

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

M É M O I R E

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN

SCIENCES EXPÉRIMENTALES DE LA SANTÉ

PAR

DOMINIQUE LAVALLÉE

ÉTUDE STRUCTURALE ET

PHARMACOLOGIQUE DE LA

PORTION MÉDIANE (11-23)

DU PEPTIDE CGRP

AVRIL 1994

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement le directeur de mes travaux de maîtrise, le docteur Alain Fournier, pour sa très grande patience et pour l'aide précieuse qu'il a su m'apporter tout au long de l'élaboration de mon projet.

Je remercie également :

les docteurs Rémi Quirion et Yvan Dumont pour l'assistance qu'ils m'ont apportée lors de l'accomplissement de la partie pharmacologique de mon projet;

mes collègues de travail qui ont grandement facilité mon travail par leurs précieux conseils et amitié;

madame Pierrette Rainbow pour son travail de secrétariat lors de la dactylographie de ce mémoire;

l'INRS-Santé et le fonds FCAR pour leur support financier.

RÉSUMÉ

Une étude de structure-activité a été réalisée dans le but de déterminer l'importance des acides aminés 11 à 23 de la portion médiane du hCGRP α pour l'adoption des structures secondaires caractérisant cette région de la molécule et pour l'activité biologique au niveau des récepteurs du CGRP. Par conséquent, une série d'analogues et de fragments du hCGRP α a été synthétisée selon une méthodologie de synthèse en phase solide mettant à profit les excellentes propriétés de couplage du réactif BOP. Les analogues synthétiques ont été obtenus par la substitution successive des acides aminés 11 à 23 avec, par exemple, la L-alanine. La synthèse de ces dérivés sur un support réticulé a produit des peptides-résines dont l'acidolyse a donné des quantités de peptides bruts correspondant à d'excellents rendements. L'abondance relative de certains peptides a de plus été augmentée au moyen d'un traitement basique, ce qui a permis la transformation d'un sous-produit, formé lors du clivage acide suite à une migration acyle N \rightarrow O sur les résidus de sérine et/ou de thréonine. Une caractérisation des peptides par CLHP analytique, électrophorèse capillaire, spectrométrie de masse, analyse des acides aminés et dichroïsme circulaire des préparations de peptides purifiés par CLHP préparative a confirmé l'homogénéité de chaque peptide.

Une évaluation pharmacologique des analogues et fragments synthétiques a été effectuée sur deux préparations tissulaires à l'aide d'essais biologiques. Selon ces essais pharmacologiques, il semble que l'arginine-11 posséderait un rôle structural de grande importance pour l'activité biologique. Par contre, les résidus Ala-13, Leu-15, Leu-16 et Ser-17 joueraient un rôle plus ou moins critique dans le maintien du caractère amphiphile de la molécule. De plus, nos résultats ont également suggéré la participation des résidus Ser-19, Gly-20, Gly-21 et Val-22 dans une structure en coude β . L'ensemble de nos résultats démontre donc l'importance des divers résidus d'acides aminés du hCGRP α pour l'induction d'une réponse adéquate au niveau des récepteurs du CGRP. Ces informations devraient être des plus utiles pour le développement futur d'agonistes et d'antagonistes plus sélectifs pour les sous-types de récepteurs CGRP $_1$ et CGRP $_2$.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES	XI
INTRODUCTION	1
MATÉRIEL ET MÉTHODES	14
1 - Synthèse des analogues et fragments du hCGRP α	15
a) Réactifs et solvants	15
b) Choix de la résine et des groupements protecteurs des acides aminés	16
c) Protocole de synthèse peptidique	16
2 - Clivage acide des peptides	20
3 - Purification des peptides	20
a) Cyclisation des analogues linéaires	20
b) Traitement basique	21
c) Protocole de purification des peptides	21

	Page
4 - Caractérisation des peptides	23
a) CLHP analytique	23
b) Électrophorèse capillaire	23
c) Analyse des acides aminés	24
d) Spectrométrie de masse	25
e) Dichroïsme circulaire	25
5 - Études pharmacologiques	26
a) Oreillette gauche de cobaye	26
b) <i>Vas deferens</i> de rat	27
6 - Analyses statistiques	27
RÉSULTATS	28
7 - Synthèse, purification et caractérisation du hCGRP α et de ses analogues et fragments	29
a) Synthèse des peptides	29
b) Traitement basique	29
c) Purification et caractérisation des peptides	31
8 - Évaluation pharmacologique des peptides	32
a) Essais biologiques du hCGRP α et de ses analogues et fragments sur l'oreillette gauche de cobaye : Profils concentration-réponse	32
b) Essais biologiques du hCGRP α et de ses analogues et fragments sur le <i>vas deferens</i> de rat : Profils concentration-réponse	41

	Page
c) Activité biologique du hCGRP α et de ses analogues et fragments sur l'oreillette gauche de cobaye	42
d) Activité biologique du hCGRP α et de ses analogues et fragments sur le <i>vas deferens</i> de rat	52
e) Puissance relative des divers analogues et fragments du hCGRP α sur l'oreillette gauche de cobaye	53
f) Puissance relative des divers analogues et fragments du hCGRP α sur le <i>vas deferens</i> de rat	54
DISCUSSION	59
9. Conception et synthèse des analogues et fragments du hCGRP α	60
a) Choix des analogues et fragments du hCGRP α	60
b) Évaluation de la pureté et caractérisation des analogues et fragments synthétiques du hCGRP α	61
10. Évaluation pharmacologique des peptides	63
a) Choix des tissus	63
b) Estimation de l'activité biologique et du contenu en hélice α des peptides synthétiques : analyse et rôles possibles des résidus 11 à 23 du CGRP	64
— position 11	69
— position 13	73
— positions 15 et 16	76
— position 17	79
— position 18	80
— positions 19 et 21	86
— position 20	88
— position 22	90
— position 23	90

	Page
CONCLUSION	97
RÉFÉRENCES	122
 ANNEXE	
1. Abréviations à une ou trois lettres des acides aminés	135
2. Abréviations des groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés trifonctionnels utilisés lors des synthèses	136

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I : Séquences des peptides de la famille du CGRP	5
Tableau II : Protocole pour un cycle de synthèse réalisé avec l'agent de couplage BOP	18
Tableaux IIIa, IIIb et IIIc : Caractérisation du hCGRP α et de ses fragments et analogues par CLHP analytique, électrophorèse capillaire, spectrométrie de masse et analyse des acides aminés	33
Tableau IVa, IVb et IVc : Ellipticité moléculaire du hCGRP α et de ses fragments et analogues à 208 et 222 nm déterminée par la spectroscopie de dichroïsme circulaire et contenu en hélice- α	36
Tableau Va, Vb et Vc : Puissance relative des fragments et analogues du hCGRP α dans différents tissus	56
Tableau VI : Paramètres conformationnels déterminés par Chou et Fasman à l'aide de 29 protéines (13)	67
Tableau VII : Degré d'hydrophilicité des différents acides aminés	70
Tableau VIII : Comparaison entre les acides aminés arginine et lysine de la position 11	71
Tableau IX : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 11	72

	Page
Tableau X : Comparaison entre les acides aminés alanine et glutamine de la position 13	74
Tableau XI : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 13	75
Tableau XII : Comparaison entre les acides aminés leucine et alanine des positions 15 et 16	77
Tableau XIII : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués aux positions 15 et 16	78
Tableau XIV : Comparaison entre les acides aminés sérine et alanine de la position 17	82
Tableau XV : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 17	83
Tableau XVI : Comparaison entre les acides aminés arginine, alanine, asparagine et lysine de la position 18	84
Tableau XVII : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 18	85
Tableau XVIII : Paramètres conformationnels du coude β des acides aminés 19 à 22 selon Chou et Fasman (13)	88
Tableau XIX : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués aux positions 19 et 21	89
Tableau XX : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 20	92

	Page
Tableau XXI : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 22	93
Tableau XXII : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 23	94

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Structure primaire du CGRP α humain	3
Figure 2 : Mécanisme réactionnel du couplage réalisé avec le réactif BOP proposé par Castro <i>et al.</i> (10)	19
Figure 3 : Mécanisme réactionnel du déplacement N \rightarrow O observé sur les résidus de sérine et de thréonine lors du clivage à l'acide fluorhydrique (4)	22
Figure 4 : CLHP analytique du [Ala ¹⁶]hCGRP ₈₋₃₇ après: A) synthèse en phase solide avec le réactif BOP et un clivage au HF; B) un traitement basique de la préparation de peptide brut avec du NH ₄ OH pour une période de 30 minutes; C) purification du peptide par CLHP préparative	30
Figure 5 : Profil de la réponse inotrope positive de l'oreillette gauche de cobaye induite par le hCGRP α (A), [Ala ¹⁷]hCGRP α (B) et [Ala ¹⁵]hCGRP α (C)	39
Figure 6 : Profil de la réponse inotrope positive de l'oreillette gauche de cobaye induite par le hCGRP α seul (A) ou en présence de 1 μ M de hCGRP ₈₋₃₇ (B), [Ala ¹⁷]-hCGRP ₈₋₃₇ (C), ou [Ala ¹⁵]hCGRP ₈₋₃₇ (D)	40
Figure 7 : Profil de la réponse inotrope positive de l'oreillette gauche de cobaye induite par le hCGRP α (A), le [Cys(Acm) ^{2,7}]hCGRP α (B) et le [Cys(Acm) ^{2,7} , Ala ¹⁷]-hCGRP α (C)	43
Figure 8 : Profil de l'inhibition de la force de contraction du vas deferens de rat induite par le hCGRP α (A), [Ala ¹⁵]-hCGRP α (B) et [Ala ¹⁷]hCGRP α (C)	44

	Page
Figure 9 : Profil de l'inhibition de la force de contraction du <i>vas deferens</i> de rat induite par le hCGRP α seul (A) ou en présence de 1 μ M de hCGRP ₈₋₃₇ (B), [Ala ¹⁵]hCGRP ₈₋₃₇ (C) ou [Ala ¹⁷]hCGRP ₈₋₃₇ (D)	45
Figure 10 : Profil de l'inhibition de la force de contraction du <i>vas deferens</i> de rat induite par le hCGRP α seul (A), le [Cys(Acm) ^{2,7}]hCGRP α (B), le [Cys(Acm) ^{2,7} , Ala ¹⁵]hCGRP α (C) et le [Cys(Acm) ^{2,7} Ala ¹⁷]hCGRP α (D)	46
Figure 11 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope positif induit par le hCGRP α et ses analogues sur l'oreillette gauche de cobaye	47
Figure 12 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope positif sur l'oreillette gauche de cobaye induit par le hCGRP α seul ou en présence de 1 μ M de hCGRP ₈₋₃₇ ou de ses analogues	48
Figure 13 : Courbes concentration-réponse de l'inhibition de la force de contraction du <i>vas deferens</i> de rat induite par le hCGRP α et ses analogues	49
Figure 14 : Courbes concentration-réponse de l'inhibition de la force de contraction du <i>vas deferens</i> de rat induite par le hCGRP α , ou le [Cys(Acm) ^{2,7}]hCGRP α et ses analogues	50
Figure 15 : Courbes concentration-réponse de l'inhibition de la force de contraction du <i>vas deferens</i> de rat induite par le hCGRP α seul, ou en présence de 1 μ M de hCGRP ₈₋₃₇ ou de ses analogues	51
Figure 16 : Modèles de la structure hélice α	65
Figure 17 : Modèle de la structure coude β	66
Figure 18 : Représentation schématique de l'hélice α amphiphile du hCGRP α selon Schiffer et Edmundson (99)	68

	Page
Figure 19 : Mécanismes d'action possibles du neuropeptide Y proposé par McLean <i>et al.</i> (69) et pouvant s'appliquer au CGRP	96
Figure 20 : Modèle moléculaire CPK du hCGRP α dans une forme semi-allongée	104
Figure 21 : Modèle moléculaire CPK du hCGRP α dans lequel le coude β (19-22) est discerné	106
Figure 22 : Modèle moléculaire CPK du hCGRP α dans lequel le coude β (30-33) est discerné	108
Figure 23 : Modèle moléculaire CPK du hCGRP α dans une forme compacte. (Structure hypothétique stabilisée par la superposition des noyaux aromatiques de Phe-27 et Phe-37)	110
Figure 24a : Modèle moléculaire CPK du hCGRP α dans lequel l'interaction Phe-27/Phe-37 a été remplacée par un pont disulfure (vue de la molécule sous une forme semi-allongée)	112
Figure 24b : Modèle moléculaire CPK du hCGRP α dans lequel l'interaction Phe-27/Phe-37 a été remplacée par un pont disulfure (vue de la molécule sous une forme compacte intermédiaire)	114
Figure 24c : Modèle moléculaire CPK du hCGRP α dans lequel l'interaction Phe-27/Phe-37 a été remplacée par un pont disulfure (vue de la molécule sous une forme compacte)	116
Figure 25a : Modèle moléculaire CPK du fragment 8-37 du hCGRP α (forme compacte vue du dessus)	118
Figure 25b : Modèle moléculaire CPK du fragment 8-37 du hCGRP α (forme compacte vue du dessous)	120

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La découverte du peptide alternatif du gène de la calcitonine («calcitonin-gene related peptide», CGRP), un peptide de 37 acides aminés, par Amara *et al.* en 1982, a été réalisée suite à une analyse structurale du gène de la calcitonine de rat (1). Un épissage alternatif de ce gène, spécifique au tissu, résulte en la production d'ARNs messagers distincts codant pour des protéines différentes (1,2,9,78,90,91,93,105,123). Dans la glande thyroïde, le gène de la calcitonine produit deux ARNs messagers, l'un codant pour un précurseur de la calcitonine et de la katalcalcine, et l'autre pour le précurseur du CGRP (2,9,90,91,123). Ces peptides sont classés au sein d'une seule et même famille.

Des études subséquentes utilisant des techniques de biologie moléculaire et d'ADN recombinant ont mis en évidence l'existence de deux formes de CGRP chez l'humain et le rat (CGRP α et CGRP β) (2,9,90,105,106,123). Par contre, une seule forme de CGRP a été identifiée chez le poulet (74) et chez le porc (54). La structure primaire du hCGRP α (CGRP α humain) a tout d'abord été suggérée à partir du gène de la calcitonine, puis elle a été confirmée par spectrométrie de masse (78). Ce peptide est caractérisé principalement par la présence d'un pont disulfure formé entre les cystéines des positions 2 et 7 et par un résidu phénylalanine amide en position C-terminal (Fig.1). La séquence du hCGRP β présente 92% d'homologie avec celle du hCGRP α . Elle a donc seulement trois acides aminés différents aux

positions 3, 22 et 25 (106) (Tableau I). Par contre, quatre substitutions d'acides aminés (positions 1,3,25 et 35) se retrouvent dans la séquence du rCGRP α (rat), dont trois entraînent un changement de charge (1,90,106). Le rCGRP β (rat), le pCGRP (porc) et le cCGRP (poulet), quant à eux, diffèrent du hCGRP α respectivement par trois, six et quatre acides aminés. Les séquences des calcitonines humaine (hCT) et de saumon (sCT), quant à elles, présentent de faibles homologues (16% et 24%) avec celle du hCGRP α . Malgré cela, il a été suggéré que le CGRP induirait certains de ses effets biologiques *via* les récepteurs de la calcitonine (12,25,38,39,88,104,122,123).

Grâce à des études utilisant des méthodes immunohistochimiques et radio-immunologiques chez le rat et l'humain, il a été possible de localiser et de quantifier le CGRP, lequel est largement distribué dans tout l'organisme. Ainsi, les deux formes du CGRP, α et β , sont synthétisées dans le système nerveux central et périphérique. Au niveau du système nerveux central, le CGRP est particulièrement abondant dans l'hypothalamus (9,25,90), alors qu'il est colocalisé avec la substance P et l'acétylcholine, respectivement, dans les fibres sensorielles et les motoneurones du système nerveux périphérique (42,67,90,111). Dans la glande thyroïde, le CGRP et la calcitonine sont présents dans les cellules parafolliculaires et leur libération dans la circulation sanguine répond à une élévation de la concentration du calcium sérique (42). Le CGRP a également été détecté dans plusieurs autres systèmes de l'organisme. Entre autres, au niveau

TABLEAU I :

SÉQUENCES DES PEPTIDES DE LA FAMILLE DU CGRP

Peptide ^{a)}	Position des acides aminés																																								
	1	5	10	15	20	25	30	35																																	
hCGRP α	<i>b)</i>																																								
	NH ₂	-	A	C	D	T	A	T	C	V	T	H	R	L	A	G	L	L	S	R	S	G	G	V	V	K	N	N	F	V	P	T	N	V	G	S	K	A	F	-	CONH ₂
hCGRP β	NH ₂	-	A	C	N	T	A	T	C	V	T	H	R	L	A	G	L	L	S	R	S	G	G	M	V	K	S	N	F	V	P	T	N	V	G	S	K	A	F	-	CONH ₂
rCGRP α	NH ₂	-	S	C	N	T	A	T	C	V	T	H	R	L	A	G	L	L	S	R	S	G	G	V	V	K	D	N	F	V	P	T	N	V	G	S	E	A	F	-	CONH ₂
rCGRP β	NH ₂	-	S	C	N	T	A	T	C	V	T	H	R	L	A	G	L	L	S	R	S	G	G	V	V	K	D	N	F	V	P	T	N	V	G	S	K	A	F	-	CONH ₂
cCGRP	NH ₂	-	A	C	N	T	A	T	C	V	T	H	R	L	A	D	F	L	S	R	S	G	G	V	G	K	N	N	F	V	P	T	N	V	G	S	K	A	F	-	CONH ₂
pCGRP	NH ₂	-	S	C	N	T	A	T	C	V	T	H	R	L	A	G	L	L	S	R	S	G	G	M	V	K	S	N	F	V	P	T	D	V	G	S	E	A	F	-	CONH ₂
PAD	NH ₂	-	K	C	N	T	A	T	C	A	T	Q	R	L	A	N	F	L	V	H	S	S	N	N	F	G	A	I	L	S	S	T	N	V	G	S	N	T	Y	-	CONH ₂
hCT	NH ₂	-	C	G	N	L	S	T	C	M	L	G	T	Y	T	Z	D	L	F	P	-	-	-	-	-	K	H	T	F	P	Z	T	A	I	G	V	G	A	P	-	CONH ₂
sCT	NH ₂	-	C	S	N	L	S	T	C	V	L	G	C	L	S	Q	E	L	H	K	-	-	-	-	L	O	T	Y	P	R	T	N	T	G	S	G	T	P	-	CONH ₂	

a) Abréviations: hCGRP α : "Calcitonin-gene related peptide" alpha humain, hCGRP β : "calcitonin-gene related peptide" bêta humain, rCGRP α : "calcitonin-gene related peptide" alpha de rat, rCGRP β : "calcitonin-gene related peptide" bêta de rat, cCGRP: "calcitonin-gene related peptide" de poulet, pCGRP: "calcitonin gene-related peptide" porcin, PAD: peptide associé au diabète (ou amyline), hCT: calcitonine humaine, sCT: calcitonine de saumon.

b) Symboles des acides aminés présentés à l'appendice 1.

du système cardiovasculaire, il a été localisé dans les fibres nerveuses sensibles associées à l'aorte (5,35,123), aux vaisseaux sanguins (25,34,35,67,90,123), aux artères coronaires (35,123) et au coeur, où il est très abondant dans les oreillettes (25,35,49,90,95,119,123). Une grande quantité de CGRP a été retrouvée dans des composantes du système urogénital, dont l'utérus, la vessie et les muscles lisses non vasculaires (36). De plus, il est retrouvé dans les fibres nerveuses sensibles entourant le côlon, le rectum, le duodénum, la vésicule biliaire et le pancréas, généralement colocalisé avec la substance P (90,108). Le CGRP a aussi été mis en évidence dans les cellules endocrines des îlots de Langerhans (31). De plus, il a été observé qu'au niveau de l'intestin la forme $\text{CGRP}\alpha$ est plus abondante dans les fibres nerveuses alors que la forme $\text{CGRP}\beta$ prédomine dans les neurones intrinsèques.

Des études réalisées à l'aide de méthodes biochimiques et autoradiographiques ont permis d'observer une corrélation entre la distribution du CGRP et de ses sites de liaison dans l'organisme, entre autres, au niveau des vaisseaux sanguins (45), du coeur (16,17,25,101,104,119,121), du cerveau (15-18,20,25,39,101,102,103,121), des poumons (33,63), du pancréas (31,66), du rein (38,39,56), de la rate (16,17,101,104) et du foie (12,62,120). Ces organes ou tissus ont été, par la suite, des sites clés pour déterminer et caractériser les diverses actions biologiques du CGRP. Ainsi, plusieurs actions biologiques ont été associées au CGRP, notamment au niveau des systèmes nerveux central, cardio-

vasculaire, gastrointestinal, urogénital, respiratoire et immunitaire.

Au niveau du système nerveux central, le CGRP agit comme inhibiteur de la sécrétion gastrique (25,48,60,82), inducteur de l'hyperthermie (17) et agit sur le centre de satiété pour diminuer la prise de nourriture (17,25,55,61). De plus, en agissant sur les noyaux végétatifs, le CGRP contrôle le système cardiovasculaire. Notamment, des études ont démontré qu'une administration intracérébroventriculaire de CGRP provoque une augmentation de la concentration de noradrénaline et une hausse de la pression sanguine et du rythme cardiaque (25,26).

Une des fonctions physiologiques du CGRP au niveau du système cardiovasculaire est la régulation du tonus vasculaire. En effet, il a été observé, chez l'homme, qu'une injection intradermique de CGRP provoque des rougeurs locales persistantes (5), alors qu'une injection sous-cutanée à des lapins entraîne une forte dilatation microvasculaire, notamment au niveau des artérioles (5). En fait, la vasodilatation des artères de la peau entraîne une augmentation de la perméabilité et de l'extravasation plasmique. Cet effet résulterait de la potentialisation de l'action des tachykinines, telle la substance P (6,7,32,43). On a aussi observé que le CGRP dilate les artères cervicales, mésentériques et coronaires (46,67,112). Ainsi, des études ont démontré qu'une administration intraveineuse de CGRP provoque une vasodilatation périphérique, qui est accompagnée d'une augmentation du rythme et de la force de contraction cardiaques. De plus, une diminution de la pression artérielle résulte en une dilatation des artères coronaires (43,65,68,110). Malgré le

fait que le mécanisme sous-jacent à l'effet vasodilatateur du CGRP soit encore mal connu, ce peptide est reconnu comme le plus puissant des agents vasodilatateurs identifiés jusqu'à ce jour (5,34,43,45,67,110).

Étant donné la forte densité de l'immunoréactivité apparentée au CGRP et de ses sites de liaison au niveau du coeur, particulièrement dans les oreillettes, des études *in vitro* ont été menées afin de déterminer si le peptide pouvait y exercer certains effets pharmacologiques. Ainsi, on a observé, sur des coeurs isolés de rat, qu'une perfusion de CGRP résulte en une diminution de la pression coronaire ainsi qu'en une augmentation de la force de contraction et du rythme cardiaque (38,46,65). Des essais biologiques *in vitro* réalisés sur des oreillettes de cobaye et de rat, ont démontré que le CGRP provoque une réponse inotrope positive sur l'oreillette gauche stimulée électriquement, ainsi que des réponses inotrope et chronotrope positives sur l'oreillette droite (16,17,30,49,65,94,95,98,104,118). Il semble que le CGRP induirait ses effets biologiques sur les oreillettes en agissant au niveau postsynaptique (49,65). Certains chercheurs ont déterminé que le mécanisme d'action cellulaire du CGRP au niveau des oreillettes implique une liaison spécifique du peptide avec ses récepteurs, l'activation de l'adénylate cyclase, suivie de celle des protéines kinases intracellulaires et finalement une phosphorylation des canaux calciques provoquant du même coup une entrée de calcium dans les myocytes des oreillettes (49,83,98,118). Toutefois, il n'est pas encore complètement expliqué comment une

hausse de calcium intracellulaire dans les oreillettes entraîne une augmentation de la force de contraction et du rythme cardiaque.

Plusieurs actions du CGRP ont aussi été notées au niveau du système gastrointestinal. Plusieurs études *in vitro* ont démontré que le CGRP provoque, chez le cobaye et le rat, une inhibition de la contraction du duodénum et une relaxation de l'iléon, précontracté à l'histamine (57,103). De plus, le CGRP inhibe la sécrétion d'insuline au niveau des îlots de Langerhans (31,44). Finalement, des études récentes ont permis la découverte d'un nouveau peptide attribué à la famille du CGRP, l'amyline ou le DAP, lequel a été associé à l'apparition du diabète de type II chez l'humain. Ce peptide agirait *via* les récepteurs du CGRP (14,58,59,76,89).

On a dénoté également de nombreuses actions du CGRP au niveau du système urogénital. Notamment, le CGRP a été localisé dans les fibres nerveuses sensorielles entourant le *vas deferens* de rat et de cobaye (40). Sur ce tissu stimulé électriquement, le CGRP inhibe la force de contraction en agissant sur les cellules musculaires lisses (16,17,40,62,96). Cet effet serait médié par une action postjonctionnelle du CGRP sur les cellules musculaires lisses du *vas deferens* (96). Des études ont également précisé que le CGRP ne modulerait pas l'action de la noradrénaline mais que son action serait plutôt d'inhiber la contraction du *vas deferens* induite par l'adénosine triphosphate (ATP). En effet, le CGRP agirait au niveau postjonctionnel en inhibant les effets de l'ATP sur les muscles lisses du *vas*

deferens, et au niveau préjonctionnel en inhibant la libération d'ATP. De plus, il a été observé que le CGRP inhibe chez l'humain la contraction spontanée de l'utérus et des trompes de Fallope (3,19), et qu'il augmente l'excrétion urinaire de chlore et de sodium en agissant *via* les récepteurs de la calcitonine (38,117).

Finalement, le CGRP agit sur le système respiratoire en inhibant la contraction des bronches induite par les tachykinines (33,53), et sur le système immunitaire en inhibant la prolifération des lymphocytes T induite par les mitogènes (114, 115). De plus, il semble qu'il modulerait l'activité de l'acétylcholine en stimulant la synthèse des récepteurs nicotiniques au niveau des jonctions neuromusculaires (80).

Le CGRP a donc d'importantes fonctions biologiques. Il devenait alors intéressant, par la suite, de synthétiser chimiquement le CGRP afin d'effectuer des études pharmacologiques permettant de mieux caractériser le peptide et ses récepteurs. Notamment, notre groupe a rapporté que l'analogue linéaire [(Cys-(Acm)^{2,7}]hCGRP α est un puissant agoniste du hCGRP α dans l'inhibition de la contraction du *vas deferens* chez le rat, alors qu'il n'a que peu d'effets sur les réponses inotrope et chronotrope des oreillettes de cobaye (16). De plus, on a observé que le fragment hCGRP₈₋₃₇ agit comme un puissant antagoniste des réponses provoquées par le hCGRP α sur les oreillettes de cobayes, alors qu'il ne possède qu'une faible activité antagoniste sur le *vas deferens* de rat (17). Un autre fragment, le hCGRP₁₂₋₃₇, quant à lui, démontre une activité antagoniste affaiblie sur

les oreillettes de cobaye, alors qu'il est totalement inactif sur le *vas deferens* de rat (16,17). Ces résultats obtenus par notre groupe ont donc permis de mettre en évidence l'existence d'une hétérogénéité des récepteurs du CGRP et ont donné lieu à leur classification. Le récepteur CGRP₁ serait sensible à l'activité antagoniste du hCGRP₈₋₃₇, alors que le récepteur CGRP₂ répondrait aux effets agonistes du [Cys(Acm)^{2,7}]hCGRP_α (16,17). De plus, l'existence d'une troisième classe de récepteurs du CGRP, qui se retrouverait dans certaines régions du cerveau de rat, a été proposée. Ceux-ci seraient très sensibles à la calcitonine de saumon (18,103).

Par la suite, des études plus approfondies de structure-activité ont permis d'identifier certains des éléments structuraux essentiels au CGRP pour son activité biologique et sa liaison aux sites récepteurs. Il semble, tout d'abord, que les acides aminés 1 à 7 situés en N-terminal soient essentiels pour la stimulation du récepteur (activité intrinsèque), alors que les résidus 8 à 18 et la portion C-terminale permettraient la formation de la conformation appropriée pour l'interaction du peptide avec les récepteurs, i.e. l'affinité (16,113). En effet, il semble que les résidus en C-terminaux soient essentiels pour la liaison aux récepteurs, car il a été démontré que les fragments N-terminaux rCGRP₁₋₁₆ et rCGRP₁₋₁₈ sont dépourvus d'affinité alors que les fragments C-terminaux hCGRP₈₋₃₇ et rCGRP₂₈₋₃₇ sont capables de se lier aux récepteurs CGRP₁ (11,12,17,57,66,76,113). Il a également été proposé que la présence de la phénylalanine amide en C-terminal serait essentielle pour la

liaison du CGRP (76) et que le pont disulfure entre les résidus 2 et 7 serait essentiel pour son activité biologique sur les récepteurs CGRP₂ (16,26,124).

D'importants progrès ont été faits dans la caractérisation des récepteurs du CGRP, mais la relation entre les structures secondaire et tertiaire du peptide et son activité biologique demeure encore mal comprise. Cependant, des études structurales utilisant des techniques de dichroïsme circulaire, de modélisation moléculaire et de résonance magnétique nucléaire ont montré que les acides aminés 8 à 18 du CGRP adoptent une structure en hélice α amphiphile qui se termine par une structure coude β , impliquant les résidus 19 à 22 et assurant la réversibilité de la chaîne peptidique (8,62,63,99). La méthode théorique de Chou et Fasman, estimant la structure adoptée par les acides aminés de la molécule, suggère également la formation de ces structures secondaires (13,24). De plus, l'élaboration d'un diagramme de Schiffer et Edmundson avec les résidus 8 à 18 révèle que l'hélice alpha est amphiphile (99). En effet, les acides aminés hydrophobes, telle la leucine, sont situés sur un côté de l'hélice, alors que les résidus hydrophiles, telle l'arginine, sont disposés sur la face opposée. La présence d'une structure secondaire amphiphile a aussi été rapportée pour plusieurs autres peptides, incluant la calcitonine (21-23,41). Il semblerait que cette région jouerait un rôle déterminant dans l'interaction du peptide avec les récepteurs en permettant son association avec la membrane cellulaire (51,52,69,75,79,100,124).

Des études récentes de notre groupe entreprises pour déterminer l'importance des acides aminés 8 à 12 du segment N-terminal du hCGRP₈₋₃₇ pour son affinité et son activité antagoniste ont démontré que la valine-8 ne serait pas nécessairement requise tandis que les résidus thréonine-9 et histidine-10 ne joueraient un rôle qu'essentiellement structural. Quant à l'arginine-11 et la leucine-12, ils contribueraient par contre de façon majeure aux propriétés antagonistes du fragment, soit en assumant un rôle structural majeur et/ou en participant directement à l'interaction spécifique avec les récepteurs CGRP₁ (72,73).

Ces résultats nous ont amenés à poursuivre des études visant à déterminer l'importance des résidus d'acides aminés présents dans le segment central du peptide CGRP. L'objectif de notre étude a donc été d'améliorer les connaissances sur le rôle joué par les structures secondaires hélice α et coude β dans la molécule en déterminant l'importance des acides aminés 11 à 23 dans le maintien de ces conformations. Pour atteindre notre objectif, nous avons synthétisé une série de fragments et d'analogues du hCGRP α obtenus après substitution successive d'un acide aminé. L'activité biologique de ces fragments et analogues a été évaluée en utilisant deux préparations tissulaires, soit l'oreillette de cobaye (récepteur CGRP₁) et le *vas deferens* de rat (récepteur CGRP₂).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 - Synthèse des analogues et fragments du hCGRP α

a) Réactifs et solvants

La synthèse des peptides a été réalisée sur un support solide constitué d'un copolymère de styrène et de divinylbenzène (1%) et contenant des groupements benzhydramine (0,33 mmole/g). Les dérivés d'acides aminés utilisés pour la synthèse portaient le groupement protecteur ter-butyloxycarbonyle (Boc) sur la fonction amine située en position alpha. De plus, les chaînes latérales des acides aminés étaient protégées de façon adéquate à l'aide de divers groupements protecteurs : Arg (Tos), Asp (β -Bzl), Cys(Acm), His(Tos), Lys(2Cl-Z), Ser(Bzl) et Thr(Bzl)*. La résine et les dérivés d'acides aminés proviennent de Bachem (Torrance, CA) tandis que le réactif de couplage utilisé, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris (diméthylamino) phosphonium (BOP), a été obtenu de Richelieu Biotechnologies (St-Hyacinthe, Québec). Les solvants organiques diméthylformamide (DMF) et le dichlorométhane (CH_2Cl_2) proviennent de Anachemia Canada inc., (Ville St-Pierre, Québec), alors que l'acide trifluoroacétique Biograde (TFA) provient de Halocarbon (Hackensack, NJ). Finalement, le diisopropyléthylamine (DIEA), obtenu de Pfaltz et Bauer (Waterbury, CT), a été distillé avant utilisation.

* Définition des groupements protecteurs: Annexe 2

b) Choix de la résine et des groupements protecteurs des acides aminés

L'utilisation d'une résine benzhydrylamine comme support solide est nécessaire afin de générer lors du clivage acide du peptide, une fonction amide sur l'acide aminé (phénylalanine) en position C-terminale (86,107). De plus, la synthèse des peptides a été réalisée avec des dérivés d'acides aminés portant le groupement Boc en alpha car il s'agit d'un groupement dont le niveau de labilité aux conditions acides convient à notre stratégie de synthèse. En fait, le groupement protecteur Boc est enlevé en présence d'un acide tel le TFA. Par contre, pour éliminer les groupements protecteurs des fonctions portées par les chaînes latérales des acides aminés, il faut un acide tel l'acide fluorhydrique, lequel est utilisé lors du clivage des peptides. Seul le groupement protecteur Acm porté par la fonction thiol des cystéines n'est pas labile à l'acide fluorhydrique, ce qui permet alors d'obtenir un peptide linéaire (107).

c) Protocole de synthèse peptidique

La méthode de synthèse peptidique utilisée est celle en phase solide qui consiste à assembler les acides aminés un à la fois sur un support solide (27-29, 71,107). Le premier acide aminé à être attaché sur la résine benzhydrylamine a été le résidu phénylalanine situé en C-terminal à la position 37. Par la suite, les acides aminés ont été ajoutés successivement un à la fois jusqu'à l'obtention du peptide complet. Les synthèses ont été réalisées à l'aide d'un synthétiseur manuel muni

de plusieurs réacteurs. L'attachement de chaque acide aminé a été fait par un cycle comprenant une déprotection, suivie du couplage, puis de plusieurs étapes de lavages (voir Tableau II). En bref, il y a eu d'abord un lavage avec du CH_2Cl_2 , puis une déprotection avec du TFA/ CH_2Cl_2 40% pour éliminer le groupement Boc de l'acide aminé. D'autres lavages ont ensuite été effectués avec de l'éthanol, du CH_2Cl_2 , du DMF et du 5% DIEA/DMF, avant de procéder à l'étape de couplage. Le couplage a été réalisé par l'ajout de trois équivalents du dérivé d'acide aminé, de 3 équiv. du réactif BOP dilué dans le DMF et de 6 équiv. de DIEA. Le mécanisme réactionnel du couplage à l'aide du BOP est montré à la Figure 2 (10,27,29). Le couplage permet la formation d'un lien peptidique entre la fonction amine de l'acide aminé ajouté précédemment et lié à la résine, et la fonction carboxylique du α -Boc-acide aminé que l'on désire incorporer. Le DIEA est utilisé comme base organique et le DMF, un solvant aprotique, est nécessaire pour la dissolution des acides aminés. Après chaque étape de couplage, un petit échantillon de peptide-résine a été prélevé afin d'effectuer un test à la ninhydrine (50). Ce test permet d'estimer la présence de fonctions amines libres et indique avec beaucoup de sensibilité le degré de couplage. Après le couplage, la résine-peptide a été bien nettoyée au moyen de plusieurs lavages. Ce cycle a été répété jusqu'à l'assemblage complet des acides aminés constituant le peptide. Une étape finale de déprotection au TFA/ CH_2Cl_2 40% a été réalisée, puis le peptide-résine a été lavé successivement avec du méthanol, du CH_2Cl_2 et du méthanol avant d'être séché sous vide.

TABLEAU II :

**PROTOCOLE POUR UN CYCLE DE SYNTHÈSE
RÉALISÉ AVEC L'AGENT DE COUPLAGE BOP**

ÉTAPE	RÉACTIF ^{a)}	TEMPS (min)
1. Lavage	CH ₂ Cl ₂	1 x 1
2. Déprotection	40% TFA/CH ₂ Cl ₂	1 x 5
3. Déprotection	40% TFA/CH ₂ Cl ₂	1 x 20
4. Lavage	EtOH	1 x 1
5. Lavage	CH ₂ Cl ₂	1 x 1
6. Lavage	DMF	1 x 1
7. Lavage	5% DIEA/DMF	1 x 1
8. Couplage	3 équiv. de α-Boc-AA-COOH + 3 équiv. de BOP/DMF + 6 équiv. de DIEA	1 x 20
9. Lavage	DMF	1 x 1
10. Lavage	CH ₂ Cl ₂	2 x 1

^{a)} Les solvants utilisés pour les lavages et les couplages ont été mesurés afin d'obtenir des volumes de 10 mL/g de résine.

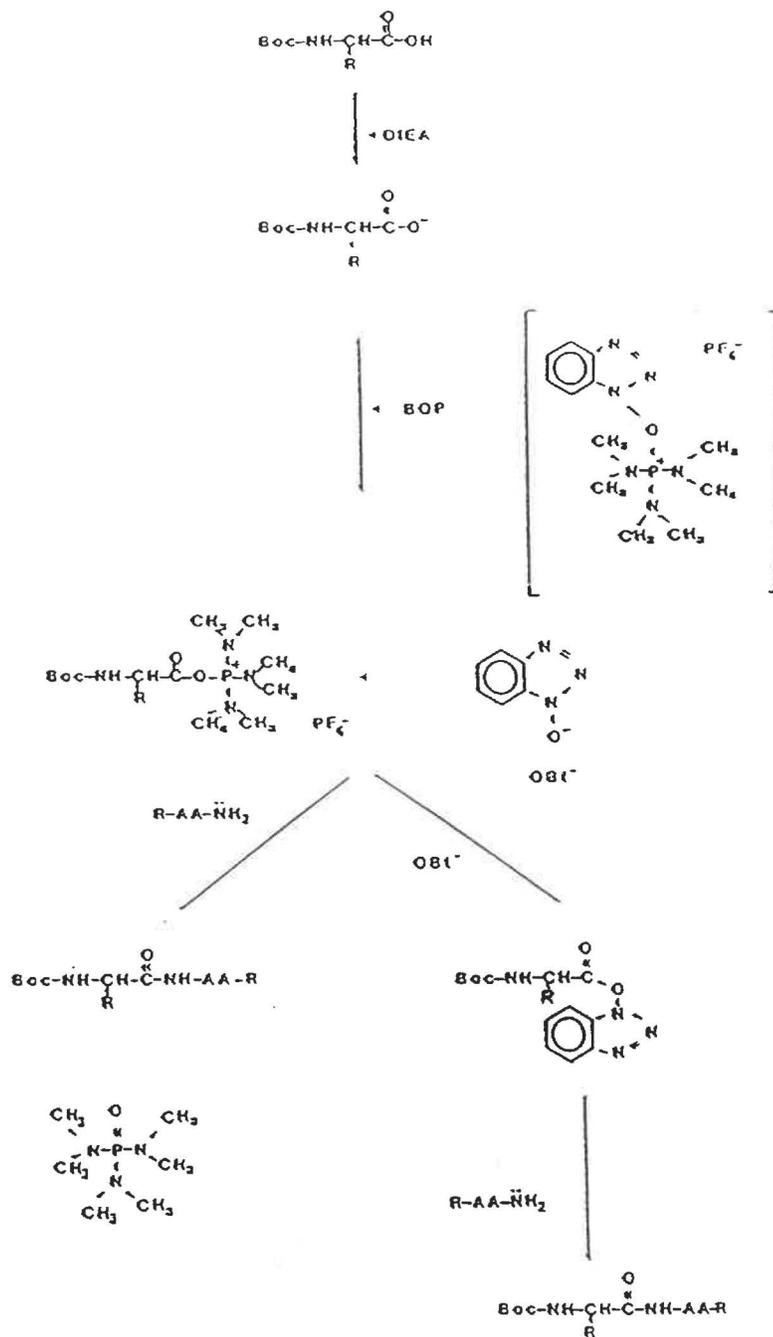


Figure 2 : Mécanisme réactionnel du couplage réalisé avec le réactif BOP proposé par Castro *et al.* (10).

2 - Clivage acide des peptides

Le peptide complet a ensuite été clivé du support solide à l'aide de l'acide fluorhydrique (HF). Du même coup, ce clivage a permis l'enlèvement des groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés, à l'exception du groupement Acm présent sur les fonctions thiols des cystéines. Une quantité connue de peptide-résine a été déposée dans un réacteur en présence de *m*-crésol (1 mL/g de peptide-résine). Le *m*-crésol sert d'agent capteur des ions carboniums formés lors du clivage des groupements protecteurs et il permet ainsi d'éviter la formation de certaines réactions secondaires (4). L'acide fluorhydrique a été ajouté au réacteur (10 mL de HF/g de peptide-résine) et la réaction a été poursuivie à 0°C pendant une heure. Le HF a alors été évaporé sous vide et le peptide a été précipité avec de l'éther anhydre. Le peptide a ensuite été extrait par filtration avec de l'acide trifluoroacétique, suivi par de l'acide acétique 20% et d'une évaporation. Le peptide brut a été redissous avec de l'eau et lyophilisé.

3 - Purification des peptides

a) Cyclisation des analogues linéaires

Une quantité connue de matériel brut de [Cys(Acm)^{2,7}]hCGRP α et de ses analogues obtenus après clivage a été dissoute dans une solution d'acide acétique/H₂O 80% dégazée (5 mg de peptide/mL). Une solution d'iode (50 équiv. dissous dans un minimum de méthanol) a ensuite été ajoutée à la solution contenant le peptide et cette solution finale a été incubée pendant 2 heures avec

une agitation occasionnelle. Après cette période de temps, de l'acide ascorbique a été ajouté jusqu'à l'obtention d'une solution décolorée. Puis, cette solution a été évaporée jusqu'à la moitié de son volume et un volume égal d'eau y a été ajouté.

b) Traitement basique

Pour certains peptides, lors du clivage au HF, une réaction secondaire est observée avec les acides aminés sérine et thréonine. Il s'agit d'un déplacement N → O qui se manifeste avec le retrait des groupements benzyles protégeant la fonction hydroxyle de ces résidus (Fig.3). Cette réaction étant réversible avec un traitement basique (4,97), nous l'avons donc effectuée sur le matériel brut des peptides obtenus après le clivage. Les peptides ont donc été dissous dans du TFA/H₂O 0,06% (500 mg de peptide / 100 mL de TFA/H₂O 0,06%) et le pH de cette solution a été amené à 9,5 à l'aide d'une solution de NH₄OH concentrée. La solution a été incubée pour une période de 30 minutes sous une faible agitation et le pH a été réajusté à 3,0 avec une solution de TFA concentrée.

c) Protocole de purification des peptides

Le matériel brut du hCGRP α et de ses fragments et analogues a été purifié par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) préparative en phase inverse sur un système Waters (modèle 590) équipé d'un module PREP PACK (Waters) et d'un détecteur de densité optique (Modèle 441). La colonne utilisée a été une Delta Pak C18 (15 μ m, 300 Å) de 30 x 5,7 cm. Les peptides ont été élués au moyen d'un gradient linéaire de 0-100% (B) en 2 heures où l'éluant (A) était H₂O

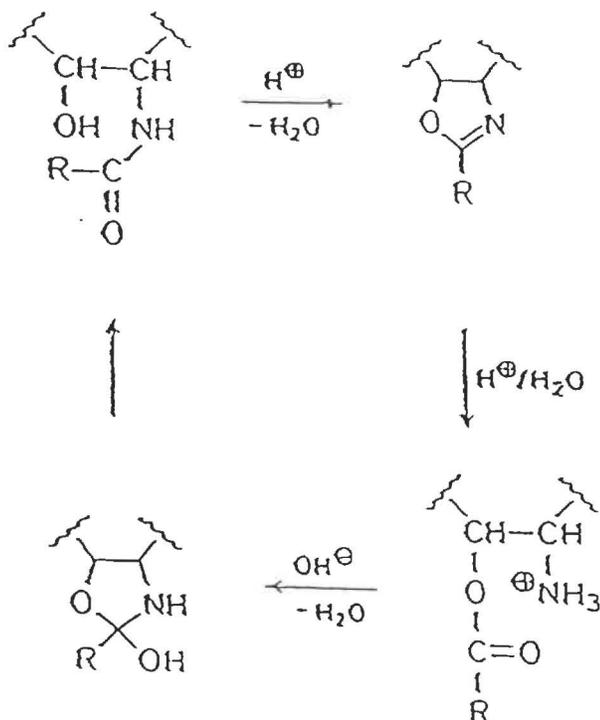
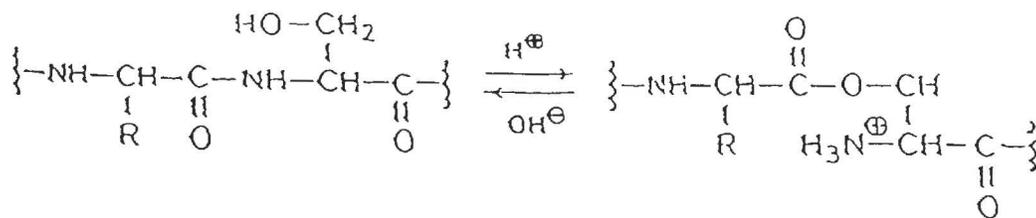


Figure 3 : Mécanisme réactionnel du déplacement N → O observé sur les résidus de sérine et de thréonine lors du clivage à l'acide fluorhydrique (4).

contenant 0,06% de TFA et (B) 40% CH₃CN dans TFA/H₂O (0,06%). Le débit de solvant a été maintenu à 40 mL/min et la détection a été faite à 229 nm par la mesure de la densité optique. Les fractions individuelles recueillies ont été analysées par CLHP analytique en phase inverse et les fractions correspondant au peptide ont été regroupées, évaporées et lyophilisées.

4 - Caractérisation des peptides

a) CLHP analytique

Les peptides purifiés ont été caractérisés par diverses méthodes, dont la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) analytique en phase inverse à l'aide d'un système 715 Ultra Wisp (Waters), muni d'un spectrophotomètre Lambda Max Waters (Modèle 481) et d'une colonne Suprapak #525 C18 (5µm). L'élution des peptides a été faite avec un gradient linéaire de 20-40% (B) ou 25-45% (B) en 20 minutes ((A) TFA/H₂O 0,06% et (B) CH₃CN), un débit de 1,5 mL/min et la détection des peptides a été faite par mesure de la densité optique à 230 nm.

b) Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire a été réalisée sur un système analytique (Applied Biosystems Inc., modèle 270A) à l'aide de la solution suivante: tampon citrate 0,02M pH 2,5. Une quantité de peptide (environ 0,1 mg) a été dissoute dans 1 mL de tampon et a été injectée dans un capillaire de 45 cm x 50 µm avec les conditions suivantes: voltage 15 ou 20 kV, température 30°C, injection 2 secondes en

mode vacuum. La détection des peptides a été réalisée par une mesure de la densité optique à 200 nm.

c) Analyse des acides aminés

L'analyse des acides aminés a été effectuée selon la méthode PICO.TAG de Waters sur un système CLHP comprenant deux pompes 510, un injecteur automatique 715 Ultra Wisp, un contrôleur de température TCM muni d'un module chauffant pour colonne et une colonne Cosmosil C18 (5 μ m). La méthode consiste à hydrolyser 0,1 mg de peptide en présence d'une solution d'acide chlorhydrique 6N contenant 1% de phénol (p/v) pour une période de 20-24 heures à 110°C. Puis, les hydrolysats ont été dissous avec une solution d'éthanol: H₂O: triéthylamine (2:2:1, v/v) et évaporés sous vide. La dérivation des échantillons a ensuite été réalisée par l'ajout d'une solution d'éthanol: H₂O: triéthylamine: phénylisothiocyanate (7 : 1 : 1 : 1, v/v), suivie d'une incubation de 20 minutes à la température de la pièce. Après évaporation sous vide, dissolution des échantillons dans un tampon phosphate de sodium pH 7,4, contenant 5% de CH₃CN et filtration, les dérivés d'acides aminés ont été analysés. Lors des analyses, la température de la colonne a été maintenue à 38°C et l'élution a été faite à un débit de 1 mL/min à l'aide d'un gradient de 0 à 100% (B). Les solvants utilisés ont été les suivants: (A) tampon acétate de sodium pH 6,4 contenant 4% de CH₃CN et 0,05% de triéthylamine et (B) 60% de CH₃CN/H₂O (les deux solvants ont été dégazés et filtrés avant utilisation). La détection des dérivés d'acides aminés a été accomplie au moyen

d'un spectrophotomètre mesurant leur densité optique à 254 nm. Le système a été contrôlé et les données analysées par un ordinateur NEC-APC IV muni du logiciel Waters Baseline 810.

d) Spectrométrie de masse

Les analyses FAB/MS ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse Kratos MS50TC muni de canons générateurs d'ions Ion Tech FAB et d'un système de traitement des données DS-90. Le gaz xénon a été activé sous 7kV et 2mA d'énergie pour la génération des ions. L'iodure de césium (CsI) a été utilisé pour la calibration (échelle: 652 à 4290) et la matrice utilisée était constituée de glycérol. Les conditions analytiques ont été les suivantes: vitesse de balayage: 10 sec/décade avec un délai de 1 sec entre les balayages, résolution statique: $M/\Delta M$ 3000.

e) Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un dichrographe Jobin Yvon CD6. L'appareil a été calibré avec l'acide (+)-10- camphorsulfonique et l'isoandrostérone. Les spectres ont été mesurés avec une largeur de bande de 2 nm, des intervalles de 0,5 nm et un temps d'intégration de 0,5 sec. Ils ont été corrigés pour la contribution du solvant et une routine de lissage a été appliquée. Les peptides ont été étudiés dans 40% de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP/H₂O) à une concentration finale de 15 μ M. Les solutions de peptides ont été déposées dans une cellule cylindrique de quartz ayant un parcours optique de 0,1 cm.

L'ellipticité moléculaire ($[\theta]_{\lambda}$) a été mesurée en $\text{degré}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ en utilisant le poids moléculaire moyen de l'ensemble des résidus de chaque peptide pour les calculs.

5 - Études pharmacologiques

a) Oreillette gauche de cobaye

Des cobayes mâles Hartley (350-400 g) provenant de Charles River Canada (St-Constant, Québec) ont été sacrifiés par décapitation. L'oreillette gauche a été soigneusement prélevée et placée dans un tampon Krebs-Ringer pH 7,4 oxygéné avec 95% O_2 / 5% CO_2 et maintenu à 37°C. Le tampon Krebs-Ringer avait la composition suivante (mM): NaCl, 113; KCl, 4,8; CaCl_2 , 2,2; KH_2PO_4 , 1,2; MgSO_4 , 1,2; NaHCO_3 , 25 et glucose, 5,5. Les tissus ont été débarrassés de tout tissu conjonctif, montés sur des électrodes de platine et suspendus dans un bain à tissus contenant 12,5 mL de tampon K-R. L'extrémité supérieure du tissu a été attachée à l'aide d'un fil de soie à un convertisseur de force (Modèle FT03D, Grass Instruments, Quincy, MA). Les tissus ont été incubés pour une période d'équilibration de 90 minutes sous une tension de 1 g et pendant ce temps, le tampon a été remplacé à toutes les 15 minutes. Puis, les tissus ont été stimulés par des pulsations électriques provenant d'un stimulateur (Grass, Modèle 544) et les paramètres de stimulation ont été les suivants: amplitude: 8V, durée: 0,3 msec et fréquence: 3Hz. Un physiographe (Grass, Modèle 79D) a mesuré les changements de tension isométriques. L'activité biologique des peptides a été mesurée par l'ajout de

concentrations croissantes cumulatives dans le bain. L'activité antagoniste du hCGRP₈₋₃₇ et de ses analogues a été mesurée par l'ajout de 1 μ M de peptide dans le bain 10 minutes avant l'addition du hCGRP α . Des courbes concentration-réponse ont ensuite été tracées en portant sur graphique la concentration de peptide en fonction du pourcentage de la réponse biologique.

b) Vas deferens de rat

Des rats mâles Sprague-Dawley (200-250 g) ont été sacrifiés par décapitation. Les *vasa deferentia* ont été prélevés et placés dans un tampon Krebs-Ringer. La partie prostatique du *vas deferens* a été montée sur des électrodes de platine. La méthode utilisée a été la même que celle décrite pour l'oreillette gauche de cobaye, mais les paramètres de stimulation ont été les suivants: amplitude: 40-100 V, durée: 0,5 msec et fréquence: 0,125 Hz.

6 - Analyses statistiques

Les données des essais biologiques ont été compilées et les courbes concentration-réponse ont été tracées à l'aide du programme Sigma Plot. Toutes les valeurs ont été exprimées par la moyenne \pm l'erreur standard. La comparaison des données a été effectuée par l'analyse des variances et par le test *t* de Student. Le niveau de signification statistique a été accepté à $p < 0,05$.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

7 - Synthèse, purification et caractérisation du hCGRP α et de ses analogues et fragments

a) Synthèse des peptides

Tous les peptides utilisés dans cette étude ont été synthétisés manuellement par la méthode en phase solide, à l'aide du réactif de couplage BOP. Le clivage des peptides du support solide avec l'acide fluorhydrique a permis d'obtenir des peptides bruts d'excellente qualité, tel que confirmé par les caractérisations.

b) Traitement basique

Le matériel brut de tous les peptides a tout d'abord été caractérisé par CLHP analytique. Le profil chromatographique obtenu pour certains peptides a présenté deux pics majeurs à des temps de rétention (T_R) rapprochés. C'est le cas, par exemple, pour le fragment [Ala¹⁶]hCGRP₈₋₃₇ qui présente un pic à 10,142 min et un à 10,942 min (Fig. 4A). La présence de ces deux pics majeurs, dont l'un est probablement le produit désiré, peut être expliquée par la présence de nombreux acides aminés sérine et thréonine dans la molécule. En effet, il est connu que ceux-ci subissent une transformation en milieu acide se traduisant par une migration acyle N \rightarrow O, suite à la déprotection de leur fonction hydroxyle (4,97). Le deuxième pic majeur correspondrait donc à un sous-produit formé lors du clivage acide ou de la synthèse. Étant donné que cette réaction secondaire est réversible en milieu basique (4,97), nous avons réalisé un traitement basique sur le matériel

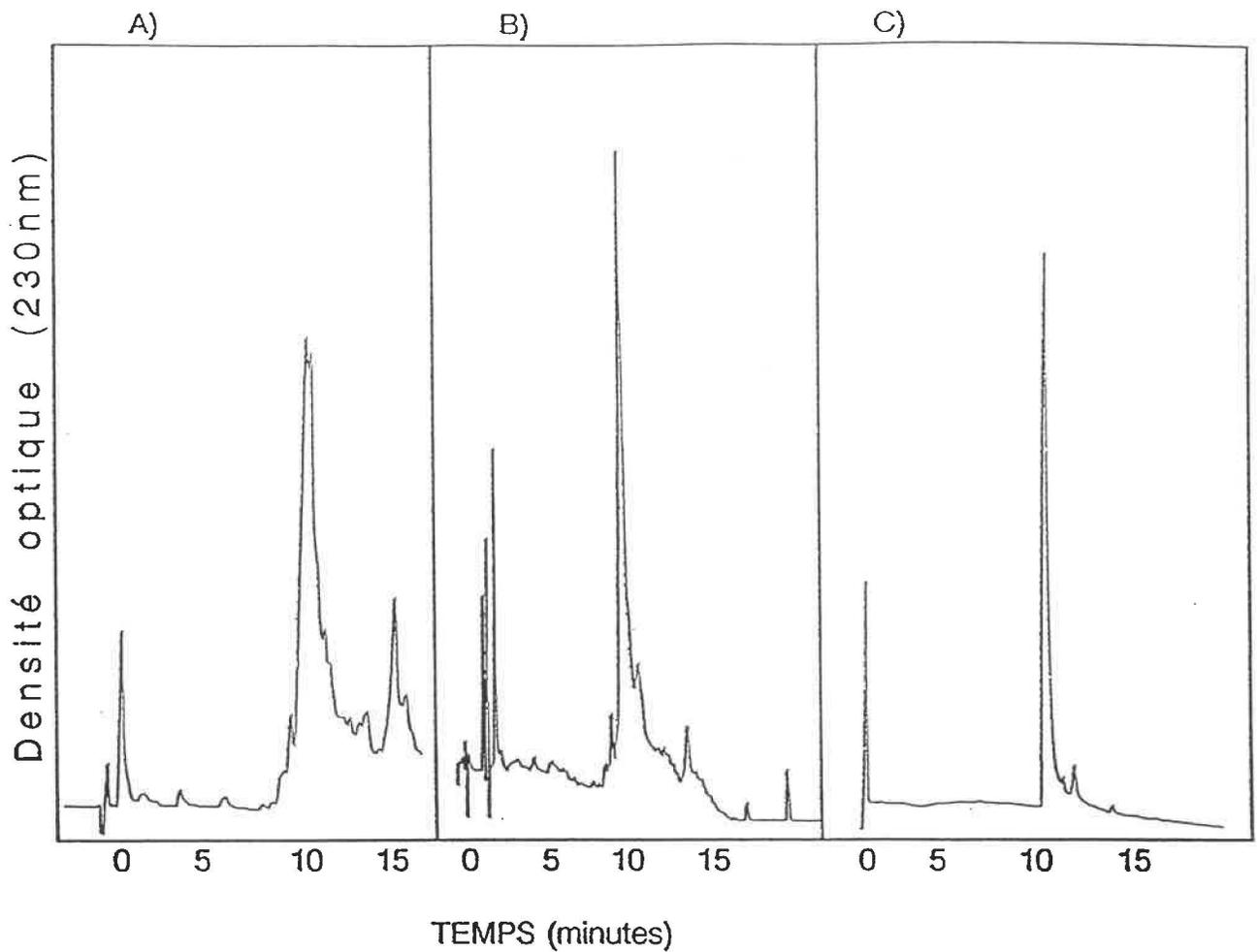


Figure 4 : CLHP analytique du $[Ala^{16}]hCGRP_{8-37}$ après:

- A) synthèse en phase solide avec le réactif BOP et un clivage au HF,
- B) un traitement basique de la préparation de peptide brut avec du NH_4OH pour une période de 30 minutes,
- C) purification du peptide par CLHP préparative.

brut de tous les peptides possédant la caractéristique de cette réaction. Puis, une deuxième analyse par CLHP analytique a été effectuée sur ces échantillons. Le profil chromatographique du $[\text{Ala}^{16}]\text{hCGRP}_{8-37}$ a alors démontré que le sous-produit correspondant au pic à 10,942 min a été complètement transformé en produit désiré possédant un T_R de 10,142 min, suite au traitement basique (Fig. 4B). Une augmentation substantielle de la quantité et de la qualité du produit correspondant au peptide désiré a ainsi été obtenue pour chacun des peptides nécessitant un traitement basique.

c) Purification et caractérisation des peptides

Le matériel brut du hCGRP_α et de ses analogues et fragments a été purifié par CLHP préparative à l'aide d'un gradient linéaire d'acétonitrile (0 à 100% (B) en 2 h). Puis, une caractérisation de tous les peptides purifiés a été réalisée par CLHP analytique, électrophorèse capillaire (EC), spectrométrie de masse (SM) et finalement par l'analyse des acides aminés. Tous les résultats sont présentés aux Tableaux IIIa, b et c. Pour le hCGRP_α , un T_R de 13,88 min a été obtenu par CLHP analytique et un T_M de 10,50 min par EC. Les différents analogues du hCGRP_α ont présenté une faible diminution de T_R par CLHP analytique à l'exception des analogues portant une substitution aux positions 17 à 21. Par contre, seuls les analogues $[\text{Ala}^{18}]\text{hCGRP}_\alpha$ et $[\text{Asn}^8]\text{hCGRP}_\alpha$ ont démontré un T_M supérieur à celui du hCGRP_α par EC, soit 11,35 min et 12,98 min respectivement (Tableau IIIa). Des résultats similaires sont obtenus pour le hCGRP_{8-37} et le $[\text{Cys}(\text{Acm})_{2,7}]\text{hCGRP}_\alpha$ et

leurs analogues (Tableaux IIIb et c). L'évaluation du poids moléculaire des peptides purifiés a également été réalisée par SM. Finalement, la détermination du nombre de résidus d'acide aminé de chaque peptide a été réalisée par l'analyse des acides aminés (Tableaux IIIa, b et c). Les résultats obtenus à l'aide de ces techniques analytiques ont donc permis de se prononcer sur la qualité des molécules synthétiques.

La spectroscopie de dichroïsme circulaire a également été réalisée pour la caractérisation des peptides purifiés. L'ellipticité moléculaire de chaque peptide a été évaluée à 208 et 222 nm et le contenu (%) en hélice α déterminé (Tableaux IVa, b et c). Entre autre, on remarque que la substitution de la valine-22 par une glycine cause des changements marqués dans l'ellipticité de la molécule de CGRP, de son analogue linéaire et du fragment correspondant. Il serait donc possible que ces changements des structures secondaires affectent l'affinité ou l'activité biologique du peptide.

8 - Évaluation pharmacologique des peptides

- a) Essais biologiques du hCGRP α et de ses analogues et fragments sur l'oreillette gauche de cobaye: Profils concentration-réponse.

Le profil concentration-réponse de l'effet du hCGRP α sur l'oreillette gauche stimulée électriquement est présenté à la Figure 5A. L'obtention d'une réponse inotrope positive maximale a nécessité une concentration de 50 nM de hCGRP α . Un

TABLEAU IIIa : Caractérisation du hCGRP α et de ses fragments et analogues par CLHP analytique, électrophorèse capillaire, spectrométrie de masse et analyse des acides aminés.

PEPTIDE	CLHP ^{a)}	EC ^{b)}	SM ^{c)}	ANALYSE DES ACIDES AMINÉS												
	T _R	T _M	PM	Asx	Glx	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Val	Leu	Phe	Lys
	(min)	(min)	(g/mole)													
hCGRP α	13,88	10,50	3790	4,09	-	3,21	4,36	1,12	2,19	4,28	4,36	1,04	4,97	3,22	2,13	2,17
[Lys ¹¹] hCGRP α	13,75	10,02	3761	3,97	-	3,07	4,18	1,09	1,07	4,14	4,06	1,10	4,86	3,26	2,03	3,27
[Gln ¹³] hCGRP α	13,12	9,83	3847	3,63	0,98	2,76	4,18	0,89	2,11	4,11	2,91	1,11	4,63	3,25	2,19	2,16
[Ala ¹⁵] hCGRP α	11,20	10,07	3749	3,68	-	3,10	4,43	1,09	1,99	4,15	5,30	1,14	5,05	2,05	2,11	2,13
[Ala ¹⁶] hCGRP α	10,49	10,10	3746	3,66	-	3,02	4,24	1,14	2,15	4,08	5,10	1,11	4,95	2,02	2,09	2,11
[Ala ¹⁷] hCGRP α	14,39	10,13	3777	3,81	-	2,05	4,16	1,11	2,11	4,02	5,07	1,08	4,92	3,21	2,12	2,14
[Ala ¹⁸] hCGRP α	15,13	11,35	3705	3,76	-	3,04	4,26	1,08	1,05	3,97	5,12	1,14	5,02	3,26	2,09	2,11
[Asn ¹⁸] hCGRP α	13,98	12,98	3748	4,68	-	2,81	4,31	1,12	1,05	4,01	4,33	1,03	4,79	2,99	2,18	2,17
[Lys ¹⁸] hCGRP α	13,68	9,76	3762	4,05	-	3,07	4,27	1,14	1,03	3,86	3,83	1,12	4,88	3,23	2,07	3,24
[Ala ¹⁹] hCGRP α	15,82	9,91	3773	4,05	-	2,13	4,29	1,13	2,15	4,02	5,04	1,10	4,83	3,29	2,09	2,19
[Ala ²⁰] hCGRP α	15,47	9,94	3803	3,69	-	3,28	3,22	1,10	2,11	4,35	5,45	1,10	4,32	3,29	2,19	2,15
[Ala ²¹] hCGRP α	14,73	9,89	3803	3,91	-	3,12	3,27	1,08	2,01	4,16	5,15	1,14	5,08	3,27	2,07	2,15
[Ala ²²] hCGRP α	13,67	9,67	3760	3,81	-	3,17	4,24	1,09	1,95	3,63	4,67	1,14	3,65	3,09	2,07	2,19
[Gly ²²] hCGRP α	12,68	10,32	3749	3,89	-	3,22	4,99	1,09	2,20	4,14	4,22	1,10	3,99	3,25	2,20	1,89
[Ala ²³] hCGRP α	13,12	9,68	3761	3,68	-	3,29	4,25	1,03	2,17	3,91	5,25	1,13	3,78	3,08	2,18	2,15

a) Temps de rétention en minutes obtenus par CLHP analytique à l'aide d'un gradient de 25-45% d'acétonitrile en 20 minutes.

b) Temps de migration en minutes obtenus par électrophorèse capillaire à l'aide d'un voltage de 20 KV.

c) Poids moléculaires en g/mole obtenus par spectrométrie de masse.

TABLEAU IIIb: (suite)

PEPTIDE	CLHP ^{a)}	EC ^{b)}	SM ^{c)}	ANALYSE DES ACIDES AMINÉS												
	T _R	T _M	PM	Asx	Glx	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Val	Leu	Phe	Lys
	(min)	(min)	(g/mole)													
hCGRP ₈₋₃₇	13,62	12,95	3128	2,79	-	3,28	4,32	1,09	2,14	2,21	2,14	1,04	5,05	3,12	1,98	2,01
[Lys ¹¹] hCGRP ₈₋₃₇	13,56	12,28	3099	3,06	-	2,78	4,24	1,14	1,16	2,05	2,21	1,10	4,79	3,00	2,10	3,17
[Gln ¹³] hCGRP ₈₋₃₇	13,35	12,42	3182	2,70	1,10	3,18	3,99	1,10	2,22	2,19	1,13	1,10	4,58	3,36	2,14	1,96
[Ala ¹⁵] hCGRP ₈₋₃₇	11,54	12,72	3085	3,31	-	3,00	4,37	1,10	2,17	2,17	3,22	1,10	4,63	2,14	1,82	1,85
[Ala ¹⁶] hCGRP ₈₋₃₇	11,25	12,88	3083	2,84	-	2,75	4,00	1,06	2,17	2,10	3,17	1,06	4,52	2,00	2,08	2,19
[Ala ¹⁷] hCGRP ₈₋₃₇	14,71	12,74	3111	3,24	-	2,09	4,03	1,08	2,18	2,21	3,19	1,01	4,65	2,89	1,98	1,95
[Ala ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	15,16	13,87	3041	3,27	-	2,74	4,04	1,09	1,12	2,03	3,20	1,10	4,55	2,86	2,07	2,13
[Asn ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	14,20	16,97	3082	3,60	-	2,98	3,99	1,10	1,12	2,20	2,15	1,11	4,83	3,25	2,20	1,82
[Lys ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	13,49	12,59	3096	2,74	-	3,00	4,08	1,08	1,03	2,10	2,16	1,10	4,73	3,36	2,17	3,04
[Ala ¹⁹] hCGRP ₈₋₃₇	15,52	12,35	3111	2,69	-	2,11	4,14	1,13	2,25	2,14	3,25	1,09	4,95	3,28	2,14	2,20
[Ala ²⁰] hCGRP ₈₋₃₇	14,97	12,94	3141	2,91	-	3,24	3,32	1,10	2,20	2,19	3,03	1,04	4,61	2,75	1,95	1,85
[Ala ²¹] hCGRP ₈₋₃₇	14,44	12,82	3141	2,75	-	3,31	3,32	1,13	2,20	2,17	3,19	1,10	4,59	3,33	2,11	1,86
[Ala ²²] hCGRP ₈₋₃₇	13,23	12,72	3099	2,85	-	2,98	3,88	1,09	2,16	2,12	3,01	1,07	3,75	2,88	2,04	2,17
[Gly ²²] hCGRP ₈₋₃₇	12,75	12,80	3082	2,82	-	2,81	5,12	0,94	1,86	1,98	2,20	1,11	4,30	3,26	2,19	1,88
[Ala ²³] hCGRP ₈₋₃₇	13,01	12,64	3097	2,95	-	2,85	3,86	0,94	1,84	1,83	2,98	1,10	3,66	2,93	2,08	2,16

a) Temps de rétention en minutes obtenus par CLHP analytique à l'aide d'un gradient de 20-40% d'acétonitrile en 20 minutes.

b) Temps de migration en minutes obtenus par électrophorèse capillaire à l'aide d'un voltage de 15 KV.

c) Poids moléculaires en g/mole obtenus par spectrométrie de masse.

TABLEAU IIIc: (suite)

PEPTIDE	CLHP ^{a)}	EC ^{b)}	SM ^{c)}	ANALYSE DES ACIDES AMINÉS												
	T _R	T _M	PM	Asx	Glx	Ser	Gly	His	Arg	Thr	Ala	Pro	Val	Leu	Phe	Lys
	(min)	(min)	(g/mole)													
[Cys(Acm) ^{2,7}] hCGRP α	12,15	10,63	3936	3,86	-	3,26	4,39	1,05	2,22	4,36	4,34	1,07	4,83	3,30	2,17	2,16
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Lys ¹¹] hCGRP α	12,10	10,37	3905	3,74	-	3,27	4,37	1,11	1,09	4,29	4,17	1,11	4,66	3,12	2,09	2,98
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Gln ¹³] hCGRP α	11,75	10,09	3991	3,74	0,95	3,25	4,40	1,09	2,20	4,36	3,13	1,13	4,73	3,25	2,17	2,18
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁵] hCGRP α	5,91	10,41	3891	3,78	-	3,26	4,38	1,13	2,13	4,29	4,78	1,05	5,08	2,05	2,19	2,17
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁶] hCGRP α	5,45	10,41	3891	3,78	-	3,23	4,39	1,11	2,08	4,29	5,37	1,04	4,84	2,15	2,09	2,24
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁷] hCGRP α	12,88	10,38	3916	3,88	-	2,20	4,30	1,13	2,00	4,18	5,12	1,14	4,64	3,12	2,20	2,19
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁸] hCGRP α	13,57	11,55	3848	3,90	-	3,20	4,23	1,12	0,99	4,05	5,09	1,09	4,74	3,05	2,14	2,17
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Asn ¹⁸] hCGRP α	12,77	13,50	3890	4,68	-	3,27	4,36	1,07	1,04	4,22	4,34	1,08	4,80	3,07	2,19	2,17
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Lys ¹⁸] hCGRP α	11,91	10,06	3904	3,69	-	3,24	4,18	1,06	1,00	4,08	4,18	1,08	5,03	3,22	2,19	2,95
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁹] hCGRP α	14,35	10,28	3916	3,67	-	2,21	4,25	1,09	2,07	4,27	5,08	1,07	4,68	3,13	2,09	2,19
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²⁰] hCGRP α	13,97	10,34	3946	4,08	-	3,17	3,10	1,05	1,99	4,18	4,91	1,05	4,68	3,03	2,09	2,15
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²¹] hCGRP α	12,90	10,23	3946	3,65	-	3,19	3,24	1,02	1,99	4,14	5,01	1,13	4,84	3,07	2,14	2,17
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²²] hCGRP α	11,61	10,10	3905	3,61	-	3,24	4,23	1,07	2,12	4,07	5,29	1,14	4,14	3,59	2,02	1,88
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Gly ²²] hCGRP α	12,28	10,84	3891	3,89	-	3,13	5,25	1,07	1,97	4,21	4,35	1,07	4,32	3,22	2,18	1,83
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²³] hCGRP α	11,29	10,04	3905	3,74	-	3,03	4,17	1,08	1,98	3,74	4,91	1,06	3,83	3,21	2,22	2,13

a) Temps de rétention en minutes obtenus par CLHP analytique à l'aide d'un gradient de 25-45% d'acétonitrile en 20 minutes.

b) Temps de migration en minutes obtenus par électrophorèse capillaire à l'aide d'un voltage de 20 KV.

c) Poids moléculaires en g/mole obtenus par spectrométrie de masse.

TABLEAU IVa: Ellipticité moléculaire du hCGRP α et de ses fragments et analogues à 208 et 222 nm déterminée par la spectroscopie de dichroïsme circulaire et contenu en hélice α .

	ELLIPTICITÉ MOLÉCULAIRE	CONTENU EN ^{c)} HÉLICE α (%)		
	$-\left[\theta\right]_{208/222}^{a)} \pm SE^{b)}$ (deg \cdot cm ² / dmol)	Limite Inf.	Limite Sup.	Moy.
hCGRP α	22400 \pm 1678 / 20956 \pm 1388	58	65	62
[Lys ¹¹] hCGRP α	20168 \pm 1618 / 17445 \pm 1411	49	56	53
[Gln ¹³] hCGRP α	19085 \pm 1677 / 15973 \pm 2204	43	54	49
[Ala ¹⁵] hCGRP α	18703 \pm 1139 / 17294 \pm 1158	49	55	52
[Ala ¹⁶] hCGRP α	23782 \pm 997 / 20519 \pm 1587	56	64	60
[Ala ¹⁷] hCGRP α	22733 \pm 2299 / 19486 \pm 336	57	59	58
[Ala ¹⁸] hCGRP α	17334 \pm 482 / 17091 \pm 437	50	53	52
[Asn ¹⁸] hCGRP α	21976 \pm 1300 / 19357 \pm 427	56	58	57
[Lys ¹⁸] hCGRP α	20388 \pm 1698 / 15838 \pm 682	47	50	49
[Ala ¹⁹] hCGRP α	21598 \pm 1195 / 19518 \pm 1138	55	61	58
[Ala ²⁰] hCGRP α	22203 \pm 1714 / 21044 \pm 907	59	64	62
[Ala ²¹] hCGRP α	24384 \pm 2108 / 22905 \pm 1508	63	70	67
[Ala ²²] hCGRP α	16665 \pm 1102 / 11506 \pm 866	35	39	37
[Gly ²²] hCGRP α	16358 \pm 1376 / 13930 \pm 972	41	46	44
[Ala ²³] hCGRP α	21465 \pm 1608 / 19437 \pm 735	56	59	58

a) Ellipticité moléculaire moyenne du peptide à 208 et 222 nm, déterminée dans 40% HFIP/H₂O.

b) SE : erreur standard.

c) Contenu en hélice α calculé à partir de $[\theta]_{222}$ (deg \cdot cm²/dmol) en utilisant la formule: contenu hélice α (%) = 100 x $([\theta]_{222}-3000)/-39\ 000$.

TABLEAU IVb: (suite)

	ELLIPTICITÉ MOLÉCULAIRE	CONTENU EN ^{c)} HÉLICE α (%)		
	$- [\theta]_{208/222}^a \pm SE^b)$ (deg•cm ² / dml)	Limite Inf.	Limite Sup.	Moy.
hCGRP ₈₋₃₇	18014 \pm 2084 / 12898 \pm 846	39	43	41
[Lys ¹¹] hCGRP ₈₋₃₇	20220 \pm 2480 / 15108 \pm 1782	42	51	47
[Gln ¹³] hCGRP ₈₋₃₇	18910 \pm 2346 / 14320 \pm 1610	40	49	45
[Ala ¹⁵] hCGRP ₈₋₃₇	9644 \pm 719 / 6764 \pm 1303	22	28	25
[Ala ¹⁶] hCGRP ₈₋₃₇	7424 \pm 1912 / 6850 \pm 1641	21	30	26
[Ala ¹⁷] hCGRP ₈₋₃₇	16936 \pm 1724 / 11329 \pm 1647	33	41	37
[Ala ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	10799 \pm 1622 / 11988 \pm 2098	33	44	39
[Asn ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	13737 \pm 1433 / 8706 \pm 1836	25	35	30
[Lys ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	16317 \pm 3155 / 12834 \pm 1761	36	45	41
[Ala ¹⁹] hCGRP ₈₋₃₇	18564 \pm 1438 / 13863 \pm 584	42	45	44
[Ala ²⁰] hCGRP ₈₋₃₇	19853 \pm 774 / 14193 \pm 705	42	46	44
[Ala ²¹] hCGRP ₈₋₃₇	20665 \pm 1269 / 16243 \pm 673	48	51	50
[Ala ²²] hCGRP ₈₋₃₇	21899 \pm 2454 / 18190 \pm 1323	51	58	55
[Gly ²²] hCGRP ₈₋₃₇	11581 \pm 626 / 4701 \pm 1415	16	23	20
[Ala ²³] hCGRP ₈₋₃₇	20796 \pm 2605 / 16044 \pm 1215	46	52	49

a) Ellipticité moléculaire moyenne du peptide à 208 et 222 nm, déterminée dans 40% HFIP/H₂O.

b) SE : erreur standard.

c) Contenu en hélice α calculé à partir de $[\theta]_{222}$ (deg•cm²/dml) en utilisant la formule: contenu hélice α (%) = 100 x $([\theta]_{222} - 3000) / -39\ 000$.

TABLEAU IVc: (suite)

	ELLIPTICITÉ MOLÉCULAIRE	CONTENU EN ^{c)} HÉLICE α (%)		
	$- [\theta]_{208/222}^a) \pm SE^b)$ (deg•cm ² / dml)	Limite Inf.	Limite Sup.	Moy.
[Cys(Acm) ^{2,7}] hCGRP α	21206 \pm 647 / 17286 \pm 986	50	55	53
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Lys ¹¹] hCGRP α	20763 \pm 2899 / 18531 \pm 792	53	57	55
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Gln ¹³] hCGRP α	24029 \pm 716 / 20148 \pm 1473	56	63	60
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁵] hCGRP α	17880 \pm 1095 / 15165 \pm 350	46	48	47
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁶] hCGRP α	23726 \pm 1457 / 22398 \pm 1203	62	68	65
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁷] hCGRP α	19088 \pm 1715 / 15004 \pm 610	45	48	47
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁸] hCGRP α	23687 \pm 2079 / 20033 \pm 1982	54	64	59
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Asn ¹⁸] hCGRP α	19488 \pm 933 / 16147 \pm 901	47	51	49
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Lys ¹⁸] hCGRP α	21577 \pm 802 / 16522 \pm 1605	46	54	50
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁹] hCGRP α	24345 \pm 1229 / 21495 \pm 804	61	65	63
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²⁰] hCGRP α	12957 \pm 2558 / 13219 \pm 1103	39	44	42
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²¹] hCGRP α	26223 \pm 807 / 25107 \pm 639	70	74	72
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²²] hCGRP α	16510 \pm 467 / 12861 \pm 2192	35	46	41
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Gly ²²] hCGRP α	21653 \pm 1598 / 19453 \pm 764	56	60	58
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²³] hCGRP α	22448 \pm 842 / 18411 \pm 701	53	57	55

a) Ellipticité moléculaire moyenne du peptide à 208 et 222 nm, déterminée dans 40% HFIP/H₂O.

b) SE : erreur standard.

c) Contenu en hélice α calculé à partir de $[\theta]_{222}$ (deg•cm²/dml) en utilisant la formule:
contenu hélice α (%) = 100 x $([\theta]_{222}-3000)/-39\ 000$.

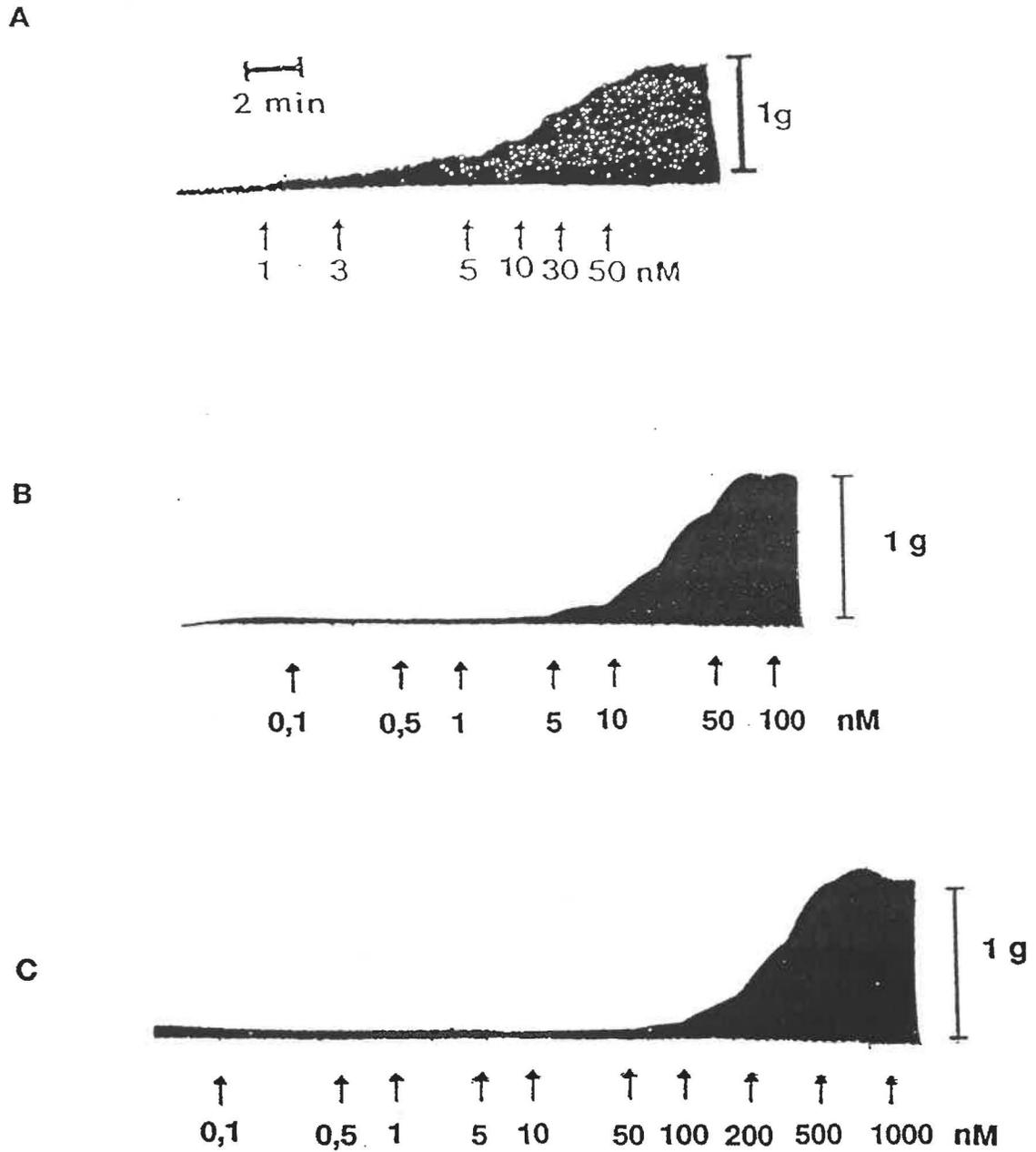


Figure 5 : Profil de la réponse inotrope positive de l'oreillette gauche de cobaye induite par le hCGRP α (A), [Ala¹⁷]hCGRP α (B) et [Ala¹⁵]hCGRP α (C).

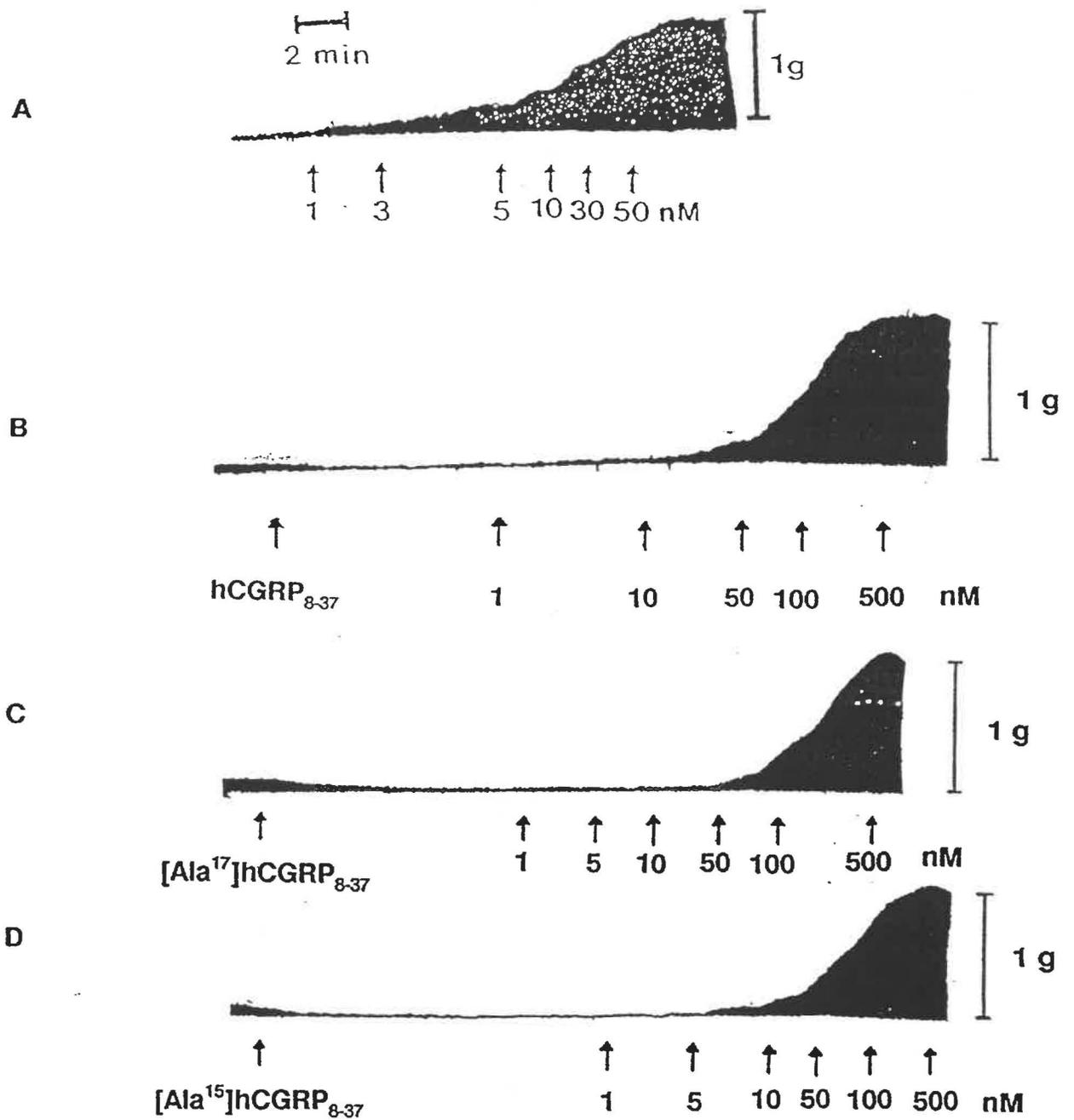


Figure 6 : Profil de la réponse inotrope positive de l'oreillette gauche de cobaye induite par le hCGRP α seul (A) ou en présence de 1 μ M de hCGRP₈₋₃₇ (B), [Ala¹⁷]hCGRP₈₋₃₇ (C), ou [Ala¹⁵]hCGRP₈₋₃₇ (D).

résultat similaire a été obtenu avec l'analogue $[Ala^{17}]hCGRP\alpha$ (Fig. 5B). Toutefois, l'obtention par l'analogue $[Ala^{15}]hCGRP\alpha$ d'une augmentation maximale de la force de contraction a exigé, quant à lui, une concentration de 500 nM (Fig. 5C). Par contre, en présence de 1 μ M du fragment $hCGRP_{8-37}$, l'induction d'une réponse inotrope positive maximale par le $hCGRP\alpha$ a nécessité une concentration de 200 nM de $hCGRP\alpha$ (Fig. 6B). Cependant, en présence de 1 μ M de $[Ala^{17}]hCGRP_{8,37}$ (Fig. 6C) ou de $[Ala^{15}]hCGRP_{8-37}$ (Fig. 6D), une augmentation maximale de la force de contraction de l'oreillette gauche a été observée après l'addition respective de 500 nM et 100 nM de $hCGRP\alpha$.

Finalement, le profil concentration-réponse de l'analogue linéaire du $hCGRP\alpha$, le $[Cys(Acm)^{2,7}]hCGRP\alpha$ (Fig. 7B) a démontré une inactivité complète sur l'oreillette gauche de cobaye, alors que l'analogue $[Cys(Acm)^{2,7}, Ala^{17}]hCGRP\alpha$ (Fig. 7C) a exigé l'addition de 1000 nM pour l'obtention d'une réponse inotrope positive maximale.

b) Essais biologiques du $hCGRP\alpha$ et de ses analogues et fragments sur le *vas deferens* de rat: Profils concentration-réponse.

Lors de l'étude avec le *vas deferens* de rat stimulé électriquement, nous avons observé que l'inhibition complète de la force de contraction de ce tissu est obtenue à l'aide d'une concentration de 100 nM de $hCGRP\alpha$ (Fig. 8A) ou de 100 nM de son analogue $[Ala^{17}]hCGRP\alpha$ (Fig. 8C). Par contre, une concentration de 500 nM de l'analogue $[Ala^{15}]hCGRP\alpha$ (Fig. 8B) a été exigée pour l'inhibition

complète de la force de contraction. Par ailleurs, en présence de $1 \mu\text{M}$ de hCGRP_{8-37} , de $[\text{Ala}^{15}]\text{hCGRP}_{8-37}$ ou de $[\text{Ala}^{17}]\text{hCGRP}_{8-37}$, une concentration de 20 nM de $\text{hCGRP}\alpha$ a été nécessaire pour l'inhibition totale de la force de contraction de ce tissu (Fig. 9B, C et D).

Finalement, nous avons observé dans le profil concentration-réponse de l'analogue linéaire $[\text{Cys}(\text{Acm})^{2,7}]\text{hCGRP}\alpha$ (Fig. 10B) que l'inhibition complète de la force de contraction du *vas deferens* est obtenue à une concentration de 500 nM. Une concentration de 1000 nM de l'analogue $[\text{Cys}(\text{Acm})^{2,7}, \text{Ala}^{17}]\text{hCGRP}\alpha$ a permis l'inhibition de la réponse (Fig. 10D), alors que 1000 nM de l'analogue $[\text{Cys}(\text{Acm})^{2,7}, \text{Ala}^{15}]\text{hCGRP}\alpha$ n'a pas été suffisant pour causer l'inhibition de la contraction de ce tissu.

c) Activité biologique du $\text{hCGRP}\alpha$ et de ses analogues et fragments sur l'oreillette gauche de cobaye.

Les courbes concentration-réponse obtenues avec le $\text{hCGRP}\alpha$ et ses analogues cycliques sur l'oreillette gauche de cobaye stimulée électriquement sont présentées à la Figure 11. Nous pouvons constater que les courbes concentration-réponse des analogues du $\text{hCGRP}\alpha$ sont toutes déplacées de façon parallèle vers la droite, ce qui est reflété par une augmentation significative du EC_{50} des analogues, comparativement au $\text{hCGRP}\alpha$ (Tableau Va). Ces résultats nous ont donc indiqué que ces analogues n'induisent qu'une activité agoniste affaiblie sur l'oreillette gauche de cobaye par rapport au $\text{hCGRP}\alpha$.

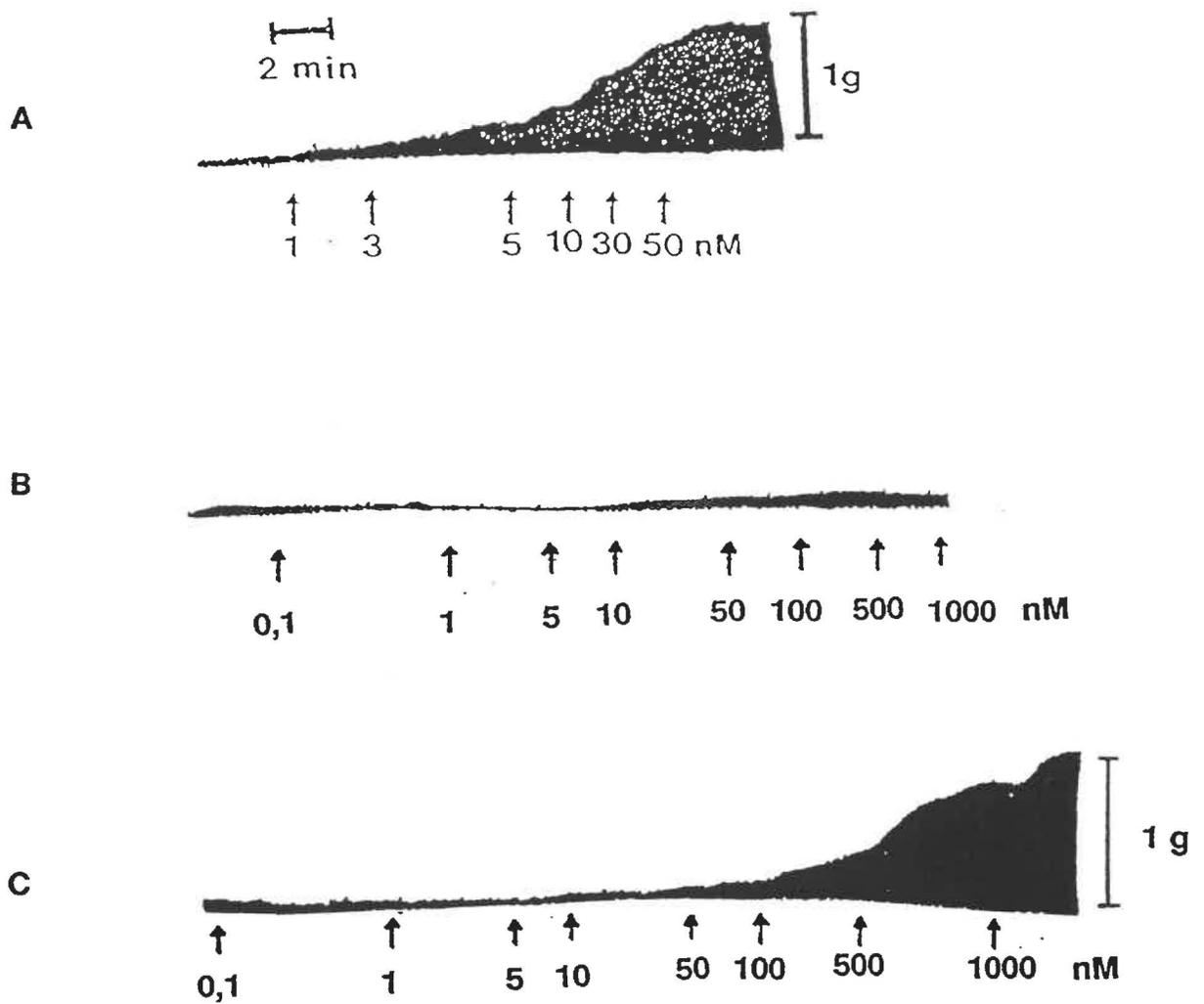


Figure 7 : Profil de la réponse inotrope positive de l'oreillette gauche de cobaye induite par le hCGRP α (A), le [Cys(Acm)^{2,7}]hCGRP α (B) et le [Cys(Acm)^{2,7}, Ala¹⁷]hCGRP α (C).

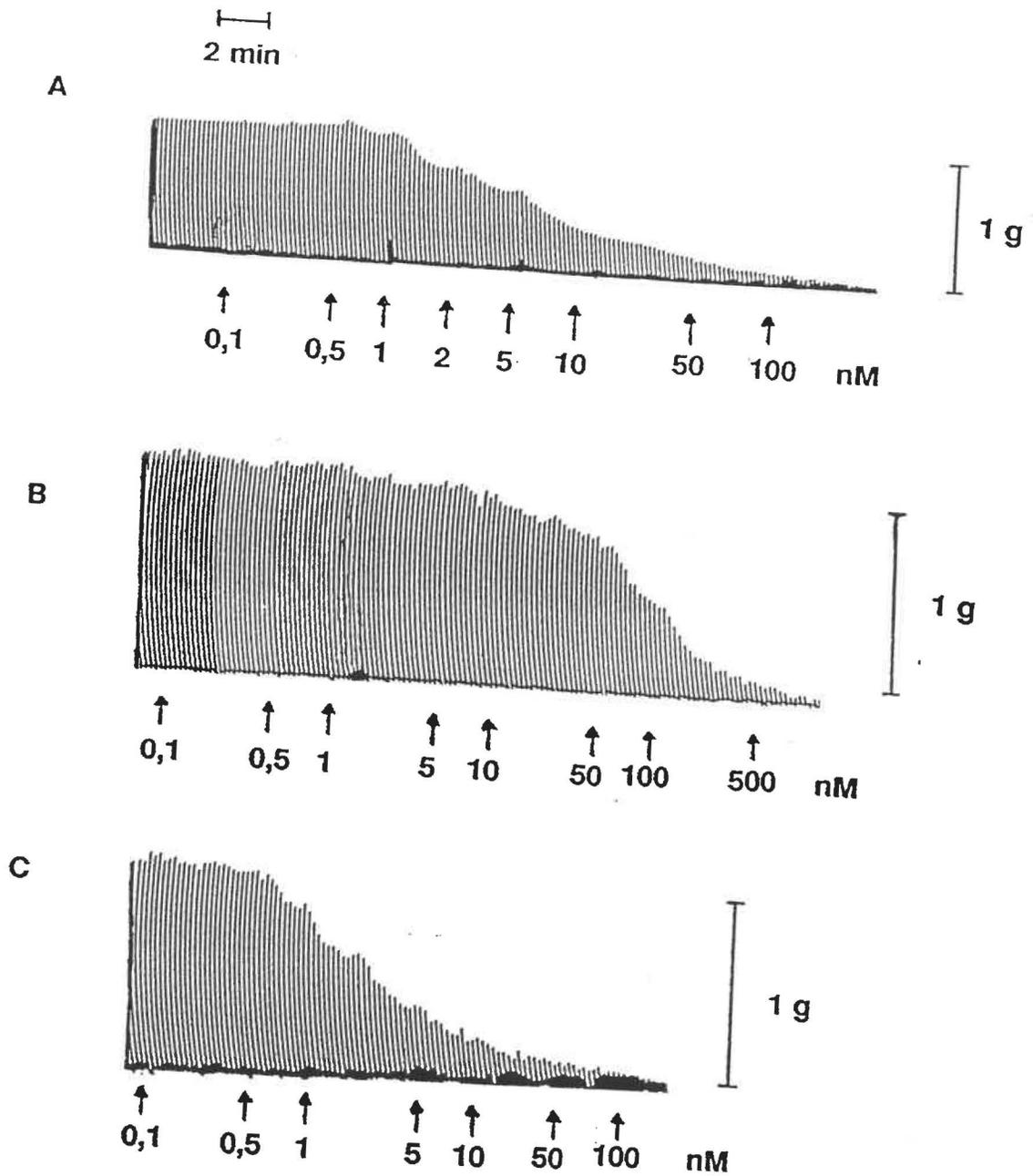


Figure 8 : Profil de l'inhibition de la force de contraction du *vas deferens* de rat induite par le hCGRP α (A), [Ala¹⁵]hCGRP α (B) et [Ala¹⁷]hCGRP α (C).

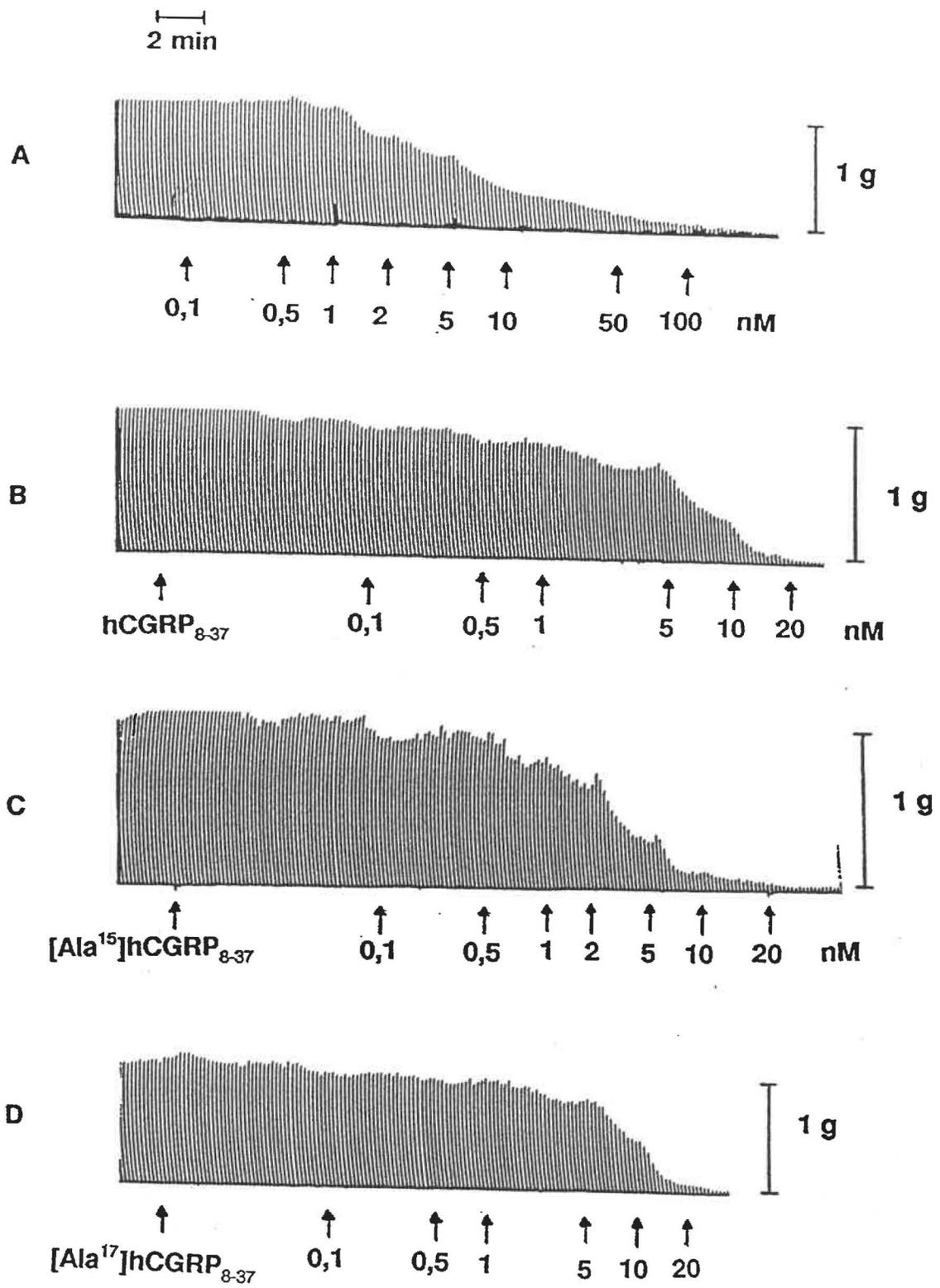


Figure 9 : Profil de l'inhibition de la force de contraction du *vas deferens* de rat induite par le hCGRP α seul (A) ou en présence de 1 μ M de hCGRP α (B), [Ala¹⁵]hCGRP α (C) ou [Ala¹⁷]hCGRP α (D).

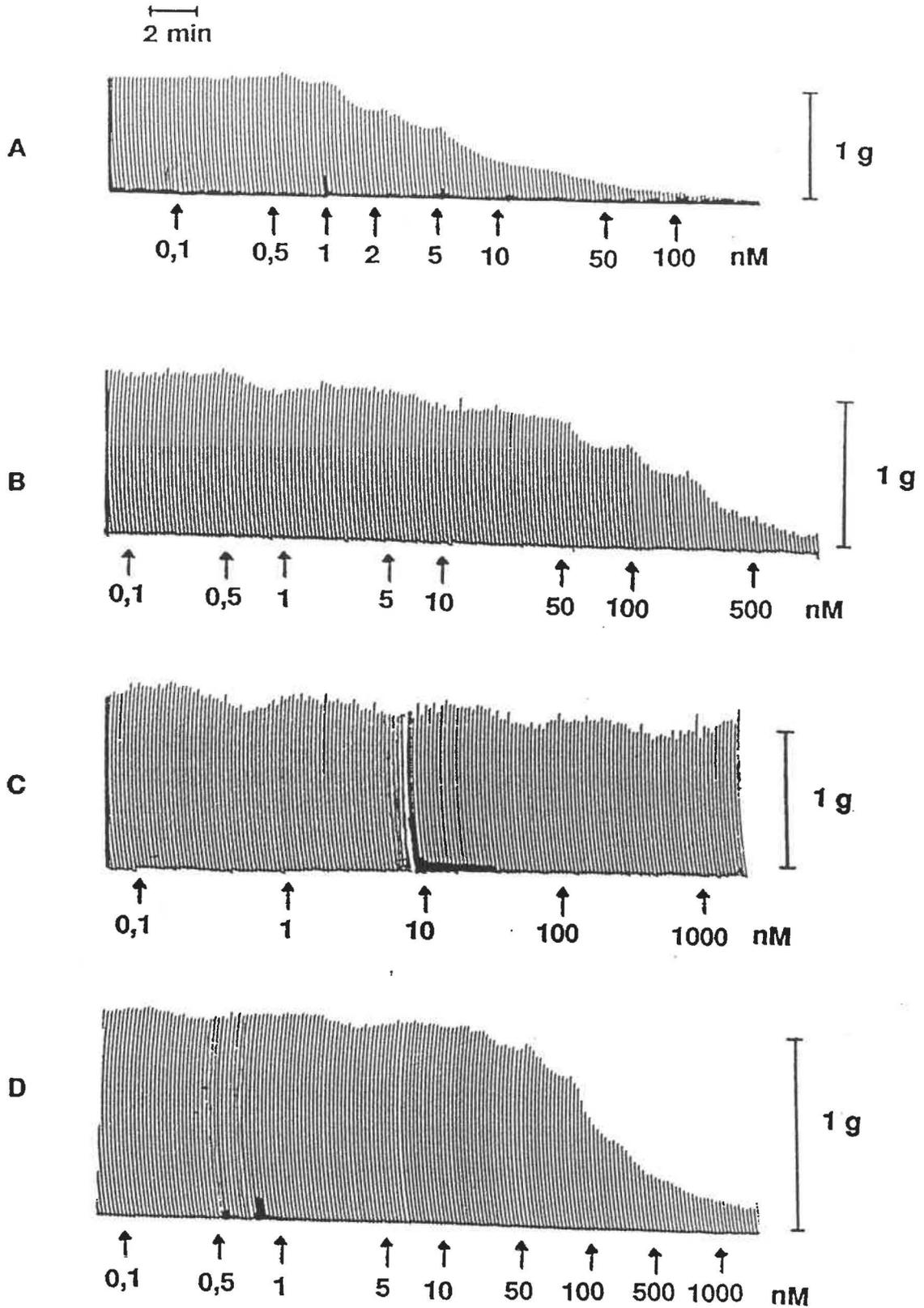


Figure 10 : Profil de l'inhibition de la force de contraction du vas deferens de rat induite par le hCGRP α seul (A), [Cys(Acm)²⁷]hCGRP α (B), [Cys(Acm)²⁷, Ala¹⁵]hCGRP α (C) et [Cys(Acm)²⁷ Ala¹⁷]hCGRP α (D).

% DE LA REPONSE MAXIMALE

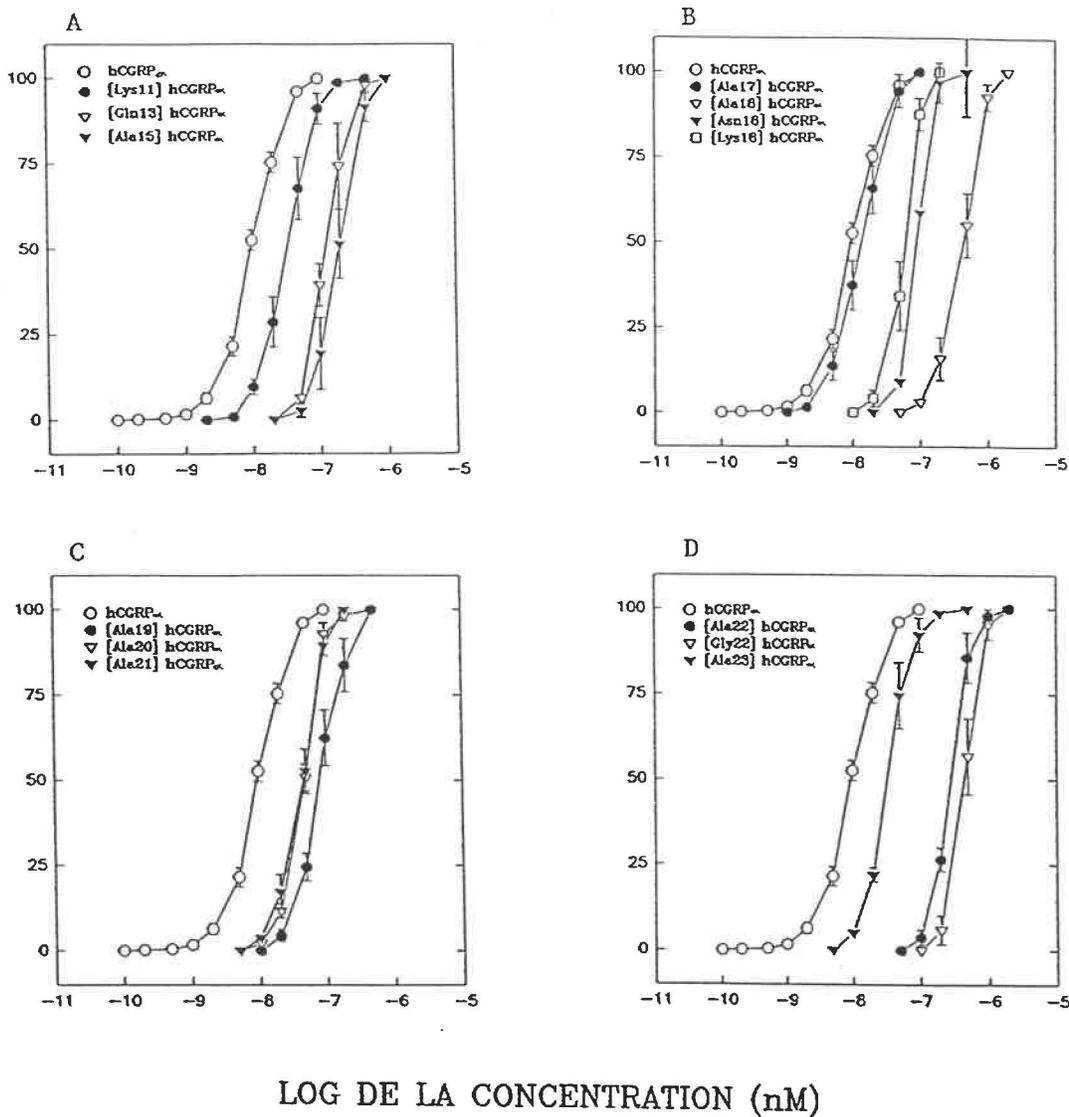


Figure 11 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope positif induit par le hCGRP α et ses analogues sur l'oreillette gauche de cobaye.

% DE LA REPONSE MAXIMALE.

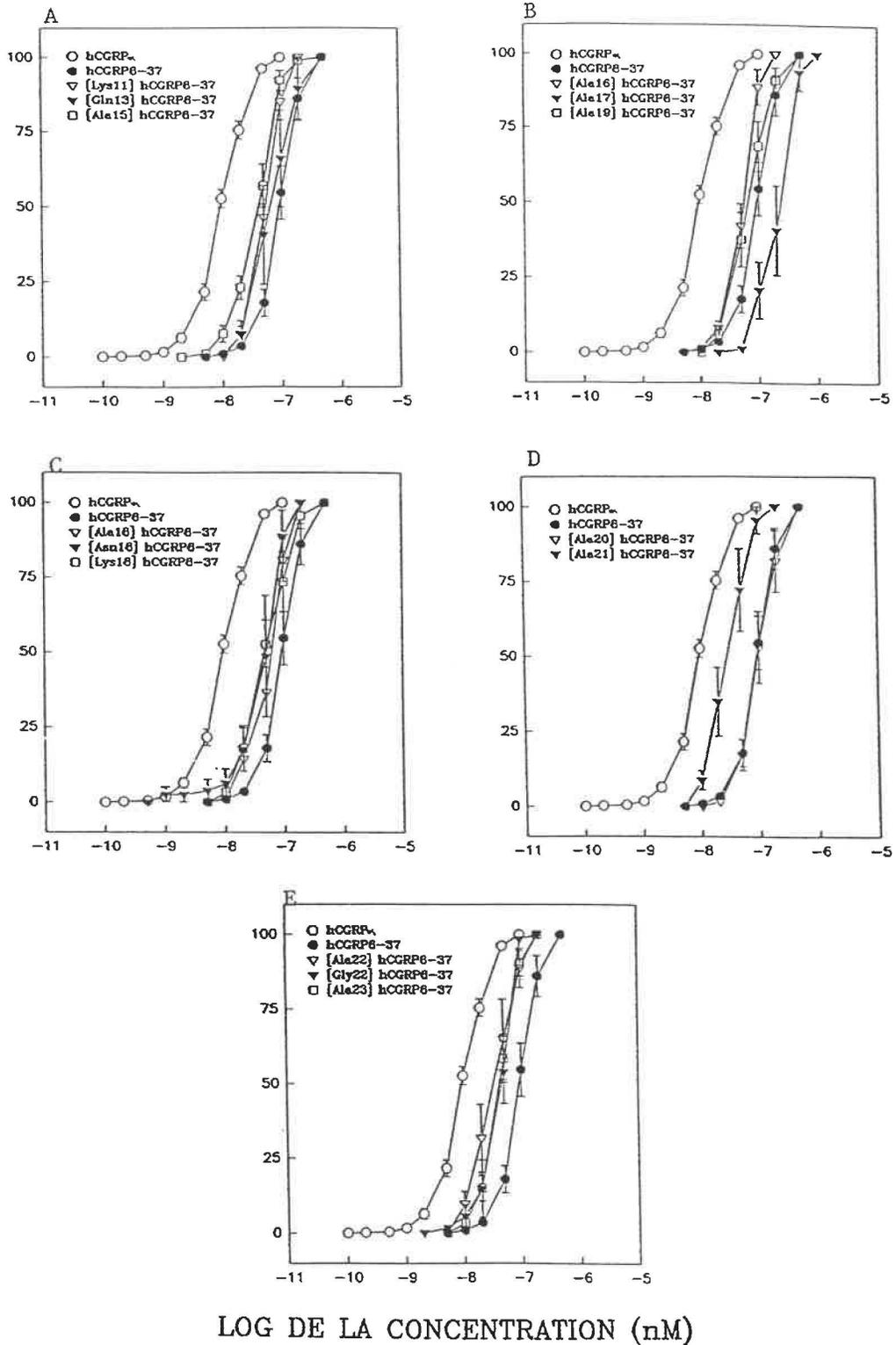
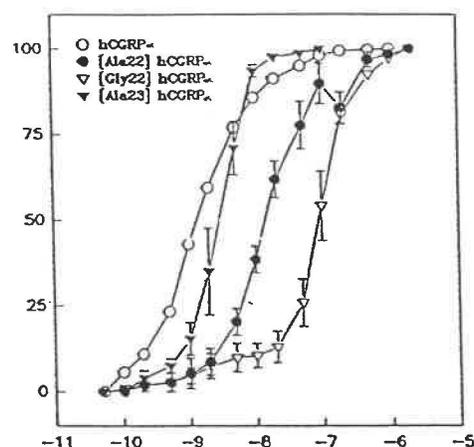
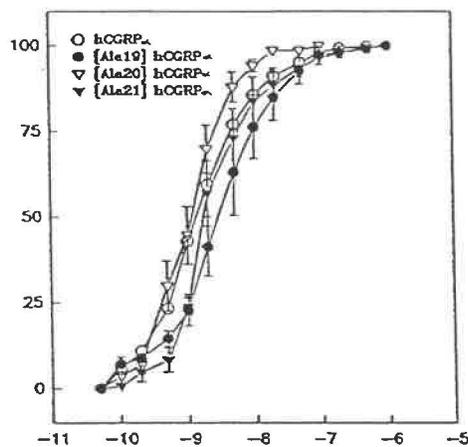
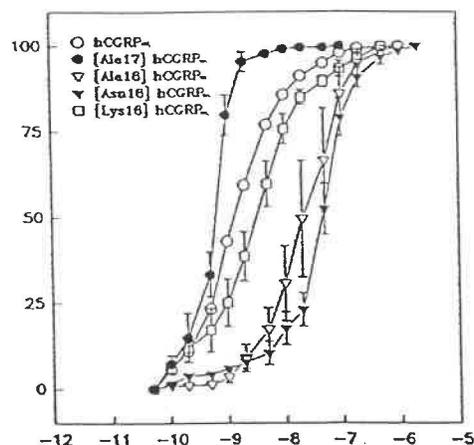
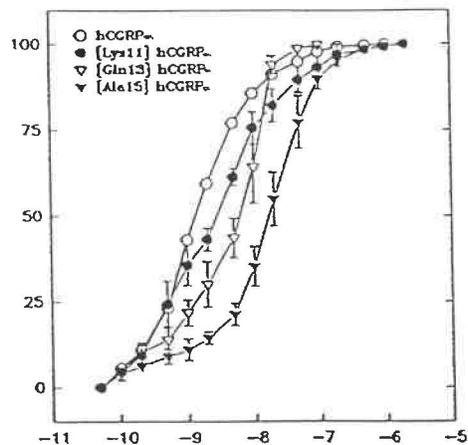


Figure 12 : Courbes concentration-réponse de l'effet inotrope positif sur l'oreillette gauche de cobaye induit par le hCGRP α , seul ou en présence de 1 μ M de hCGRP $_{8-37}$ ou de ses analogues.

% D'INHIBITION



LOG DE LA CONCENTRATION (nM)

Figure 13 : Courbes concentration-réponse de l'inhibition de la force de contraction du *vas deferens* de rat induite par le hCGRP α et ses analogues.

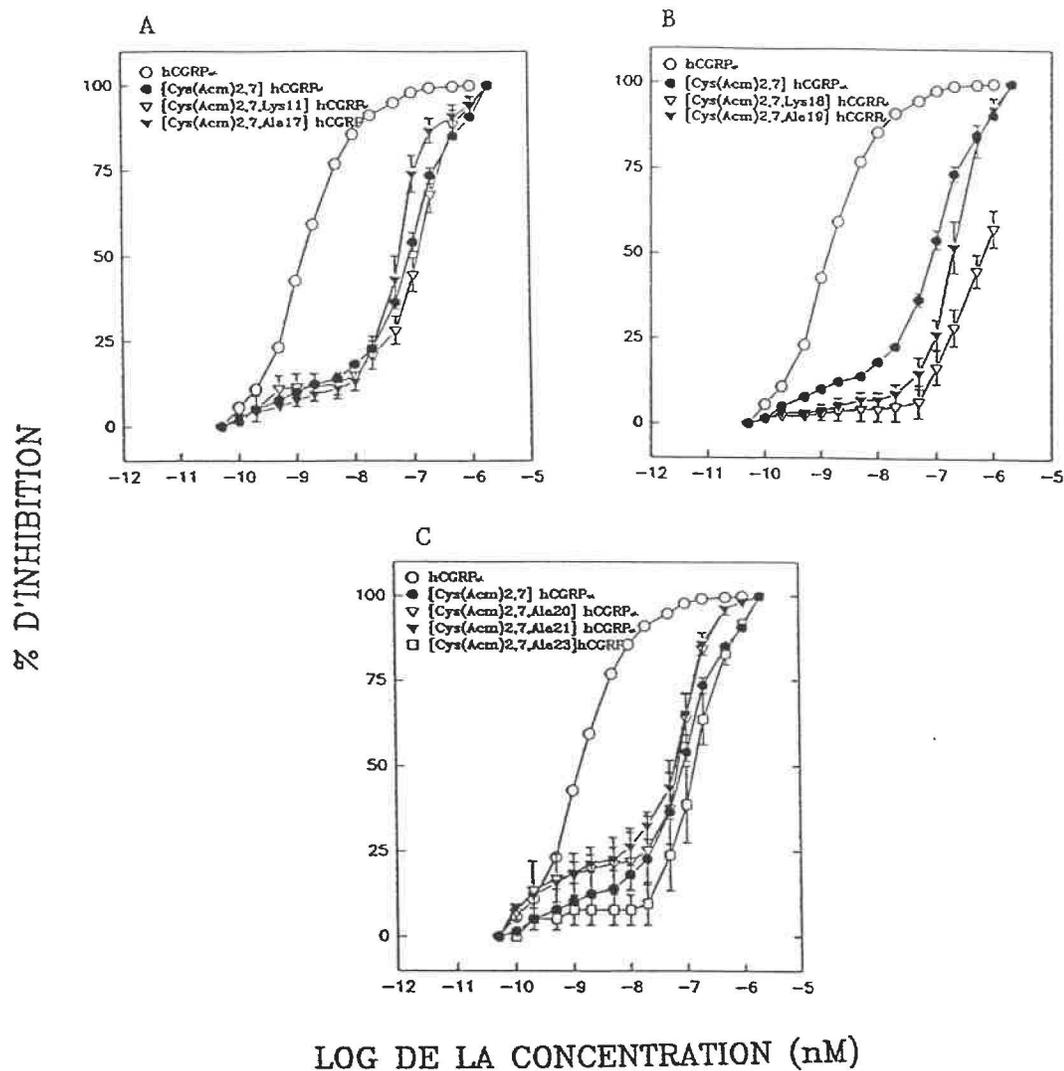


Figure 14 : Courbes concentration-réponse de l'inhibition de la force de contraction du *vas deferens* de rat induite par le hCGRP α , ou le [Cys(Acm)^{2,7}]hCGRP α et ses analogues.

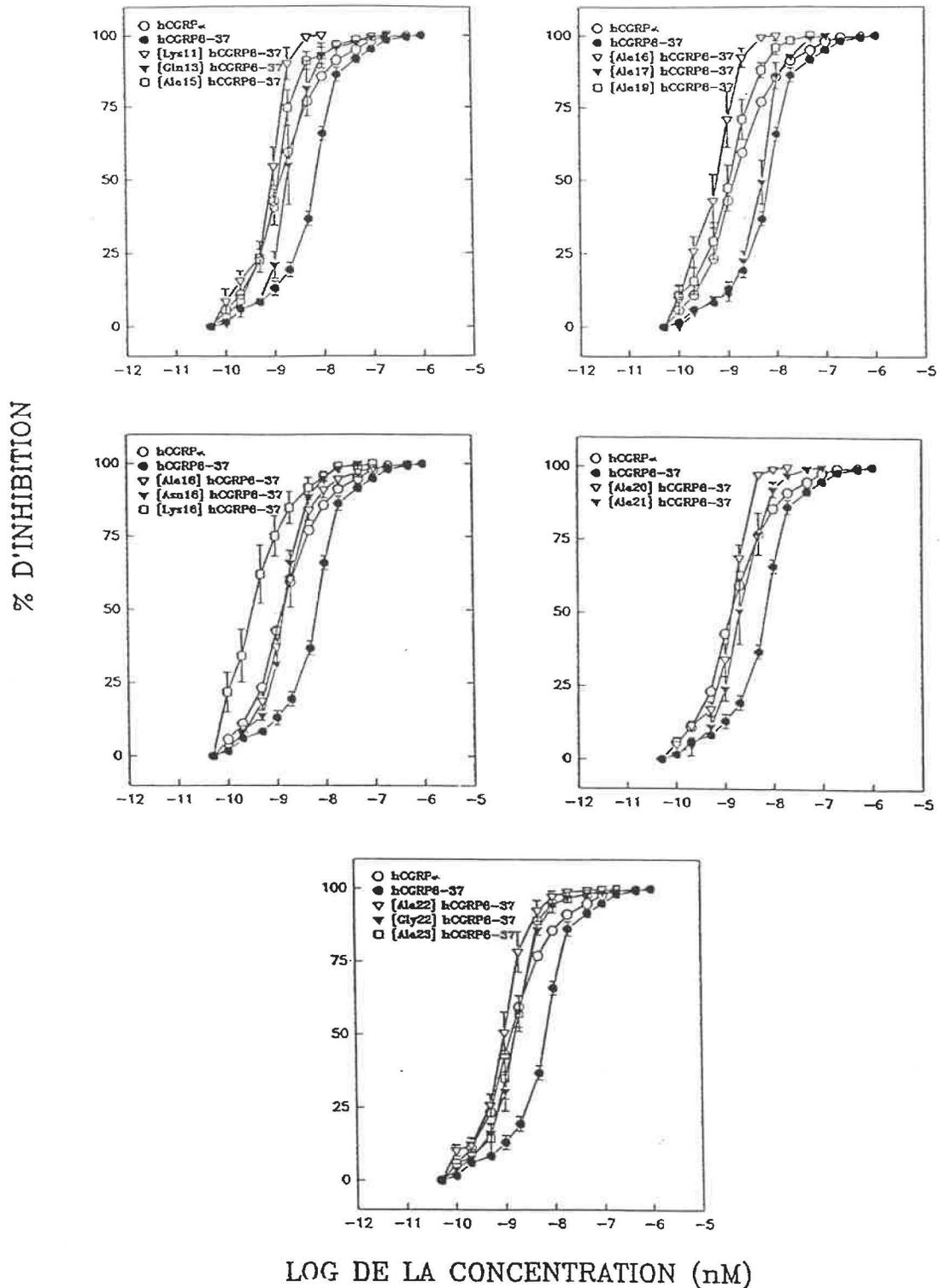


Figure 15 : Courbes concentration-réponse de l'inhibition de la force de contraction du *vas deferens* de rat induite par le hCGRP α seul, ou en présence de 1 μ M de hCGRP $_{8-37}$ ou de ses analogues.

De plus, la courbe concentration-réponse du hCGRP α est aussi déplacée de façon similaire vers la droite en présence d'une concentration de 1 μ M du fragment hCGRP₈₋₃₇ ou de ses analogues, sans pour autant modifier la réponse maximale (Fig. 12). D'autre part, en présence des fragments [Ala¹⁷]hCGRP₈₋₃₇ et [Ala²⁰]hCGRP₈₋₃₇ des valeurs de EC₅₀ supérieures ou équivalentes à celles du fragment non-substitué hCGRP₈₋₃₇ ont été mesurées (tableau Vb).

d) Activité biologique du hCGRP α et de ses analogues et fragments sur le vas deferens de rat.

La Figure 13 illustre les courbes concentration-réponse de l'inhibition de la force de contraction du *vas deferens* de rat induite par le hCGRP α et ses analogues. Deux analogues, le [Ala¹⁷]hCGRP α et le [Ala²⁰]hCGRP α , ont présenté une augmentation de l'activité agoniste sur ce tissu comparativement au hCGRP α . Ceci a été caractérisé par un déplacement de la courbe concentration-réponse vers la gauche (Fig. 13B et C) et par une valeur de EC₅₀ diminuée (Tableau Va).

L'activité antagoniste du hCGRP₈₋₃₇ et de ses analogues a également été évaluée sur l'inhibition de la force de contraction induite par le hCGRP α sur le *vas deferens* de rat stimulé électriquement. Nous pouvons constater dans le Tableau Vb qu'aucun analogue n'a présenté une meilleure activité antagoniste que le fragment hCGRP₈₋₃₇, étant donné que les valeurs de EC₅₀ du hCGRP α obtenues en présence des antagonistes sont toutes inférieures à 6,3 nM. Ce résultat est alors représenté par un déplacement des courbes concentration-réponse vers la gauche

comparativement à celle obtenue en présence du hCGRP₈₋₃₇.

Finalement, très peu d'analogues linéaires du hCGRP α ont démontré une activité agoniste mesurable sur le *vas deferens* de rat (Tableau Vc). Par contre, les analogues portant une substitution aux positions 17, 20 et 21 par une alanine ont présenté une meilleure activité agoniste que l'analogue linéaire non-substitué sur le *vas deferens* de rat (Fig. 14 et Tableau Vc) avec des valeurs de EC₅₀ de 55 nM, 55 nM et 40 nM comparativement à 75 nM pour le [Cys(Acm)^{2,7}]hCGRP α .

e) Puissance relative apparente des divers analogues et fragments du hCGRP α sur l'oreillette gauche de cobaye.

Les valeurs de EC₅₀ des analogues du hCGRP α sont présentées au Tableau Va. Le hCGRP α , avec un EC₅₀ de 10,4 nM a été le peptide le plus puissant pour l'induction de la force de contraction sur l'oreillette gauche de cobaye stimulée électriquement.

Cependant, les fragments [Ala¹⁷]hCGRP₈₋₃₇ et [Ala²⁰]hCGRP₈₋₃₇ ont respectivement présenté des puissances relatives apparentes au hCGRP₈₋₃₇ de 208% et 102% dans l'antagonisme des effets inotropes induits par le hCGRP α dans l'oreillette gauche de cobaye (Tableau Vb). La puissance relative apparente étant en fait une comparaison entre les valeurs de EC₅₀ obtenues en présence des fragments substitués et celle obtenue en présence du hCGRP₈₋₃₇.

Finalement, le seul analogue linéaire qui a démontré une activité biologique sur ce tissu est le [Cys(Acm)^{2,7}, Ala¹⁷]hCGRP α et celui-ci a été caractérisé par une valeur de EC₅₀ de 609 nM (Tableau Vc).

f) Puissance relative des divers analogues et fragments du hCGRP α sur le vas deferens de rat.

Tel que montré à la Figure 13B, la courbe concentration-réponse de l'analogue [Ala¹⁷]hCGRP α dans le vas deferens de rat a été déplacée significativement vers la gauche, ce qui signifie qu'il s'agit, en fait, d'un analogue plus puissant que la molécule-mère (le hCGRP α) avec un EC₅₀ de 0,6 nM comparativement à 1,5 nM pour le hCGRP α (puissance relative de 250%). Un seul autre analogue, le [Ala²⁰]-hCGRP α a montré une puissance relative supérieure à celle du hCGRP α (125%).

De plus, on remarque que les courbes concentration-réponse du hCGRP α ont été déplacées vers la gauche en présence de 1 μ M des différents fragments comparativement au déplacement obtenu avec le hCGRP₈₋₃₇ (Fig. 15). Ces résultats nous ont donc indiqué que ces peptides ne sont pourvus que d'une faible activité antagoniste face aux récepteurs du CGRP présents dans ce tissu.

Finalement, plusieurs analogues linéaires n'ont démontré aucun effet mesurable à une concentration de 1000 nM sur l'inhibition de la contraction du vas deferens de rat. Par contre, les analogues portant une substitution aux positions 17, 20 et 21 ont présenté un léger déplacement de leurs courbes concentration-

réponse vers la gauche comparativement au [Cys(Acm)^{2,7}]hCGRP α . Ces analogues sont donc caractérisés par des puissances relatives au [Cys(Acm)^{2,7}]hCGRP α de 136%, 135% et 187% respectivement.

TABLEAU Va : Puissance relative des fragments et analogues du hCGRP α dans différents tissus.

PEPTIDE	Oreillette gauche (cobaye)		Vas Deferens (rat)	
	EC ₅₀ (nM) ^{a)}	PR(%) ^{b)}	EC ₅₀ (nM)	PR(%)
hCGRP α	10,4 ± 0,7	100	1,5 ± 0,1	100
[Lys ¹¹] hCGRP α	36 ± 7*	29	2,7 ± 0,2*	56
[Gln ¹³] hCGRP α	135 ± 20*	8	4,9 ± 1,2*	31
[Ala ¹⁵] hCGRP α	200 ± 33*	5	18,3 ± 5,2*	8
[Ala ¹⁶] hCGRP α	inactif	-	inactif	-
[Ala ¹⁷] hCGRP α	16 ± 4*	63	0,6 ± 0,1*	250
[Ala ¹⁸] hCGRP α	398 ± 57*	3	39 ± 15*	4
[Asn ¹⁸] hCGRP α	432 ± 72*	2	46 ± 8*	3
[Lys ¹⁸] hCGRP α	55 ± 8*	19	3,6 ± 1,0*	42
[Ala ¹⁹] hCGRP α	85 ± 14*	12	4,1 ± 1,6*	37
[Ala ²⁰] hCGRP α	43 ± 4*	24	1,2 ± 0,3*	125
[Ala ²¹] hCGRP α	40 ± 3*	26	2,6 ± 0,6*	58
[Ala ²²] hCGRP α	281 ± 24*	4	16,3 ± 4,5*	9
[Gly ²²] hCGRP α	445 ± 56*	2	88 ± 20*	2
[Ala ²³] hCGRP α	33 ± 5*	31	3,1 ± 0,6*	48

a) EC₅₀: concentration de hCGRP α ou d'analogues nécessaires pour produire 50% de la réponse maximale. Cette valeur est la moyenne ± erreur standard de données obtenues de 5 à 15 tissus.

b) PR: puissance relative, *p<0.05 vs hCGRP α .

TABLEAU Vb: (suite)

PEPTIDE	Oreillette gauche (cobaye)		Vas Deferens (rat)	
	EC ₅₀ (nM) ^{a)}	PRA(% ^{b)}	EC ₅₀ (nM)	FRA(%)
hCGRP α en présence de 1000 nm de	10,4 \pm 0,7		1,5 \pm 0,1	
hCGRP ₈₋₃₇	99 \pm 13	100	6,3 \pm 0,5	100
[Lys ¹¹] hCGRP ₈₋₃₇	54 \pm 5*	54	0,6 \pm 0,1*	10
[Gln ¹³] hCGRP ₈₋₃₇	83 \pm 29	84	2,3 \pm 0,6*	37
[Ala ¹⁵] hCGRP ₈₋₃₇	35 \pm 3*	36	1,2 \pm 0,2*	19
[Ala ¹⁶] hCGRP ₈₋₃₇	48 \pm 6*	48	0,6 \pm 0,1*	10
[Ala ¹⁷] hCGRP ₈₋₃₇	206 \pm 37*	208	4,5 \pm 0,8*	71
[Ala ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	51 \pm 6*	51	1,7 \pm 0,5*	27
[Asn ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	46 \pm 12*	46	1,5 \pm 0,1*	24
[Lys ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	50 \pm 14*	50	0,4 \pm 0,1*	6
[Ala ¹⁹] hCGRP ₈₋₃₇	70 \pm 12	71	1,1 \pm 0,3*	17
[Ala ²⁰] hCGRP ₈₋₃₇	101 \pm 22	102	1,3 \pm 0,2*	21
[Ala ²¹] hCGRP ₈₋₃₇	30 \pm 8*	31	2,3 \pm 0,5*	37
[Ala ²²] hCGRP ₈₋₃₇	35 \pm 8*	35	1,0 \pm 0,2*	16
[Gly ²²] hCGRP ₈₋₃₇	40 \pm 6*	40	1,6 \pm 0,2*	25
[Ala ²³] hCGRP ₈₋₃₇	40 \pm 5*	40	1,6 \pm 0,3*	25

a) EC₅₀: concentration de hCGRP α nécessaire pour produire 50% de la réponse maximale induite en présence de fragments et d'analogues à 1 μ M. Cette valeur est la moyenne \pm erreur standard de données obtenues de 5 à 15 tissus.

b) PRA: puissance relative apparente, *p < 0,05 vs hCGRP₈₋₃₇.

TABLEAU Vc : (suite)

PEPTIDE	Oreillette gauche (cobaye)		Vas Deferens (rat)	
	EC ₅₀ (nM) ^{a)}	PR(%) ^{b)}	EC ₅₀ (nM)	PR(%)
[Cys(Acm) ^{2,7}] hCGRP α	inactif	-	75 \pm 6	100
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Lys ¹¹] hCGRP α	inactif	-	115 \pm 15*	65
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Gln ¹³] hCGRP α	inactif	-	>1000	-
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁵] hCGRP α	inactif	-	>1000	-
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁶] hCGRP α	inactif	-	inactif	-
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁷] hCGRP α	609 \pm 186	-	55 \pm 13	136
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁸] hCGRP α	inactif	-	>1000	-
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Asn ¹⁸] hCGRP α	inactif	-	>1000	-
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Lys ¹⁸] hCGRP α	inactif	-	696 \pm 159*	11
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ¹⁹] hCGRP α	inactif	-	196 \pm 28*	38
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²⁰] hCGRP α	inactif	-	55 \pm 23	135
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²¹] hCGRP α	inactif	-	40 \pm 12*	187
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²²] hCGRP α	inactif	-	>1000	-
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Gly ²²] hCGRP α	inactif	-	>1000	-
[Cys(Acm) ^{2,7} ,Ala ²³] hCGRP α	inactif	-	139 \pm 44*	54

a) EC₅₀: concentration de [Cys(Acm)^{2,7}]hCGRP α ou d'analogues nécessaires pour produire 50% de la réponse maximale. Cette valeur est la moyenne \pm erreur standard de données obtenues de 5 à 15 tissus.

b) PR: puissance relative, *p<0.05 vs [Cys(Acm)^{2,7}]hCGRP α .

DISCUSSION

DISCUSSION

9. Conception et synthèse des analogues et fragments du hCGRP α

a) Choix des analogues et fragments du hCGRP α

Nous avons entrepris l'étude de la portion médiane du hCGRP α sur la base des résultats obtenus lors de la caractérisation pharmacologique des fragments et analogues du hCGRP₈₋₃₇. En effet, des études antérieures de notre groupe ont montré, d'une part, que la réduction du fragment hCGRP₈₋₃₇ par le retrait du segment 8 à 11 donne lieu à une perte significative de l'affinité et de l'activité antagoniste pour certains types de récepteurs du CGRP (16,17). D'autre part, d'autres études récentes de notre groupe, entreprises afin de déterminer l'importance des acides aminés 8 à 12 du segment N-terminal du hCGRP₈₋₃₇ pour l'affinité et l'activité antagoniste, ont montré que la valine-8 ne posséderait que peu d'importance, tandis que les résidus thréonine-9 et histidine-10 ne joueraient qu'un rôle essentiellement structural pour la pleine expression de l'affinité du hCGRP₈₋₃₇. Quant à l'arginine-11 et la leucine-12, ils contribueraient par contre, de façon majeure, aux propriétés antagonistes du fragment, soit en assumant un rôle structural clé et/ou en participant directement à l'interaction spécifique avec les récepteurs du CGRP (72,73). Nous avons donc, dans un premier temps, synthétisé une série d'analogues du CGRP α humain afin de déterminer le rôle des résidus d'acides aminés suivant la portion 8 à 11 et formant le segment central du peptide CGRP.

La région médiane du CGRP est caractérisée par la présence des structures

secondaires hélice α et coude β . Nous avons alors amorcé une étude visant à déterminer l'importance des acides aminés 11 à 23 dans le maintien de ces conformations. Les analogues ont donc été préparés en procédant à une substitution des résidus 11 à 23, par exemple au moyen d'une L-alanine, un acide aminé ne possédant qu'une courte chaîne latérale composée d'un groupement méthyle et permettant ainsi d'évaluer l'importance de la chaîne latérale portée par chacun des résidus. Le choix de l'alanine pour la substitution est d'autant plus pertinent que cet acide aminé est caractérisé par un très haut potentiel pour le maintien de l'hélice α , une structure secondaire prédominante dans le segment 8 à 18 de la molécule native (8,62,64).

b) Évaluation de la pureté et caractérisation des analogues et fragments synthétiques du hCGRP α .

La synthèse de tous les peptides a été effectuée par la méthode en phase solide qui consiste à assembler les acides aminés un à la fois sur un support solide, à l'aide d'un réactif de couplage (27-29,71,107). Le clivage des peptides de la matrice polymérique et le retrait des groupements protecteurs protégeant les fonctions réactives des acides aminés trifonctionnels, ont été obtenus efficacement au moyen de l'acide fluorhydrique. Ainsi, une quantité appréciable de matériel brut a pu être obtenue pour chacun des peptides. Cependant, la présence d'un sous-produit a été révélée pour certaines préparations de peptides bruts lors d'une analyse effectuée par CLHP analytique (Fig.4). Ce sous-produit était caractérisé

par un pic chromatographique situé à un T_r voisin de celui correspondant au pic du produit désiré (Fig. 4A). Il aurait donc été extrêmement difficile de séparer ces deux fractions de façon satisfaisante par CLHP préparative.

Par conséquent, un traitement basique du matériel brut de tous les peptides possédant cette caractéristique a permis de transformer la majorité du sous-produit en peptide désiré (Fig. 4B). Il semble donc que ce sous-produit majeur a résulté d'un déplacement acyle $N \rightarrow O$ sur un (ou des) résidu(s) de sérine et/ou de thréonine lors du clivage acide des peptides (Fig.3). Cette réaction secondaire semble particulièrement facilitée par la séquence de la molécule de hCGRP α .

La purification des peptides bruts par CLHP préparative a donné des produits d'une excellente qualité ($\geq 98\%$). Une caractérisation des peptides purifiés a été accomplie par plusieurs méthodes, dont la CLHP analytique (Fig. 4C), l'électrophorèse capillaire, la spectrométrie de masse et l'analyse des acides aminés (Tableaux III a, b, c). Les résultats ont indiqué que la substitution des résidus 11 à 23 du hCGRP α afin de former les divers analogues n'a résulté, à l'exception des analogues portant une substitution aux positions 17 à 21, qu'en une faible diminution du T_r sur CLHP analytique. D'autre part, seuls les analogues [Ala¹⁸]hCGRP α et [Asn⁸]hCGRP α ont montré une augmentation du temps de migration (T_m) par électrophorèse capillaire. Les diverses substitutions n'ont donc pas semblé changer le T_m de façon importante puisque les analogues ont été caractérisés par des T_m voisins de celui du hCGRP α . Des résultats similaires ont été obtenus pour

le hCGRP₈₋₃₇ et le [Cys(Acm)^{2,7}]hCGRP α et leurs analogues.

L'analyse des acides aminés d'un échantillon de chacun des peptides étudiés a également confirmé la pureté et la composition des peptides. En effet, le nombre estimé de chacun des acides aminés correspondait effectivement au nombre de résidus \pm 10% retrouvés dans la séquence des peptides. Le nombre de résidus de cystéine présents n'a cependant pas été déterminé. Finalement, l'évaluation par spectrométrie de masse, du poids moléculaire des peptides purifiés, a également confirmé la qualité des peptides puisque les résultats obtenus correspondaient exactement aux poids moléculaires théoriques calculés.

10. Évaluation pharmacologique des peptides

a) Choix des tissus

L'évaluation pharmacologique des peptides a été effectuée au moyen de deux préparations tissulaires afin de définir les exigences structurales des différents types de récepteurs du CGRP. En effet, une hétérogénéité des récepteurs a été proposée par de nombreux auteurs (103,116). En particulier, notre groupe a observé que le fragment hCGRP₈₋₃₇ possède une puissance antagoniste différente selon la nature du tissu (16,17). En effet, nous avons observé que le hCGRP₈₋₃₇ agit comme un puissant antagoniste des réponses induites par le hCGRP α sur les oreillettes de cobaye, alors qu'il ne possède qu'une faible activité antagoniste sur le *vas deferens* de rat. Il semble donc que le récepteur CGRP₁ (oreillettes de cobaye) serait sensible à l'activité antagoniste du hCGRP₈₋₃₇ alors que le récepteur CGRP₂

(*vas deferens* de rat) répondrait plutôt aux effets agonistes du [Cys(Acm)^{2,7}]-hCGRP α . Par conséquent, des essais biologiques ont été réalisés sur ces tissus au moyen des analogues et fragments développés dans cette étude.

b) Estimation de l'activité biologique et du contenu en hélice α des peptides synthétiques: analyse et rôles possibles des résidus 11 à 23 du CGRP

Des études antérieures ont démontré la présence d'une structure secondaire hélicoïdale dans la portion médiane de la molécule de CGRP. En effet, ces études ont indiqué que le segment formé des résidus 8 à 18 du hCGRP α adopte une structure en hélice α lorsque mis en présence d'un co-solvant visant à induire les structures secondaires. L'hélice α (Fig.16) et la structure en coude β (Fig.17) suivant celle-ci ont également été prédites par une analyse effectuée à l'aide des paramètres de Chou et Fasman (13). Ces auteurs ont déterminé la propension conformationnelle de chaque acide aminé à l'aide d'une étude réalisée au moyen de 29 protéines. Ils ont donc évalué le potentiel de formation de structures secondaires de chacun des résidus d'acide aminé (Tableau VI) (13). La présence d'une structure hélicoïdale amphiphile dans cette portion de la molécule de CGRP a également été prédite par une représentation schématique telle que décrite par Schiffer et Edmundson (Fig.18) (99).

À l'aide de ces paramètres, nous avons évalué la probabilité de la formation d'une structure hélice α entre les résidus 8 à 18. Les résultats obtenus confirment la présence de ce type de structure secondaire et toutes les exigences requises

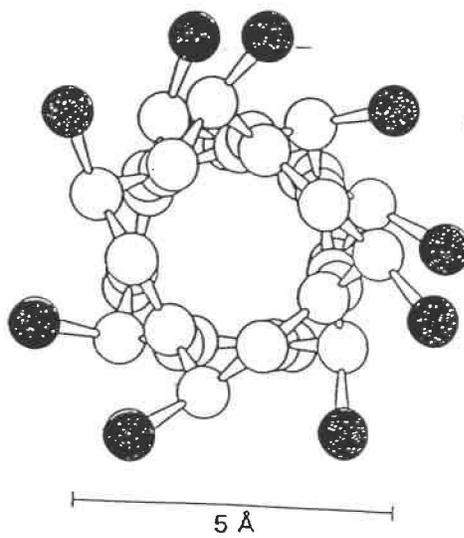
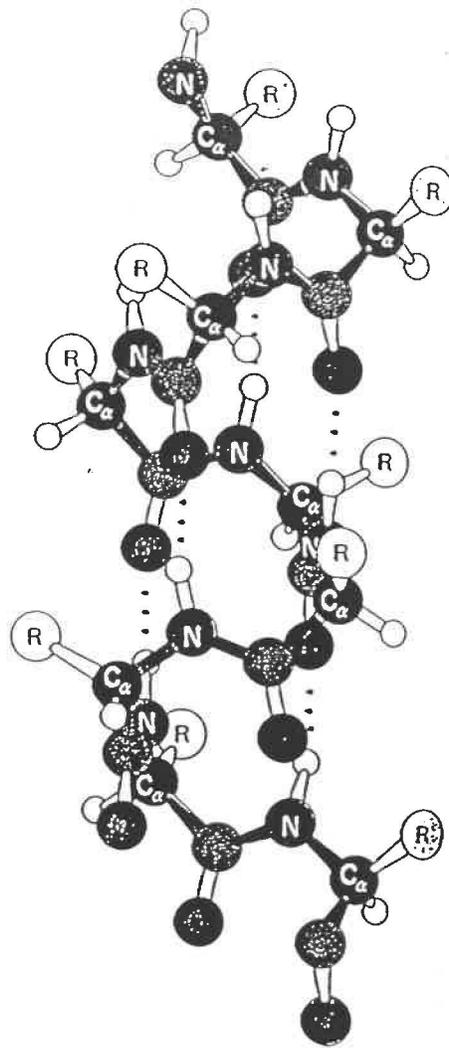


Figure 16 : Modèles de la structure hélice α

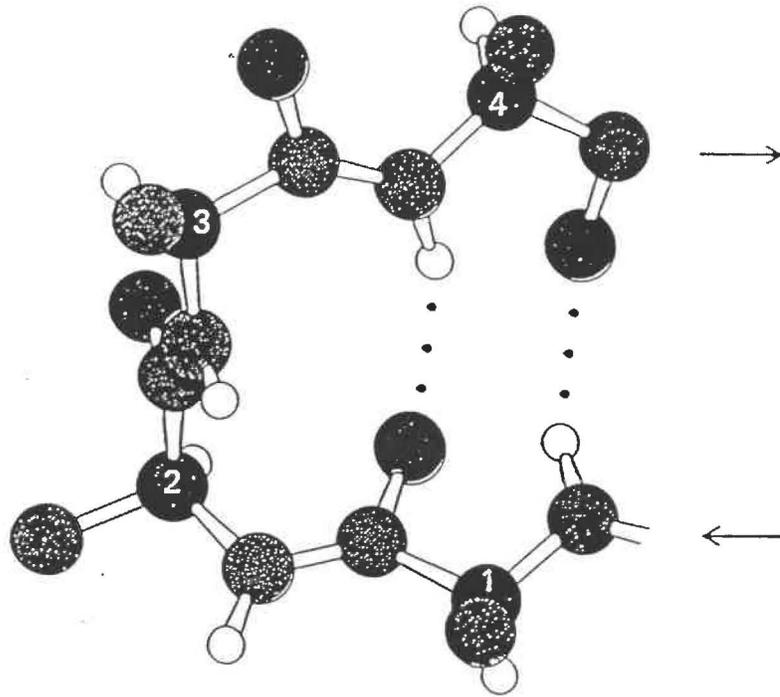


Figure 17 : Modèle de la structure coude β

TABLEAU VI : Paramètres conformationnels déterminés par Chou et Fasman à l'aide de 29 protéines (13)

CONFORMATIONAL PARAMETERS FOR α -HELICAL, β -SHEET, AND β -TURN RESIDUES IN 29 PROTEINS *

P_α		P_β		P_t	f_t	f_{t+1}	f_{t+2}	f_{t+3}	
Glu 1.51	} H_α	Val 1.70	} H_β	Asn 1.56	Asn 0.161	Pro 0.301	Asn 0.191	Trp 0.167	
Met 1.45		Ile 1.60		Gly 1.56	Cys 0.149	Ser 0.139	Gly 0.190	Gly 0.152	
Ala 1.42		Tyr 1.47		Pro 1.52	Asp 0.147	Lys 0.115	Asp 0.179	Cys 0.128	
Leu 1.21		Phe 1.38		Asp 1.46	His 0.140	Asp 0.110	Ser 0.125	Tyr 0.125	
Lys 1.16		Trp 1.37		Ser 1.43	Ser 0.120	Thr 0.108	Cys 0.117	Ser 0.106	
Phe 1.13	} h_α	Leu 1.30	} h_β	Cys 1.19	Pro 0.102	Arg 0.106	Tyr 0.114	Gln 0.098	
Gln 1.11		Cys 1.19		Tyr 1.14	Gly 0.102	Gln 0.098	Arg 0.099	Arg 0.099	Lys 0.095
Trp 1.08		Thr 1.19		Lys 1.01	Thr 0.086	Gly 0.085	His 0.093	His 0.093	Asn 0.091
Ile 1.08		Gln 1.10		Gln 0.98	Tyr 0.082	Asn 0.083	Glu 0.077	Glu 0.077	Arg 0.085
Val 1.06		Met 1.05		Thr 0.96	Trp 0.077	Met 0.082	Lys 0.072	Lys 0.072	Asp 0.081
Asp 1.01	} I_α	Arg 0.93	} I_β	Trp 0.96	Gln 0.074	Ala 0.076	Thr 0.065	Thr 0.079	
His 1.00		Asn 0.89		Arg 0.95	Arg 0.070	Tyr 0.065	Phe 0.065	Phe 0.065	Leu 0.070
Arg 0.98		His 0.87		His 0.95	Met 0.068	Glu 0.060	Trp 0.064	Trp 0.064	Pro 0.068
Thr 0.83		Ala 0.83		Glu 0.74	Val 0.062	Cys 0.053	Gln 0.037	Gln 0.037	Phe 0.065
Ser 0.77		Ser 0.75		Ala 0.66	Leu 0.061	Val 0.048	Leu 0.036	Leu 0.036	Glu 0.064
Cys 0.70	} i_α	Gly 0.75	} b_β	Met 0.60	Ala 0.060	His 0.047	Ala 0.035	Ala 0.058	
Tyr 0.69		Lys 0.74		Phe 0.60	Phe 0.059	Phe 0.041	Pro 0.034	Pro 0.034	Ile 0.056
Asn 0.67		Pro 0.55		Leu 0.59	Glu 0.056	Ile 0.034	Val 0.028	Val 0.028	Met 0.055
Pro 0.57		Asp 0.54		Val 0.50	Lys 0.055	Leu 0.025	Met 0.014	Met 0.014	His 0.054
Gly 0.57		Glu 0.37		Ile 0.47	Ile 0.043	Trp 0.013	Ile 0.013	Ile 0.013	Val 0.053

* P_α , P_β , P_t are conformational parameters of helices, β sheets, and β turns; f_t , f_{t+1} , f_{t+2} , f_{t+3} are bend frequencies in the four positions of the β turn; H_α , H_β , etc., are as defined previously.¹⁰ From Chou & Fasman.^{5, 11}

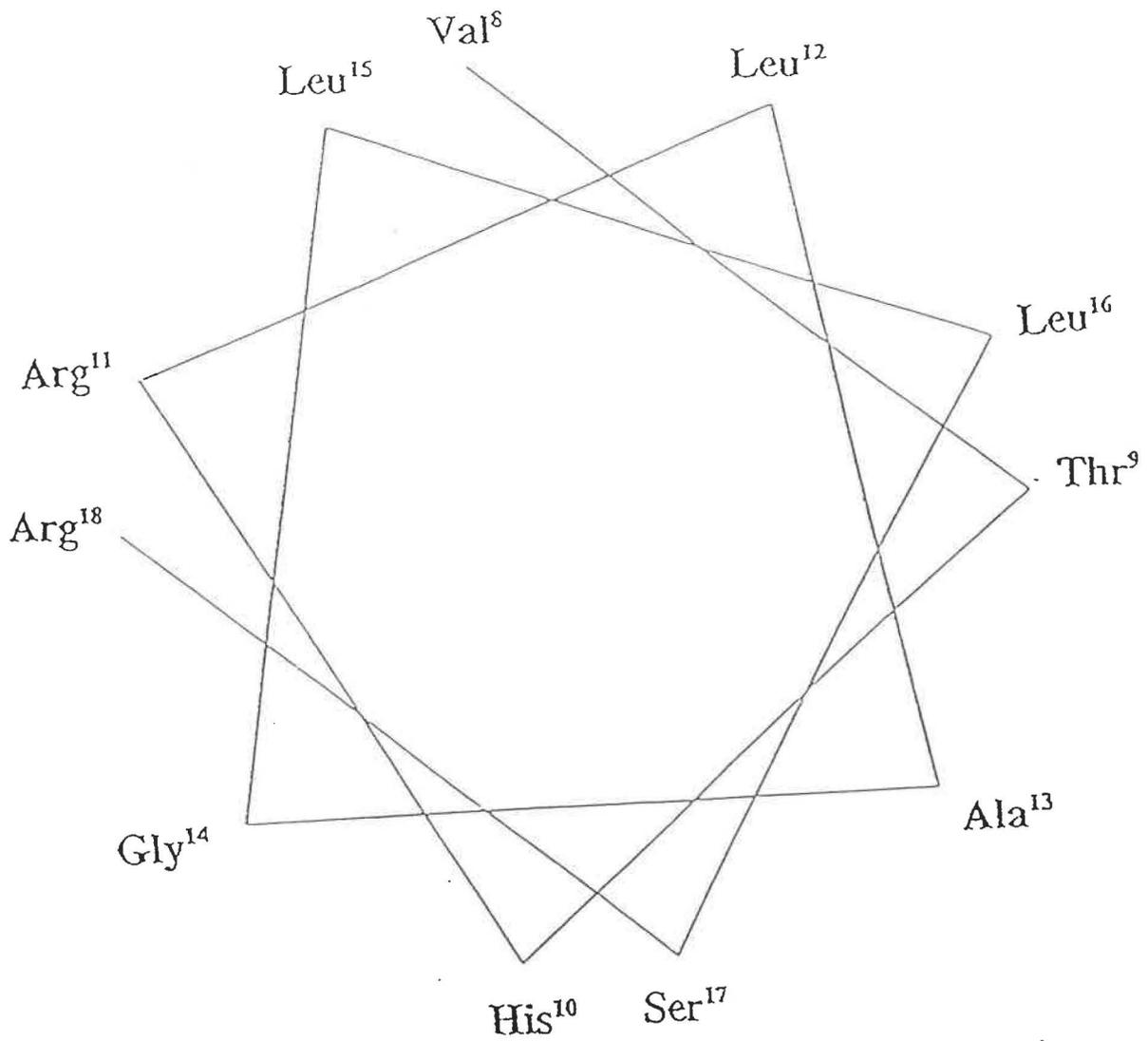


Figure 18 : Représentation schématique de l'hélice α amphiphile du hCGRP α selon Schiffer et Edmundson (99).

pour l'existence de celle-ci ont été rencontrées pour tous nos peptides.

Une analyse des résultats des activités biologiques a donc été réalisée sur la base du potentiel de formation des structures secondaires (Tableau VI) et du degré d'hydrophilicité (Tableau VII) des résidus 11 à 23 du CGRP.

Position 11

La position 11 du CGRP α humain est occupée par l'acide aminé arginine. Il s'agit donc d'un acide aminé basique, très hydrophile (+10) et possédant un potentiel intermédiaire de formation d'une hélice α ($P\alpha = 0,98$). La première substitution explorée de cette arginine a été réalisée au moyen d'une lysine. Celle-ci exhibe des propriétés semblables en terme de basicité et de degré d'hydrophilicité, mais est caractérisée par un potentiel élevé de formation de l'hélice α ($P\alpha = 1,16$) (Tableau VIII). Rappelons que notre groupe a précédemment effectué la substitution de l'arginine-11 par une alanine dans le fragment hCGRP₈₋₃₇ et a déterminé que ce résidu contribue de façon majeure à la propriété antagoniste du fragment, soit en assumant un rôle structural et/ou en participant directement à l'interaction spécifique avec les récepteurs du CGRP (72).

Avec la substitution de l'arginine-11 par une lysine, nous avons obtenu une perte significative de l'affinité du hCGRP α en présence du fragment 8-37 dans l'antagonisme de la réponse inotrope induite par le hCGRP α sur l'oreillette gauche de cobaye et de l'effet induit par le hCGRP α sur le *vas deferens* de rat (Tableau IX). De la même façon, l'activité démontrée par l'analogue [Lys¹¹]hCGRP α et son

TABLEAU VII : Degré d'hydrophilicité des différents acides aminés

Acide aminé	Degré d'hydrophilicité ^{a)}
Arginine	+ 10
Acide aspartique	+ 10
Acide glutamique	+ 10
Lysine	+ 10
Sérine	+ 1.6
Asparagine	+ 1.3
Glutamine	+ 1.3
Glycine	+ 0.6
Proline	+ 0.6
Thréonine	- 0.6
Alanine	- 0.9
Histidine	- 0.9
Cystéine	- 2.5
Méthionine	- 3.4
Valine	- 4.1
Isoleucine	- 5
Leucine	- 5
Tyrosine	- 6.6
Phénylalanine	- 7.2
Tryptophane	- 10

a) Les paramètres d'hydrophilicité ont été déterminés par Hopp et Woods (47). Une valeur numérique maximale de - 10 a été assignée à l'acide aminé le plus hydrophobe et une valeur de + 10 à l'acide aminé le plus hydrophile.

TABLEAU VIII : Comparaison entre les acides aminés arginine et lysine de la position 11

Acide aminé	Structure	Degré d'hydrophilicité ^{a)}	Paramètre conformationnel de l'hélice α (P_α) ^{b)}
Arginine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HN}=\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	+ 10	0,98 (i_α)
Lysine	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \qquad \qquad \\ \text{NH}_2 \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$	+ 10	1,16 (h_α)

a) Les paramètres d'hydrophilicité ont été déterminés par Hopp et Woods (47). Une valeur numérique maximale de -10 a été assignée à l'acide aminé le plus hydrophobe et une valeur de +10 à l'acide aminé le plus hydrophile.

b) Les paramètres conformationnels (P_α) ont été déterminés par Chou et Fasman à l'aide d'une étude réalisée au moyen de 29 protéines (13). Les symboles $H_\alpha > h_\alpha > l_\alpha > i_\alpha > b_\alpha > B_\alpha$ indiquent l'ordre décroissant du potentiel de formation de l'hélice alpha.

TABLEAU IX : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 11

	Tests biologiques <i>in vitro</i>				Dichroïsme circulaire		
	Oreillette gauche de cobaye		<i>Vas deferens</i> de rat		Contenu en hélice α (%)		
	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	limite inf.	limite sup.	moyenne
hCGRP α	10,4 \pm 7	100	1,5 \pm 0,1	100	58	65	62
[Lys ¹¹] hCGRP α	36 \pm 7*	29	2,7 \pm 0,2*	56	49	56	53
[Cys(Acm) ^{2,7}] hCGRP α	inactif	-	75 \pm 6	100	50	55	53
[Cys(Acm) ^{2,7} , Lys ¹¹] hCGRP α	inactif	-	115 \pm 15*	65	53	57	55
hCGRP ₈₋₃₇	99 \pm 13	100	6,3 \pm 0,5	100	39	43	41
[Lys ¹¹] hCGRP ₈₋₃₇	54 \pm 5*	54	0,6 \pm 0,1*	10	42	51	47

équivalent linéaire sur ces deux préparations tissulaires a été grandement affectée. L'analyse du contenu en hélice α de ces peptides effectuée par dichroïsme circulaire a démontré, quant à elle, que cette substitution ne semble pas affecter de façon importante la formation de la structure hélicoïdale dans le peptide CGRP. Ces résultats suggèrent donc l'importance de la présence de la chaîne latérale de l'arginine pour la pleine expression de l'activité agoniste et antagoniste aux différents récepteurs du CGRP. Il semble donc que l'arginine-11 soit impliquée directement au niveau structural, soit dans le maintien d'une structure tertiaire appropriée et/ou en participant directement à l'interaction du peptide avec le récepteur. Ces résultats sont donc en accord avec ceux obtenus antérieurement par notre groupe (72).

Position 13

Dans le hCGRP α , on retrouve une alanine à la position 13. L'alanine, dont la chaîne latérale est constituée d'un groupement méthyle, est un acide aminé caractérisé par un excellent potentiel conformationnel de formation de l'hélice α ($P\alpha$) (Tableau X). Nous avons effectué la substitution de l'alanine par une glutamine plus hydrophile (+1,3) et possédant un $P\alpha$ légèrement affaibli ($P\alpha$; 1,11) (Tableau X). En présence de cette substitution, l'analogue est caractérisé par une hausse importante des concentrations de peptides nécessaires pour induire une augmentation de la force de contraction sur l'oreillette gauche de cobaye (ED_{50}) et pour l'inhibition de la contraction sur le *vas deferens* de rat (Tableau XI).

TABLEAU X : Comparaison entre les acides aminés alanine et glutamine de la position 13

Acide aminé	Structure	Degré d'hydrophilicité ^{a)}	Paramètre conformationnel de l'hélice α (P_α) ^{b)}
Alanine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	- 0,9	1,42 (H_α)
Glutamine	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	+ 1,3	1,11 (h_α)

a) Les paramètres d'hydrophilicité ont été déterminés par Hopp et Woods (47). Une valeur numérique maximale de -10 a été assignée à l'acide aminé le plus hydrophobe et une valeur de +10 à l'acide aminé le plus hydrophile.

b) Les paramètres conformationnels (P_α) ont été déterminés par Chou et Fasman à l'aide d'une étude réalisée au moyen de 29 protéines (13). Les symboles $H_\alpha > h_\alpha > l_\alpha > i_\alpha > b_\alpha > B_\alpha$ indiquent l'ordre décroissant du potentiel de formation de l'hélice alpha.

TABLEAU XI : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 13

	Tests biologiques <i>in vitro</i>				Dichroïsme circulaire		
	Oreillette gauche de cobaye		Vas deferens de rat		Contenu en hélice α (%)		
	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	limite inf.	limite sup.	moyenne
hCGRP α	10,4 ± 7	100	1,5 ± 0,1	100	58	65	62
[Gln ¹³] hCGRP α	135 ± 20*	8	4,9 ± 1,2*	31	43	54	49
[Cys(Acm) ^{2,7}] hCGRP α	inactif	-	75 ± 6	100	50	55	53
[Cys(Acm) ^{2,7} , Gln ¹³] hCGRP α	inactif	-	> 1000	-	56	63	60
hCGRP ₈₋₃₇	99 ± 13	100	6,3 ± 0,5	100	39	43	41
[Gln ¹³] hCGRP ₈₋₃₇	83 ± 29	84	2,3 ± 0,6*	37	40	49	45

L'analogue linéaire [Cys(Acm)^{2,7},Gln¹³]hCGRP , a pour sa part tout comme son homologue, présenté une perte d'activité totale au récepteur CGRP₁, alors qu'il est demeuré inactif à une concentration de 1 μ M au récepteur CGRP₂. La présence de l'alanine en position 13 semble donc cruciale pour l'activité du hCGRP α sur les deux tissus testés. Cette baisse d'activité du [Gln¹³]hCGRP α peut être expliquée en partie par une déstabilisation de la structure hélicoïdale, telle que mesurée par dichroïsme circulaire (Tableau XI). Par contre, l'activité antagoniste du fragment 82-37 substitué n'apparaît pas différente de celle du contrôle (hCGRP₈₋₃₇) sur les récepteurs CGRP₁, tel qu'estimé par les valeurs de EC₅₀ obtenues pour le hCGRP α . La présence de la chaîne latérale de l'alanine pourrait donc jouer un rôle structural important dans la molécule native et participer à la formation d'une conformation appropriée pour l'activation du récepteur. Cependant, son rôle structural apparaît être de moindre importance au niveau du maintien des propriétés antagonistes du fragment hCGRP₈₋₃₇. La présence d'un résidu hydrophobe à cette position dans la molécule de CGRP semble aussi être importante pour le maintien de son caractère amphiphile.

Positions 15 et 16

La substitution des leucines 15 ou 16 dans le CGRP α humain par une alanine a eu un effet des plus néfastes sur l'activité biologique de ces analogues (Tableaux XII et XIII). En effet, l'analogue [Ala¹⁵]hCGRP α a démontré une très faible capacité à induire une contraction sur l'oreillette de cobaye et pour inhiber la contraction du

TABLEAU XII : Comparaison entre les acides aminés leucine et alanine des positions 15 et 16

Acide aminé	Structure	Degré d'hydrophilicité ^{a)}	Paramètre conformationnel de l'hélice α (P_α) ^{b)}
Leucine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-CH-COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$	- 5,0	1,21 (H_α)
Alanine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	- 0,9	1,42 (H_α)

a) Les paramètres d'hydrophilicité ont été déterminés par Hopp et Woods (47). Une valeur numérique maximale de -10 a été assignée à l'acide aminé le plus hydrophobe et une valeur de +10 à l'acide aminé le plus hydrophile.

b) Les paramètres conformationnels (P_α) ont été déterminés par Chou et Fasman à l'aide d'une étude réalisée au moyen de 29 protéines (13). Les symboles $H_\alpha > h_\alpha > l_\alpha > i_\alpha > b_\alpha > B_\alpha$ indiquent l'ordre décroissant du potentiel de formation de l'hélice alpha.

TABLEAU XIII : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués aux positions 15 et 16

	Tests biologiques <i>in vitro</i>				Dichroïsme circulaire		
	Oreillette gauche de cobaye		Vas deferens de rat		Contenu en hélice α (%)		
	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	limite inf.	limite sup.	moyenne
hCGRP α	10,4 \pm 7	100	1,5 \pm 0,1	100	58	65	62
[Ala ¹⁵] hCGRP α	200 \pm 33*	5	18,3 \pm 5,2*	8	49	55	52
[Ala ¹⁶] hCGRP α	inactif	-	inactif	-	56	64	60
[Cys(Acm) ^{2,7}] hCGRP α	inactif	-	75 \pm 6	100	50	55	53
[Cys(Acm) ^{2,7} , Ala ¹⁵] hCGRP α	inactif	-	> 1000	-	61	65	63
[Cys(Acm) ^{2,7} , Ala ¹⁶] hCGRP α	inactif	-	inactif	-	62	68	65
hCGRP ₈₋₃₇	99 \pm 13	100	6,3 \pm 0,5	100	39	43	41
[Ala ¹⁵] hCGRP ₈₋₃₇	35 \pm 3*	36	1,2 \pm 0,5*	19	22	28	25
[Ala ¹⁶] hCGRP ₈₋₃₇	48 \pm 6*	48	0,6 \pm 0,1*	10	21	30	26

vas deferens de rat stimulé électriquement (PRA: 5% et 8% respectivement), alors que son équivalent linéaire n'a affiché aucune activité agoniste sur les deux tissus. Quant aux analogues substitués à la position 16, ils ont démontré une inactivité totale dans tous les cas. Seules les propriétés antagonistes des fragments ont été moins affectées en nécessitant des concentrations de hCGRP α de 35 et 48 nM pour obtenir une réponse maximale sur la préparation tissulaire enrichie en récepteurs CGRP $_1$ (Tableau XIII). La présence de ces leucines 15 et 16 semble donc critique pour le maintien de l'activité agoniste aux deux tissus. Donc, en fait, les résidus hydrophobes 15 et 16 pourraient jouer un rôle important dans le maintien du caractère amphiphile de l'hélice α de la molécule de CGRP et jouer ainsi un rôle structural de grande importance dans l'interaction avec les récepteurs.

Position 17

Par la suite, nous avons remplacé la sérine-17 par une alanine (Tableau XIV). Cette substitution a été très favorable, à la fois pour l'activité des analogues linéaire et cyclique au récepteur CGRP $_2$ et pour les propriétés antagonistes du fragment au récepteur CGRP $_1$ (Tableau XV). En effet, les analogues [Ala 17]hCGRP α et [Cys(Acm) 2,7 , Ala 17]hCGRP α ont présenté des affinités (EC_{50}) plus grandes que les molécules non modifiées, ce qui a résulté en des puissances relatives de 250% et 136% respectivement. De plus, il s'agit du seul analogue linéaire possédant une activité agoniste mesurable sur l'oreillette gauche de cobaye. L'augmentation de

l'effet antagoniste du fragment spécifiquement sur les récepteurs CGRP₁, fait donc de cette position un site privilégié pour l'élaboration future d'antagonistes spécifiques au récepteurs de type 1. Puisque l'alanine est un acide aminé caractérisé par un très bon potentiel conformationnel de formation de l'hélice α ($H\alpha$), il serait donc possible que ces fortes augmentations des activités biologiques soient dues à une stabilisation supplémentaire de la structure hélicoïdale de cette portion de la molécule de CGRP. En fait, les résultats de dichroïsme circulaire démontrent que le contenu en hélice α des différents analogues n'a pas été, dans la plupart des cas, affecté favorablement par la présence de l'alanine à la position 17, malgré le fait qu'elle soit dotée d'un excellent $P\alpha$. Il semblerait alors que la présence d'un résidu moins hydrophile à cette position permettrait à la molécule d'assumer un caractère amphiphile approprié pour l'hélice α et favoriserait ainsi la liaison au récepteur et son activation. Malgré les exigences structurales différentes des deux types de récepteurs du CGRP, la présence de l'alanine à la position 17 du hCGRP α est reconnue favorablement dans les deux cas.

Position 18

Diverses substitutions ont été réalisées à la position 18 afin de remplacer l'arginine présente dans la molécule native. Tout d'abord, la substitution par l'alanine a été faite, comme pour les autres cas, afin d'évaluer l'importance de la chaîne latérale portée par l'arginine. Puis, une modification impliquant l'incorporation d'une lysine, un acide aminé de basicité et de degré d'hydrophilicité semblables a aussi

été explorée (Tableau XVI). On observe au Tableau XVII que ces analogues ont présenté une activité agoniste beaucoup plus faible que le hCGRP α sur les deux tissus testés. On a même obtenu une perte d'activité presque totale avec les analogues linéaires sur le récepteur CGRP $_2$. De plus, ces substitutions ont diminué de 50% la puissance relative apparente des fragments au niveau de l'oreillette gauche de cobaye, alors qu'elles ont provoqué une diminution encore plus importante au niveau du *vas deferens* de rat. L'apport de résidus possédant de meilleurs potentiels de formation de l'hélice α n'a donc pas avantage les propriétés agonistes ou antagonistes et ceci est reflété par un contenu en hélice α équivalent pour ces analogues (Tableau XVII). La chaîne latérale de l'arginine semble donc participer à une interaction au niveau de la structure tertiaire de la molécule de CGRP et son absence est néfaste pour le maintien des propriétés biologiques.

Selon la littérature, une structure coude β (" β -turn") impliquant quatre résidus d'acides aminés fait suite à l'hélice α , assurant ainsi la réversibilité de la chaîne peptidique (8,62,63,99). Par contre, les résidus directement impliqués dans la formation de cette structure secondaire sont encore inconnus. S'agit-il des résidus 18 à 21, 19 à 22 ou 20 à 23? Nous avons donc tenté de le déterminer en effectuant diverses substitutions sur les positions 18 à 23. Selon les paramètres de Chou et Fasman (13), nous avons calculé que la présence d'une structure coude β est possible seulement entre les résidus 18-21 ou 19-22. Nous avons donc effectué la substitution de l'arginine-18 par une asparagine, l'acide aminé doté du

TABLEAU XIV : Comparaison entre les acides aminés sérine et alanine de la position 17

Acide aminé	Structure	Degré d'hydrophilicité ^{a)}	Paramètre conformationnel de l'hélice α (P_α) ^{b)}
Sérine	$\begin{array}{c} \text{HO-CH}_2\text{-CH-COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	+ 1,6	0,77 (i_α)
Alanine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	- 0,9	1,42 (H_α)

a) Les paramètres d'hydrophilicité ont été déterminés par Hopp et Woods (47). Une valeur numérique maximale de -10 a été assignée à l'acide aminé le plus hydrophobe et une valeur de +10 à l'acide aminé le plus hydrophile.

b) Les paramètres conformationnels (P_α) ont été déterminés par Chou et Fasman à l'aide d'une étude réalisée au moyen de 29 protéines (13). Les symboles $H_\alpha > h_\alpha > i_\alpha > b_\alpha > B_\alpha$ indiquent l'ordre décroissant du potentiel de formation de l'hélice alpha.

TABLEAU XV : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 17

	Tests biologiques <i>in vitro</i>				Dichroïsme circulaire		
	Oreillette gauche de cobaye		Vas deferens de rat		Contenu en hélice α (%)		
	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	limite inf.	limite sup.	moyenne
hCGRP α	10,4 ± 7	100	1,5 ± 0,1	100	58	65	62
[Ala ¹⁷] hCGRP α	16 ± 4*	63	0,69 ± 0,1*	250	57	65	62
[Cys(Acm) ^{2,7}] hCGRP α	inactif	-	75 ± 6	100	50	55	53
[Cys(Acm) ^{2,7} , Ala ¹⁷] hCGRP α	609 ± 186	-	55 ± 13	136	45	48	47
hCGRP ₈₋₃₇	99 ± 13	100	6,3 ± 0,5	100	39	43	41
[Ala ¹⁷] hCGRP ₈₋₃₇	206 ± 37*	208	4,5 ± 0,8*	71	33	41	37

TABLEAU XVI: Comparaison entre les acides aminés arginine, alanine, asparagine et lysine de la position 18

Acide aminé	Structure	Degré d'hydrophilicité ^{a)}	Paramètre conformationnel de l'hélice α (P_α) ^{b)}
Arginine	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{HN}=\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	+ 10	0,98 ($i\alpha$)
Alanine	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	- 0,9	1,42 ($H\alpha$)
Asparagine	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{NCO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	+ 1,3	0,67 ($b\alpha$)
Lysine	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}-\text{COOH} \\ \qquad \qquad \\ \text{NH}_2 \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$	+ 10	1,16 ($h\alpha$)

a) Les paramètres d'hydrophilicité ont été déterminés par Hopp et Woods (47). Une valeur numérique maximale de -10 a été assignée à l'acide aminé le plus hydrophobe et une valeur de +10 à l'acide aminé le plus hydrophile.

b) Les paramètres conformationnels (P_α) ont été déterminés par Chou et Fasman à l'aide d'une étude réalisée au moyen de 29 protéines (13). Les symboles $H\alpha > h\alpha > i\alpha > \alpha > b\alpha > B\alpha$ indiquent l'ordre décroissant du potentiel de formation de l'hélice alpha.

TABLEAU XVII : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 18

	Tests biologiques <i>in vitro</i>				Dichroïsme circulaire		
	Oreillette gauche de cobaye		Vas deferens de rat		Contenu en hélice α (%)		
	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	limite inf.	limite sup.	moyenne
hCGRP α	10,4 \pm 7	100	1,5 \pm 0,1	100	58	65	62
[Ala ¹⁸] hCGRP α	398 \pm 57*	3	39 \pm 15*	4	50	53	52
[Asn ¹⁸] hCGRP α	432 \pm 72*	2	46 \pm 8*	3	56	58	57
[Lys ¹⁸] hCGRP α	55 \pm 8*	19	3,6 \pm 1,0*	42	47	50	49
[Cys(Acm) ^{2,7}] hCGRP α	inactif	-	75 \pm 6	100	50	55	53
[Cys(Acm) ^{2,7} , Ala ¹⁸] hCGRP α	inactif	-	> 1000	-	54	64	59
[Cys(Acm) ^{2,7} , Asn ¹⁸] hCGRP α	inactif	-	> 1000	-	47	51	49
[Cys(Acm) ^{2,7} , Lys ¹⁸] hCGRP α	inactif	-	696 \pm 159*	11	46	54	50
hCGRP ₈₋₃₇	99 \pm 13	100	6,3 \pm 0,5	100	39	43	41
[Ala ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	51 \pm 6	51	1,7 \pm 0,5*	27	33	44	39
[Asn ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	46 \pm 12*	46	1,5 \pm 0,1*	24	25	35	30
[Lys ¹⁸] hCGRP ₈₋₃₇	50 \pm 14*	50	0,4 \pm 0,1*	6	36	45	41

meilleur potentiel de formation d'une structure coude β en tant que premier résidu (Tableau VI). Cette modification a entraîné une baisse importante des propriétés agonistes et antagonistes des analogues sur les deux préparations tissulaires (Tableau XVII). Ces résultats semblent signifier que le résidu arginine-18 ne participerait probablement pas à la formation de la structure coude β , mais serait plutôt le dernier résidu impliqué dans la formation de l'hélice- et que la présence de sa chaîne latérale jouerait un rôle structural important pour l'activation des récepteurs du CGRP.

Positions 19 et 21

La substitution de la sérine-19 et de la glycine-21 par une alanine apporte, dans les deux cas, un résidu caractérisé par un potentiel faible de formation de coude β aux positions 1 et 3 respectivement (Tableau XVIII). L'analogue [Ala¹⁹]-hCGRP α a démontré une moins bonne capacité que le hCGRP α à induire une réponse inotrope positive sur l'oreillette gauche de cobaye (12%), ainsi que pour l'inhibition de la contraction du *vas deferens* de rat (37%), alors que son équivalent linéaire est respectivement inactif et moins puissant (38%) que le contrôle dans les deux tissus étudiés (Tableau XIX). Par contre, l'activité antagoniste du fragment n'a pas vraiment été affectée puisque le EC₅₀ du hCGRP α en sa présence n'est pas statistiquement différent de celui mesuré en présence du hCGRP₈₋₃₇ (70 nM et 99 nM). Ces différentes pertes d'activités ne peuvent pas être expliquées par une déstabilisation de la structure hélicoïdale (Tableau XIX). Il serait donc possible

qu'elles soient plutôt dues à la présence d'un résidu déstabilisant le coude β , ce qui confirmerait encore une fois la participation de la sérine-19 dans la formation de cette structure comme premier résidu.

Pour ce qui est de la position-21, la présence d'une alanine affecte l'activité de l'analogue [Ala²¹]hCGRP α et de celle du hCGRP α en présence du fragment 8-37 au niveau des deux tissus. Par contre, l'analogue linéaire s'est avéré pourvu d'une meilleure activité agoniste que la molécule non modifiée au niveau du *vas deferens* de rat (187%). Ces résultats peuvent être expliqués en partie par une meilleure stabilisation de la portion hélicoïdale (Tableau XIX). Malgré cela, ces résultats semblent indiquer que la glycine-21 participerait à la structure coude β en étant le résidu de la position 3, expliquant du même coup la perte d'activité des analogues portant une alanine en position-21, résidu qui possède un moins bon paramètre de formation du coude β à la position 3 ($f_i + 2$) (Tableau XVIII).

TABLEAU XVIII : Paramètres conformationnels du coude beta des acides aminés 19 à 22 selon Chou et Fasman (13)

	Position 1 (f_i)	Position 2 (f_{i+1})	Position 3 (f_{i+2})	Position 4 (f_{i+3})
Sérine-19	0,120	-	-	-
Glycine-20	-	0,085	-	-
Glycine-21	-	-	0,190	-
Valine-22	-	-	-	0,053
Alanine	0,060	0,076	0,035	0,058
Glycine	-	-	-	0,152

Position 20

Le remplacement de la glycine-20 par une alanine n'a pas affecté de façon importante les propriétés agonistes des analogues au niveau des préparations tissulaires enrichies en récepteur CGRP₂, ni les propriétés antagonistes du fragment au récepteur CGRP₁. En effet, on remarque au Tableau XX qu'il y a eu une hausse ou équipotence de ces différentes activités. Ces résultats semblent donc suggérer de nouveau la participation des résidus 19 à 22 dans la formation de la structure secondaire coude β , la glycine-20 étant le 2^e résidu, puisque l'alanine est caractérisée par un potentiel structural ($f_i + 1$) équivalent à celui de la

TABLEAU XIX : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués aux positions 19 et 21

	Tests biologiques <i>in vitro</i>				Dichroïsme circulaire		
	Oreillette gauche de cobaye		Vas deferens de rat		Contenu en hélice α (%)		
	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	limite inf.	limite sup.	moyenne
hCGRP α	10,4 \pm 7	100	1,5 \pm 0,1	100	58	65	62
[Ala ¹⁹] hCGRP α	85 \pm 14*	12	4,1 \pm 1,6*	37	55	61	58
[Ala ²¹] hCGRP α	40 \pm 3*	26	2,6 \pm 0,6*	58	63	70	67
[Cys(Acm) ²⁷] hCGRP α	inactif	-	75 \pm 6	100	50	55	53
[Cys(Acm) ²⁷ , Ala ¹⁹] hCGRP α	inactif	-	196 \pm 28*	38	61	65	63
[Cys(Acm) ²⁷ , Ala ²¹] hCGRP α	inactif	-	40 \pm 12*	187	70	74	72
hCGRP ₈₋₃₇	99 \pm 13	100	6,3 \pm 0,5	100	39	43	41
[Ala ¹⁹] hCGRP ₈₋₃₇	70 \pm 12	71	1,1 \pm 0,3*	17	42	45	44
[Ala ²¹] hCGRP ₈₋₃₇	30 \pm 8*	31	2,3 \pm 0,5*	37	48	51	50

glycine (Tableau XVIII).

Position 22

La substitution de la valine-22 par une alanine ou une glycine entraîne une chute dramatique de l'activité biologique des analogues cycliques dans les deux tissus testés (Tableau XXI). La présence de l'alanine, un résidu déstabilisant la structure secondaire, peut expliquer ces baisses d'activités. Par contre, comparativement à la valine (0,152 vs 0,053), la glycine est un résidu possédant un excellent potentiel de formation du coude β lorsque située en position-4. (Tableau XVIII). Dans ce cas, on se serait plutôt attendu à un effet positif sur les activités biologiques *in vitro*, dû à une stabilisation du coude β . Nos résultats ne vont pas dans ce sens. Ils peuvent être expliqués par une trop grande flexibilité dans cette région de la molécule apportée par la présence de trois résidus glycines aux positions 20, 21 et 22. En fait, cela pourrait avoir comme effet d'annuler l'apport positif de la présence d'un résidu à haut potentiel de formation de coude β en position 4.

Position 23

Dans la molécule de hCGRP α , on retrouve une valine à la position 23. Cette valine a aussi été substituée par une alanine afin d'évaluer l'importance de sa chaîne latérale et de la présence d'un résidu hydrophobe à cette position. On remarque que la présence d'une alanine à la position 23 est néfaste pour l'activité des analogues et du fragment au niveau des deux tissus testés et entraîne une

perte de puissance relative apparente de 50% ou plus dans tous les cas (Tableau XXII). Il semble donc que la présence d'une valine hydrophobe à la position 23 soit importante pour le maintien des propriétés agonistes et antagonistes et du caractère amphiphile de la molécule de CGRP ou de son fragment 8-37.

Les résidus 11 à 23 du hCGRP α pourraient donc assumer un rôle strictement structural dans la formation des structures secondaires hélice α amphiphile et coude β caractérisant la portion médiane de la molécule. Cette structure secondaire hélicoïdale amphiphile pourrait être impliquée dans l'interaction du hCGRP avec ses récepteurs et leur environnement membranaire. Ainsi, selon un mécanisme déjà proposé d'ailleurs pour plusieurs peptides caractérisés par une structure secondaire amphiphile, tels la calcitonine (8,22,51,52,69,75,79,100) et le neuropeptide tyrosine (NPY) (Fig.19A) (69,70), la liaison du segment central du hCGRP α aux phospholipides membranaires faciliterait la reconnaissance de la molécule par les récepteurs.

D'autre part, l'hélice α amphiphile pourrait également imposer une contrainte conformationnelle au hCGRP α en favorisant l'adoption d'une structure tertiaire et en donnant lieu à une interaction spécifique de la portion C-terminale avec les récepteurs. Ce mécanisme déjà proposé aussi pour le NPY, est également possible pour le CGRP (Fig.19B) (69,70). En effet, l'hélice α amphiphile, qui caractérise le segment central du CGRP, pourrait participer à l'adoption et/ou à la stabilisation

TABLEAU XX : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 20

	Tests biologiques <i>in vitro</i>				Dichroïsme circulaire		
	Oreillette gauche de cobaye		Vas deferens de rat		Contenu en hélice α (%)		
	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	limite inf.	limite sup.	moyenne
hCGRP α	10,4 \pm 7	100	1,5 \pm 0,1	100	58	65	62
[Ala ²⁰] hCGRP α	43 \pm 4*	24	1,2 \pm 0,3*	125	59	64	62
[Cys(Acm) ^{2,7}] hCGRP α	inactif	-	75 \pm 6	100	50	55	53
[Cys(Acm) ^{2,7} , Ala ²⁰] hCGRP α	inactif	-	55 \pm 23*	135	39	44	42
hCGRP ₈₋₃₇	99 \pm 13	100	6,3 \pm 0,5	100	39	43	41
[Ala ²⁰] hCGRP ₈₋₃₇	101 \pm 22	102	1,3 \pm 0,2*	21	42	46	44

TABLEAU XXI : Puissance relative et contenu (%) en hélice- α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 22

	Tests biologiques <i>in vitro</i>				Dichroïsme circulaire		
	Oreillette gauche de cobaye		Vas deferens de rat		Contenu en hélice- α (%)		
	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	limite inf.	limite sup.	moyenne
hCGRP α	10,4 \pm 7	100	1,5 \pm 0,1	100	58	65	62
[Ala ²²] hCGRP α	281 \pm 24*	4	16,3 \pm 4,5*	9	35	39	37
[Gly ²²] hCGRP α	445 \pm 56*	2	88 \pm 20*	2	41	46	44
[Cys(Acm) ^{2,7}] hCGRP α	inactif	-	75 \pm 6	100	50	55	53
[Cys(Acm) ^{2,7} , Ala ²²] hCGRP α	inactif	-	> 1000	-	35	46	41
[Cys(Acm) ^{2,7} , Gly ²²] hCGRP α	inactif	-	> 1000	-	56	60	58
hCGRP ₈₋₃₇	99 \pm 13	100	6,3 \pm 0,5	100	39	43	41
[Ala ²²] hCGRP ₈₋₃₇	35 \pm 8*	35	1,0 \pm 0,2*	16	51	58	55
[Gly ²²] hCGRP ₈₋₃₇	40 \pm 6*	40	1,6 \pm 0,2*	25	16	23	20

TABLEAU XXII : Puissance relative et contenu (%) en hélice α du hCGRP α et de ses analogues substitués à la position 23

	Tests biologiques <i>in vitro</i>				Dichroïsme circulaire		
	Oreillette gauche de cobaye		Vas deferens de rat		Contenu en hélice α (%)		
	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	EC ₅₀ (nM)	PR(%)	limite inf.	limite sup.	moyenne
hCGRP α	10,4 ± 7	100	1,5 ± 0,1	100	58	65	62
[Ala ²³] hCGRP α	33 ± 5*	31	3,1 ± 0,6*	48	56	59	58
[Cys(Acm) ^{2,7}] hCGRP α	inactif	-	75 ± 6	100	50	55	53
[Cys(Acm) ^{2,7} , Ala ²³] hCGRP α	inactif	-	139 ± 44*	54	53	57	55
hCGRP ₈₋₃₇	99 ± 13	100	6,3 ± 0,5	100	39	43	41
[Ala ²³] hCGRP ₈₋₃₇	40 ± 5*	40	1,6 ± 3*	25	46	52	49

de la conformation active de ce peptide. La structure secondaire amphiphile du CGRP participerait donc à l'induction d'une contrainte conformationnelle au niveau de la molécule, permettant un positionnement adéquat des résidus N et C-terminaux favorisant l'interaction spécifique aux récepteurs. Puisque les fragments dépourvus du segment N-terminal (hCGRP₈₋₃₇) interagissent spécifiquement avec les récepteurs CGRP₁, ceux-ci ne peuvent donc pas satisfaire les exigences du modèle d'interaction B de la figure 19.

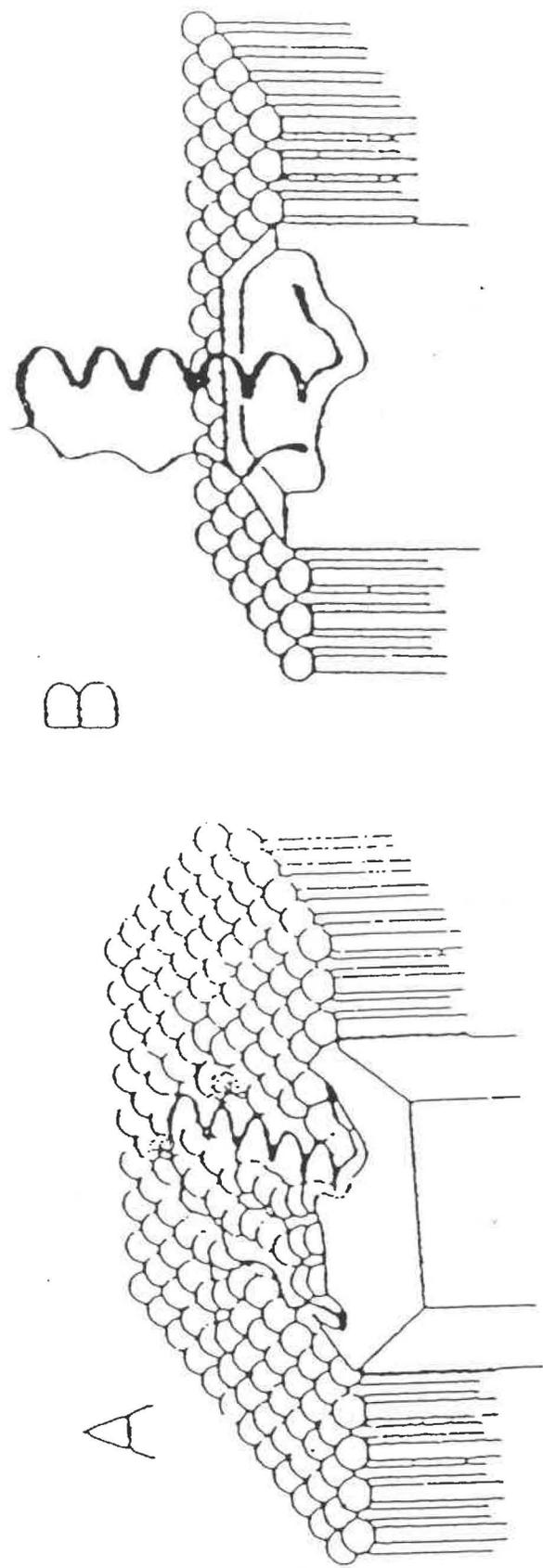


Figure 19 : Mécanismes d'action possibles du neuropeptide Y proposé par McLean et al. (69) et pouvant s'appliquer au CGRP

CONCLUSION

CONCLUSION

La présente étude a été réalisée à l'aide de fragments et d'analogues synthétiques du hCGRP α portant une substitution des résidus 11 à 23. Des essais biologiques ont été réalisés sur l'oreillette gauche de cobaye et le *vas deferens* de rat. Cette évaluation pharmacologique des peptides nous a permis d'étudier le rôle respectif des acides aminés 11 à 23 du hCGRP α dans le maintien des structures secondaires hélice α et coude β , prédominant dans cette portion de la molécule de CGRP.

Les divers analogues et fragments du hCGRP α ont été synthétisés efficacement au moyen de la méthode en phase solide en faisant usage du réactif de couplage BOP. Des quantités attendues de peptide-résine ont été obtenues pour tous les composés. Le clivage acide des peptides de la matrice polymérique et le retrait simultané des groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés trifonctionnels, ont été effectués à l'aide de l'acide fluorhydrique. Un matériel brut d'excellente qualité a été obtenu pour chacun des peptides. Toutefois, un sous-produit a été révélé pour plusieurs de ces préparations peptidiques lors de l'analyse par CLHP analytique. Ce sous-produit caractérisé par un temps de rétention voisin de celui du peptide désiré, a été transformé suite à un traitement basique, en une quantité équivalente du peptide recherché. Bien que l'analyse complète n'ait pas été accomplie, on peut soupçonner que ce sous-produit résulte d'une

réaction secondaire définie comme un déplacement acyle N → O impliquant des résidus de sérine et/ou de thréonine. La caractérisation de tous les peptides purifiés a été réalisée par CLHP analytique, électrophorèse capillaire, spectrométrie de masse, analyse des acides aminés et dichroïsme circulaire et a permis de confirmer l'homogénéité et la composition des peptides.

Ces divers analogues ont été ensuite évalués pharmacologiquement au moyen de bioessais pour les récepteurs de type CGRP₁ et CGRP₂, soit respectivement l'effet inotrope sur l'oreillette gauche de cobaye et la contraction du *vas deferens* de rat stimulé électriquement. L'ensemble des résultats a indiqué que la substitution de Arg-11 par une lysine a grandement affecté l'activité biologique du hCGRP_α, suggérant ainsi que l'arginine-11 est impliquée dans un rôle clé de nature structurale ou pharmacophore. La présence du résidu hydrophobe Ala-13 semble, quant à elle, importante pour le maintien du caractère amphiphile de la molécule. De plus, les résultats ont démontré le rôle structural extrêmement critique joué par les leucines 15 et 16 dans les deux préparations tissulaires. D'autre part, [Ala¹⁷]hCGRP_α s'est avéré être 2,5 fois plus puissant que la molécule native dans le *vas deferens* de rat, ceci indiquant que la présence d'un résidu plus hydrophobe à la position 17 améliorerait le caractère amphiphile approprié pour la manifestation de l'activité biologique. Finalement, il semblerait que Arg-18 soit important pour le maintien des propriétés biologiques du CGRP et qu'il serait impliqué comme dernier résidu dans la structure secondaire hélicoïdale. Les

résidus Ser-19, Gly-20, Gly-21 et Val-22, quant à eux, seraient impliqués dans la formation d'un coude β alors que Val-23 serait critique pour le maintien du caractère amphiphile de la molécule.

Les résultats de notre étude indiquent donc que les résidus 11 à 23 de la portion médiane du hCGRP α pourraient assumer un rôle principalement conformationnel dans la formation des structures secondaires hélice α amphiphile et coude β caractérisant cette portion de la molécule. Cette structure amphiphile pourrait, en fait, être impliquée dans l'interaction du hCGRP α avec l'environnement membranaire des récepteurs. Ainsi, la liaison du segment central du hCGRP α aux phospholipides membranaires permettrait la reconnaissance par les récepteurs de la portion C-terminale de la molécule. D'autre part, l'hélice α amphiphile pourrait également imposer l'adoption d'une structure tridimensionnelle au hCGRP α favorisant une interaction spécifique de la portion C-terminale avec les récepteurs. Le maintien du caractère amphiphile de la molécule de CGRP apparaît donc comme étant critique pour son activité, ce qui confère, aux résidus 11 à 23, en particulier, un rôle structural des plus importants. Ceci peut d'ailleurs être visualisé au moyen d'un modèle moléculaire du hCGRP α .

La Figure 20 montre la molécule de hCGRP α sous une forme semi-allongée. On y distingue la partie N-terminale (à gauche) contenant un pont disulfure entre les résidus Cys-2 et Cys-7, puis la structure hélice α impliquant les résidus 8 à 18. Un coude β , formé par les résidus 19 à 22, assure la réversibilité de la chaîne

peptidique. Ce coude est d'ailleurs davantage en évidence à la Figure 21 dans laquelle la molécule de hCGRP α est vue du côté opposé. Finalement, nous avons la portion C-terminale (à droite), contenant une deuxième structure coude β entre les résidus 30-33.

La figure 22 souligne, quant à elle, la présence hypothétique du deuxième coude β entre les résidus 30 à 33. Du même coup, la présence de cette structure permet un rapprochement des deux résidus aromatiques Phe-27 et Phe-37. Ce rapprochement pourrait aussi être, selon notre hypothèse, favorisé par la formation d'un lien d'hydrogène entre la fonction C-terminale amide et le carbonyle de l'asparagine-26. Il serait donc intéressant de vérifier cette hypothèse à l'aide d'un analogue synthétique du CGRP afin de voir si cette stabilisation de la conformation tertiaire de la molécule est accompagnée d'une amélioration de l'activité biologique.

La Figure 23 montre la molécule de hCGRP α sous une forme plutôt compacte. Nous avons émis une autre hypothèse voulant que cette conformation soit stabilisée par une interaction électrostatique entre le résidu acide Asp-3 et le résidu basique Lys-35, ce qui créerait une stabilisation moléculaire additionnelle. De plus, sous cette forme, il est permis de bien voir la répartition des résidus hydrophobes au centre (Phe, Leu, etc...) et les résidus plus hydrophiles à l'extérieur (Lys, Arg, etc...). Cette représentation nous permet aussi de remarquer la proximité des deux résidus Phe-27 et Phe-37 et la superposition de leur cycle

aromatique entraînant un recouvrement de leurs électrons π .

Dans un modèle dans lequel nous avons conservé l'hypothèse du recouvrement des électrons π des deux phénylalanines, nous avons alors remplacé cette structure par un pont S-S (Figures 24a, 24b et 24c). Dans les figures résultantes, où la molécule est montrée dans diverses configurations, on remarque encore une fois, la présence d'une distribution bien définie des résidus hydrophobe/hydrophile, ce qui assure le caractère amphiphile de la molécule de CGRP.

Finalement, les figures 25a et 25b représentent le fragment hCGRP8-37 fortement replié sur lui-même et dans lequel la répartition amphiphile des résidus est maximisée.

Des recherches futures seront donc nécessaires afin de vérifier la validité des hypothèses émises à l'aide des représentations tridimensionnelles du hCGRP α . D'autre part, cette étude pourrait être poursuivie par l'analyse de modifications structurales touchant les résidus 24 à 37. Ainsi, une caractérisation plus approfondie de la structure adoptée par les résidus 23 à 29 et la présence hypothétique d'un deuxième coude β impliquant les acides aminés 30-33 serait souhaitable. De plus, une étude de liaison des analogues sur divers tissus devra également être réalisée afin de compléter nos connaissances des exigences structurales des divers types de récepteur du CGRP. Finalement, une étude plus approfondie pourrait être effectuée avec les peptides de la même famille que le

hCGRP α , telles la calcitonine, l'adrénoméduline et l'amyline, au moyen de diverses techniques spectroscopiques (dichroïsme circulaire, RMN) pour déterminer si les différences structurales, notamment au niveau de l'hélice α , ont une signification biologique.

Figure 20

**Modèle moléculaire CPK du hCGRP α
dans une forme semi-allongée.**

Légende

noir : atomes de carbone
blanc : atomes d'hydrogène
rouge : atomes d'oxygène
bleu : atomes d'azote
jaune : atomes de soufre



Figure 21

**Modèle moléculaire CPK du hCGRP α
dans lequel le coude β (19-22) est
discerné.**



Figure 22

**Modèle moléculaire CPK du hCGRP α
dans lequel le coude β (30-33) est
discerné.**



Figure 23

**Modèle moléculaire CPK du hCGRP α
dans une forme compacte.
(Structure hypothétique stabilisée par
la superposition des noyaux
aromatiques de Phe-27 et Phe-37).**



Figure 24a

**Modèle moléculaire CPK du hCGRP α
dans lequel l'interaction Phe-27/Phe-37
a été remplacée par un pont disulfure
(vue de la molécule sous
une forme semi-allongée).**



Figure 24b

**Modèle moléculaire CPK du hCGRP α
dans lequel l'interaction Phe-27/Phe-37
a été remplacée par un pont disulfure
(vue de la molécule sous
une forme compacte intermédiaire).**



Figure 24c

**Modèle moléculaire CPK du hCGRP α
dans lequel l'interaction Phe-27/Phe-37
a été remplacée par un pont disulfure
(vue de la molécule sous une forme compacte).**



Figure 25a

**Modèle moléculaire CPK du fragment 8-37
du hCGRP α
(forme compacte vue du dessus).**

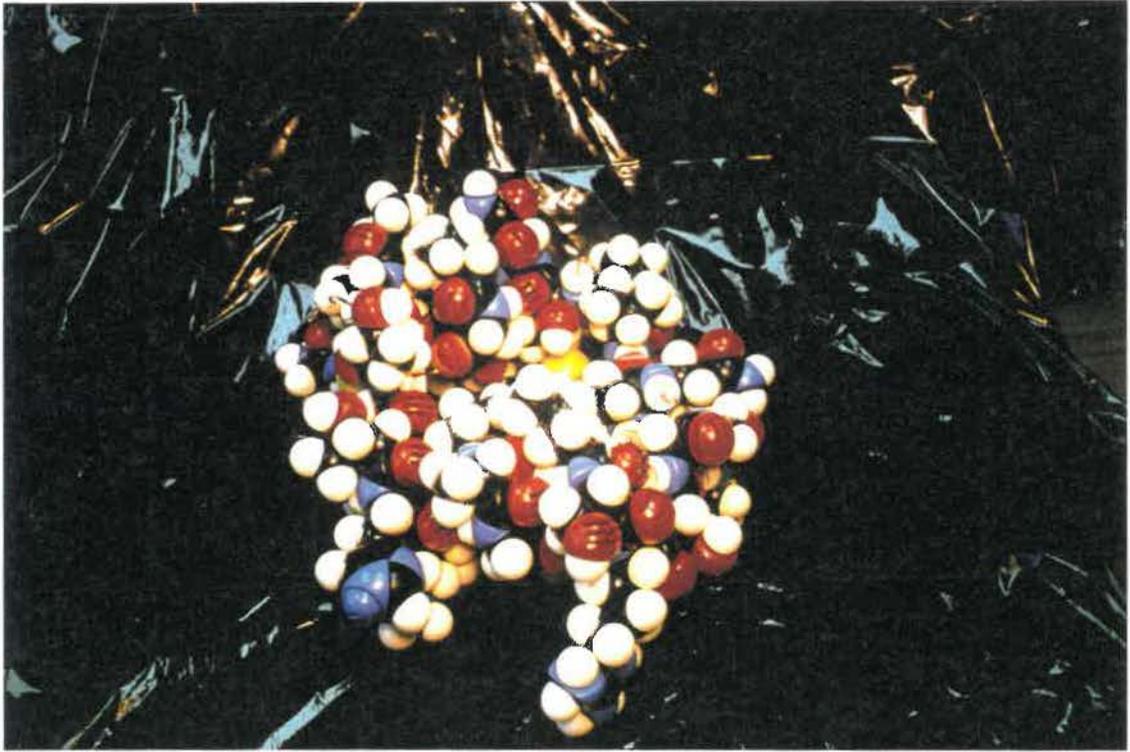


Figure 25b

**Modèle moléculaire CPK du fragment 8-37
du hCGRP α
(forme compacte vue du dessous).**



RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

1. AMARA, S.G., JONAS, V., ROSENFELD, M.G., ONG, E.S. & EVANS, R.M. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* (London) 298 : 240-244, 1982.
2. AMARA, S.G., ARRIZA, J.L., LEFF, S.E., SWANSON, L.W., EVANS, R.M. & ROSENFELD, M.G. Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* 229 : 1094-1097, 1985.
3. BEK, T., OTTESEN, B. & FAHRENKRUG, J. The effect of galanin, CGRP and ANP on spontaneous smooth muscle activity of rat uterus. *Peptides* 9 : 497-500, 1988.
4. BODANSKY, M. & MARTINEZ, J. Side reactions in peptide synthesis. *Synthesis* : 333-356 (1981).
5. BRAIN, S.D., WILLIAMS, T.J., TIPPINS, J.R., MORRIS, H.R. & MacINTYRE, I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* (London), 313 : 54-56, 1985.
6. BRAIN, S.D. & WILLIAMS, T.J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.* 86 : 855-860, 1985.
7. BRAIN, S.D., MacINTYRE, I. & WILLIAMS, T.J. A second form of human calcitonin gene-related peptide which is a potent vasodilator. *Eur. J. Pharmacol.* 124 : 349-352, 1986.
8. BREEZE, A.L., HARVEY, T.S., BAZZO, R. & CAMPBELL, I.D. Solution structure of human calcitonin gene-related peptide by ¹H NMR and distance geometry with restrained molecular dynamics. *Biochemistry* 30 : 575-582, 1991.
9. BREIMER, L.H., MacINTYRE, I. & ZAIDI, M. Peptides from the calcitonin genes: molecular genetics, structure and function. *Biochem. J.* 255 : 377-390, 1988.
10. CASTRO, B., DORMOY, J.R., EVIN, G. & SELVE, C. Réactifs de couplage peptidique IV (1). L'hexafluorophosphate de benzotriazole N-oxytriisométhyl-aminophosphonium. *Tetrahedron Lett.* : 1219-1222, 1975.

11. CHAKDER, S. & RATTAN, S. [Tyr⁷]-calcitonin gene-related peptide 28-37 (rat) as a putative antagonist of calcitonin gene-related peptide responses on opossum internal anal sphincter smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253 : 200-206, 1990.
12. CHIBA, T., YAMAGUCHI, A., YAMATANI, T., NAKAMURA, A., MORISHITA, T., INUI, T., FUKASE, M., NODA, T. & FUJITA, T. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP(8-37). *Am. J. Physiol.* 256 : E331-E335, 1989.
13. CHOU, P.Y. & FASMAN, G.D. Empirical predictions of protein conformation. *Ann. Rev. Biochem.* 47 : 251-276, 1978.
14. COOPER, G.J.S., WILLIS, A.C., CLARK, A., TURNER, R.C., SIM, R.B. & REID, K.B.M. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 8628-8632, 1987.
15. DAWBARN, D., GREGORY, J. & EMSON, P.C. Visualization of calcitonin gene-related peptide receptors in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 111 : 407-408, 1985.
16. DENNIS, T., FOURNIER, A., ST-PIERRE, S. & QUIRION, R. Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251 : 718-725, 1989.
17. DENNIS, T., FOURNIER, A., CADIEUX, A., POMERLEAU, F., JOLICOEUR, F.B., ST-PIERRE, S. & QUIRION, R. hCGRP₈₋₃₇ a calcitonin gene-related peptide antagonist revealing CGRP receptor heterogeneity in brain and periphery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254 : 123-128, 1990.
18. DENNIS, T., FOURNIER, A., GUARD, S., ST-PIERRE, S. & QUIRION, R. Calcitonin gene-related peptide (hCGRP α) binding sites in the nucleus accumbens. A typical structural requirements and marked phylogenetic differences. *Brain Res.* 539 : 59-66, 1991.
19. DOCKRAY, G.J. Calcitonin gene-related peptide. *Atlas of Science Pharmacology* : 40-45, 1988.
20. DOTI-SIGRIST, S. BORN, W. & FISCHER, J.A. Identification of a receptor for calcitonin gene-related peptides I and II in human cerebellum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151 : 1081-1087, 1988.

21. EPAND, R.M., EPAND, R.F., STAFFORD, A.R. & ORLOWSKI, R.C. Deletion sequences of salmon calcitonin that retain the essential biological and conformational features of the intact molecule. *J. Med. Chem.* **31** : 1595 - 1598, 1988.
22. EPAND, R.M., EPAND, R.F. & ORLOWSKI, R.C. Biologically active calcitonin analogs which have minimal interactions with phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151** : 203-207, 1988.
23. EPAND, R.M., EPAND, R.F. & ORLOWSKI, R.C. Study of a series of analogs of salmon calcitonin in which alanine replaces leucine. *Eur. J. Biochem.* **188** : 633-635, 1990.
24. FASMAN, G.D. Prediction of protein conformation from the primary structure. *Ann. N.Y. Acad. Sc.* **348** : 147-159, 1980.
25. FISCHER, J.A. & BORN, W. Novel peptides from the calcitonin gene: expression, receptors and biological function. *Peptides* **6** : 265-271, 1985.
26. FISHER, L.A., KIKKAWA, D.O., RIVIER, J.E., AMARA, S.G., EVANS, R.M., ROSENFELD, M.G., VALE, W.W. & BROWN, M.R. Stimulation of noradrenergic sympathetic outflow by calcitonin gene-related peptide. *Nature* **305** : 534-536, 1983.
27. FOREST, M. & FOURNIER, A. BOP reagent for the coupling of pGlu and Boc-His (Tos) in solid phase peptide synthesis. *Int. J. Peptide Protein Res.* **35** : 89-94, 1990.
28. FOREST, M., MARTEL, J.C., ST-PIERRE, S., QUIRION, R. & FOURNIER, A. Structural study of the N-terminal segment of neuropeptide tyrosine. *J. Med. Chem.* **33** : 1615-1619, 1990.
29. FOURNIER, A., WANG, C.T. & FELIX, A.M. Applications of BOP reagent in solid phase synthesis. Advantages of BOP reagent for difficult couplings exemplified by a synthesis of [Ala¹⁵-GRF (1-29)-NH₂]. *Int. J. Peptide Protein Res.* **31** : 86-97, 1988.
30. FRANCO-CERECEDA, A. & LUNDBERG, J.M. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and capsaicin-induced stimulation of heart contractile rate and force. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **331** : 146-151, 1985.

31. FUJIMARA, M., GREELEY, G.H., HANCOCK, M.B., ALWMARK, A., SANTOS, A., COOPER, C.W., REUMONT, K.J., ISHIZUKA, J. & THOMPSON, J.C. Colocalization of calcitonin gene-related peptide and somatostatin in pancreatic islet cells and inhibition of insulin secretion by calcitonin gene-related peptide in the rat. *Pancreas* 3 : 49-52, 1988.
32. GAMSE, R. & SARIA, A. Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide. *Eur. J. Pharmacol.* 114 : 61-66, 1985.
33. GATTO, C., LUSSKY, R.C., ERICKSON, L.W., BERG, K.J., WOBKEN, J.D. & JOHNSON, D.E. Calcitonin and CGRP block bombesin and substance P-induced in airway tone. *J. Appl. Physiol.* 66 : 573-577, 1989.
34. GENNARI, C. & FISCHER, J.A. Cardiovascular action of calcitonin gene-related peptide in humans. *Calcif. Tissue Int.* 37 : 581-584, 1985.
35. GERSTHEIMER, F.P. & METZ, J. Distribution of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the guinea pig heart. *Anat. Embryol.* 175 : 255-260, 1986.
36. GHATEI, M.A., GU, J., MULDERY, P.K., BLANK, M.A., ALLEN, J.M. MORRISON, J.F.B., POLAK, J.M. & BLOOM, S.R. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the female rat urogenital tract. *Peptides* 6 : 809-815, 1985.
37. GIRGIS, S.I., STEVENSON, J.C., LYNCH, C., SELF, C.H., MACDONALD, D.W.R., BEVIS, P.J.R., WIMALAWANSA, S.J., MORRIS, H.R. & MacINTYRE, I. Calcitonin gene-related peptide: potent vasodilator and major product of calcitonin gene. *The Lancet* : 14-16, 1985.
38. GNAEDINGER, M.P., VEHLINGER, D.E., WEIDMANN, P., SHA, S.G., MUFF, R., BORN, W., RASCHER, W. & FISCHER, J.A. Distinct hemodynamic and renal effects of calcitonin gene-related peptide and calcitonin in men. *Am. J. Physiol.* 257 : E848-E854, 1989.
39. GLOTZMAN, D. & MITCHELL, J. Interaction of calcitonin and calcitonin gene-related peptide as receptor sites in target tissues. *Science* 227 : 1343-1345, 1985.
40. GOTO, K., KIMURA, S. & SAITO, A. Inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide on excitation and contraction of smooth muscles of the rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241 : 635-641, 1987.

41. GREEN III, F.R., LYNCH, B. & KAISER, E.T. Biological and physical properties of a model calcitonin containing a glutamate residue interrupting the hydrophobic face of the idealized amphiphilic α -helical region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 8340-8344, 1987.
42. GRUNDITZ, T., EKMAN, R., HÅKANSON, R., RERUP, C., SUNDLER, F. & UDDMAN, R. Calcitonin gene-related peptide in thyroid nerve fibers and C-cells: effects on thyroid hormone secretion and response to hypercalcemia. *Endocrinology* 119 : 2313-2324, 1986.
43. HAASS, M. & SKOFITSCH, G. Cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptide in the pithed rat: comparison with substance P. *Life Sciences* 37 : 2085-2090, 1985.
44. HERMANSEN, K. & AHRËN, B. Dual effects of calcitonin gene-related peptide on insuline secretion in the perfused dog pancreas. *Regulatory Peptides* 27 : 149-157, 1990.
45. HIRATA, Y., TAKAGI, Y., TAKATA, S., FUKUDA, Y., YOSHIMI, H. & FUJITA, T. Calcitonin gene-related peptide receptor in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151 : 1113-1121, 1988.
46. HOLMAN, J.J., CRAIG, R.K. & MARSHALL, I. Human α and β - CGRP and rat α -CGRP are coronary vasodilators in the rat. *Peptides* 7 : 231-235, 1986.
47. HOPP, T.P. & WOODS, K.R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 3824-3828, 1981.
48. HUGUES, J.J., LEVINE, A.S., MORLEY, J.E., GOSNELL, B.A. & SILVIS, S.E. Intraventricular calcitonin gene-related peptide inhibits gastric acid secretion. *Peptides* 5 : 665-668, 1984.
49. ISHIKAWA, T., OKAMURA, N., SAITO, A., MASAKI, T. & GOTO, K. Positive inotropic effect of calcitonin gene-related peptide mediated by cyclic AMP in guinea pig heart. *Circulation Res.* 63 : 726-734, 1988.
50. KAISER, I., COLESCOTT, R.L., BOSSINGER, C.D. & COOK, P.I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 34 : 595-598, 1970.
51. KAISER, E.T. & KEZDY, F.J. Amphiphilic secondary structure: design of peptide hormones. *Science* 223 : 249-255, 1984.

52. KAISER, E.T. Design principles in the construction of biologically active peptides. *TIBS Lett.* 12 : 305-309, 1987.
53. KEITH, I.M. & EKMAN, R. Calcitonin gene-related peptide in hamster lung and its coexistence with serotonin: a chemical and immunocytochemical study. *Regulatory Peptides* 22 : 315-323, 1988.
54. KIMURA, S., SUGITA, Y., KANAZAWA, I., SAITO, A. & GOTO, K. Isolation and amino acid sequence of calcitonin gene-related peptide from porcine spinal cord. *Neuropeptides* 9 : 75-82, 1987.
55. KRAHN, D.D., GOSNELL, B.A., LEVINE, A.S. & MORLEY, J.E. Effects of calcitonin gene-related peptide on food intake. *Peptides* 5 : 861-864, 1984.
56. KURTZ, A., MUFF, R., BORN, W., LUNDBERG, J.M., MILLBERG, B.I., GNÄDINGER, M.P., VEHLINGER, D.E., WEIDMANN, P., HÖKFELT, T. & FISCHER, J.A. Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion. *J. Clin. Invest.* 82 : 538-543, 1988.
57. LEGREVÈS, P., NYBERG, F., HÖKFELT, T. & TERENIUS, L. Calcitonin gene-related peptide is metabolized by an endopeptidase hydrolysing substance P. *Regulatory Peptides* 25 : 277-286, 1989.
58. LEIGHTON, B. & COOPER, G.J.S. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle *in vitro*. *Nature (London)* 335 : 632-635, 1988.
59. LEIGHTON, B., FOOT, E.A., COOPER, G.J.S. & KING, J.M. Calcitonin gene-related peptide-1 (CGRP-1) is a potent regulator of glycogen metabolism in rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 249 : 357-361, 1989.
60. LENZ, H.J., MORTRUP, M.T., RIVIER, J.E. & BROWN, M.R. Central nervous system actions of calcitonin gene-related peptide on gastric acid secretion in the rat. *Gastroenterology* 88 : 539-544, 1985.
61. LENZ, H.J. Calcitonin and CGRP inhibit gastrointestinal transit *via* distinct neuronal pathways. *Ann. J. Physiol.* 254 : G920-G924, 1988.
62. LYNCH, B. & KAISER, E.T. Biological properties of two models of calcitonin gene-related peptide with idealized amphiphilic α -helices of different lengths. *Biochemistry* 27 : 7600-7607, 1988.
63. MAK, J.C.W. & BARNES, P.J. Autoradiographic localization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) binding sites in human and guinea pig lung. *Peptides* 9 : 957-963, 1988.

64. MANNING, M.C. Conformation of the alpha form of human calcitonin gene-related peptide (CGRP) in aqueous solution as determined by circular dichroism spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160 : 388-392, 1989.
65. MARSHALL, I., AL-KAZWINI, S.J., ROBERTS, P.M., SHEPPERSON, N.B., ADAMS, M. & CRAIG, R.K. Cardiovascular effects of human and rat CGRP compared in the rat and other species. *Eur. J. Pharmacol.*, 123 : 207-216, 1986.
66. MATON, P.N., PRADHAM, T., ZHOU, Z.C., GARDNER, J.D. & JENSEN, R.T. Activities of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and related peptides at the CGRP receptor. *Peptides* 11 : 485-489, 1990.
67. McCULLOCH, J., UDDMAN, R., KINGMAN, T.A. & EDVINSSON, L. Calcitonin gene-related peptide: functional role in cerebrovascular regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 5731-5735, 1986.
68. McEWAN, J., LARKIN, S., DAVIES, G., CHIERCHIA, S., BROWN, M., STEVENSON, J., MacINTYRE, I. & MASERI, A. Calcitonin gene-related peptide: a potent dilator of human epicardial coronary arteries. *Circulation* 74 : 1243-1247, 1986.
69. McLEAN, L.R., BARON, B.M., BUCK, S.H. & KRSTENANSKY, J.L. Lipid and membrane interactions of neuropeptide Y. *Biochim. Biophys. Acta* 1024 : 1-4, 1990.
70. McLEAN, L.R., BUCK, S.H. & KRSTENANSKY, J.L. Examination of the role of the amphiphatic α -helix in the interaction of neuropeptide Y and active cyclic analogues with cell membrane receptors and dimyristoylphosphatidylcholine. *Biochemistry* 29 : 2016-2022, 1990.
71. MERRIFIELD, R.B. Solid phase peptide synthesis I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85 : 2159-2164, 1963.
72. MIMEAULT, M., FOURNIER, A., DUMONT, Y., ST-PIERRE, S. & QUIRION, R. Comparative affinities and antagonistic potencies of various human calcitonin gene-related peptide fragments on CGRP receptors in brain and periphery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258 : 1084-1090, 1991.
73. MIMEAULT, M., ST-PIERRE, S. & FOURNIER, A. Conformational characterization by circular dichroism spectroscopy of various fragments and analogs of calcitonin gene-related peptide. *Eur. J. Biochem.* 213 : 927-934, 1993.
74. MINVIELLES, S., CRESSENT, M., LASMOLES, F., JULLIENNE, A., MILHAUD, G. & MOUKHIAR, M.S. Isolation and partial characterization of the calcitonin gene in a lower vertebrate. *FEBS Lett.* 203 : 7-101, 1986.

75. MOE, G.R. & KAISER, E.T. Design, synthesis and characterization of a model peptide having potent calcitonin-like biological activity: implications for calcitonin structure/activity. *Biochemistry* 24 : 1971-1976, 1985.
76. MORISHITA, T. YAMAGUCHI, A., FUJITA, T. & CHIBA, T. Activation of adenylylate cyclase by islet amyloid polypeptide with COOH-terminal amide *via* calcitonin gene-related peptide receptors on rat liver plasma membranes. *Diabetes* 39 : 875-877, 1990.
77. MORITA, K., KATO, I., UZAMA, T., HORIAND, M. & NODA, T. Structure-activity relationship of calcitonin-gene related peptide. *Horm. Metabol. Res.* 21 : 666-668, 1989.
78. MORRIS, H.R., PANICO, M., ETIENNE, T., TIPPINS, J., GIRGIS, S.I. & MacINTYRE, I. Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. *Nature* (London) 308 : 746-748, 1984.
79. MOTTA, A., MORELLI, M.A.C., GOUD, N. & TEMUSSI, P.A. Sequential ¹H-NMR assignment and secondary structure determination of salmon calcitonin in solution. *Biochemistry* 28 : 7996-8002, 1989.
80. NEW, H.V. & MUDGE, A.W. Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. *Nature* 323 : 809-811, 1986.
81. NODA, T., MORITA, K., UZAMA, T., KINOSHITA, H. & HORI, M. Synthesis of analog of human calcitonin gene-related peptide. [ASU^{2,7}]-h-CGRP. *Experientia* 43 : 890-892, 1987.
82. OKIMURA, Y., CHIHARA, K., ABE, H., KAJI, H., KITA, T., KASHIO, Y. & FUJITA, T. Effect of intracerebroventricular administration of rat calcitonin gene-related peptide (CGRP), human calcitonin and [ASU^{1,7}]-eel calcitonin on gastric acid secretion in rats. *Endocrinol. Japan* 33 : 273-277, 1986.
83. ONO, K., DELAY, M., NAKAJIMA, T., IRISAWA, H. & GILES, W. Calcitonin gene-related peptide regulates calcium current in heart muscle. *Nature* 340 : 721-724, 1989.
84. OTAKA, A., FUJII, N., FUNAKOSHI, S., YAMAMOTO, I., TORIZUKA, K., NODA, T., MORITA, K. & YAJIMA, H. Studies on peptides. CXLII. Synthesis of Des-1-Ala-des- α -amino-human calcitonin gene-related peptide. *Chem. Pharm. Bull.* 34 : 3915-3918, 1986.

85. PARKER, J.M.R., GUO, D. & HODGES, R.S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25 : 5425-5432, 1986.
86. PIETTA, P.G., CAVALLO, P.F., TAKAHASSHI, K. & MARSHALL, G.R. Preparation and use of benzhydrylamine polymers in peptide synthesis. II. Synthesis of thyrotropin releasing hormone, thyrocalcitonin 26-32 and eledoisin. *J. Org. Chem.* 39 : 44-48, 1974.
87. PROVENCHER, S.W. & GLOCKNER, J. Estimation of globular secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20 : 33-37, 1981.
88. RAUE, F., SCHNEIDER, H.G., ZINK, A. & ZIEGLER, R. Action of calcitonin gene-related peptide at the calcitonin receptor of the T47D cell line. *Horm. Metab. Res.* 19 : 563-567, 1987.
89. ROBERTS, A.N., LEIGHTON, B., TODD, J.A., COCKBURN, D., SCHOFIELD, P.N., SUTTON, R., HOLT, S., BOYD, Y., DAY, A.J., FOOT, E.A., WILLIS, A.C., REID, K.B.M. & COOPER, G.J.S. Molecular and functional characterization of amylin, a peptide associated with type 2 diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 9662-9666, 1989.
90. ROSENFELD, M.G., MERMOD, J.J., AMARA, A.G., SWANSON, L.W., SAWCHENKO, P.E., RIVIER, J., VALE, W.W. & EVANS, R.M. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene *via* tissue-specific RNA processing. *Nature* 304 : 129-135, 1983.
91. ROSENFELD, M.G., AMARA, S.G., & EVANS, R.M. Alternative RNA processing: determining neuronal phenotype. *Science* 225 : 1315-1320, 1984.
92. ROUX, M., NEUMANN, J.-M., HODGES, R.S., DEVAUX, P.F. & BLOOM, M. Conformation changes of phospholipid headgroups induced by a cationic integral membrane peptide as seen by deuterium magnetic resonance. *Biochemistry* 28 : 2313-2321, 1989.
93. RUSSO, A.F., NELSON, R., ROOS, B.A. & ROSENFELD, M.G. Differential regulation of the coexpressed calcitonin / α -CGRP and β -CGRP neuroendocrine genes. *J. Biol. Chem.* 263 : 5-8, 1988.
94. SAITO, A., KIMURA, S. & GOTO, K. Calcitonin gene-related peptide as potential neurotransmitter in guinea pig right atrium. *Am. J. Physiol.* 250 : H693-H698, 1986.

95. SAITO, A., ISHIKAWA, T., KIMURA, S. & GOTO, K. Role of calcitonin gene-related peptide as cardiogenic neurotransmitter in guinea pig left atria. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243 : 731-735, 1987.
96. SAITO, A., TOMOBE, Y. & GOTO, K. Effect of capsaicin on smooth muscles of rat *vas deferens*: involvement of calcitonin gene-related peptide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242 : 666-672, 1987.
97. SAKAKIBARA, S. Chemistry and biochemistry of amino acids. *Peptides and proteins*, ed. by Weinstein, B., Dekker, M., New York 1 : 51, 1971.
98. SATOH, M., OKU, R., MAEDA, A., FUJII, N., OTAKA, A., FUNAKOSHI, S., YAJIMA, H. & TAKAGI, H. Possible mechanisms of positive inotropic action of synthetic human calcitonin gene-related peptide in isolated rat atrium. *Peptides* 7 : 631-635, 1986.
99. SCHIFFER, M. & EDMUNDSON, A.B. Use of helical wheels to represent the structure of protein and to identify segments with helical potential. *Biophys. J.* 7 : 121-135, 1967.
100. SCHWYZER, R. Peptide chemistry as a tool in molecular biology: does the membrane lipids phase catalyse peptide receptor interaction? *Peptides*, ed. by Deber, C.M., Hruby, V.J., Kopple, K.D. Rockford : 3-11, 1985.
101. SEIFERT, H., CHESNUL, J., SOUZA, E.D., RIVIER, J. & VALE, W. Binding sites for calcitonin-gene related peptide in distinct areas of rat brain. *Brain Res.* 346 : 195-198, 1985.
102. SEXTON, P.M., MCKENZIE, J.S., MASON, R.T., MOSELEY, J.M., MARTIN, T.J. & MENDELSON, F.A.O. Localization of binding sites for calcitonin-gene related peptide in rat brain by *in vitro* autoradiography. *Neuroscience* 19 : 1235-1245, 1986.
103. SEXTON, P.M., MCKENZIE, J.S. & MENDELSON, F.A.O. Evidence for a new subclass of calcitonin / calcitonin gene-related peptide binding sites in rat brain. *Neurochem. Int.* 12 : 323-335, 1988.
104. SIGRIST, S., FRANCO-CERECEDA, A., MUFF, R., HENKE, H., LUNDBERG, J.M. & FISCHER, J.A. Specific receptor and cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology* 119 : 381-388, 1986.

105. STEENBERG, P.H., HÖPPENER, J.W.M., ZANDBERG, J., VAN DEVEN, W.J.M., JANSS, H.S. & LIPS, C.S.M. Calcitonin gene-related peptide coding sequence is converted in the human genome and expressed in medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59 : 358-360, 1984.
106. STEENBERG, P.H., HÖPPENER, J.W.M., ZANDBERG, J., LIPS, C.J.M. & JANSZ, H.S. A second human calcitonin / CGRP gene. *FEBS Lett.* 183 : 403-407, 1985.
107. STEWART, J.M. & YOUNG, J.D. Solid phase peptide synthesis. *Pierce Chemical Co.*, Rockford, IL, 176 p., 1984.
108. STIEF, C.G., BENARD, F., BOSCH, R.J.L.H., ABOSEIF, S.R., LUE, T.F. & TANAGHO, E.A. A possible role for calcitonin gene-related peptide in the regulation of smooth muscle tone of the bladder and penis. *J. Urology* 143 : 392-397, 1990.
109. STREHLOW, K.G. & BLADWIN, R.L. Effect of the substitution Ala → Gly at each of five residue positions in the c-peptide helix. *Biochemistry* 28 : 2130-2133, 1989.
110. STRUTHERS, A.D., BROWN, M.J., MACDONALD, D.W.R., BEACHAM, J.L., STEVENSON, J.C., MORRIS, H.R. & MacINTYRE, I. Human calcitonin gene-related peptide: a potent endogenous vasodilator in man. *Clin. Sci.* 70 : 389-393, 1986.
111. TAKAMI, K., KAMAI, Y., SHIOSAKA, S., LEE, Y., GIRGIS, S., HILLYARD, C.J., MacINTYRE, I., EMSON, P.C. & TOHYAMA, M. Immunohistochemical evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide and acetyl transferase-like immunoreactivity in neurons of the rat hypoglossal, facial and ambiguous nuclei. *Brain Res.* 328 : 386-389, 1985.
112. THOM, D.M.H., HUGHES, A.D., GOLDBERG, P., MARTIN, G., SCHACHTER, M. & SEVER, P.S. The actions of calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide as vasodilators *in vivo* and *in vitro* in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 24 : 139-144, 1987.
113. TIPPINS, J.R., DIMARZO, V., PANICO, M., MORRIS, H.R. & MacINTYRE, I. Investigation of the structure/activity relationship of human calcitonin gene-related peptide (CGRP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134 : 1306-1311, 1986.
114. UMEDA, Y., TAKAMIYA, M., YOSHIZAKI, H. & ARISAWA, M. Inhibition of mitogen-stimulated T lymphocytes proliferation by calcitonin gene-related peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154 : 227-235, 1988.
115. UMEDA, Y. & ARISAWA, M. Characterization of the calcitonin gene-related peptide receptor in mouse T lymphocytes. *Neuropeptides* 14 : 237-242, 1989.

116. UMEDA, Y. & ARISAWA, M. Characterization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in guinea pig lung. *Japan J. Pharmacol.* 51 : 377-384, 1989.
117. VILLARREAL, D., FREEMAN, R.H., VERBURG, K.M. & BRANDS, M.W. Effects of calcitonin gene-related peptide on renal blood flow in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 188 : 316-322, 1988.
118. WANG, X. & FISCUS, R.R. Calcitonin gene-related peptide increases cAMP, tension and rate in rat atria. *Am. J. Physiol.* 256 : R421-R428, 1989.
119. WIMALAWANSA, S.J. & MacINTYRE, I. Calcitonin gene-related peptide and its specific binding sites in the cardiovascular system of rat. *Int. J. of Cardiology* 20 : 29-37, 1988.
120. YAMAGUCHI, A., CHIBA, T., OKIMURA, Y., YAMATANI, T., MORISHITA, T., NAKAMURA, A., INUI, T., NODA, T. & FUJITA, T. Receptors for calcitonin gene-related peptide on the rat liver plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152 : 383-391, 1988.
121. YOSHIZAKI, H., TAKAMIYA, M. & OKADA, T. Characterization of picomolar affinity binding sites for [¹²⁵I]-human calcitonin gene-related peptide in rat brain and heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146 : 443-451, 1987.
122. ZAIDI, M., CHAMBERS, T.J., BEVIS, P.J.R., BEACHAM, J.L., GAINES, R.E. & MacINTYRE, I. Effects of peptides from the calcitonin genes on bone and bone cells. *Q. J. Exp. Physiol.* 73 : 471-485, 1988.
123. ZAIDI, M., MOONGA, B.S., BEVIS, P.J.R., BASCAL, Z.A. & BREIMER, L.H. The calcitonin gene peptides: biology and clinical relevance. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 28 : 109-159, 1990.
124. ZAIDI, M., BRAIN, S.D., TIPPINS, J.R., DI MARZO, V., MOONGA, B.S., CHAMBERS, T.J., MORRIS, H.R. & MacINTYRE, I. Structure-activity relationship of human calcitonin gene-related peptide. *Biochem. J.* 269 : 775-780, 1990.

ANNEXE 1: Abréviations à une ou trois lettres
des acides aminés

Nom	Abréviation	
Alanine	Ala	A
Cystéine	Cys	C
Cystine	(Cys) ₂	-
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Phénylalanine	Phe	F
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Méthionine	Met	M
Asparagine	Asn	N
Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Asp ou Asn, non distingué	Asx	B
Glu ou Gln ou pGlu, non distingué	Glx	Z

ANNEXE 2: Abréviations des groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés trifonctionnels utilisés lors des synthèses.

Acide aminé	GROUPEMENT PROTECTEUR			
	Abréviation	Nom	Formule	Labilité aux acides
Arginine	Tos	p-toluènesulfonyle	$\text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-}$	Stable au TFA Labile au HF
Sérine	Bzl	benzyle	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$	Stable au TFA Labile au HF
Acide aspartique	β -Bzl	bêta-benzyle	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$	Stable au TFA Labile au HF
Lysine	2Cl-Z	chloro-2 benzyl-oxycarbonyle	$\text{Cl-C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{-O-CO-}$	Stable au TFA Labile au HF
Thréonine	Bzl	benzyle	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$	Stable au TFA Labile au HF
Histidine	Tos	p-toluènesulfonyle	$\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-}$	Stable au TFA Labile au HF
Cystéine ^{a)}	ACM	acétamidométhyle	$\text{CH}_3\text{-CO-NH-CH}_2\text{-}$	Stable au TFA Stable au HF

a) Le groupement acétamidométhyle a été utilisé afin de protéger la fonction thiol des résidus de cystéine présents dans le hCGRP α . Il est relativement stable aux acides forts, tel l'acide fluorhydrique (HF) employé pour le clivage des peptides de la résine.