors que les résines PAM permettent d'obtenir une extrémité carboxylée. La rapidité de synthèse, de même que la facilité des changements de solvants et d'isolation des peptides de leur support de résine, constituent les principaux avantages de cette méthode.

La difficulté des synthèses vient de la complexité des acides aminés et du nombre d'étapes réactionnelles nécessaires. On utilise donc les groupements protecteurs sur les chaînes latérales pour atténuer ce problème. Les principaux groupements protecteurs sont: Asp(OcHex), Glu(OcHex), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Arg(N^G-tosyle), Lys(2-ClZ), Cys(4-MeBzl ou AcM), His(N^{im}-tosyle), Trp(For). (tableau 3) Les autres chaînes latérales restent habituellement non protégées (Barany et Merrifield, 1980). Les acides aminés sont de configuration absolue L sauf pour la D-Val employée pour un analogue spécifique.

1.3 Méthode de synthèse peptidique

La synthèse de peptide sur phase solide débute avec un support réticulé auquel est fixé, par un lien ester, le groupement carboxyle de l'acide aminé C-terminal du peptide recherché. Les acides aminés sont ainsi ajoutés par étapes pour aboutir au peptide protégé complet. Le peptide est alors séparé du support et les groupements protecteurs sont simultanément éliminés lors du clivage (Stewart et Young, 1984). (tableau 4)

Le schéma de protection orthogonal via les acides aminés-Boc est basé sur la puissance des réactifs employés. Ainsi le Boc est labile dans le TFA alors que les groupes protecteurs des chaînes latérales sont éliminés par un acide fort (le HF) (Stewart et Young, 1984).

1.3.1 Déprotection des acides aminés

La résine BHA.HCl nécessite préalablement une étape de neutralisation de l'hydrochlorure avant de procéder au couplage d'acides aminés. La résine baigne 15 minutes dans du CH₂Cl₂ avec 5% DIEA avant de subir 2 lavages au CH₂Cl₂. Elle sera ainsi neutralisée permettant un premier couplage d'acide aminé. Deux étapes permettent de retirer le groupement Boc. Tout d'abord, la solution de TFA est ajoutée sous azote pour 5 min puis

Tableau 3 : Description des principaux groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés multifonctionnels utilisés lors de la synthèse des analogues de la Big-ET-1

acides aminés	groupement protégé	Groupements protecteurs		
		nom	abréviations	structure
Asp, Glu	w-COOH	cyclohexyle	OcHex	C ₆ H ₁₁
Cys	β-SH	acétamidométhyle	Acm	CH ₃ CONHCH ₂ -
		méthylbenzyle	MBzl	CH ₃ - C ₆ H ₄ - CH ₂ -
His	NH aromatique	p-toluène sulfonyle	Tos	CH ₃ - C ₆ H ₄ - SO ₂ -
Lys	w-NH ₂	2-chlorobenzyle oxycarbonyle	2-ClZ	Cl-C ₆ H ₄ -CH ₂ OCO-
Ser	β-OH	benzyle	Bzl	C ₆ H ₅ - CH ₂ -
Trp	NH aromatique	formyle	For	CHO-

le réacteur est drainé au moyen d'une pression d'azote. La seconde étape, identique, se poursuit durant 20 min. La déprotection est réalisée au moyen de TFA 40%/CH₂Cl₂. Les résines PAM déjà porteuses d'un résidu d'acide aminé via un groupe phénylacétamidométhyle sont directement déprotégées avec 40% TFA dans CH₂Cl₂ en 20 minutes pour les préparer au couplage.

1.3.2 Couplage

Pour le couplage d'un acide aminé, les résines sont préparées par 2 lavages au CH₂Cl₂. Un lavage à l'éthanol est employé afin de comprimer la résine et extraire le maximum de solvant. Finalement, 1 lavage au CH₂Cl₂ et 1 lavage avec du DMF changent le milieu de réaction. Par la suite, 3 équivalents d'acide aminé-Boc et 3 de BOP sont dissous dans un minimum de DMF en présence de 4 équivalents de DIEA. La solution obtenue est alors ajoutée au réacteur et agitée sous azote pendant 45 min. Après ce délai, le DMF permet un premier rinçage suivi de 2 lavages au CH₂Cl₂ pour éliminer l'excès de réactif.

Cette séquence de déprotection-couplage se répète jusqu'à l'assemblage complet du peptide. Lorsque le peptide est entièrement synthétisé, une déprotection finale retire le groupement Boc en N-terminal. Le peptide-résine est retiré du réacteur et rincé avec du méthanol avant d'être séché sous vide.

Il faut noter qu'avec la présence de cystéine en fin de chaîne ou de méthionine dans la séquence, il est important d'ajouter 0,5% d'éthanedithiol dans le TFA 40% lors des déprotections pour éviter les réactions secondaires (oxydations des atomes de soufre).

1.4 Clivage

1.4.1 Clivage au HF

La méthode de clivage au HF permet de séparer le peptide de la résine et simultanément d'éliminer la plupart des groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés. Des volumes de 1 mL de m-crésol et de 0,1 mL d'éthanediol par gramme de résine sont ajoutés avant d'introduire le HF (10 mL/gr de résine) dans le réacteur mis sous vide (Fournier, Wang et Felix, 1988). Avec la présence de Met dans la séquence peptidique, l'éthanthiol ajouté permet d'éviter une fois de plus les réactions secondaires. La réaction est réalisée à 0°C pendant 1 heure avec agitation. Le HF est par la suite évaporé durant environ 30 minutes. Le peptide est précipité à l'éther, trituré avec le même solvant sur un verre fritté puis filtré. Une extraction avec du TFA Biograde sépare le peptide de la résine. Le TFA est ensuite évaporé, le peptide précipité dans l'éther (1 h), filtré et séché sous vide. La congélation à -20°C garantit la conservation des peptides bruts jusqu'à la purification.

1.4.2 Clivage au TMSOTf dans le TFA

Le TMSOTf (trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle), un acide fort, permet le clivage du lien peptide-résine. Le peptide ne doit pas contenir de groupements protecteurs pour les chaînes latérales tels p-toluènesulfonyl (Tos) ou cyclohexyle sur Asp, car ceux-ci sont difficiles à éliminer par cette réaction (Grant, 1992; Otaka, 1993).

La procédure est la suivante. Le mélange est composé de 1 gr de peptide-résine, 2 gr de TMSOTf et 6,5 mL de TFA (acide trifluoroacétique). La réaction de clivage se poursuit durant 24 heures à 0°C. La neutralisation de la solution à un pH de 7 est réalisée avec le NH₄OH 50%, ce qui provoque l'arrêt de la réaction. Par la suite, on extrait le peptide au TFA Biograde, avant de procéder à 3 lavages à l'éther. Le peptide est alors lyophilisé et congelé à -20 °C pour garantir sa conservation.

1.5 Purification des peptides bruts

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) préparative sur phase inverse, avec un système Prep LC 500Å de Waters, comprenant un module PrepPak 1000 et un détecteur d'absorbance modèle 441, permet la purification des analogues de la Big-endothéline obtenus après le clivage. Le matériel à purifier (600 mg) est dissous dans 1 L d'H₂O contenant 0.06% de TFA désoxygéné 15 min au moyen d'un jet d'azote. La solution obtenue est injectée sur une colonne Deltapak C₁₈ (15µm; 300 Å) de 30 x 5.7 cm. L'élution s'effectue à l'aide d'un gradient linéaire de 0% à 100% de la solution d'acétonitrile (B) en 2.5h avec les solvants suivants: (A) H₂O (0.06% TFA) et (B) ACN 40%/ H₂O (0.06% TFA). Le débit a été fixé à 40 mL/min et la densité optique de l'éluat a été mesurée à 229 nm. Un système de HPLC analytique, muni d'un contrôleur automatisé de gradient et couplé à un spectromètre Lambda Max modèle 481 LC est utilisé pour l'analyse des fractions recueillies. Une colonne Vydac (10 µm) de phase inverse (30 x 0.39 cm) permet d'effectuer la séparation à l'aide des solvants suivants: (A) H₂O (0.06% TFA) et (B) ACN selon un mode de gradient linéaire (25 à 65% de (B) en 15 min). La mesure de l'absorbance à 230 nm permet la détection du lien peptidique. Le débit est fixé à 1,5 mL/min. Enfin, les fractions correspondant au peptide pur ont été regroupées, évaporées puis lyophilisées.

1.6 Formation des ponts disulfures

1.6.1 Cyclisation au K₃Fe(CN)₆

L'oxydation au K₃Fe(CN)₆, la méthode usuelle pour la formation des ponts disulfures, montre une faible régiosélectivité. Donc l'utilisation du groupement acétamidométhyle sur les Cys en position 1 et 15 permet d'obtenir un peptide ayant seulement 2 Cys libres (en position 3 et 11) et ainsi éliminer la création d'isomères.

Le peptide est dissous dans le TFA Biograde, puis dilué dans 3 L d'eau dégazée. Après ajustement à un pH de 8,0 avec du NH_4OH , la solution réagit avec 20 équivalents de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0,1 M) durant 30 minutes. La purification du peptide monocyclique est réalisée suite à l'ajustement du pH à 2,0 avec le TFA Biograde.

1.6.2 Cyclisation à l'iode

L'iode permet simultanément d'éliminer les groupements acétamidométhyles des cystéines 1 et 15 et de former le pont disulfure. Le peptide monocyclique est dissous dans l'acide acétique 80% dans l'eau avant l'ajout de 50 équivalents d'iode. Après 2 h, à température de la pièce, l'acide L-ascorbique, ajoutée jusqu'à décoloration, arrête la réaction. Le mélange, dilué 1 pour 100 avec du TFA 0.06%, est injecté sur une colonne HPLC préparative tel qu'indiqué précédemment.

1.7 Déformylation

Le groupement formyle a servi à protéger le groupement indole du Trp²¹ d'une éventuelle oxydation. Il a été important d'éliminer celui-ci pour obtenir le peptide désiré. Le protocole suivant a permis la déformylation d'échantillons de l'analogue cyclique de la Big-endothéline-1. Une solution aqueuse 0,1 N de pipéridine est dégazée 15 min à 0 °C et le peptide ajouté à raison de 1 mg pour 3 mL de solution. La réaction se poursuit durant 30 min; un refroidissement rapide par congélation de la solution dans de l'azote liquide l'arrête. Le solvant est éliminé par lyophilisation. Enfin, 2 ou 3 autres lyophilisations, selon le cas, avec dissolution du peptide dans l' H_2O sont nécessaires pour obtenir un produit blanc amorphe. La déformylation produit un déplacement de quelques secondes du temps de rétention sur HPLC analytique.

1.8 Test de réduction au NH₄I

Ce test sert à déterminer s'il y a eu oxydation de la méthionine présente dans le peptide. Le peptide dissous dans 5 mL de TFA Biograde est ajouté à 20 équivalents de NH₄I. La réaction est activée en mettant 20 équivalents de diméthylsulfure (DMS). Elle se poursuit pour 30 minutes à 0°C. Le produit est ensuite évaporé à sec avant d'être dissous à nouveau dans le TFA 0,06%. Il est finalement mis au lyophilisateur pour être ultérieurement analysé sur HPLC analytique.

2.0 Caractérisation des analogues

2.1 Test de Kaiser

Un test qualitatif à base de ninhydrine, décrit par Kaiser et al., évalue le degré de couplage (Kaiser et al., 1970). Le mélange est constitué de 2 gouttes de KCN (2 mL KCN 0,001M dans 100 mL de pyridine), de 2 gouttes de phénol (80 g phénol dans 20 mL d'éthanol), 4 gouttes de ninhydrine (500 mg dans 10 mL d'éthanol). La résine est ajoutée à cette solution et chauffée 5 minutes. Une coloration bleue de la solution indique des groupements amines libres présents en solution. Une coloration jaune permet de conclure que le couplage est adéquatement complété.

2.2 Méthodes sur HPLC analytique

Un HPLC analytique permet de soumettre l'ensemble des dérivés à des mesures de pureté. Une colonne Pep-S Super Pac (5µm) (25 x 0.4 cm) de Pharmacia, reliée à un système formé d'un contrôleur 600E de Waters et d'un détecteur d'absorbance ajustable modèle 484 a rendu possible la chromatographie. Le détecteur était réglé à 230 nm. Le système utilise les éluants (A) H₂O (0.06% TFA) et (B) ACN avec un gradient de 25 à 65 % de (B) en 25 min pour un débit de 1 mL/min.

3. Évaluation enzymatique de la Big Endothéline

3.1 Solvants et réactifs

L'étude des cinétiques de l'enzyme de conversion est réalisée dans le tampon Hepes. Les différents inhibiteurs (pepstatine A, fluorure de phénylméthylsulphonyle (PMSF) et acide chloromercuriphénylsulphonique) et le tampon proviennent de Aldrich (Milwaukee, WI) alors que le sucrose a été acheté chez Fisher (Montréal, QC). Le dosage de protéines a été réalisé avec un système de dosage de Bradford incluant le standard de BSA (albumine bovine sérique) et le réactif de Dye provenant de Bio-Rad (Richmond, CA). Le phosphoramidon, le Triton X100 et le détergent CHAPS ont été achetés chez Sigma (St-Louis, MO).

3.2 Isolation de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE)

Le poumon représente une bonne source de ECE sensible au phosphoramidon. Le poumon de boeuf frais a été solubilisé dans 7 volumes de tampon et homogénéisé au mélangeur biologique (60 sec). Le tampon Hepes 10 mM contient 1 mM de PMSF pour empêcher la dégradation par les sérine-protéases, 1 mM de p-chloromercuriphénylsulphonate pour les autres métalloprotéases, 0,01 mM de pepstatine A pour les protéases acides et 0,25 M de sucrose pour stabiliser le cocktail d'inhibiteurs (tampon A). Le tampon Hepes est idéal car il maintient un pH de 7,31 à 37 °C et se lie très peu aux métaux.

Le tissumizer Tekmar MC-15 a permis une homogénéisation plus fine. La solution a été centrifugée par 2 fois à 1000 g (10 min) afin de récupérer le surnageant. Le processus a permis d'éliminer le culot contenant les cellules non brisées et les grosses particules cellulaires.

La centrifugation à 100 000 g (60 min) a permis d'isoler ECE lié aux membranes qui précipitent à cette vitesse. Le culot a été lavé avec 2 volumes de tampon A avant d'être

encore centrifugé à 100 000 g (60 min.). Le culot final a été suspendu dans 1 volume de tampon Hepes 10 mM avant d'être congelé à - 80 °C.

3.3 Dosage des protéines totales de l'échantillon de ECE

Le réactif Dye, dans lequel le bleu de comassie permet la liaison aux protéines, est dilué 1 pour 4 avec de l'eau bidistillée. Les standards de BSA servent pour étalonner la courbe normale des concentrations en fonction de l'absorbance (0,2 à 0,9 mg/mL). Ainsi 100 µL de standard et d'échantillon (dilué 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/40, 1/80, 1/160) sont ajoutés à 5 mL du réactif Dye et incubés 5 minutes à 22°C. L'absorbance à 595 nm permet, par comparaison à la courbe standard, de retrouver la quantité de protéines totales en solution.

3.4 Dosage de l'activité de ECE

Environ 20 µg de protéines sont incubées avec 0,4 mL de tampon Hepes avec les inhibiteurs (tampon A) pour 30 minutes à 37 °C. L'ajout de 100 µg de Big endothéline/mL de solution déclenche la réaction qui se poursuit à 37 °C pour le temps de cinétique soit 0 minute à 4 h. La réaction est arrêtée en incubant l'échantillon 10 minutes à 100°C. Une centrifugation à 16 000 g (5 minutes) permet d'éliminer le sel et les petites particules avant l'analyse sur HPLC.

3.5 Analyse de la durée de l'arrêt de la réaction

L'effet de l'ébullition sur une possible dégradation de la Big-ET a été testé. Les milieux d'analyse étaient: premièrement, la solution usuelle (20µg de protéines et 100 µg de Big-ET dans le tampon A), deuxièmement, un milieu sans inhibiteurs (20µg de protéines et 100 µg de Big-ET dans le tampon Hepes seul) et troisièmement un mélange sans enzyme (100 µg de Big-ET dans le tampon A). L'incubation à 37°C s'est poursuivie durant 1 h. La

cinétique de l'arrêt de la réaction s'étend de 0 à 10 minutes par intervalles de 2 minutes. Les échantillons sont centrifugés à 16 000 g et analysés sur le système HPLC.

3.6 Analyse de l'effet du détergent CHAPS

L'enzyme membranaire a été isolée grâce à l'utilisation du CHAPS, un détergent doux. Ainsi, 20 mM de CHAPS est préalablement incubé pendant 20 minutes, avec 20 µg de ECE membranaire, à 4°C. Par la suite, le mélange est équilibré avec 0,4 mL de tampon Hepes avec les inhibiteurs (tampon A) pour 30 minutes à 37°C. L'ajout de 100 µg de Big endothéline/mL de solution déclenche la réaction qui se poursuit à 37 °C pour la cinétique de réaction soit de 0 minute à 1 h. La réaction est arrêtée en incubant l'échantillon 10 minutes à 100°C.

L'utilisation des colonnes Sep-Pak-C18 s'est avérée nécessaire pour éliminer le CHAPS avant l'injection dans le système HP. La résine de la mini-colonne a été préparée avec 2 mL de TFA 0.06% suivi de 5 mL d'eau distillée car l'adsorption a lieu dans un milieu aqueux. Le mélange est versé sur le haut de la colonne. Le premier lavage a lieu avec le TFA 0.06% (1mL) avant de récolter le produit recherché avec 1 mL d'acétonitrile (ACN) à diverses concentrations (40%, 50 % et 60%). Par la suite le surplus d'ACN doit être évaporé pour parachever le processus. Finalement, une centrifugation 16 000 g (5 minutes) élimine le sel et les petites particules, ce qui permet l'analyse sur HPLC.

3.7 Analyse de l'effet du phosphoramidon

Le phosphoramidon est le principal inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'endothéline. Ainsi, selon l'étude de Plumpton, une concentration de 10^{-4} M réduit significativement la production d'endothéline (Plumpton et al., 1994). Cette concentration de phosphoramidon a donc été ajoutée à notre aliquot pour analyser la présence ou l'absence d'endothéline endogène. Par la suite, les composants demeurent identiques à ceux employés

lors des cinétiques enzymatiques sauf que la réaction est arrêtée au temps 0 pour être directement analysée par le système HP.

3.8 Méthode d'analyse sur le système HPLC

Le système HPLC est constitué d'un système de pompage et d'injection Hewlett Packard 1050 automatique reliés au programme d'ordinateur HP CHEM sur WINDOWS. Le détecteur d'absorbance Hewlett Packard effectue ses lectures à 229 nm. Une colonne Vydak C18 (10 μ m) est employée pour la séparation des composants. Le conditionnement de la colonne est réalisé à l'aide d'un gradient de 100% ACN à 100% TFA 0,06% d'une durée de 18 minutes. Le débit est réglé à 0,5 mL/min.

Pour les analyses, la méthode employée est d'une durée de 60 minutes avec un débit de 0,5 mL/min. Le solvant passe de 0% d'ACN dans le TFA 0.06% à 35% d'ACN en 15 minutes. Celui-ci reste à ce niveau pour 15 minutes avant de passer à 65% d'ACN encore en 15 minutes. Finalement, le retour aux conditions initiales se réalise en 15 minutes.

Pour l'intégrateur automatique, seulement l'intervalle de temps entre 15 et 39 minutes est analysé. La valeur de rejet pour l'aire sous la courbe est fixée à 5 et la valeur de la largeur initiale pour les pics est de 0,030.

L'étape finale de la séquence analysée est le nettoyage de la colonne et son entreposage. Celle-ci est réalisée sur une période de 60 minutes à un débit de 0,5 mL/min. Le gradient passe de 100% de TFA 0,06% à 80% d'ACN en 8 minutes. Il reste 20 minutes à ce niveau et passe à 100% d'ACN en une minute pour y rester jusqu'à la fin des 60 minutes. La dernière programmation permet de mettre le débit à 0 mL/min pour l'entreposage.

Résultats

4. Synthèse et purification de la Big-ET-1(1-39)

Le nombre d'acides aminés dans la séquence de la Big-ET-1 complique sa synthèse. Ainsi le chromatogramme de la figure 11, obtenu suite au clivage au HF, montre un pic majeur à 10,04 min). On observe aussi plusieurs pics de produits secondaires. Suite à une première purification, la Big-ET-1(1-39) linéaire a été isolée à 12,3 min mais les produits secondaires n'ont pas tous été éliminés. (figure 12) La cyclisation au $K_3Fe(CN)_6$ permet la formation du premier pont disulfure entre les Cys 3 et 11. La figure 13 dévoile un pic majeur à 12,64 min ayant une pureté relative de 55%. La Big-ET-1 (1-39) monocyclique³⁻¹¹ a subi une seconde cyclisation. La cyclisation à l'iode des cystéines en position 1 et 15 a entraîné une forte dégradation du peptide. Le pic majeur à 12,58 min indique une pureté relative de 44%. On note aussi la présence d'un épaulement à 13,04 min. (figure 14) Alors la Big-ET-1(1-39) bicyclique a due être purifiée à nouveau. Dans la figure 15, le chromatogramme montre un pic majeur à 10,6 min qui ne représente que 35% de pureté relative . L'étude d'oxydation des résidus méthionine réalisée avec le NH_4I , s'est révélée négative pour ce peptide.

Une nouvelle synthèse de la Big-ET-1(1-39), avec cette fois un groupement formyle sur le Trp, a été réalisée. Le peptide a été clivé et analysé par HPLC analytique. On observe, sur la figure 16, un pic significatif à 10,28 min correspondant. Un second type de clivage a été testé simultanément. Le clivage au TMSOTf entraîne une très forte dégradation de la Big-ET-1(1-39) (Trp-^{F₀}). Ainsi, aucun pic significatif ne peut être observé du chromatogramme de la figure 17.

La quantité de Big-ET-1(1-39) (Trp-^{F₀}) idéale pour l'injection sur la colonne a été vérifiée afin d'optimiser la purification. La figure 18 permet la comparaison entre 3 quantités de substrat soit: 0,7, 1,5 et 1,75 grammes. La partie correspondant à 0,7 g indique un pic majeur (55%) à 12,6 min avec une présence de multiples pics secondaires. Avec 1,5 g

Figure 11: Analyse sur HPLC analytique de la pureté du clivage au HF de la Big-ET-1 (1-39)

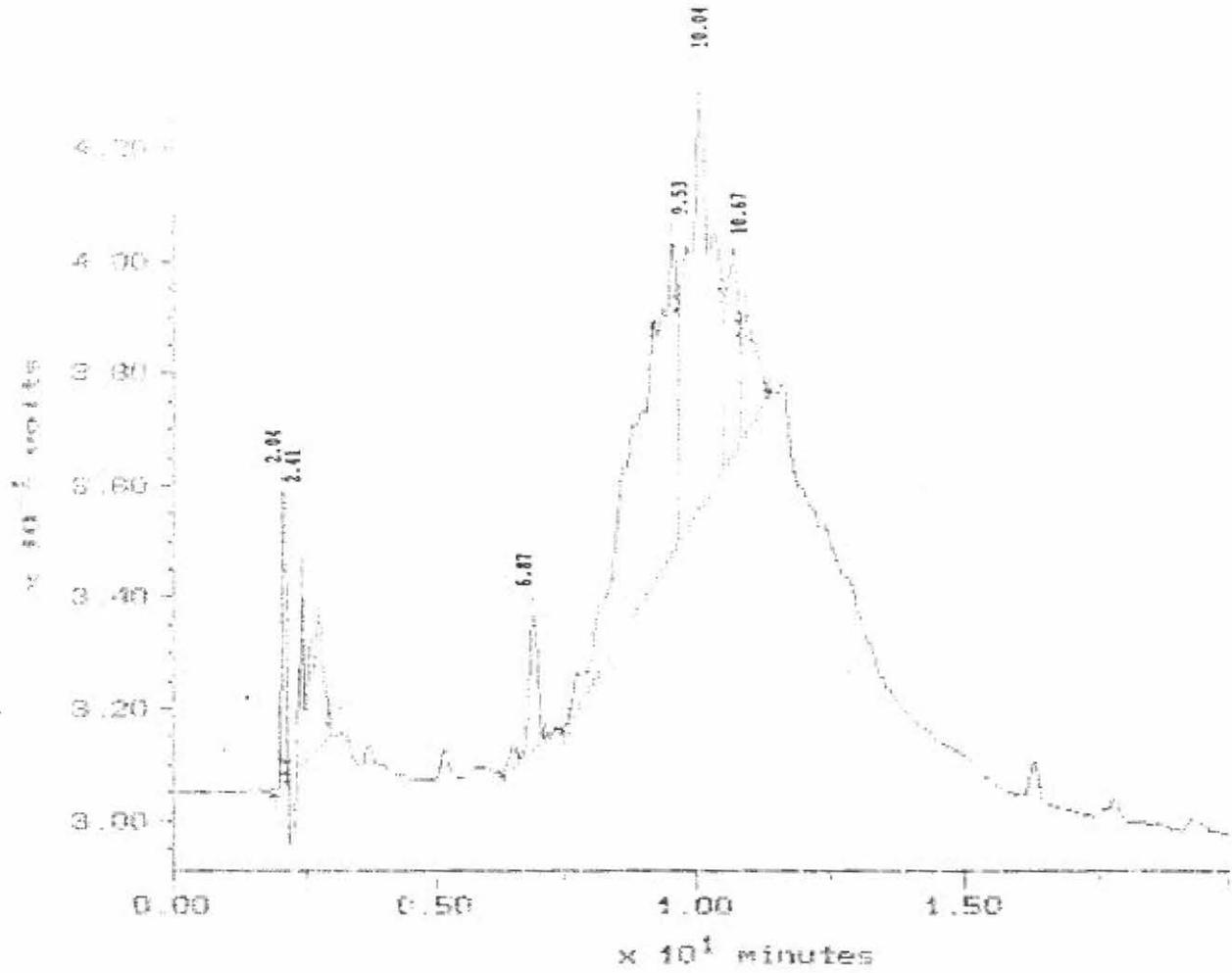


Figure 12: Analyse de la pureté de la Big-ET-1 (1-39) linéaire sur HPLC analytique

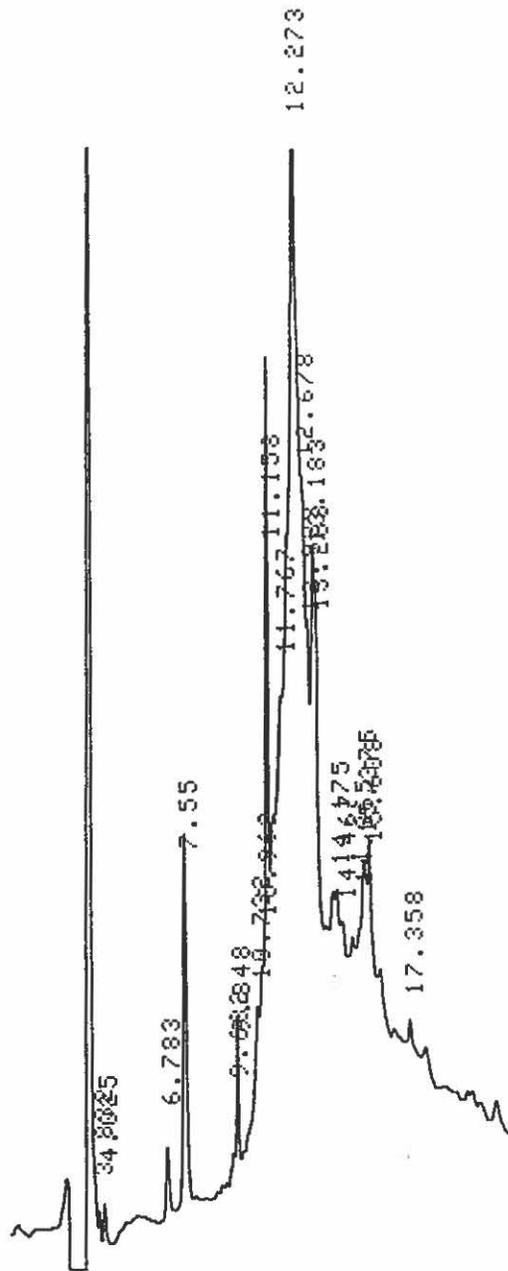


Figure 13: Chromatogramme de la Big-ET-1 (1-39) linéaire après la cyclisation au $K_3Fe(CN)_6$

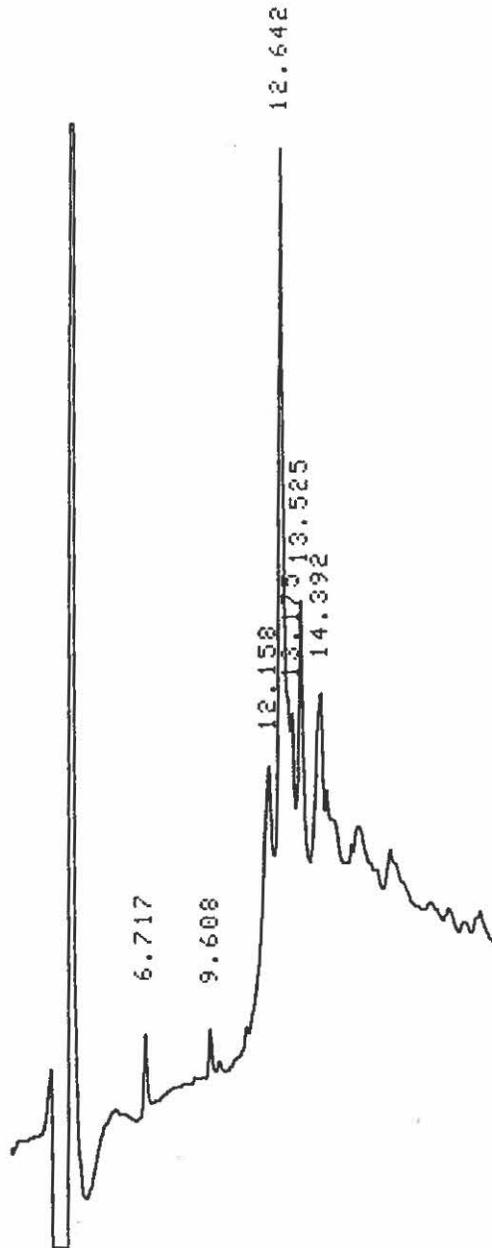


Figure 15: Analyse de la purification finale de la Big-ET-1 (1-39) bicyclique par HPLC analytique

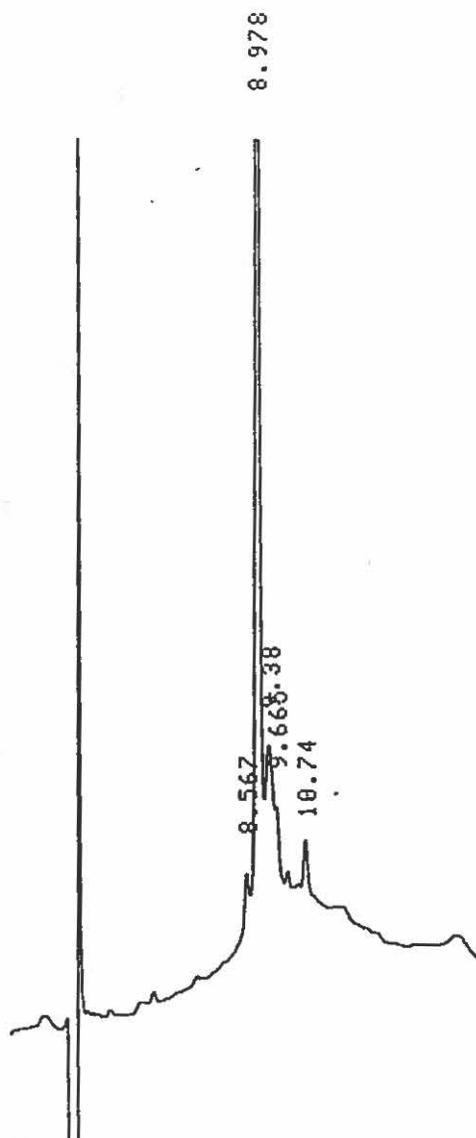


Figure 17: Analyse par HPLC des résultats du processus de clivage au TMSOTf de la Big-ET-1 (1-39)(Trp^{For})

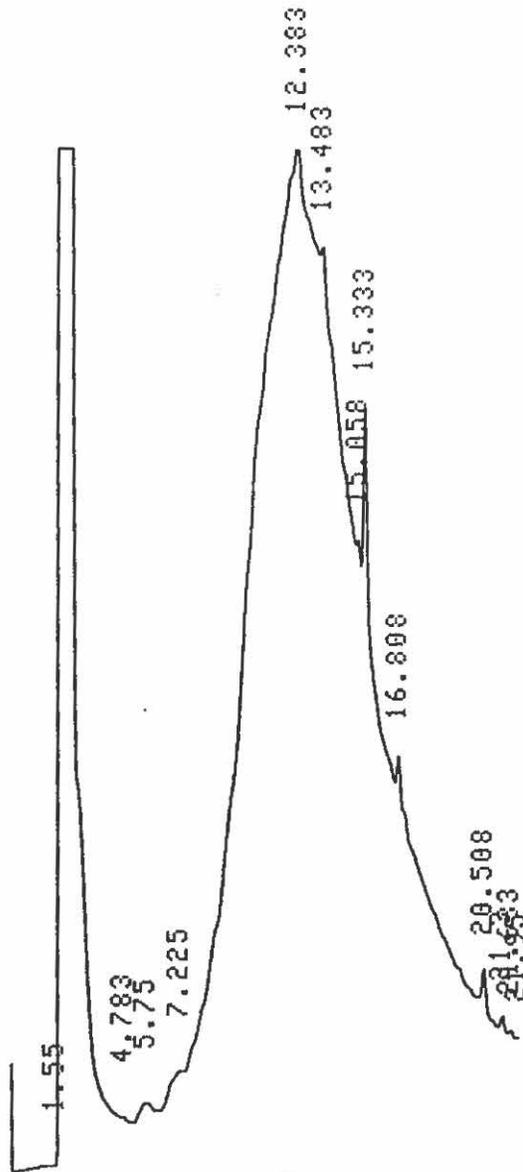
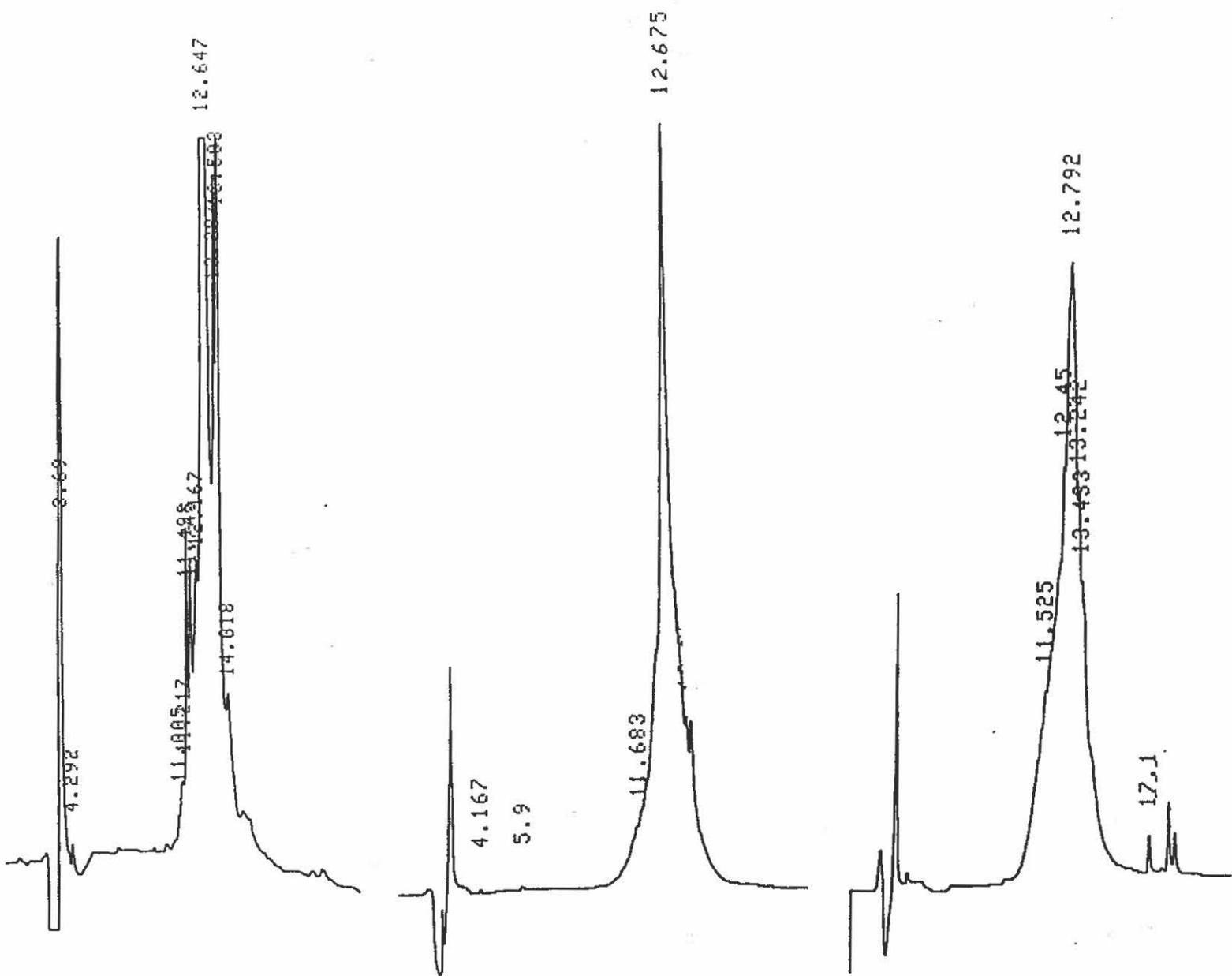


Figure 18: Analyses des purifications de la Big-ET-1(1-39)(Trp^{For}) linéaire par HPLC préparative selon la quantité injectée (0,7, 1,5 et 1,75 g de peptide) sur une colonne DeltaPak C₁₈ (15μ)



injecté, le pic majeur est plus significatif avec 83% de pureté relative. L' injection de 1,75g de produit montre un pic majeur à 12,8 min ayant plusieurs épaulements secondaires.

Les cyclisations de la Big-ET-1(1-39) (Trp-^{For}) linéaire débutent avec la réaction au $K_3Fe(CN)_6$ sur les cystéines en position 3 et 11. La figure 19 montre clairement un seul pic (97%) à 11,17 min qui correspondrait à la Big-ET-1(1-39) (Trp-^{For}) monocyclique. La cyclisation à l'iode permet par la suite la formation du pont disulfure entre les cystéines 1 et 15. Le chromatogramme de la figure 20 indique la pureté relative de la Big-ET-1(1-39) (Trp-^{For}) bicyclique. Ainsi le pic majeur (76%) apparaît à 8,98 min.

Le traitement de la Big-ET-1(1-39) (Trp-^{For}) avec la pipéridine permet de former le peptide désiré en éliminant le groupement protecteur formyle. Le chromatogramme permet d'observer un peptide pur à 67% ayant un temps de rétention à 8,94 min. (figure 21) Une réaction au NH_4I est réalisée afin de confirmer que la méthionine du peptide n'est pas altérée par les méthodes de clivage et de purification. La Big-ET-1(1-39) a été purifiée à nouveau pour obtenir une pureté finale de 100%.

5. Analyses enzymatiques

Globalement, voici ce qui se produit au niveau des cinétiques enzymatiques. Notre enzyme est mise en présence du substrat (la Big-ET-1 ou ses fragments) comprenant le lien clivable Trp-Val. Suite à l'action de ECE, on obtient 2 fragments (ET-1(1-21) et le segment 22-39). Par la suite, on dose la disparition du substrat et l'apparition du produit final principal (ET-1).

La première étape, avant les essais enzymatiques, consiste à déterminer la quantité de protéines contenues dans l'extrait membranaire. Le dosage du standard de BSA (albumine bovine sérique) a permis de mesurer la concentration de protéines extraites du poumon de

Figure 19: Analyse sur HPLC de l'oxydation au $K_3Fe(CN)_6$ des Cys^{3,11} de la Big-ET-1 (1-39)(Trp^{For}) linéaire

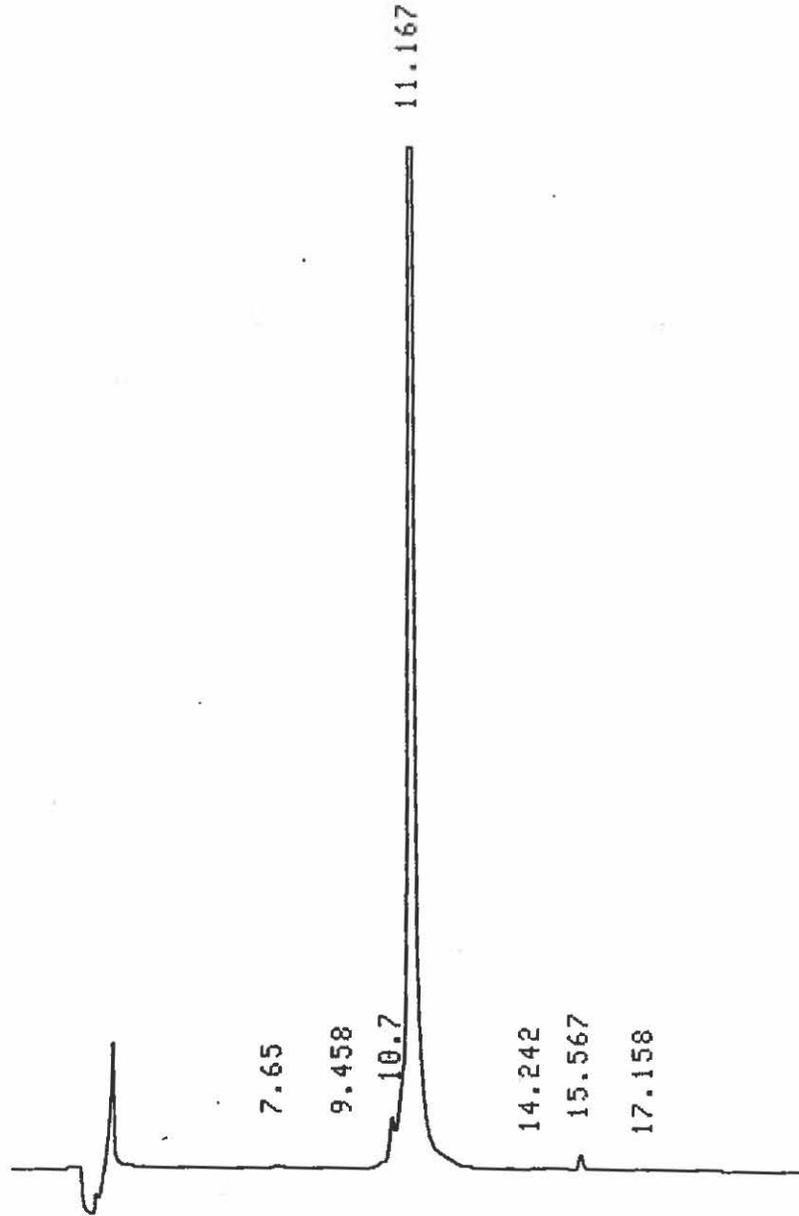


Figure 20: Analyse de la cyclisation à l'iode des Cys¹⁻¹⁵ de la Big-ET-1 (1-39)(Trp^{For}) monocyclique

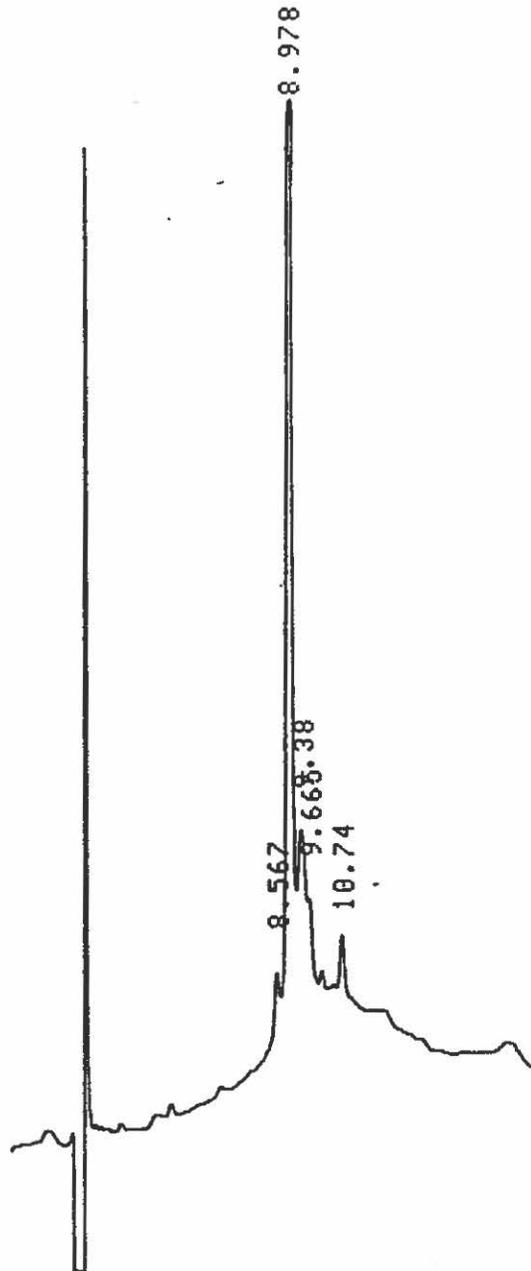
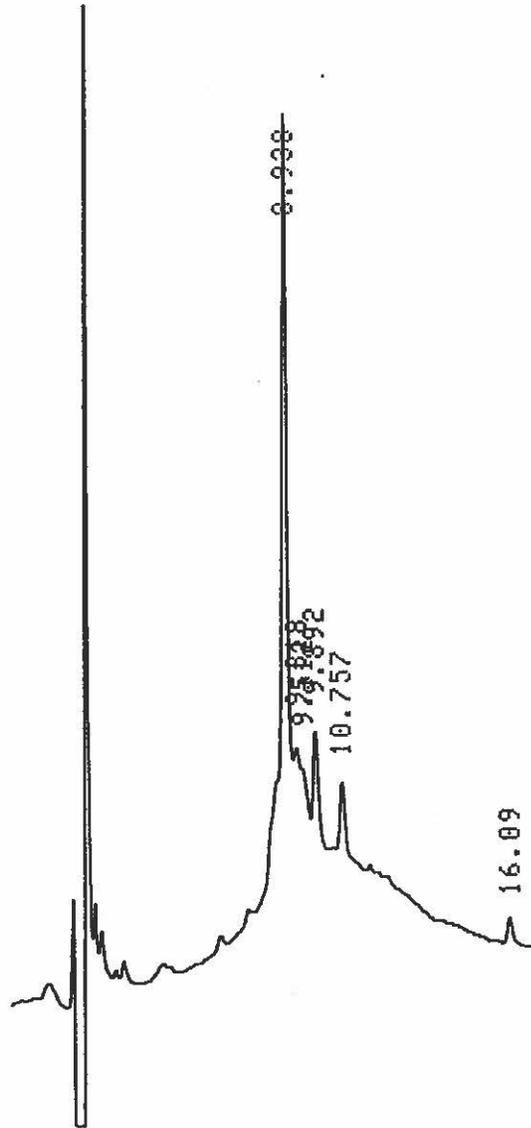


Figure 21: Analyse de la déformylation de la Big-ET-1 (1-39)(Trp^{F69}) bicyclique



boeuf. (figure 22) Par extrapolation des diverses dilutions d'enzymes, on obtient une concentration de 19,6 mg/mL d'échantillon. Les composantes de l'analyse enzymatique ont été testées séparément puis conjointement afin de déterminer leurs temps de rétention respectifs. La Big-ET-1 (1-39) est élue à 23,3 min alors que ET-1 sort à 25,2 min. (figures 23 et 24) Le mélange enzymatique apparaît après 40 min et le cocktail d'inhibiteurs quant à lui est complètement élué à 18 min.

Les étapes du protocole ont été évaluées séparément afin d'obtenir une optimisation des résultats. Une concentration de 500 µg/mL de Big-ET-1 était suffisante pour être observée sur le système HPLC. La concentration de 20 mg/mL de ECE-protéines permet une réaction adéquate. La durée d'ébullition, pour l'arrêt de la réaction enzymatique a été fixée à 10 min. On observe à la figure 25 que ce délai n'entraîne pas de dégradation significative de la Big-ET-1.

Une cinétique complète a donc été entreprise afin de déterminer l'action de ECE sur la Big-ET-1 (1-39). On observe à la figure 26 l'apparition de l'endothéline. La quantité de Big-ET-1 demeure aussi relativement stable. (figure 27) Par comparaison avec les injections standards, on remarque que c'est environ 50% de la Big-ET-1 qui demeure présente en solution. Ainsi, les aires sous la courbe sont respectivement de 1203,2 , 624,7 et 383,2 pour ET-1 à une concentration de 500 µg/mL, la Big-ET-1 du mélange et la ET-1 néoformée. La perte d'environ 20% de ET-1 peut s'expliquer par une dégradation enzymatique dans le milieu.

L'utilisation du CHAPS, détergent doux, pour libérer ECE des membranes, implique l'emploi de pré-colonnes Sep-Pak afin d'éliminer le détergent en solution. On a donc comparé les différents éluants. (figure 28) Dans le lavage au TFA 0,06%, on observe une forte présence de ET-1 à 25,6 min. Avec 40% d'acétonitrile, la Big-ET-1 et la ET-1 sont extraites. Avec 50% d'ACN, toute la Big-ET-1 a été éliminée et il reste un peu de ET-1 en solution. A 60% d'ACN, tous les peptides sont élués. C'est donc ce mélange (60% ACN) qui sera utilisé pour les analyses. On a séparé l'enzyme des membranes pour voir si l'effet de

Figure 22: Courbe standard de BSA pour le dosage de protéines par la méthode de Bradford

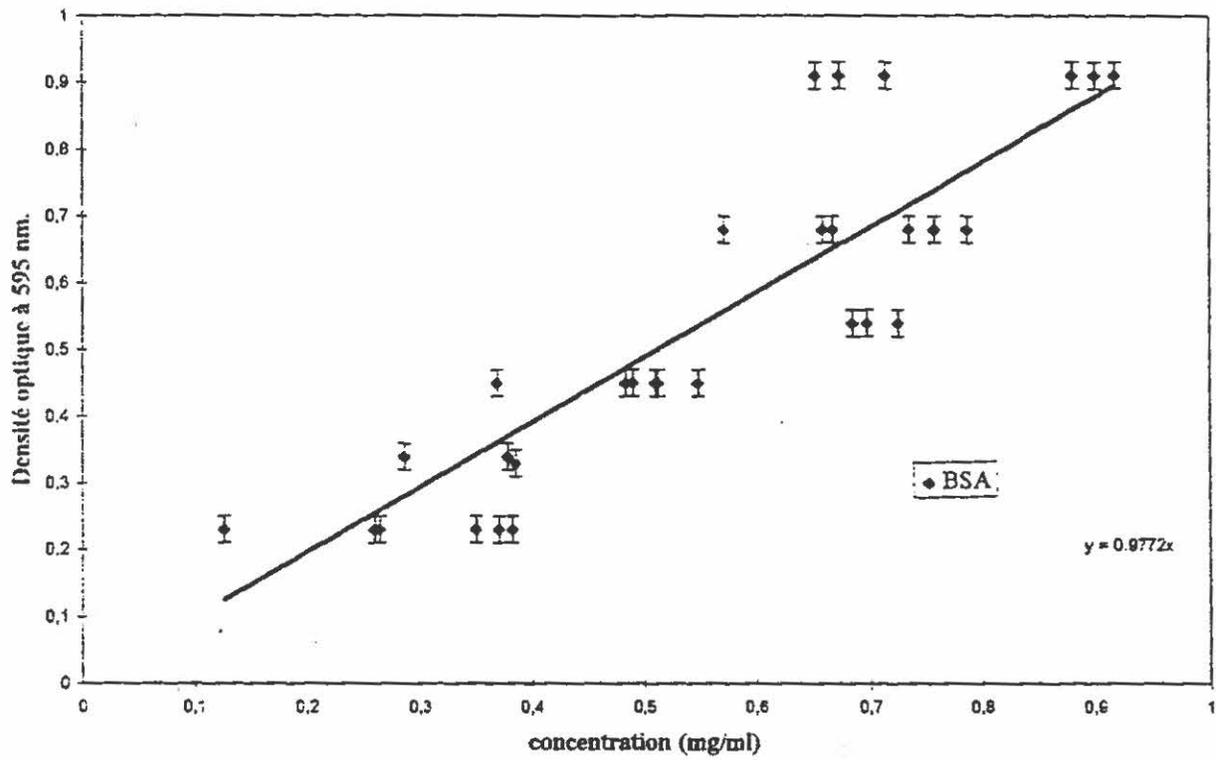


Figure 23: Analyse par HPLC des composantes isolées (A= ET-1, B= Big-ET-1 et C= Protéines-ECE) lors des cinétiques enzymatiques

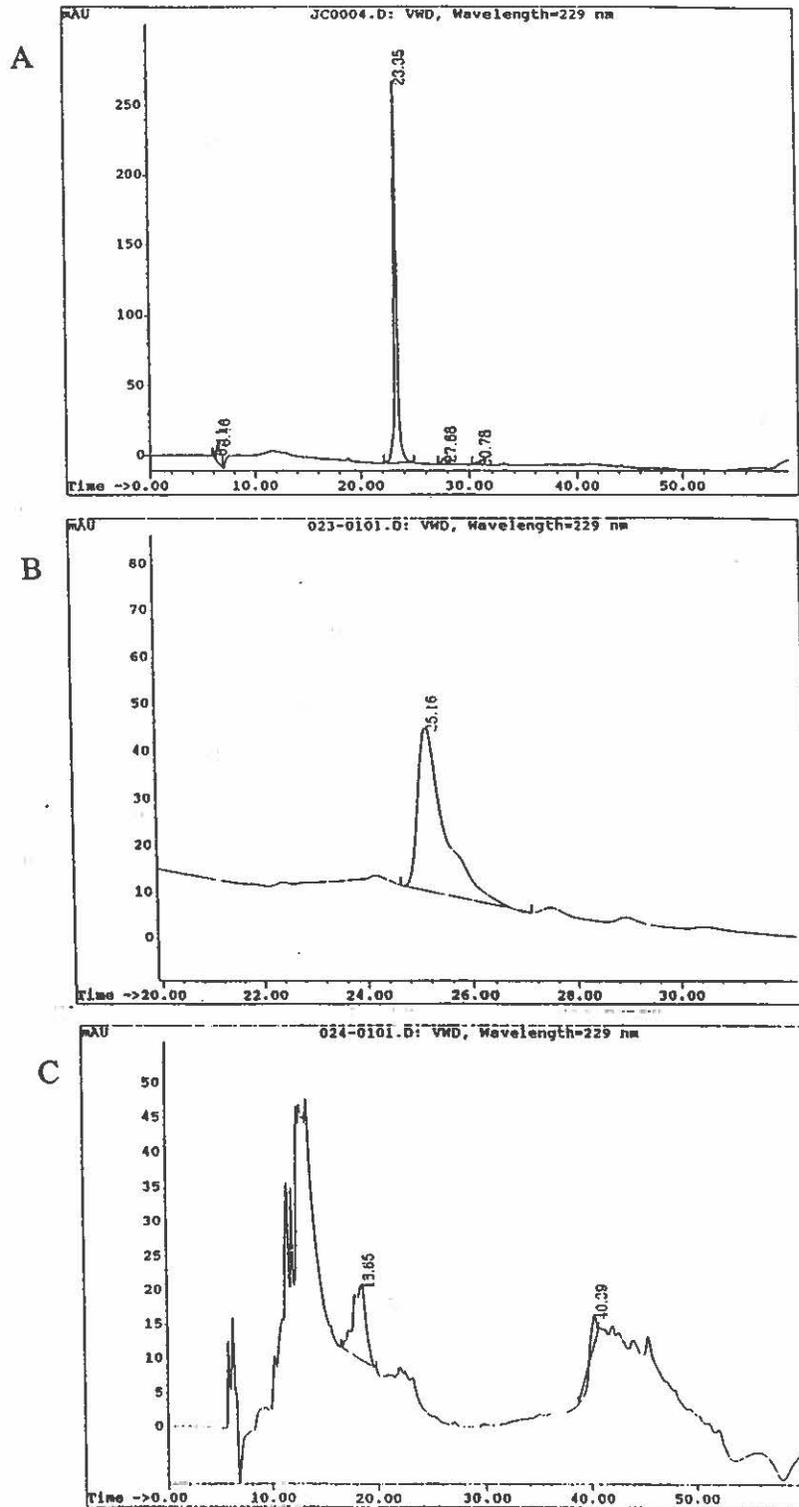


Figure 24: Co-injection sur le système HPLC de la Big-ET-1(1-39) et ET-1 dans le milieu tampon sans inhibiteur

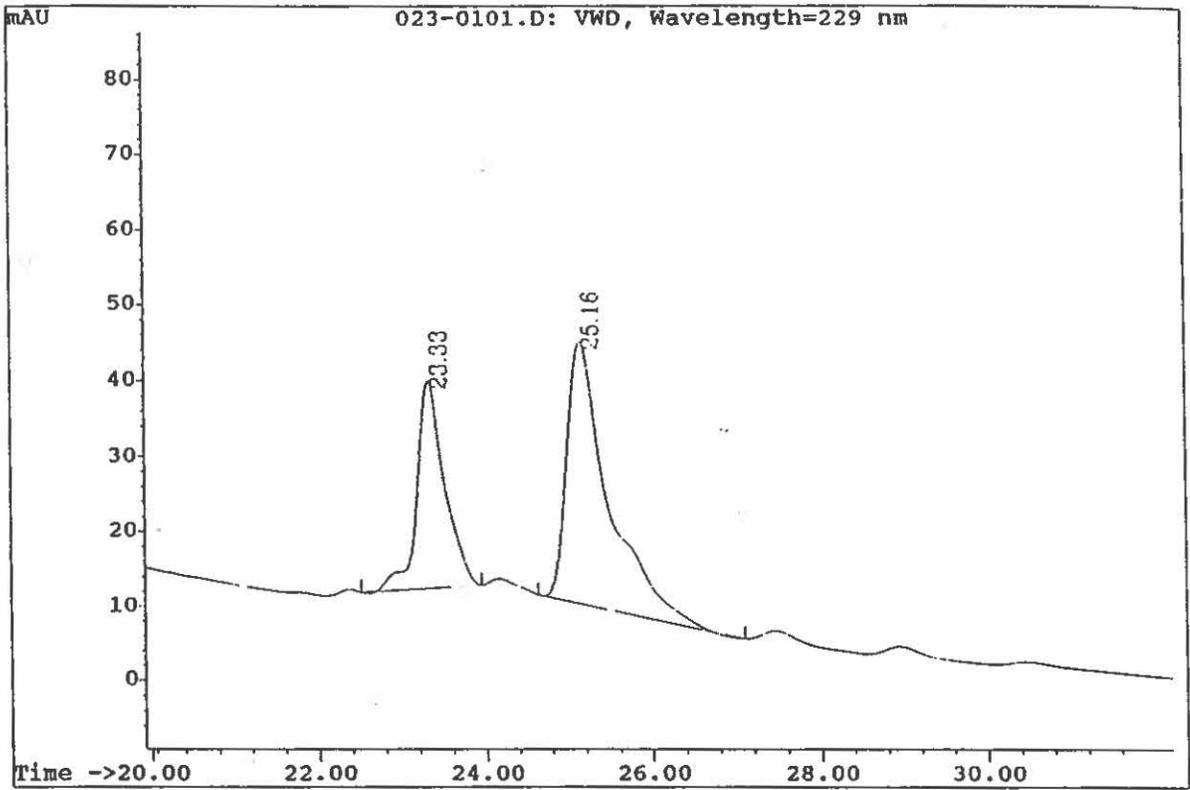


Figure 25: Analyse de l'effet de l'ébullition sur la transformation de la Big-ET-1

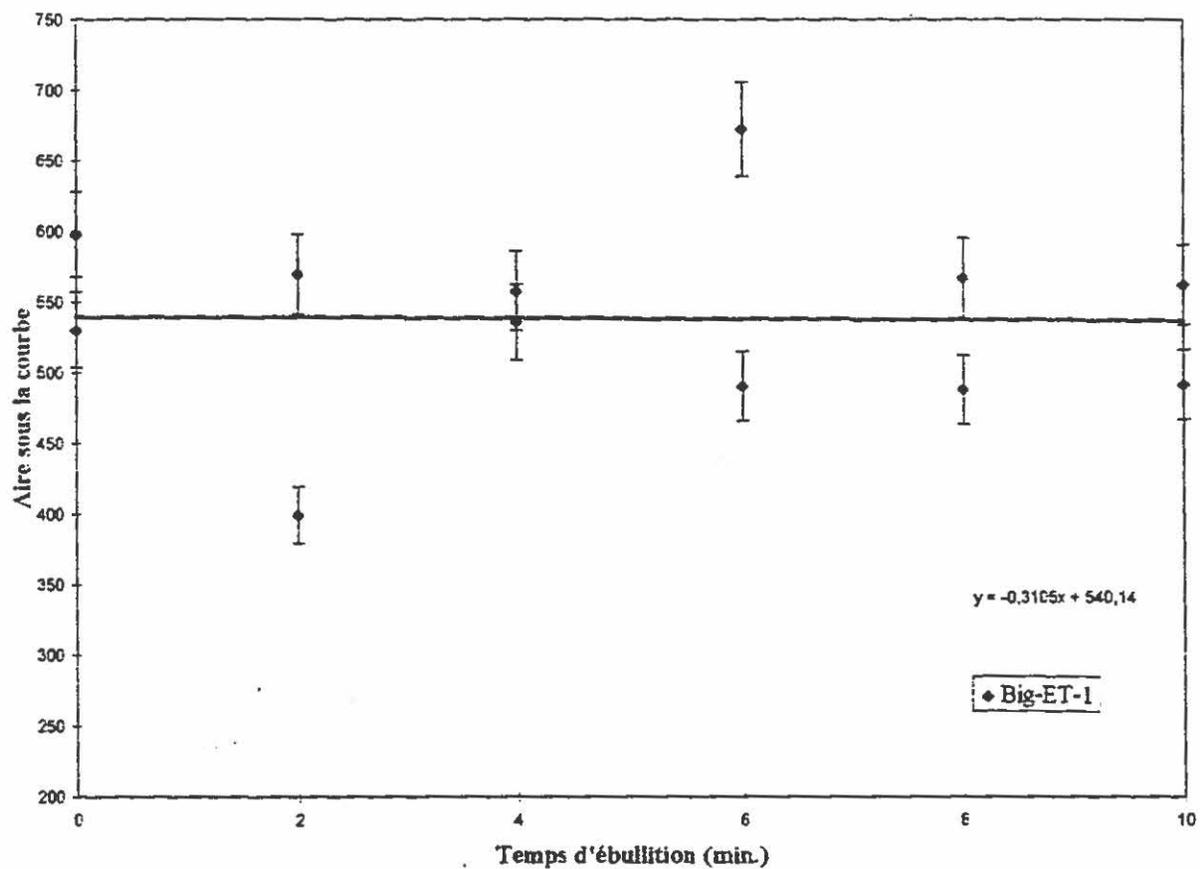


Figure 26: Analyse de la transformation des la Big-ET-1 en ET-1 au temps 0 de a cinétique

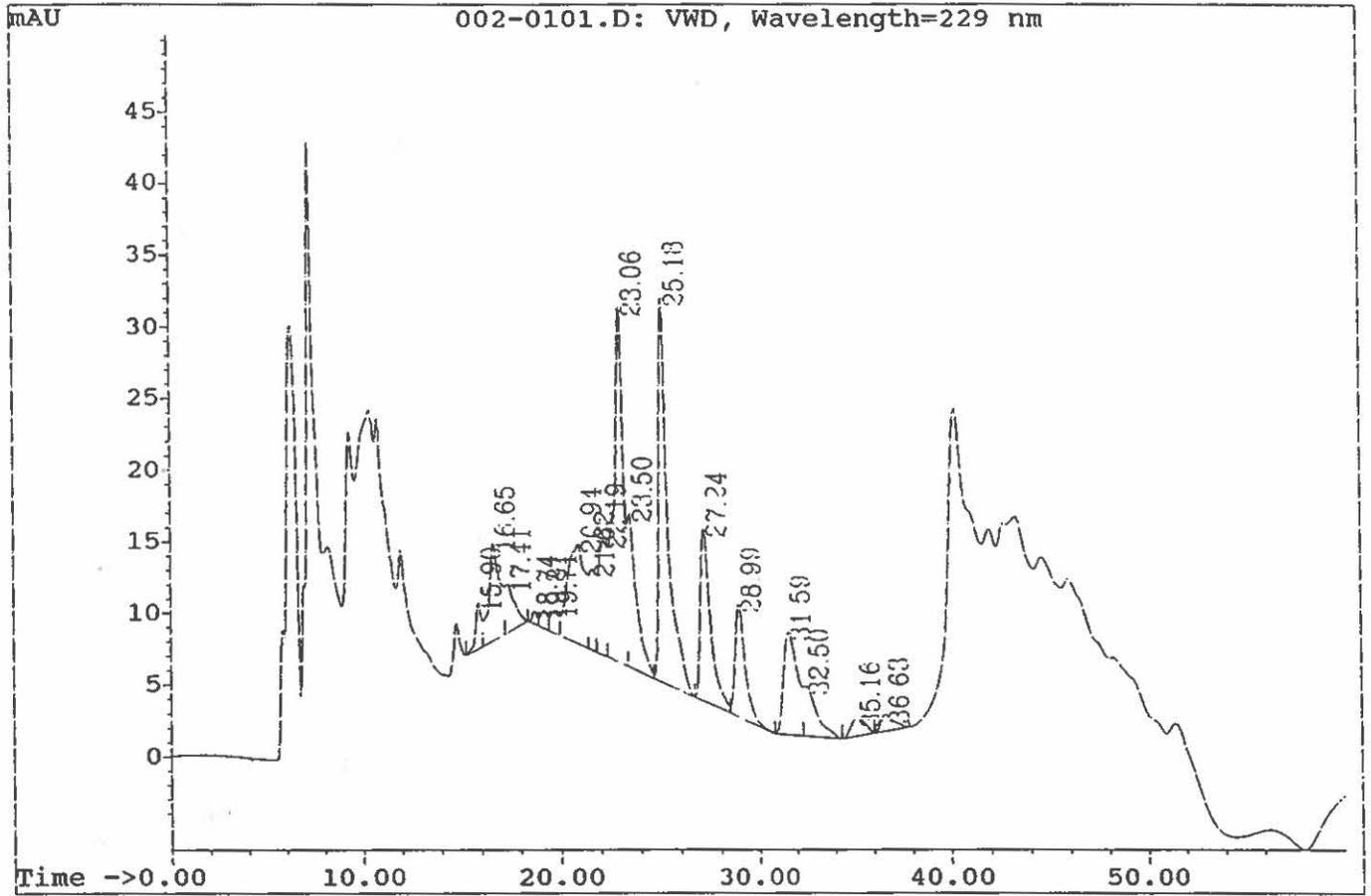


Figure 27: Cinétique enzymatique à 37 °C du clivage de la Big-ET-1 par ECE

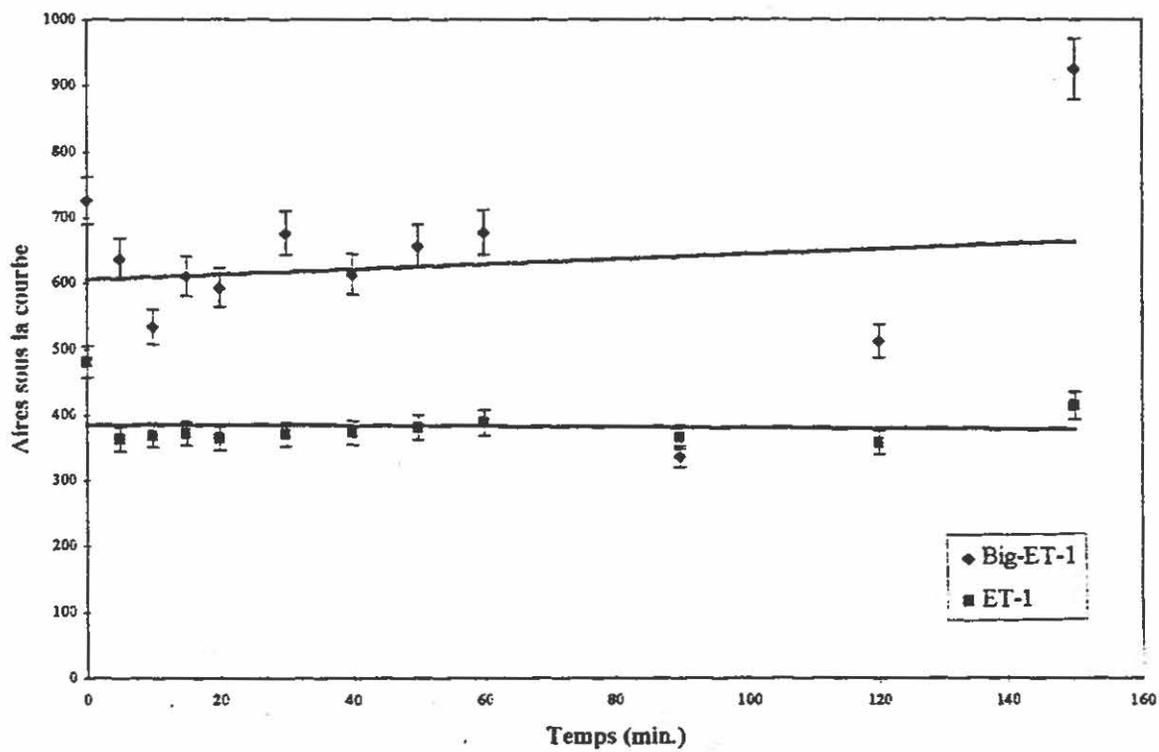
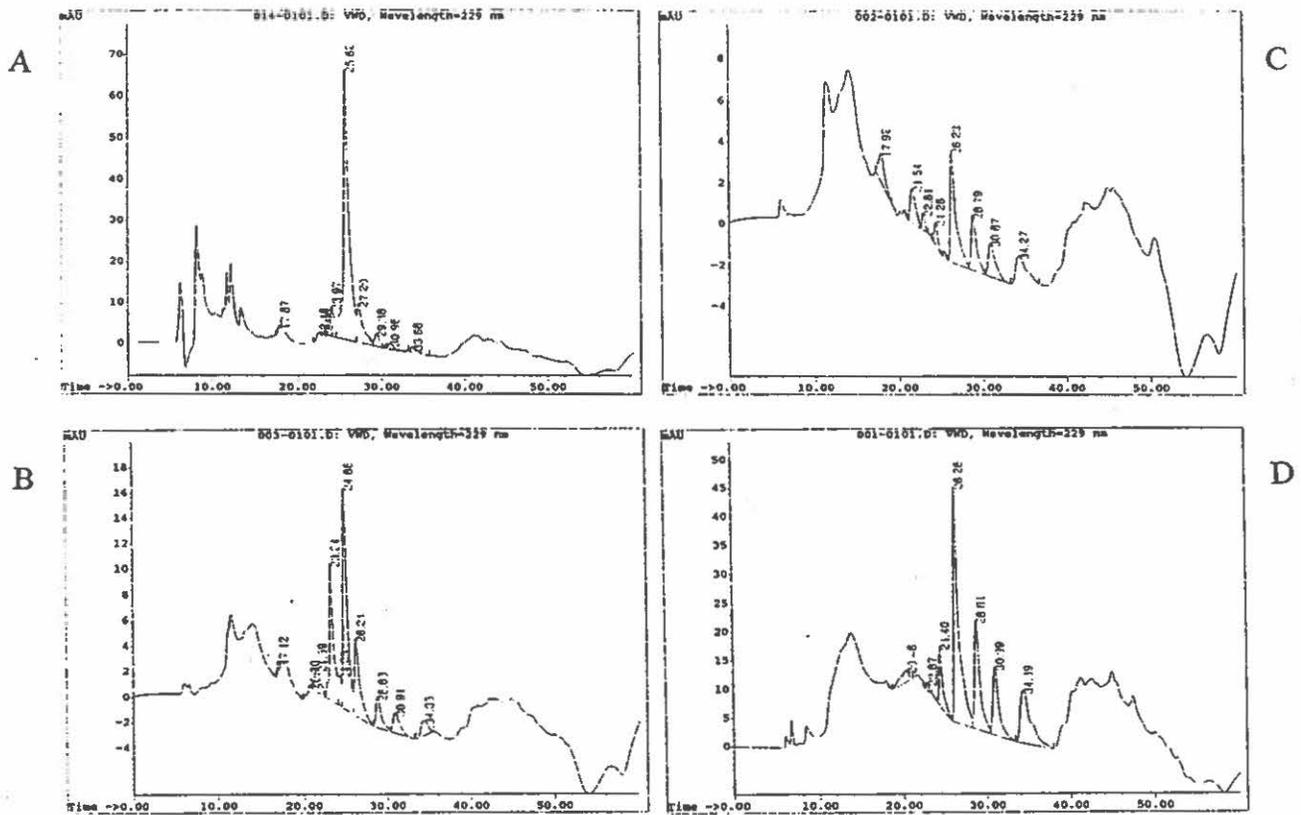


Figure 28: Analyse des éluats des colonnes Sep-Pak employées afin d'éliminer le détergent CHAPS présent dans le mélange réactionnel enzymatique (A: 0% ACN, B: 40% ACN, C: 50% ACN et D: 60% ACN)



ECE est ainsi optimisé. On observe une légère diminution de la quantité relative de ET-1 en fonction du temps et une augmentation de la Big-ET-1. (figure 29)

D'autres analyses ont aussi été entreprises afin de déterminer l'inhibition de l'enzyme par le phosphoramidon. Le chromatogramme de la figure 30 indique que la dégradation de la Big-ET-1 par ECE est inhibée par le phosphoramidon. En effet, aucune présence de ET-1 n'est notée. La figure 31 montre une réaction réalisée à 4°C. On n'observe encore aucune formation de ET-1 à partir de la Big-ET-1 présente dans le mélange.

6. Synthèse et purification des fragments de la Big-endothéline-1

Les séquences des 9 fragments synthétisés ont été sélectionnées de façon à obtenir un peptide possédant le lien de scission et une délétion des ponts cystines. (tableau 5) Suite aux différentes synthèses et aux étapes de clivage, une purification a permis d'isoler les analogues purifiés. (tableau 6) La pureté de ceux-ci varie entre 95 et 100%. Cela nous permet d'estimer que les résultats observés seront entièrement dus aux analogues. La pureté des analogues est estimée par la méthode d'HPLC analytique. Sur le chromatogramme de la Big-ET-1 (20-23), un seul pic à 10,39 min est isolé. (figure 32) L'analyse des aires sous la courbe, permet de calculer le pourcentage de pureté soit 100% pour ce cas.

Figure 29: Cinétique de ECE isolée des membranes au moyen de CHAPS

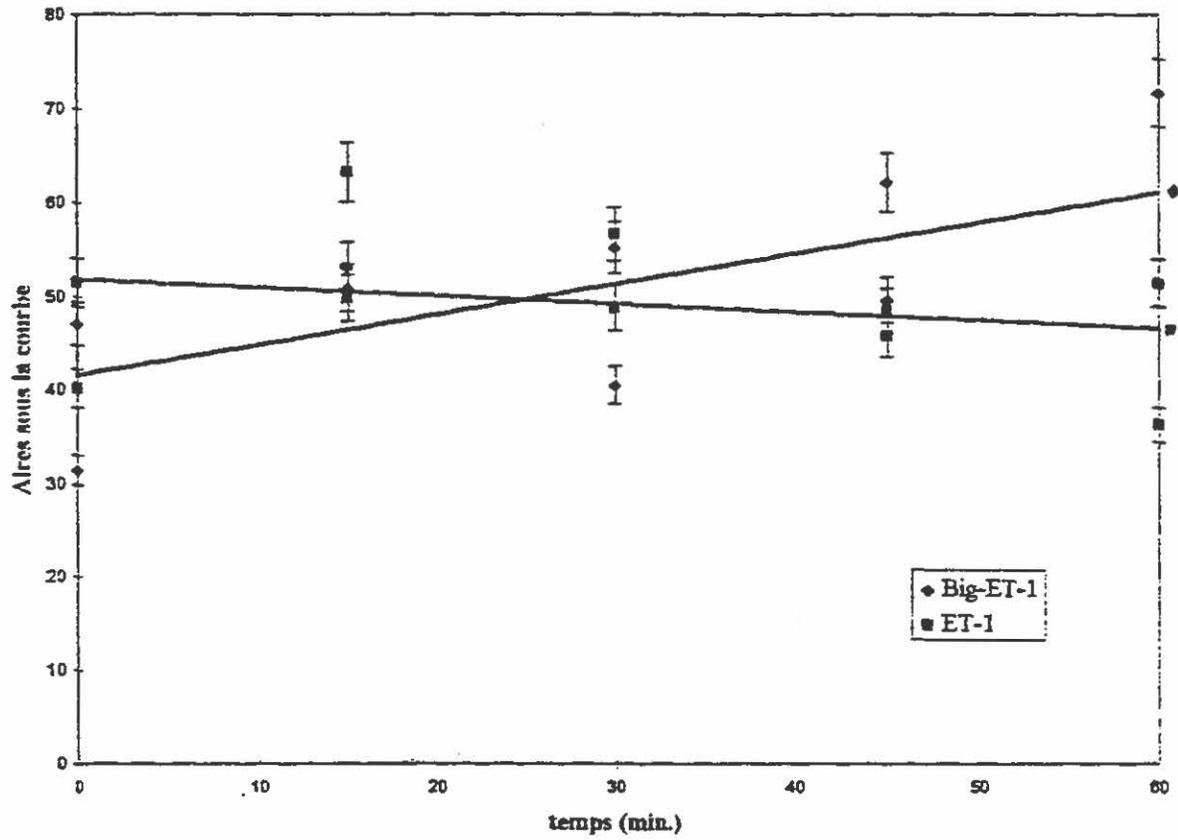


Figure 30: Analyse de l'effet du phosphoramidon sur le clivage de la Big-ET-1 (1-39) par ECE à 4°C

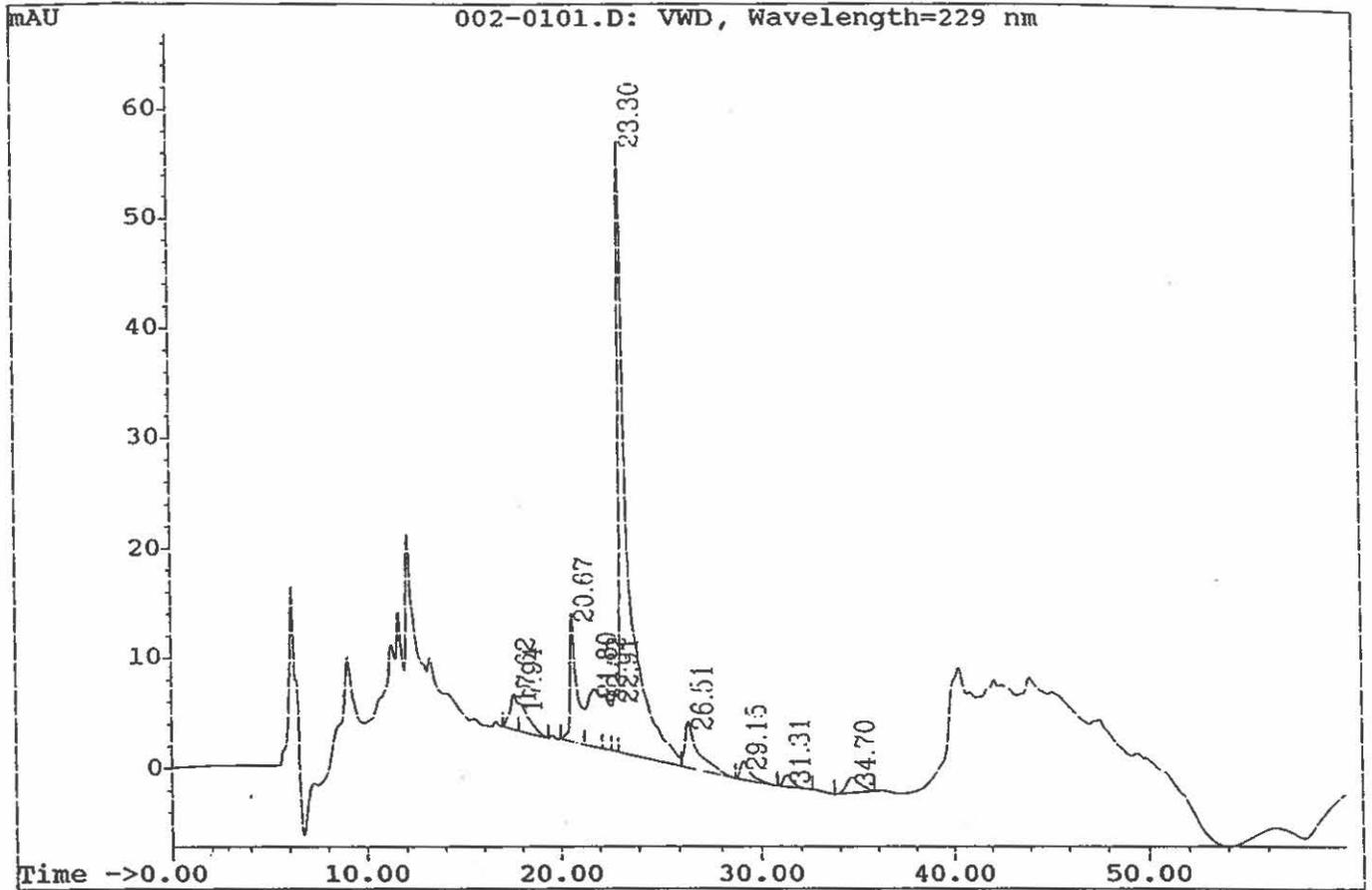


Figure 31: Caractérisation de ET-1 endogène présente à 4 °C dans le mélange enzymatique contenant des inhibiteurs

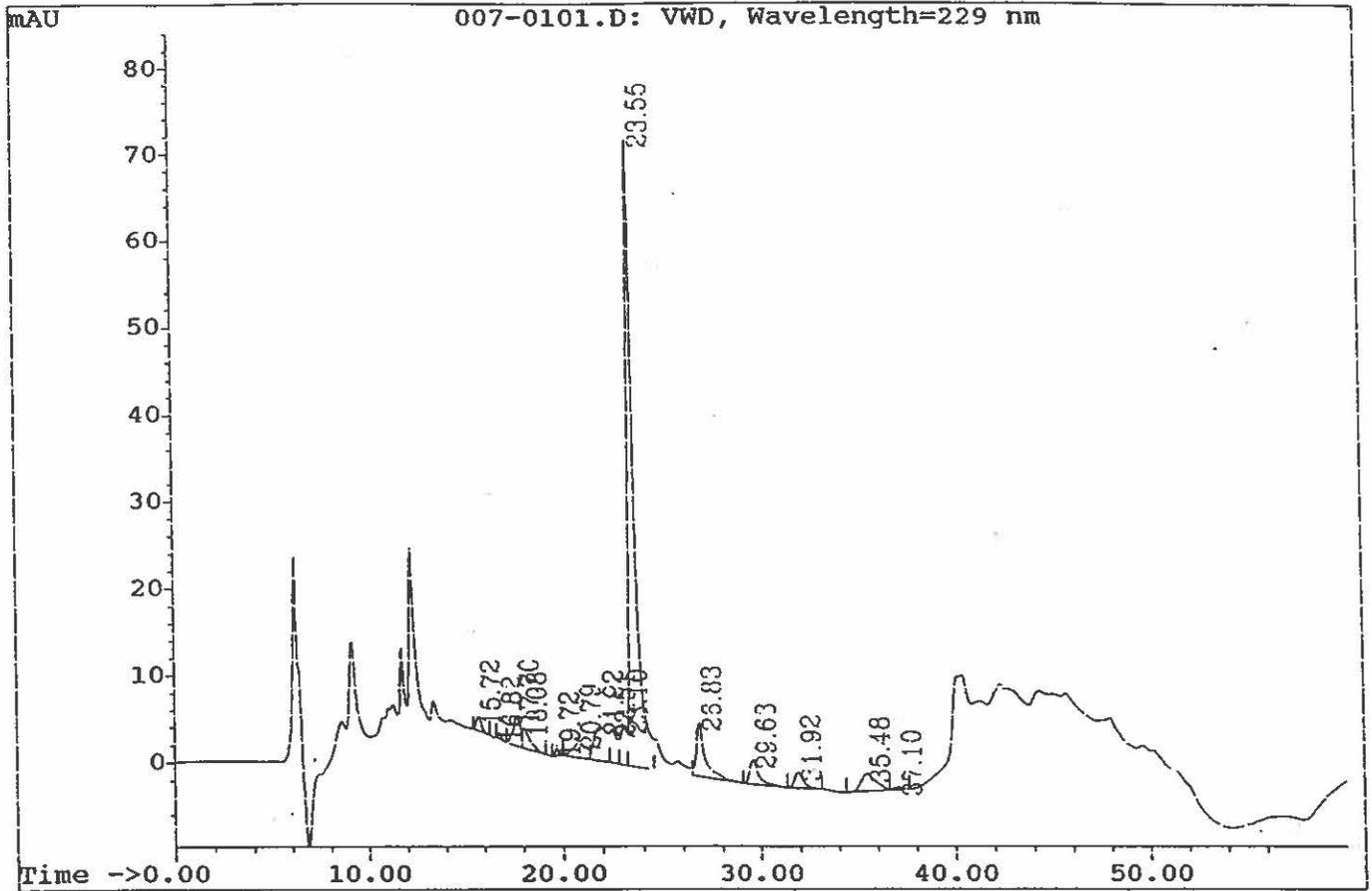


Tableau 5 : Les séquences des différents fragments de la Big-ET-1 synthétisés

Big-ET-1 (1-39)

Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp-Val
Asn Thr Pro Glu His Ile Val Pro Tyr Gly Leu Gly Ser Pro Ser Arg Ser

Big-ET-1(20-23)

Ile Trp-Val Asn

Big-ET-1(19-23)

Ile Ile Trp-Val Asn

Big-ET-1(18-25)

Asp Ile Ile Trp-Val Asn Thr Pro

Big-ET-1(16-27)

His Leu Asp Ile Ile Trp-Val Asn Thr Pro Glu His

Big-ET-1(16-29)

His Leu Asp Ile Ile Trp-Val Asn Thr Pro Glu His Ile Val

Big-ET-1(18-31)

Asp Ile Ile Trp-Val Asn Thr Pro Glu His Ile Val Pro Tyr

Big-ET-1(16-31)

His Leu Asp Ile Ile Trp-Val Asn Thr Pro Glu His Ile Val Pro Tyr

Big-ET-1(16-32)

His Leu Asp Ile Ile Trp-Val Asn Thr Pro Glu His Ile Val Pr Tyr Gly

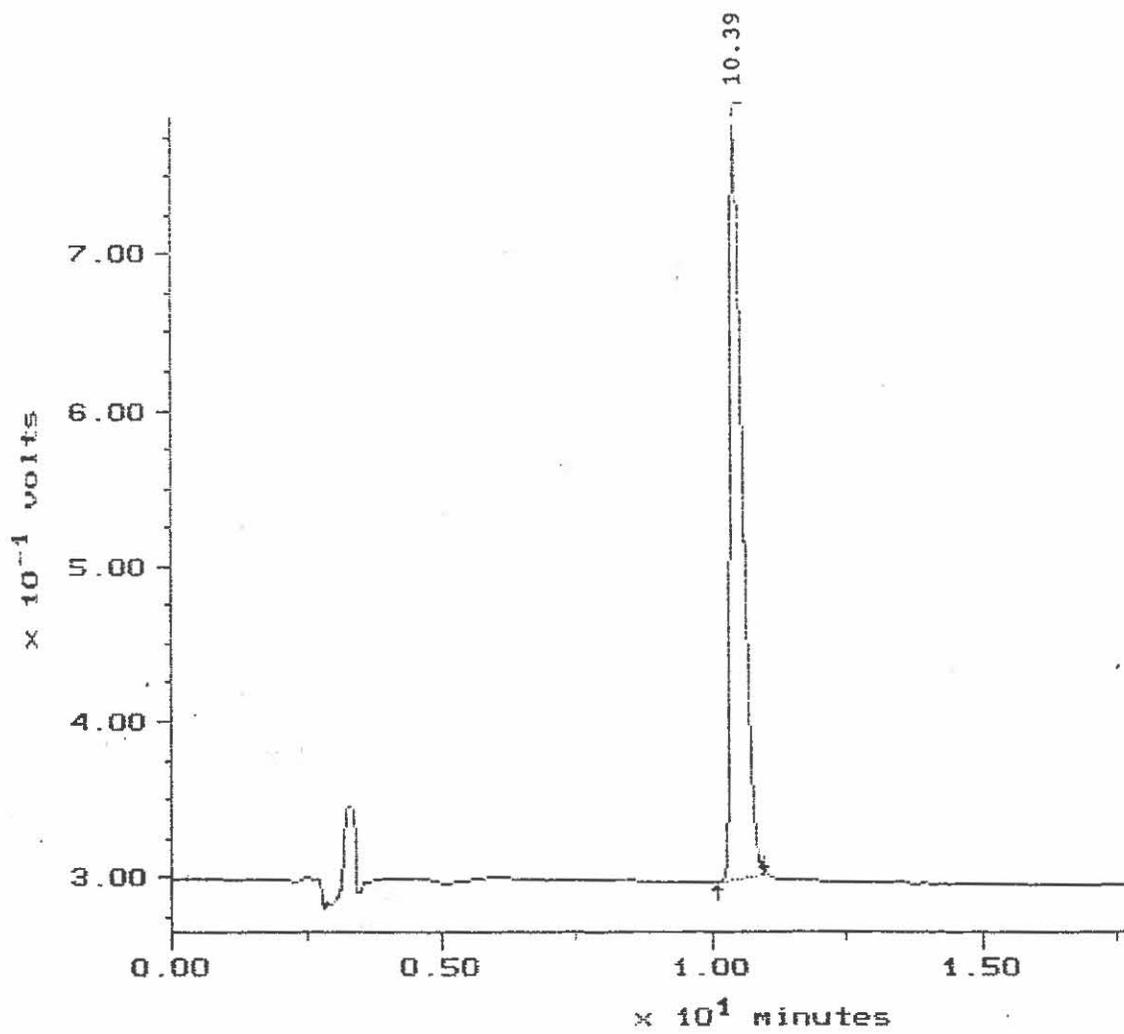
Big-ET-1(17-27)[D-Val²²]

Leu Asp Ile Ile Trp-^DVal Asn Thr Pro Glu His

Tableau 6: Caractérisation sur HPLC analytique de la pureté des fragments synthétisés par la méthode sur phase solide

Fragments synthétisés	Pureté (%)
Big-ET-1 (1-39)	100
Big-ET-1 (20-23)	100
Big-ET-1 (19-23)	97,3
Big-ET-1 (18-25)	100
Big-ET-1 (16-27)	99,1
Big-ET-1 (18-29)	100
Big-ET-1 (16-29)	96,4
Big-ET-1 (18-31)	95,9
Big-ET-1 (16-31)	96,3
Big-ET-1 (16-32)	100
Big-ET-1 (17-27) (D-Val ²²)	100

Figure 32: Analyse sur HPLC de l'analogue Big- ET-1 (20-23) linéaire synthétisé par la méthode sur phase solide



Discussion

7 Synthèse de la Big-ET-1

7.1 Choix des résines et des groupes protecteurs des acides aminés

Merrifield, en 1963, a mis au point une méthode de synthèse sur phase solide (Merrifield, 1963). Il identifia le polymère idéal comme étant insoluble dans tous les solvants employés et ayant une forme physique stable permettant une filtration simple. Ce polymère devait aussi posséder un groupe fonctionnel pouvant lier le premier acide aminé via un lien covalent. Plusieurs résines ont été confectionnées pour développer des caractéristiques particulières. Les résines BHA permettent d'avoir un groupement C-terminal amide. Elle a été utilisée pour la synthèse des analogues de la Big-ET-1. Les résines PAM permettent d'obtenir une extrémité C-terminale carboxylée, en plus de présenter une plus grande stabilité lors des traitements acides. La résine PAM a été employée pour la synthèse de la Big-ET (1-39).

Lors de la préparation de longs peptides, la synthèse mène à un mélange de produits ayant des propriétés très similaires; ils seront alors difficiles à séparer du produit désiré (Clark-Lewis et Kent, 1989). Il existe 3 types de produits secondaires: (Clark-Lewis et Kent, 1989; Sarin et al., 1984) la délétion où le peptide est temporairement empêché de réagir et, par la suite, reprend la synthèse; la terminaison où la synthèse du peptide est arrêtée de façon permanente, et la modification lorsque des réactions secondaires se produisent sur le peptide durant le couplage, le clivage ou la cyclisation.

La principale difficulté lors de la synthèse vient de la complexité des acides aminés et du nombre d'étapes réactionnelles nécessaires. On utilise donc les groupes protecteurs sur les chaînes latérales pour diminuer ce problème. Ils servent donc à protéger les fonctions réactives des chaînes latérales, à protéger de façon temporaire la fonction amine d'un acide aminé pour diminuer sa réactivité (généralement, en transformant l'amine en carbamate), à

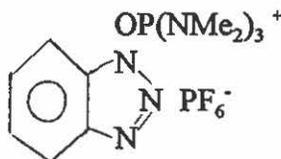
protéger de façon temporaire ou semi-permanente la fonction carboxyle de l'autre acide aminé, par la formation d'un ester (Loffet, 1991).

Les principaux groupements protecteurs employés lors des synthèses sont: Asp(OcHex), Glu(OcHex), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Arg(N^G-tosyle), Lys(2-ClZ), Cys(4-MBzl ou Acm), His(N^{im}-tosyle). La synthèse de la Big- ET-1 (1-39) s'est avérée délicate. La longue séquence d'acides aminés et l'absence de protection du Trp lors de notre tentative, peut expliquer les faibles rendements obtenus en étape post-HF. Le Trp est très sensible à l'oxydation. Donc un groupement protecteur, le formyle a été ajouté sur sa chaîne latérale. Le but est d'éviter ainsi les réactions secondaires sur ce résidu.

7.2 Méthode de couplage

Le réactif BOP (hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium) est un sel non hygroscopique très stable et soluble dans les solvants organiques utilisés pour la synthèse peptidique tel l'acétone, l'acétonitrile, etc... (Fournier, 1988; Felix et al., 1988; Castro et al., 1975). Il a été développé par Castro et al. en 1975 afin d'améliorer la synthèse sur phase solide (Castro et al., 1975). L'activation du groupement carboxyle passe par la formation d'un dérivé acyloxyphosphonium qui est à son tour transformé en ester de HOBt (hydroxybenzotriazole), un ester actif, qui permet le couplage (Fournier et al., 1988). Le BOP permet un couplage rapide et un plus faible excès d'acides aminés protégés est requis (Castro et al., 1975; Fournier et al., 1988).

BOP:



Le DMF (de nature polaire) augmente l'efficacité du couplage lorsqu'il est utilisé comme solvant (Clark-Lewis et Kent, 1989). Le DIEA est une base encombrée, ce qui

permet de diminuer la racémisation via l'abstraction de l'hydrogène du carbone alpha. Il est bon de noter que le DIEA doit être préalablement distillé sur ninhydrine afin d'éliminer les amines primaires et secondaires contaminant généralement cette base.

La déprotection des groupements Boc réalisée à l'aide du TFA (acide trifluoroacétique) entraîne une dégradation des peptides en fonction de la température et du temps (Lundt et al., 1978). La déprotection avec le TFA mène à la formation de trifluoroacétate de t-butyle. Ce carbocation est un intermédiaire de la réaction de déprotection. Cet ester de t-butyle va alkyler entre autres la Met et le Trp. Par contre, cet ester peut être détruit par un capteur de carbocations. Le capteur de carbocations sert principalement à trapper les ions carbonium tertiaires, source des réactions secondaires. C'est donc pour cela qu'un capteur de carbocations est ajouté lors de la réaction afin de prévenir la dégradation. Le 1,2-éthanedithiol, qui produit un thioéther, est le meilleur jusqu'à présent (Stewart et Young, 1984).

Après chaque couplage d'acide aminé, il est bon de vérifier si la réaction a effectivement eu lieu dans le mélange. Ainsi, le rendement du couplage de l'acide aminé peut être déterminé par une réaction colorimétrique qualitative (test à la ninhydrine) qui mesure le niveau de résidus d'acide aminé qui n'ont pas réagi lors du couplage. Ce test rapide permet de détecter les couplages incomplets. La sensibilité de ce test serait de l'ordre de 99% (Kaiser et al., 1970). Par contre, il est bon de noter que le résidu proline ne réagit pas avec la ninhydrine (Clark-Lewis et Kent, 1989). Il est important de noter que la proline réagira en colorant en brun-rouge les billes de résine plutôt qu'en bleu comme les autres acides aminés. Le test à la ninhydrine permet donc de minimiser la formation de délétions.

7.3 Méthodes de clivage

Le traitement du peptide avec un acide fort permet de cliver simultanément le lien peptide-résine et la majorité des groupements protecteurs des chaînes latérales (OcHex, Tos,

2-ClZ, Bzl). Les groupements Acm des cystéines résistent au HF et au TMSOTf et permettent la formation régiosélective des ponts cystines. Par contre, les Cys-MBzl en position 3 et 11 sont déprotégés par le traitement à l'acide et peuvent ainsi former une première cystine. Les groupements protecteurs Acm des Cys, en position 1 et 15, ne sont pas éliminés par le HF. Donc les Cys ne peuvent pas réagir et former de pont disulfure. Le groupement formyle, résistant à l'acide, est ajouté sur le Trp²¹ afin de le protéger des réactions secondaires telles l'oxydation ou l'alkylation.

La déprotection sélective est réalisée grâce au principe de labilité graduée à l'acide. Le lien entre le peptide et la résine est un lien benzyl-ester, stable dans les conditions d'assemblage mais qui peut être clivé par un acide anhydre fort qui enlèvera aussi les groupements protecteurs (Stewart et Young, 1984).

Donc, en général, les groupes protecteurs sont éliminés en même temps que la liaison peptide-résine par un acide fort (ex.:HF) via une réaction SN1 ou par un acide alkylsulfonique. Ainsi les groupes protecteurs sélectifs peuvent aussi être enlevés spécifiquement les uns après les autres, selon la méthode de clivage, sans altérer les autres groupements (Patek, 1993). Un capteur de carbocations ou "scavenger" peut être utilisé pour éliminer les espèces très réactives lors du traitement au HF. Les principaux "scavengers" utilisés sont l'anisole et le m-crésol (Stewart et Young, 1984). L'ajout de m-crésol permet de capter les carbocations formés dans la réaction et ainsi éviter certaines des réactions secondaires (Clark-Lewis et Kent, 1989).

Le chromatogramme de la figure 14 montre l'analyse sur HPLC de la Big-ET-1(1-39) post clivage. Comme on peut le constater, la pureté du peptide correspondant à un temps de rétention de 10,04 minutes est de moins de 32%. Nous observons tout de même un pic majeur.

7.4 Méthode de purification sur HPLC

La HPLC en phase inverse (HPLC-RP) est la méthode idéale pour la purification et l'analyse. Les conditions de purification dépendent de la masse, de la charge et de l'hydrophobicité du peptide. Cette méthode est simple, rapide, reproductible et requiert peu de manipulations (Clark-Lewis et Kent, 1989; Gray, 1993; MacLennan, 1992). Pour la HPLC-RP, la méthode utilise une phase stationnaire non polaire avec un éluant à polarité décroissante. La rétention du composé sur la colonne dépend des interactions hydrophobes avec la phase mobile (Smith et al., 1988).

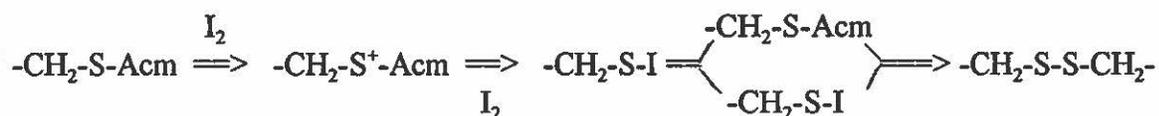
On a tenté de déterminer la quantité de produit devant être injectée sur la colonne afin d'optimiser la séparation de la Big-ET-1. On a testé les 3 quantités suivantes: 0,7, 1,5 et 1,75 grammes. Par la suite, la quantité de produit purifié a montré qu'avec une augmentation du poids de peptide purifié (1 à 2 gr), on observe une amélioration de la pureté de la fraction principale (100%); contrairement à ce qui est observé avec de plus faibles quantités (0,5 à 0,75 gr). Donc on remarque que 1,5 gr de Big-ET-1 injecté entraîne une meilleure séparation que pour 0,7 gr. (figure 12) Ainsi, le peptide brut est très contaminé. L'utilisation d'une plus grande quantité à l'injection permet de diminuer l'étalement du peptide sur la colonne qui fait en sorte que le peptide recherché est élué sur un très grand nombre de tubes. Ce phénomène serait probablement dû à des interactions avec les sous-produits présents dans le mélange brut. En augmentant la quantité, la partie contenant le peptide se concentre à une région de la colonne et l'élution est plus significative.

7.5 Méthodes de cyclisation

La régiospécificité des cystéines permet de comparer l'activité du peptide linéaire à celle du peptide cyclique, ce qui démontre la réactivité liée à la structure tertiaire du peptide. Lors de la cyclisation du peptide, plusieurs conformations sont ainsi éliminées, comme l'ont

démontré les résultats obtenus. La cyclisation augmente aussi la stabilité: le peptide est donc plus résistant à l'hydrolyse et/ou à la dégradation (Felix, al., 1988).

Le choix du groupement protecteur des cystéines est la décision la plus importante lors de la synthèse peptidique. Ce choix dépend de la taille, l'hydrophobicité et la nature chimique du peptide et évidemment de la nécessité de former des ponts disulfures régiosélectifs (Ramage et Stewart, 1993). Ainsi la formation des ponts disulfures est permise par l'utilisation d'une protection orthogonale des groupements thiols (Akaji, Nishiuchi et Kiso, 1995). La vitesse d'oxydation en cystine dépend de la nature du solvant et de celle du groupement protecteur du soufre. Nous utilisons 2 types de Boc-Cys soit le Boc-méthylbenzyle-Cys (MBzl-Cys) qui est déprotégé au HF et le Boc acétamidométhyle-Cys (Acm-Cys) qui est déprotégé à l'iode. Ainsi les groupements MBzl sont éliminés au traitement au HF, ce qui entraîne la libération des fonctions thiols des Cys. L'oxydation directe permet ensuite la formation du pont disulfure. Pour la réaction des Acm-Cys, les dérivés thioéthers ont la propriété de réagir avec l'iode pour donner naissance à un pont disulfure (oxydation à l'iode). Cette méthode permet la transformation directe des cystéines en cystine. La protection la plus répandue est Cys-Acm. L'intérêt du groupement Acm réside dans sa résistance aux acides forts donc résistant au clivage par le HF (Cavelier, Daunis et Jacquier, 1989).



Tamamura étudia la formation de la cystine. Pour l'endothéline, la première oxydation au $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ a permis d'obtenir 2 produits majeurs, soit la forme native (type 1 ayant les ponts disulfures 3-11 et 1-15) et son isomère (type 2 ayant les ponts 1-11 et 3-15) dans un ratio 3:1. Cette première cystine formée est le pont 3-11. Par la suite, le pont 1-15 est créé

par la réaction à l'iode. Il est impossible d'observer la formation de l'isotype 2 mais plusieurs sous-produits sont détectables avec la cyclisation à l'iode (Tamamura et al., 1995).

Lors des étapes de purification préliminaire et de cyclisation, les pertes de matériel se sont avérées trop importantes pour achever adéquatement la purification. La première purification, celle du peptide linéaire, montre une amélioration de la pureté jusqu'à 38% (figure 12) La section correspondant au pic de 12,3 minutes a par la suite subi la première cyclisation des cystéines en position 3 et 11, via le $K_3Fe(CN)_6$. Les fractions ont été recueillies afin d'obtenir, comme résultats analysés, le chromatogramme de la figure 16. La seconde cyclisation, via l'iode, a entraîné une forte dégradation du profil sur HPLC. (Figure 14) Celle-ci cause aussi une perte de matériel considérable. Le peptide bicyclique a dû subir une purification subséquente, mais cela a très peu augmenté sa pureté, en entraînant encore des pertes de matériel. (figure 15) Par la suite d'autres purifications auraient dû être entreprises afin d'obtenir un peptide pur. Une nouvelle synthèse a plutôt été entamée. Heureusement, des sources d'amélioration pour les étapes successives au clivage ont été isolées.

7.6 Réactions secondaires

L'acide aspartique, la glutamine, la méthionine et le tryptophane sont les acides aminés qui présentent les réactions secondaires les plus courantes (Bedford et al., 1992 et Clark-Lewis et Kent, 1989). La protection des chaînes latérales de l'asparagine évite la formation des cycles imides avec l'azote de la chaîne latérale. Le traitement au TFA peut favoriser cette réaction.

Lors de la synthèse, la Met est laissée non protégée. Comme la méthionine s'oxyde spontanément en sulfoxyde par exposition à l'air atmosphérique, il est important d'effectuer un test pour déterminer si cette réaction a eu lieu dans le peptide.

Les synthèses de la Big-ET-1 ont été réalisées avec et sans le groupement protecteur sur la chaîne latérale du Trp. Le cycle indole du tryptophane est principalement sensible à l'oxydation en milieu acide ce qui mène à la production d'un mélange complexe habituellement coloré (Stewart et Young, 1984). Donc si le Trp reste non protégé, il peut y avoir une réaction secondaire impliquant le cycle indole. L'utilisation du Trp(N^{fm}-formyle) évite ce problème (Barany et Merrifield, 1980). Les résultats obtenus ont démontré une plus forte dégradation avec le Trp libre.

7.7 Améliorations du processus de synthèse

7.7.1 Procédures de synthèse et de purification

Lors des étapes de couplage, les temps de réaction ont été prolongés de façon à optimiser la synthèse. Pour éviter la dégradation du peptide, le groupement formyle a été ajouté sur l'indole de la chaîne latérale du tryptophane. Cela afin d'éviter l'oxydation de l'indole qui serait une cause majeure de formation de produits secondaires.

Les différentes méthodes de clivage du peptide-résine ont été évaluées. Le peptide clivé au HF (figure 16) a été comparé au peptide obtenu par le clivage au TMSOTf. (figure 17) Le clivage au HF serait plus fiable que celui au TMSOTf où on observe la formation de sous-produits de l'endothéline. (figures 16 et 17) Le mécanisme de formation des produits secondaires n'est pas clair mais pourrait être dû à la nature des groupements protecteurs des cystéines qui viennent interagir ou bien, à un clivage du lien très scissile entre His¹⁶ et Leu¹⁷ de l'endothéline (Nomizu, 1991). Le clivage au TMSOTf a été suggéré récemment, comme étant un très bon remplacement pour le HF. Comme on le voit ici, ce n'est pas le cas pour la Big-ET-1. On note aussi que la synthèse de la Big-ET-1 s'est améliorée par rapport à la première synthèse (figure 11). Donc les changements apportés ont amélioré la méthode.

Ainsi, le test au NH_4I permet de déterminer si la méthionine contenue dans le peptide n'est pas oxydée. Pour les purifications sur HPLC préparatif, la durée du gradient a été réduite à une heure; ce qui diminue la rétention du peptide et restreint la formation de produits secondaires avant la séparation.

7.7.2 Formation des ponts disulfures

Les liaisons disulfures induisent une conformation particulière et indispensable pour l'activité biologique du peptide. Lors de la synthèse d'un peptide, chaque résidu d'acide aminé est introduit successivement dans la chaîne et c'est seulement lorsque le peptide est complété, qu'il faut alors créer les ponts disulfures de manière régiosélective (Cavalier Daunis et Jacquier, 1989). Les méthodes plus anciennes consistent en une oxydation à l'air des fonctions thiols non protégées mais la formation des ponts disulfures est alors non régiosélective. Les nouvelles stratégies de synthèse supposent l'existence de sélectivité de déprotection pour obtenir seulement 2 fonctions SH libres à la fois (Nakajima et al., 1989; Akaji, Nishiuchi et Kiso, 1995).

Le choix du groupement protecteur des cystéines est la décision la plus importante lors de la synthèse peptidique. Ainsi la formation des ponts disulfures est permise par l'utilisation d'une protection orthogonale des groupements thiols. Il existe 2 types de Boc-cystéine soit le Boc-méthylbenzyle-Cys (MBzl-Cys) qui est déprotégé au HF et le Boc acétamidométhyle-Cys (Acm-Cys) qui est déprotégé à l'iode (Nishiuchi et Kiso, 1995). L'intérêt du groupement Acm réside dans sa résistance aux acides forts donc résistant au clivage par le (Cavelier, Daunis et Jacquier, 1989). Ainsi les Cys-MBzl sont utilisées en position 3 et 11 pour la formation du premier pont disulfure et les Cys-Acm, sur les résidus 1 et 15, permettent de compléter le second pont.

Pour la cyclisation au $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, la cinétique de réaction d'une durée de 4 heures a permis l'analyse des résultats. Les graphiques de la cinétique n'indiquent aucun déplacement

du temps de rétention du pic principal. Après 1 heure, une dégradation légère du peptide est observable. La réaction serait alors complétée à l'intérieur de ce laps de temps. La réaction de cyclisation serait complétée entièrement après une heure. (figure 19) La pureté du peptide s'est vue grandement améliorée à cette étape.

La cinétique de cyclisation à l'iode des cystéines 1 et 15 a été réalisée sur une durée de 5,5 heures. Après 2 heures, la dégradation du peptide est détectable. De plus, la réaction nécessite au moins 30 minutes pour se compléter. La durée de réaction sera donc fixée à 2 heures dans les conditions mentionnées précédemment. La cyclisation a été réalisée entraînant une légère formation de sous-produits de réaction. (figure 20)

Finalement, suite à l'obtention du peptide bicyclique, une cinétique de déformylation sera réalisée. (figure 21) Il n'y a pas de variation observable du temps de rétention, par contre, on détecte une dégradation du produit après une heure. Le temps de réaction optimal est donc de 30 minutes. Tous ces changements ont permis d'améliorer les rendements des différentes étapes afin d'obtenir un peptide en quantité et en qualité suffisantes pour exécuter les tests enzymatiques. Préalablement, un test d'oxydation a été effectué pour s'assurer que la méthionine contenue dans la séquence peptidique n'était pas touchée.

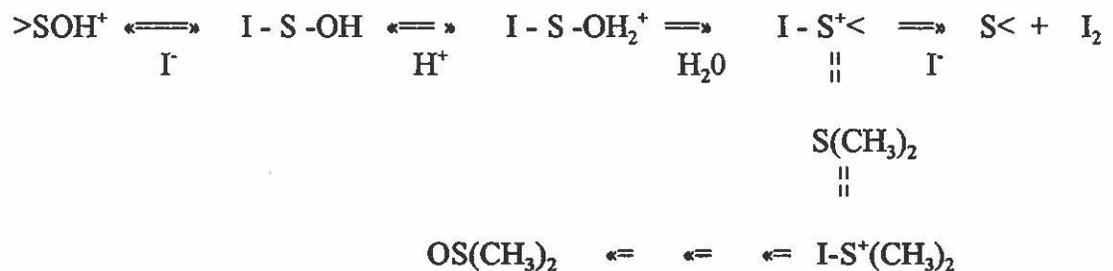
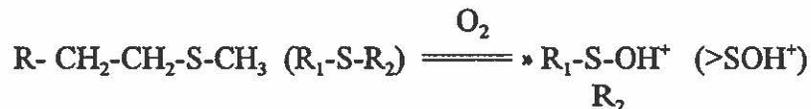
8. Évaluation des peptides

8.1 Méthodes sur HPLC analytique

Le produit final a été co-injecté avec un standard afin de vérifier l'authenticité du produit. Les résultats de l'analyse ont permis de conclure que le peptide synthétisé et purifié correspond bel et bien à la Big- ET-1 (1-39) standard. Les analyses sur HPLC peuvent certifier l'homogénéité du peptide purifié.

8.2 Test de réduction au NH₄I

Le problème majeur associé à la méthionine est l'alkylation et l'oxydation de l'atome de soufre. Le carbocation formé lors des étapes de déprotection réagit sur la chaîne latérale pour donner un sel de sulfonium qui subira d'autres dégradations (Nicolas, 1995). L'oxydation de la méthionine se produit tant durant la synthèse peptidique que lors de la formation des ponts disulfures. La clé réside donc dans la détermination d'un agent réducteur pouvant être employé avec des ponts disulfures. Initialement, les thiols étaient employés mais ils sont incompatibles avec les cystéines. Plus récemment, l'utilisation du NH₄I dans le TFA a été appliquée pour la réduction et ce avec beaucoup de succès. Comme dit précédemment, les peptides ont été testés et des résultats négatifs nous ont permis de conclure que ceux-ci n'avaient pas subi d'oxydation.



9. Cinétiques enzymatiques

9.1 Analyses enzymatiques

Le poumon est un des organes qui répond le plus aux effets agonistes de l'endothéline et c'est aussi son site majeur de clairance via la circulation pulmonaire (Kent et Keenan, 1995). C'est de cet organe que l'enzyme a été extraite. La ECE membranaire a donc été

isolée à partir du poumon de boeuf selon la méthode décrite précédemment. Le boeuf a été employé simplement pour des raisons utilitaires, pour sa grande disponibilité. On a donc obtenu un homogénat de protéines liées aux membranes. La courbe standard de BSA a permis de déterminer par extrapolation, la quantité de protéines contenue dans le mélange. (figure 22) On obtient une valeur moyenne de 20 mg de protéines par mL de solution.

Les études préliminaires des composants isolés ont permis de déterminer les temps de rétention de ceux-ci sur le système HPLC. Ainsi la Big-ET-1 (1-39) bicyclique serait observable vers un temps de rétention de 23 minutes alors que le pic de l'endothéline bicyclique sortirait vers 25 minutes. Le mélange membranaire a aussi été testé pour s'assurer que cette région ne présentait aucun pic significatif pouvant interférer. (figure 23) La ECE sort aux environs de 40 minutes et le cocktail d'inhibiteurs élue avant 18 min. Donc la région analysée est libre d'interférence. Pour ce qui est du cocktail d'inhibiteurs, la littérature permet de conclure qu'il n'y aurait pas d'interaction de ces inhibiteurs avec ECE de sorte qu'ils ne viendraient pas modifier l'action enzymatique.

Par la suite, une co-injection de la Big-ET-1 et ET-1 a permis de prouver qu'il n'y avait pas d'interaction entre les deux molécules pouvant venir modifier les temps de rétention de celles-ci. Les résultats négatifs ont permis de poursuivre les démarches. (figure 24)

On a tenté de déterminer l'effet de l'ébullition de la solution enzymatique dans la formation de l'endothéline à partir de la Big-ET-1. (figure 25) Ainsi on ne trouve pas d'endothéline néoformée même si l'ébullition se poursuit jusqu'à 10 minutes dans les conditions expérimentales. Donc la Big-ET-1 demeure stable dans les conditions d'arrêt de la réaction.

Les différentes cinétiques réalisées à 37°C indiquent une présence d'endothéline. On remarque qu'environ 50% de Big-ET et 50% d'endothéline formée demeurent dans le mélange au temps initial. (figure 26 et 27) Le ratio reste, par la suite, plus ou moins stable durant toute la cinétique. Ce qui peut amener diverses hypothèses pour expliquer l'observation d'ET-

1 à $t=0$, soit la présence d'endothéline endogène au niveau des membranes, soit une réaction de dégradation instantanée à 37°C, ce qui entraînerait un plateau rapidement atteint lors de la cinétique. L'utilisation d'un marqueur pour une détection plus fine de l'endothéline néoformée pourrait être souhaitable car les membranes contiennent des contaminants indésirables. De plus, le plateau observé à 50% de Big-ET-1 peut s'expliquer par le fait que ECE nécessiterait des co-facteurs pour optimiser sa réaction de clivage. On sait déjà que le zinc serait impliqué dans une transformation de structure tertiaire de ECE. Il serait donc intéressant de vérifier si le mélange réactionnel devrait être suppléé en zinc. Il serait bon aussi de vérifier si d'autres co-facteurs seraient nécessaires à l'action de ECE.

Les premières tentatives utilisèrent l'enzyme lié aux membranes. L'ajout de CHAPS, un détergent doux, a permis de séparer l'enzyme des membranes dans le but de faciliter l'action de ECE avec le peptide (Warner et al., 1992). Comme le CHAPS ne peut être directement injecté sur la colonne analytique, l'utilisation du Sep-Pak était souhaitable. Ainsi, une solution de 40% ACN est suffisante pour déloger les peptides de la colonne. (figure 28) Par contre, l'acétonitrile a dû être évaporée, ce qui complique la tâche en rendant cette étape peu reproductible. On observe des cinétiques similaires à celles utilisant l'enzyme liée aux membranes. (figure 29) Cela suggère que les membranes ne viennent pas réellement limiter l'action de l'enzyme de conversion sur la Big-ET-1. D'ailleurs la diminution de ET n'est pas significative.

9.2 Analyses de l'effet du phosphoramidon

Le phosphoramidon est l'inhibiteur le plus connu pour ECE. Ainsi, selon l'étude de Plumpton, une concentration de 10^{-4} M réduit significativement la production d'endothéline (Plumpton et al., 1994). Pour déterminer s'il y a présence endogène d'endothéline dans les membranes, le phosphoramidon est ajouté au mélange ECE-protéines congelé afin d'empêcher toute dégradation. Comme on l'observe à la figure 32, l'endothéline est absente du mélange membranaire avec phosphoramidon. Donc celui-ci ne contiendrait pas d'endothéline

endogène. Ce chromatogramme nous permet de confirmer que le phosphoramidon inhibe la transformation de la Big-ET-1 en ET-1. Nous pouvons donc arriver à émettre l'hypothèse que la réaction serait très rapide à 37 °C.

On a aussi testé l'enzyme avec la Big-ET-1 pour une dégradation à 4 °C. On n'observe là encore aucune présence de ET-1 donc la réaction n'aurait pas lieu à cette température. Cela vient aussi confirmer l'absence d'endothéline endogène et suggère un clivage de Big-ET-1 instantané dans les conditions expérimentales à 37°C. (figure 31)

10. Analogues de la Big-ET-1(1-39)

10.1 Choix des analogues synthétisés

Le choix des analogues a été effectué en partant du lien de clivage P-P' soit Trp²¹-Val²². Certaines études estiment qu'il faut un minimum de 7 résidus d'acides aminés pour réussir à reconnaître le peptide, soit de P₄ à P₃' (Handa et al., 1995). Les analogues choisis ont des longueurs variées afin de déterminer le fragment le plus court, reconnu et scissile par ECE. Les analogues sélectionnés ont des séquences variant entre 4 et 17 acides aminés. Ainsi, on sait que le principal inhibiteur de ECE, le phosphoramidon est un dipeptide substitué. (tableau 5) Cela suggère que seulement 2 acides aminés sont suffisants pour interagir avec ECE. Ici, avec 4 acides aminés, on aurait une faible spécificité. Alors qu'avec 17 acides aminés, la spécificité serait grandement augmentée. En éliminant la séquence contenant les ponts disulfures, on facilite la synthèse d'éventuels inhibiteurs.

10.2 Synthèse et purification des analogues

Les synthèses peptidiques des analogues ont été réalisées selon les méthodes décrites. Les produits finaux indiquent une pureté très élevée. (tableau 6) Par exemple, le

chromatogramme de la figure 32 permet d'évaluer la purification par HPLC. Comme on peut le constater, un seul pic est observable pour la Big-ET-1 (20-23).

Conclusion

Ainsi , la synthèse des analogues, nous a permis d'obtenir des peptides relativement purs qui serviront lors des expérimentations futures. De plus, grâce à l'optimisation du protocole de synthèse de la Big-ET-1, nous avons réussi à obtenir une pureté de 100% pour ce peptide. Les cinétiques enzymatiques nous confirment l'activité de ECE. En effet, la cinétique démontre la présence de ET-1 néoformé dans le milieu. Ce qui confirme que les méthodes développées sont adéquates pour résoudre les questions qui demeurent en suspens.

Donc, pour résoudre le problème de la réaction instantanée, on pourrait diminuer la température afin de ralentir l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline et ainsi observer la cinétique enzymatique complète. Il serait aussi intéressant de déterminer si un co-facteur est impliqué dans le processus de transformation de la Big-ET ou si une rétroinhibition expliquerait la cinétique stationnaire.

Les analogues de la Big-ET-1 ont été synthétisés et pourront être analysés pour les reconnaissances par ECE. En effet, les diverses études ont permis de déterminer que l'enzyme extraite était active dans les conditions décrites et ce avec une action quasi instantanée à 37°C. Nous pourrions déterminer le ou les fragments reconnaissant l'enzyme de conversion de l'endothéline, donc qui subissent le clivage au niveau du lien Trp-Val. Par la suite, de nouvelles synthèses de ces analogues seront envisagées avec la formation, cette fois, d'un lien pseudopeptidique non scissile par ECE. Nous souhaitons ainsi parvenir à synthétiser un inhibiteur spécifique à ECE.

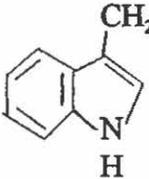
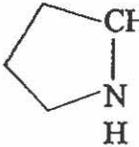
Ces liaisons pseudopeptidiques miment le lien peptidique mais sont non scissiles par les enzymes protéolytiques. Les peptidomimétiques permettent d'augmenter l'efficacité et la sélectivité des peptides actifs dans l'organisme. Ils permettent aussi de diminuer les effets secondaires et de prolonger l'activité en freinant la dégradation enzymatique (Hruby et Bonner, 1994). L'objectif ultime des peptidomimétiques est de créer un inhibiteur montrant

une forte liaison (réversible ou non) à l'enzyme qui viendrait compétitionner avec le substrat naturel et causer son déplacement du site actif (Gante, 1994).

Il serait donc intéressant de remplacer le lien Trp²¹-Val²² de la Big-ET par un lien réduit dans le but d'inhiber la transformation, par ECE, de la Big-ET-1 en ET-1 et ainsi effectuer une régulation du taux de ET formé. Les buts de notre recherche visent donc à contribuer à l'élucidation du mode d'action de l'ECE au niveau moléculaire. Plus particulièrement, à identifier le plus court substrat reconnu par ECE pour parvenir à déterminer la structure du peptide lorsque celui-ci est lié à ECE. Pour permettre cette analyse, les hypothèses suivantes ont été posées. La Big-ET-1 doit avoir un site de reconnaissance spécifique pour ECE et la Big-ET-1 doit adopter une structure reconnue par l'enzyme à laquelle elle se lie.

Appendice A

Les abréviations et la structure des acides aminés usuels

Glycine	Gly		$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Alanine	Ala		$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Phénylalanine	Phe	$\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 -$	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Tyrosine	Tyr	$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{CH}_2 -$	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Tryptophane	Trp		$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Proline	Pro		
Cystéine	Cys	$\text{HS} - \text{CH}_2 -$	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Sérine	Ser	$\text{HO} - \text{CH}_2 -$	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Thréonine	Thr	$\text{CH}_3 - \text{CH} -$	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Valine	Val	$\text{CH}_3 - \text{CH} -$	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Leucine	Leu	$\text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH}_2 -$	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Isoleucine	Ile	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH} -$	$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$

Méthionine	Met	$\text{CH}_3 - \text{S} - (\text{CH}_2)_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$
Arginine	Arg	$\text{HN} = \underset{\text{NH}_2}{\text{C}} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$
Lysine	Lys	$\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_3 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$
Histidine	His	$\begin{array}{c} \text{HC} = \text{C} - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH} \end{array}$
Acide aspartique	Asp	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$
Acide glutamique	Glu	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$
Asparagine	Asn	$\text{H}_2\text{NCO} - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$
Glutamine	Gln	$\text{H}_2\text{NCO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\text{CH}} - \text{COOH}$

Liste des références

AHN, K., Beningo, K., Olds, G., Hupe, D., 1992, The endothelin converting enzyme from human umbilical vein is a membrane bound metalloprotease similar to that from bovine aortic endothelial cells, Proceeding of the National Academy Sciences, vol 89, p. 8608-10

AKAJI, K., Nishiuchi, H., Kiso, Y., 1995, Synthesis of human endothelin-1 by regioselective disulfide formation using silyl chloride-sulfoxide system, Tetrahedron Letters, vol 36, no. 11, p. 1875-78

ASHIZAWA, N., Okumura, H., Kobayashi, F., Aotsuka, T., Takahashi, M., Asakura, R., Arai, K., Matsuura, A., 1994a, Inhibitory activities of metal chelators on ECE: in vitro studies, Biological Pharmacology Bulletin, vol 17, no. 2, p. 207-11

ASHIZAWA, N., Okumura, H., Kobayashi, F., Aotsuka, T., Asakura, R., Arai, K., Ashikawa, N., Matsumura, A., 1994b, Inhibitory activities of metal chelators on endothelin converting enzyme: in vivo studies, Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol 22, supp. 8, p. S 53-56

AUMELAS, A., Chiche, L., Kubo, S., Chino, N., Tamaoki, H., Kobayashi, Y., 1995, Lys(-2)Arg(-1) endothelin-1 solution structure by two-dimensional H-NMR: possible involvement of electrostatic interactions in native disulfide bridge formation and in biological activity decrease, Biochemistry, vol 34, no. 15, p. 4546-61

BALWIERCZAK, J. L., Kukkola, P.J., Savage, P., Jeng, A.Y., 1995, Effects of metalloprotease inhibitors on smooth muscle endothelin converting enzyme activity, Biochemical Pharmacology, vol 49, no. 3, p. 291-96

BARANY, L. et Merrifield, 1980, The peptide: analysis, synthesis, biology, éd. Gross, E. et Meienhofer, J, Academic Press, Vol 2, Toronto

BATTISTINI, B., Botting, R., Warner, T.D., 1995, Endothelins: a knockout in London, Trends in Pharmacological Sciences, vol 16, p. 217-22

BEAUBIEN, G., Schafer, M. K.H., Weihe, E., Dong, W., Chrétien, M., Seidah, N.G., Day, R., 1995, The distinct gene expression of the pro-hormone convertase in the rat heart suggests potential substrates, Cell Tissue Research, vol 279, p. 539-49

BEDFORD J., Hyde, C., Johnson, T., Jun, W., Quibell, M., et Sheppard, R.C., 1992, Amino acid structure and "difficult sequences" in solid phase peptide synthesis, International Journal of Peptide and Protein Research, Vol 40, p. 300-307

BERTENSHAW, S.R., Rogers, R.S., Stern, M.K., Norman, B.H., 1993, Phosphorous containing inhibitors of endothelin converting enzyme: effects of the electronic nature of phosphorous on inhibitor potency, Journal of Medicinal Chemistry, vol 36, p. 173-76

BIGAUD, M., Hauss, B., Jauch, M.F., D'Orchymont, H., 1994, Structure activity relationship of phosphoramidon derivatives for *in vivo* endothelin converting enzyme inhibition, Fundamental Clinical Pharmacology, vol 8, p. 155-61

CAI, Y., Yamada, T., Xin, X., Agui, T., Matsumoto, K., 1995, Mapping of the gene for rat endothelin receptor A and B to chromosomes 19 and 15 respectively, Animal Genetics, vol 26, p. 39-41

CASTRO, B., Dormoy, J.R., Evin, G., and Selve, C., 1975, Réactifs de couplage peptidique IV (1) l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino phosphonium (B.O.P), Tetrahedron Letters, vol 14, p. 1219-22

CAVELIER, E., Daunis, J., Jacquier, R., 1989, Les réactions régiosélectives de formation de ponts disulfures en synthèse de peptides contenant des cystines, Bulletin de la Société Chimique de France, No 6, p. 1-4

CHIOU, W. J., Shiosaki, K., Tasker, A.S., Wu-Wong, J.R., 1994, Characterization of two endothelin converting enzymes and their preference for Big endothelin-1 and -2 as substrates, Life Sciences, vol 54, no. 21, 1613-19

CLAING, A., 1995, Phe²² - Big-ET-1(19-37); A new potent inhibitor of endothelin converting enzyme, Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol 26, supp. 3, p. S72-S74

CLARK-LEWIS, I., Kent, S., 1989, Chemical Synthesis, purification, and characterization of peptides and proteins, The use of HPLC in receptor biochemistry, Alan R. Liss Inc., New York, p. 50-75

CORVOL, P., Alhenc-Gelas, F., Soubrier, F., 1993, L'endothélium, site de production et de métabolisme des peptides vasoactifs, Médecine Sciences, Vol 9, p. 1050-60

COWLEY, D. J., Pelton, J.T., 1995, Solution conformation dynamics of the C-terminal residues in endothelin-1 and analogs: a time-resolved fluorescence study, International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 46, p. 56-64

De LOMBAERT, S., Ghai, R.D., Jeng, A.Y., Trapani, A.J., Webb, R.L., 1994, Pharmacological profile of a non-peptidic dual inhibitor of neutral endopeptidase 24.11 and endothelin-converting enzyme, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 204, no. 1, p. 407-12

De NANTEUIL, G., Benoist, A., Rémond, G., Descombes, J-J., Barou, V., Verbeuren, T.J., 1995, Synthesis of the endothelin converting enzyme inhibitor phosphoramidon, Tetrahedron Letters, vol. 36, no. 9, p. 1435-38

DENAULT, J. B., Claing, A., D'Orléans-Juste, P., Sawamura, T., Kido, T., Masaki, T., Leduc, R., 1995, Processing of proendothelin-1 by human furin convertase, FEBS Letters, vol 362, p. 276-80

DENG, Y., Savage, P., Shetty, S.S., Martin, L.L., Jeng, A.Y., 1992, Identification and partial purification of a thiol endothelin converting enzyme from porcine aortic endothelial cells, Journal of Biochemistry, vol 111, p. 346-51

DONLAN, M. L., Brown, F.K., Jeffs, P.W., 1992, Solution conformation of human Big-endothelin-1, Journal of Biomolecular NMR, vol 2, p. 407-20

DOUGLAS, S. A., Beck, G.R., Elliott, J.D., Ohlstein, E.H., 1995, Pharmacological evidence for the presence of three distinct functional endothelin receptor subtypes in the rabbit lateral saphenous vein, British Journal of Pharmacology, vol 114, p. 1529-40

DOULUT, S., Rodriguez, M., Lugrin, D., Vecchini, F., Kitabgi, P., Aumelas, A., and Martinez, J., 1992, Reduced peptide bond pseudopeptide analogues of neurotensine, Peptide Research, vol 5, no. 1, p. 30-38

EMOTO, N., Yanagisawa, M., 1995, Endothelin converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon sensitive metalloprotease with acidic pH optimal , Journal of Biological Chemistry, vol. 270, no. 25, p.15262-68

EPPS, D. E., Mao, B., Staples, D.J., Sawyer, T.K., 1988, Structure-conformation relationship of synthetic peptide inhibitors of human renin studied by resonance energy transfer and molecular modeling, International Journal of Peptide and Protein Research, vol 31, p. 22-34

ERGUL, A., Puett, D., 1995, Trp-21 is important in the processing and secretion of big-endothelin-1, Molecular and Cellular Endocrinology, vol 110, p. 89-94

FABBRINI, S.M., Vitale, A., Pedrazzini, E., Nitti, G., Zamai, M., Tamburin, M., Caiolfa, V.R., Patrono, C., Benatti, L., 1993, *In vivo* expression of mutant preproendothelins: hierachy of processing events but no strict requirement of Trp-Val at the processing site, Proceedings of the National Academy of Sciences, vol 90, p. 3923-27

FABBRINI, S.M., Vitale, A., Pedrazzini, E., Nitti, G., Zamai, M., Tamburin, M., Caiolfa, V.R., Patrono, C., Benatti, L., 1991, Heterologous *in vivo* processing of human

preproendothelin-1 into bioactive peptides, Proceedings of the National Academy of Sciences, vol 88, p. 8939-43

FASSINA, G., Cassani, G., 1993, Peptide-based assay for the identification of endothelin converting enzyme inhibitors, Peptide Research, vol 6, no. 2, p. 73-78

FAWSI, A. B., Cleven, R.M., Wright, D. L., 1994, A rapid and selective endothelin converting enzyme assay: characterization of phosphoramidon sensitive enzyme from guinea pig lung membrane, Analytical Biochemistry, vol 222, p. 342-50

FELIX, A.M., Wang, C-T., Heimer, E.P. Fournier, A., 1988, Applications of BOP in solid phase synthesis: solid phase side-chain to side-chain cyclization using BOP reagent, International Journal of Peptide and Protein Research vol. 31, p. 231-238

FOURNIER, A., Wang, C.T., Felix, A.M., 1988, Application of BOP reagent in solid phase synthesis: Advantages of BOP reagent for difficult coupling exemplified by a synthesis of (Ala¹⁵)-GRF (1-29)-NH₂, International Journal of Peptide and Protein Research, vol 31, p. 86-97

GANTE, J., 1994, Peptidomimetics-tailored enzyme inhibitors, Angewandte Chemie International Edition in English, vol 33, p. 1699-1720

GRANT, G. A., 1992, Synthetic Peptides, W.H., Freeman and cie., USA., New-York, p. 130-136

GRAY, W.R., 1993, Disulfide structures of highly bridged peptides: a new strategy for analysis, Protein Science (1993), vol. 2, p. 1732-1748

GUI, G., Xu, D., Emoto, N., Yanagisawa, M., 1993, Intracellular localization of membrane bound endothelin converting enzyme from rat lung, Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol 22, supp. 8, p. S 53-56

HANDA, B.K., Keech, E., Conway, E.A., Broadhurst, A., Ritchie, A., 1995, Design and synthesis of a quenched fluorogenic peptide substrate for human cytomegalovirus proteinase, Antiviral Chemistry and Chemotherapy, vol. 6, no. 4, p. 255-61

HARRISON, V. J., Barnes, K., Turner, A.J., Wood, E., Corder, R., Vane, J.R., 1995, Identification of endothelin-1 and big-endothelin-1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells, Proceedings of the National Academy of Sciences, vol 92, p. 6344-48

HEMSEN, A., 1995, Metabolism of Big-ET-1(1-38) and (22-38) in human circulation in relation to production of ET-1, Regulatory Peptides, vol 55, p. 287-97

HISAKI, K., Matsumura, Y., Maekawa, H., Fujita, K., Takaoka, M., Morimoto, S., 1994, Conversion of Big ET-1 in the rat lung: role of phosphoramidon-sensitive endothelin-1 converting enzyme, American Journal of Physiology, vol 266, p. H 422-28

HRUBY, V. J., Bonner, G.G., 1994, Design of novel synthetic peptides including cyclic conformationally and topographically constrained analogs, Methods in Molecular Biology, vol 35, p. 201-40

IKURA, T., Sawamura, T., Shiraki, T., Hosokawa, H., Kido, T., Hosikawa, H., Shimada, K., Tanzawa, K., Kobayashi, S., Miwa, S., Masaki, T., 1994, c DNA cloning and expression of bovine endothelin converting enzyme, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol 203, no.3, p. 1417-22

INOUE, A., Yanagisawa, M., Takawa, Y., Mistui, Y., Kobayashi, M., Masaki, T., 1989, The human preproendothelin-1 gene: complete nucleotide sequence and regulation of expression, The Journal of Biological Chemistry, vol 264, p. 14954-59

ITOH, Y., Yanagisawa, M., Ohkubo, S., Kimura, C., Kosaka, T., Inoue, A., Ishida, N., Mitsui, Y., Onda, H., Fujino, M., Masaki, T., 1988, Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin, FEBS Letters, vol. 231, no. 2, p. 440-44

JANES, R. W., Peapus, D.H., Wallace, B.A., 1992, The crystal structure of human endothelin, Structural Biology, vol 1, no. 5, p. 311-19

JUKIC, D., Mayer, M., Schmitt, P., Drapeau, G., Regoli, D., Michelot, R., 1991, Synthesis and biological activities of neurokinin pseudopeptide analogues containing a reduced peptide bond, European Journal of Medicinal Chemistry, vol 26, p. 921-28

KAISER, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., Cook, P.I., 1970, Color test for detection of free terminal amino groups in the synthesis of peptide, Analytical Biochemistry, vol 34, p. 595-98

KENT, A., Keenan, A.K., 1995, Evidence for signalling by Big endothelin-1 via conversion to endothelin-1 in pulmonary artery smooth muscle cells, Life Sciences, vol 57, no. 12, p. 1191-96

KNAP, A. K., Soriano, P., Savage, P., Del Grande, D., 1993, Identification of a novel aspartyl endothelin converting enzyme in porcine aortic endothelial cells, Biochemistry and Molecular Biology International, vol 29, no. 4, p. 739-45

KRYSTEK, S. R. , Hunt, J.T., Stein, P.D., Stouch, T.R., 1995, Tridimensional quantitative structure-activity relationships of sulfonamide endothelin inhibitors, Journal of Medicinal Chemistry, vol 38, p. 659-68

- KUNDU, G. C., Wilson, I.B., 1993, Endothelin converting enzyme: the binding of metal ions, International Journal of Peptide and Protein Research, vol 42, no. 1, p. 64-67
- KUNDU, G. C., Wilson, I.B., 1992, Identification of endothelin converting enzyme in bovine lung membranes using a new fluorogenic substrate, Life Sciences, vol 50, p. 965-70
- KURODA, M., Yamazaki, K., Taga, T., 1994, Conformation of the C-terminus of endothelin-1 in aqueous solution studied by Monte-Carlo simulation, FEBS Letters, vol 355, p. 263-266
- LA, M., Reid, J.L., 1995, Endothelin-1 and the regulation of vascular tone, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, vol 22, p. 315-23
- LAWRENCE, E., Brain, S.D., 1993, Big endothelin-1 and Big endothelin-3 are constrictor agents in the microvasculature: evidence for the local phosphoramidon sensitive conversion of big endothelin-1, European Journal of Pharmacology, vol 223, p. 243-50
- LAZOU, A., Bogoyevitch, M.A., Clerk, A., Fuller, S.J., Marshall, C.J., Sugden, P.H., 1994, Regulation of mitogen-activated protein kinase cascade in adult rat heart preparations in vitro, Circulation Research, vol 75, p. 932-41
- LEVIN, E.R., 1995, Mechanisms of disease: endothelin, New England Journal of Medicine, vol. 333, no. 6, p. 553
- LOFFET, A., 1991, Synthèse de peptides: les stratégies industrielles, Informations Chimie, vol. 329, (juin 91), p. 190-193
- LUGRIN, D., Vecchiniu F., Doulut, S., Rodriguez, M., Martinez, J., Kitabgi, P., 1991, Reduced peptide bond analogues of neurotensine: binding, biological activities and in vitro metabolic stability, European Journal of Pharmacology, vol 205, p. 191-98
- LUNDT, B.F., Johansen, N.L., Volund, A., Markussen, J., 1978, Removal of t-butyl and t-butoxycarbonyl protecting groups with trifluoroacetic acid, International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 12, p. 258-68
- MACLENNAN, J., Practical preparative chromatography, Preparative chromatography, part 2, Conversations in chemistry, p.13-16
- MARRAUD, M., Dupont, V., Grand, V., Zerkout, S., Lecoq, A., Boussard, G., Vidal, J., Collet, A., Aubry, A., 1993, Modifications of the amide bond and conformation constraints in pseudopeptide analogues, Biopolymers, vol. 33, p. 1135-48
- MASAKI, T., Yanagisawa, M., 1992, Physiology and pharmacology of endothelins, Medical Research Reviews, vol 12, no. 4, p. 391-421

MASDOURI, L. E., Aubry, A., Sakarellos, C., Gomez, E.J., Cung, M.T., Marraud, M., 1988, A β -turn like conformation in reduced peptide, International Journal of Peptide and Protein Research, vol 31, p. 420-28

MATSUMURA, Y., Umekawa, T., Kawamura, H., Robinson, P.S., Cook, N.D., Morimoto, S., 1992a, A simple method for measurement of phosphoramidon sensitive endothelin converting enzyme activity, Life Sciences, vol 51, p. 1603-11

MATSUMURA, Y., Tsukahara, Y., Kuninobu, K., Takaoka, M., Morimoto, S., 1992b, Phosphoramidon sensitive endothelin converting enzyme in vascular endothelial cells converts big endothelin-1 and big endothelin-3 to their mature form, FEBS Letters, vol 305, no. 2, p. 86-90

MATSUMURA, Y., Ikegawa, R., Tsukahara, H., Takaoka, M., Morimoto, S., 1990, Conversion of Big Endothelin-1 to Endothelin-1 by two types of metalloproteases derived from porcine aortic endothelial cells, FEBS Letters, vol 272, no. 2, p. 166-70

MORITA, A., Nomizu, M., Okitsu, M., Horie, K., Yokogoshi, H., Roller, P.P., 1994, D-Val²² containing human big endothelin-1 analog, (D-Val²²)Big ET-1(16-38) inhibits the endothelin converting enzyme, FEBS Letters, vol 353, p. 84-88

MERRIFIELD, R. B., 1963, Solid phase peptide synthesis: the synthesis of a tetrapeptide, Journal of the American Chemical Society, vol 85, p. 2149-54

NAKAJIMA, K., Niiyama, K., Ihara, M., Kojiri, K. Suda, H., 1989, Synthesis of endothelin-1 analogues, endothelin-3, and sarafotoxin S6b: structure-activity relationships, Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13 (Supp. 5), p. S8-S12

NOMIZU, M., 1991, Solid phase peptide synthesis of the human endothelin precursor peptide, International Journal of Peptides and Proteins Research, vol 38, p. 580-87

NICOLAS, E., 1995, A study of the use of NH₄I for the reduction of the methionine sulfoxide in peptides, Tetrahedron, vol 51, no. 19, p. 5701-10

OHNAKA, K., Takayanagi, R., Nishikawa, M., Haji, M., Nawata, H., 1993, Purification and characterization of a phosphoramidon sensitive endothelin converting enzyme in porcine aortic endothelium, Journal of Biological Chemistry, vol 268, no. 35, p. 26759-66

OKADA, K., Takada, J., Arai, Y., Matsuyama, K., Yano, 1991, Importance of the C-terminal region of Big endothelin-1 for specific conversion by phosphoramidon-sensitive endothelin converting enzyme, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol 180, no. 2, p. 1019-23

- OPGENORTH, T.J., Kimura, S., Wu-Wong, J.R., 1995, Characterization of endothelin converting enzyme, Methods in Neurosciences, vol 23, p. 251-65
- OPGENORTH, T. J., Wu Wong, J.R., Shiosaki, K., 1992, Endothelin converting enzyme, FASEB Journal, vol 6, p. 2653-59
- OTAKA, A., 1993, Deprotection and cleavage methods, Tetrahedron Letters, vol 34, no. 44, p. 7039-42
- PATEK, M., 1993, Multistep deprotection for peptide chemistry , International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 42, p. 97-117
- PLUMPTON, C., 1995, Phosphoramidon inhibition of the in vivo conversion of Big-ET-1 to ET-1, British Journal of Pharmacology, vol 116, p. 1821-28
- PLUMPTON, C., Kalinka, S., Martin, R.C., Horton, J.K., Davenport, A.P., 1994, Effects of phosphoramidon and pepstatin A on the secretion of endothelin-1 and Big-endothelin-1 by human umbilical vein endothelial cells: measurement by two-site enzyme-linked immunosorbent assay, Clinical Science, vol 87, p. 245-51
- POLLOCK, D.M., Keith, T.L., Highsmith, R.F., 1995, Endothelin receptors and calcium signaling, FASEB Journal, vol 9, p. 1196-1204
- POLLOCK, D.M., Shiosaki, K., Sullivan, G.M., Opegnorth, T.J., 1991, Rhamnose moiety of phosphoramidon is not required for in vivo inhibition of endothelin converting enzyme, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol 186, no. 2, p. 1146-50
- RAMAGE, R., Stewart, S.J., 1993, Peptide synthesis: synthesis of the Cysteine-containing peptides of biological and pharmaceutical interest, h-ANF and h-Big endothelin, Journal of Chemical Society, vol 1 p. 1947-52
- ROUX, S., Loffler, B.M., Gray, G.A., Sprecher, U., Clozel, M., Clozel, J.P., 1995, The role of endothelin in experimental cerebral vasospasm, Neurosurgery, vol 37, no. 1, p. 78-86
- RUBANYL, G. M., Polokoff, M.A., 1994, Endothelin: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology, Pharmacological Reviews, vol 46, no. 3, p. 325-415
- RUBANYL, G. M., Parker Boelho, L.H., 1991, Endothelins, FASEB Journal, vol 5, p. 2713-20
- SARIN, V.K., Kent, S.B.H., Mitchell, A.R., et Merrifield, R.B., 1984, A general approach to the quantitation of synthetic efficiency in solid-phase peptide synthesis as a function of chain length, Journal of the American Chemical Society, vol. 106, p. 7845

SAVAGE, P., Shetty, S.S., Martin, L.L., Jeng, A.Y., 1993, Conversion of proendothelin-1 into endothelin-1 by aspartyl protease, International Journal of Peptide and Protein Research, vol 42, p. 227-32

SCHMIDT, M., Kroger, B., Jacob, E., Seulberger, H., Subkowski, T., Otter, R., Meyer, T., Schmalzing, G., Hillen, H., 1994, Molecular characterization of human and bovine endothelin converting enzyme (ECE-1), FEBS Letters, vol 356, p. 238-43

SHIMADA, K., Matsumura, Y., Wakabayashi, K., Takahashi, M., Matsubara, A., Iijima, Y., Tanzawa, K., 1995a, Cloning and functional expression of human endothelin converting enzyme cDNA, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol 207, no. 2, p. 807-12

SHIMADA, K., 1995b, Identification and characterization of two isoforms of an ECE-1, FEBS Letters, vol 371, p. 140-44

SHIMADA, K., Takahashi M., Tanzawa, K., 1994, Cloning and functional expression of endothelin converting enzyme from rat endothelial cells, Journal of Biological Chemistry, vol 269, no. 28, p. 18275-78

SHIOSAKI, K., Tasker, A.S., Sullivan, G.M., Sorensen, B.K., von Geldern, T.W., Wu-Wong, J.R., Marselle, C.A., Opgenorth, T.J., 1993, Potent and selective inhibitors of an aspartyl protease like endothelin converting enzyme identified in rat lung, Journal of Medicinal Chemistry, vol 36, p. 468-78

SIMONSON, M.S., Dunn, M.J., 1994, Cellular signaling peptide of the endothelin gene family, FASEB Journal, vol 4, no. 12, p. 2989-3000

SMITH, R.M., 1988, Gas and liquid chromatography in analytical chemistry, John Wiley & Sons, Toronto

SOKOLOVSKY, M., 1992, Structure function relationship of endothelins, sarafotoxins and their receptor subtypes, Journal of Neurochemistry, vol 59, no. 3, p 809-12

SPINELLA, M. J., Krystek, S.R., Peapus, D.H., Wallace, B.A., Brunner, C., Anderson, T.T., 1989, A proposed structural model of endothelin, Peptide Research, vol 2, no. 4, p. 286-91

STEWART, J.M., Young, J.D., 1984, Solid Phase peptide synthesis, 2e édition, Pierce Chemical Cie., Rockford, Illinois

TAKADA, J., Okada, K., Ikegawa, T., Matsuyama, K., Yano, M., 1991, Phosphoramidon sensitive endothelin converting enzyme in the cytosol of cultured bovine endothelial cells, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol 176, no. 2, p. 860-65

TAKAGI, Y., Ninomiya, H., Sakamoto, A., Miwa, S., Masaki, T., 1995, Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors, Journal of Biological Chemistry, vol 270, no. 17, p. 10072-78

TAKAHASHI, M., Matsushita, Y., Iijima, Y., Tanzawa, K., 1993, Purification and characterization of endothelin converting enzyme from rat lung, Journal of Biological Chemistry, vol 168, no. 28, p. 21394-98

TAMAMURA, H., Otaka, A., Nakamura, J., Okubo, K., Koie, T., Ikeda, K., Ibuka, T., Fujii, N., 1995, Disulfide bond-forming reaction using dimethyl sulfoxide/ aqueous HCl system and its application to regioselective two disulfide bond formation, International Journal of Peptide and Protein Research, vol 45, p. 312-19

TAMAOKI, H., Kyogoku, Y., Nakajima, K., Sakakibara, S., Hayashi, M., Kobayashi, Y., 1992, Conformational study of endothelins and sarafotoxins with the cystine-stabilized helical motif by means of CD spectra, Biopolymers, vol 32, p. 353-57

TSUKAHARA, Y., Matsumura, Y., Kuninobu, K., Kojima, T., Takaoka, M., Morimoto, S., 1993, Phosphoramidon sensitive endothelin converting enzyme in cultured vascular smooth muscle cells converts Big Endothelin-3 to Endothelin-3, Life Sciences, vol 53, p. 465-71

TSURUMI, Y., Ohnata N., Iwamoto, T., Shigematsu, N., Sakamoto, K., Nishikawa, M., Kiyoto, S., Okuhara, M., 1994, WS79089 A, B and C, new endothelin converting enzyme inhibitors isolated from *Streptosporangium roseum* No.79089, Journal of Antibiotics, vol 47, no. 6, p. 619-30

VON GELDERN, T. W., Holleman, W.H., Opgenorth, T.J., 1991, A fluorogenic assay for endothelin converting enzyme, Peptide Research, vol 4, no. 1, p. 32-35

WALLACE, B. A., Janes, R.W., Bassolino, D.A., Krystek, S.R., 1995, A comparison of X-ray and NMR structure for human endothelin-1, Protein Sciences, vol 4, p. 75-83

WARNER, T. D., Budzik, G.P., Matsumoto, T., Mitchell, J.A., Forstermann, U., Murad, F., 1992, Regional differences in ECE activity in rat brain: inhibition by phosphoramidon and EDTA, British Journal of Pharmacology, vol 106, p. 948-52

WEBB, D. J., 1991, Endothelin receptors cloned, endothelin converting enzyme characterized and pathophysiological roles for endothelin proposed, Trends in Pharmacological Sciences, vol 12, p. 43-46

XU, D., Emoto, N., Giaid, A., Slaughter, C., Kaw, S., deWit, D., Yanagisawa, M., 1994, ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyses the proteolytic activation of Big endothelin-1, Cell, vol 78, p. 473-85

YANAGISAWA, M., and Masaki, T., 1989, Molecular biology and biochemistry of the endothelins, Trends in Pharmacological Sciences, vol 10, p. 374-78

YONEYAMA, T., Hori, M., Makatani, M., Yamamura, T., Tanaka, T., Matsuda, Y., Karaki, H., 1995, Subtypes of endothelin ET_A and ET_B receptors mediating tracheal smooth muscle contraction, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol 207, no. 2, p. 668-74

YORIMITSU, K., Moroi, K., Inagaki, N., Saito, T., Masuda, Y., Masaki, T., Seino, S., Kimura, S., 1995, Cloning and sequencing of a human endothelin converting enzyme in renal adenocarcinoma (ACHN) cells producing endothelin-2, Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 208, no. 2, p. 721-27

ZAID, A., Golomb, E., Bridenbaugh, R., Keiser, H.R., 1993, Metabolism of endothelin-1 and Big endothelin-1 by recombinant neutral endopeptidase EC 3.4.24.11, British Journal of Pharmacology, vol 109, p. 1024-28

Tableau 4 : Étapes du protocole de synthèse sur phase solide

NEUTRALISATION (seulement pour les résines BHA. HCl)		
1-	CH ₂ Cl ₂ 5% DIEA	15 minutes
2-	(2x) CH ₂ Cl ₂	2 minutes
3-	<u>procéder directement au couplage</u>	
DEPROTECTION		
1-	TFA 40% / CH ₂ Cl ₂	5 minutes
2-	TFA 40% / CH ₂ Cl ₂	20 minutes
COUPLAGE		
1-	(2x) CH ₂ Cl ₂	2 minutes
2-	EtOH	2 minutes
3-	CH ₂ Cl ₂	2 minutes
4-	(2x) DMF	2 minutes
5-	3 équivalents de Boc-A.A. (dissous dans le DMF) 5 équivalents de base: DIEA 3 équivalents de BOP (dissous dans le DMF)	45 minutes
6-	rinçage au DMF	2 minutes
7-	rinçage (2x) CH ₂ Cl ₂	2 minutes
8-	Test Kaiser à la ninhydrine	
9-	reprendre la déprotection pour l'acide aminé suivant	
