

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Étude structure-activité de l'endothéline-1 : détermination d'éléments responsables de la liaison, de l'activation et de la sélectivité des récepteurs ET_A et ET_B.

Par
Chantal Langlois

Thèse présentée pour l'obtention du grade
Docteur ès science (PhD)
Biologie

Jury d'évaluation :

Évaluateur externe :	Dr Réjean Couture Université de Montréal
Évaluateur externe :	Dr Alain Cadieux Université de Sherbrooke
Évaluateur interne :	Dr Patrick Devine INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche :	Dr Alain Fournier INRS-Institut Armand-Frappier

Août 2005

© droits réservés de Chantal Langlois, 2005

Résumé

L'endothéline (ET) fait partie d'une famille de peptides vasoactifs constitués d'une chaîne de 21 acides aminés. Cette chaîne est repliée par deux ponts disulfures et ses extrémités N- et C-terminales sont libres. Il existe trois isoformes de l'ET soit ET-1, ET-2 et ET-3, qui diffèrent entre elles par leur structure ainsi que par leur activité biologique. En effet, ET-1 et ET-2 semblent posséder une activité vasoconstrictrice alors que ET-3 engendrerait plutôt une vasodilatation. L'activité biologique des ETs s'exerce, chez les mammifères, via deux types de récepteurs : ET_A et ET_B. Le premier se retrouve principalement sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins et il possède une affinité plus grande pour ET-1 et ET-2 que pour ET-3. Sa stimulation entraîne une vasoconstriction puissante et soutenue. Le récepteur ET_B possède une plus vaste distribution dans l'organisme et ne présente aucune spécificité envers l'une ou l'autre des isoformes de l'ET.

Cette étude visait à déterminer les éléments de la molécule d'ET-1 importants pour la liaison et l'activation des récepteurs ET_A et ET_B, mais aussi ceux responsables de la sélectivité de ceux-ci. En ce sens plusieurs séries d'analogues de l'ET-1, en plus d'analogues tronqués du segment C-terminal ont été développés. Ces analogues peptidiques ont été synthétisés sur phase solide au moyen de la chimie Fmoc ou t-Boc. Après clivage, certains analogues ont subi des réactions de cyclisation et de déformylation. Les analogues ont ensuite été purifiés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) préparative sur phase inverse. Chaque analogue a finalement été caractérisé par CLHP analytique sur phase inverse et par spectrométrie de masse (MALDI-TOF).

L'évaluation pharmacologique des analogues a été réalisée sur deux préparations tissulaires riches en l'un ou l'autre des deux récepteurs de l'ET. Ainsi, des anneaux d'aorte de rat dénudée de leur endothélium ont permis de déterminer l'activité biologique des analogues sur le récepteur ET_A tandis que le parenchyme pulmonaire de cobaye a été

utilisé pour évaluer leur activité sur le récepteur ET_B. L'affinité de certains analogues a été évaluée par des essais de compétition, contre l'ET-1 radiomarquée, sur des cellules CHO exprimant soit le récepteur ET_A ou le récepteur ET_B. De plus, des études de dichroïsme circulaire ont été effectuées afin d'évaluer l'arrangement structural de certains analogues.

Les résultats obtenus sur les préparations ET_A ont montré pour la première fois, contrairement au concept établi et présenté dans la littérature, que la structure complète de l'ET-1 n'est pas nécessaire pour l'activation du récepteur ET_A. Le segment 9-21 contiendrait en effet tous les pharmacophores, alors que le segment N-terminal participerait plutôt à l'affinité du peptide pour le récepteur. De ces pharmacophores, l'acide glutamique de la position 10 semble jouer un rôle de premier plan dans le processus de liaison et d'activation alors que la lysine-9 et l'acide aspartique-18 auraient plutôt un rôle dans la stabilisation de la structure secondaire. À l'intérieur du fragment 9-21, la présence de modifications aux extrémités N- ou C-terminales semble aussi agir en stabilisant cette dernière. En nous basant sur les résultats de structure-activité et sur ceux obtenus par dichroïsme circulaire, nous proposons que le segment C-terminal de l'ET-1 adopte une structure en hélice irrégulière jusqu'à son extrémité comme proposé par l'équipe de Wallace suite à des études par cristallographie. Cette structure permet d'aligner le groupement carboxylique terminal avec l'imidazole de l'His¹⁶ et le noyau phénolique de la Tyr¹³ de façon à former un relais de charge permettant vraisemblablement d'activer le récepteur ET_A par un mécanisme moléculaire similaire à celui retrouvé au site catalytique des sérine protéases (Langlois *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus sur les préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye, ont montré que la présence de la charge positive, portée par la chaîne latérale de la lysine, à l'extrémité N-terminale des analogues 9-21 défavoriserait la liaison et l'activation du récepteur ET_B. La position 13 semble également jouer un rôle important dans la sélectivité du fragment envers le récepteur ET_A. En effet, le remplacement de la Tyr par un acide aminé non ionisable a augmenté l'activité biologique des analogues du fragment 9-21 sur les préparations pulmonaires. Finalement, nos résultats sont en accord avec notre

hypothèse à savoir que le récepteur ET_B accommoderait un ligand de structure allongée, hautement hydrophobe dont l'extrémité C-terminale serait repliée de façon à placer le tryptophane-21 dans l'environnement voisin de la leucine-17.

Pour finir, nous avons vérifié si les fragments PTHrP (1-16) et PTHrP (1-23), définis récemment comme des stimulateurs des ostéoblastes lors du développement de métastases osseuses suite au cancer de la prostate, agissent comme agonistes du récepteur ET_A. Cette hypothèse avait été avancée par une équipe américaine en comparant les séquences de ces fragments à celle de l'ET-1. Donc, nous avons repris ces fragments du PTHrP pour les étudier dans nos modèles pharmacologiques des récepteurs de l'ET. Selon nos résultats, aucun des deux fragments n'a montré d'activité contractile sur les préparations d'aorte de rat et de parenchyme pulmonaire de cobaye. De plus, même à des concentrations élevées, ceux-ci n'ont pu bloquer l'activité biologique engendrée par l'ET-1 sur ces préparations. Finalement, les essais de liaison ont également montré qu'ils ne compétitionnent pas pour le même site de liaison que l'ET-1. Par conséquent, il ne semble pas que l'activation des ostéoblastes, observée lors du développement de métastases osseuses passe directement par la voie traditionnelle de l'ET-1 (Langlois *et al.*, 2005).

Chantal Langlois
Étudiante

Alain Fournier
Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier mes parents, Francine et Clément, ainsi que mon conjoint, Stéphane, pour leur support, leurs encouragements et leur compréhension qu'ils m'ont témoignés tout au long de ces années.

Je voudrais également adresser mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche, le Dr Alain Fournier, pour la formation et la rigueur scientifique qu'il m'a enseignées tout au long de mes études graduées. Je tiens aussi à souligner l'aide que j'ai reçue de tous les membres du laboratoire et plus particulièrement de Myriam Létourneau.

Je remercie finalement les Conseils de recherche médicale du Canada et les Fonds de la recherche en santé du Québec pour les soutiens financiers accordés.

Table des matières

Résumé.....	ii
Remerciements.....	v
Liste des figures.....	xi
Liste des tableaux.....	xvi
Liste des appendices	xviii
Liste des abréviations.....	xix
 Chapitre 1 : Endothéline.....	 1
1.1. Découverte.....	2
1.2. Caractéristiques moléculaires.....	3
1.3. Isoformes.....	4
1.4. Biosynthèse.....	6
1.5. L'ECE.....	7
1.6. Catabolisme.....	9
1.7. Récepteurs.....	10
1.8. Identification des sites de liaison des récepteurs.....	15
1.9. Mécanismes de transduction de signal.....	18
1.10. Études structure-fonction.....	22
1.11 Structures secondaires.....	24
1.12 Agonistes et antagonistes.....	26
1.13 Problématique et hypothèses de travail.....	28
 Chapitre 2 : PTHrP.....	 30
2.1. Cancer de la prostate et métastases osseuses.....	31
2.2. Implication de l'ET-1 dans le développement de lésions ostéoblastiques..	32
2.3. Problématique et hypothèse de travail.....	33
 Chapitre 3 : Matériel et méthodologies.....	 34
3. Synthèse des analogues de l'ET-1.....	35
3.1. Protocole de synthèse peptidique en chimie t-Boc.....	35

3.1.1. Réactifs et solvants utilisés.....	35
3.1.2. Fixation sur la résine de l'acide aminé en position C-terminal.....	36
3.1.3. Test à l'acide picrique.....	36
3.1.4. Cycle de couplage en chimie t-Boc.....	37
3.1.4.1. Déprotection de l'amine terminale.....	37
3.1.4.2. Neutralisation de la résine.....	38
3.1.4.3. Couplage des t-Boc-acides aminés.....	38
3.1.5. Clivage du peptide de la résine.....	39
3.2. Protocole de synthèse peptidique en chimie Fmoc.....	41
3.2.1. Réactifs et solvants utilisés.....	41
3.2.2. Fixation sur la résine de l'acide aminé en C-terminal.....	42
3.2.3. Détermination du degré de substitution de la résine.....	42
3.2.4. Cycle de couplage en chimie Fmoc.....	43
3.2.4.1. Déprotection de l'amine terminale.....	43
3.2.4.2. Couplage des Fmoc-acides aminés.....	43
3.2.4.3. Couplage de Fmoc-Cys(Trt)-OH.....	45
3.2.5. Clivage du peptide de la résine.....	45
4. Modification chimique des analogues.....	46
4.1. Formation des ponts disulfures.....	46
4.1.1. Traitement au ferricyanure de potassium.....	46
4.1.2. Traitement avec 50 éq d'iode.....	47
4.1.3. Traitement avec 10 éq d'iode.....	47
4.2. Déformylation des analogues.....	48
4.3. Acétylation des analogues.....	48
5. Purification des analogues.....	48
6. Caractérisation des analogues.....	49
6.1. CLHP analytique.....	49
6.2. Spectrométrie de masse.....	50
7. Évaluation pharmacologique des analogues de l'ET-1.....	50
7.1. Animaux et produits utilisés.....	50
7.2. Évaluation pharmacologique des analogues sur le récepteur ET _A	51

7.3. Évaluation pharmacologique des analogues sur le récepteur ET _B	54
8. Radiomarquage de l'ET-1.....	55
9. Essais de compétition entre les analogues et l' [¹²⁵ I]ET-1.....	55
9.1. Culture cellulaire.....	55
9.2. Essais de compétition sur le récepteur ET _A	56
9.3. Essais de compétition sur le récepteur ET _B	57
10. Dichroïsme circulaire.....	57

Chapitre 4 : Résultats..... 58

11. Étude du segment 8 à 10 de l'ET-1.....	59
11.1. Synthèse peptidique.....	59
11.2. Caractérisation des analogues.....	61
11.3. Essais pharmacologiques.....	62
11.3.1. Effectués sur le récepteur ET _A	62
11.3.2. Effectués sur le récepteur ET _B	64
12. Fragments 8-21, 9-21 et 10-21.....	68
12.1. Synthèse peptidique.....	69
12.2. Caractérisation des analogues.....	69
12.3. Essais pharmacologiques.....	71
12.3.1. Effectués sur le récepteur ET _A	71
12.3.2. Effectués sur le récepteur ET _B	73
12.4. Essais de liaison.....	76
12.4.1. Effectués sur le récepteur ET _A	76
13. Étude structure-fonction du fragment 9-21.....	77
13.1. Synthèse peptidique.....	77
13.2. Caractérisation des analogues.....	78
13.3. Essais pharmacologiques.....	81
13.3.1. Effectués sur le récepteur ET _A	81
13.3.2. Effectués sur le récepteur ET _B	86
14. Étude de l'impact de la structure tridimensionnelle de l'ET-1.....	93
14.1. Analogues contenant une ou plusieurs homocystéines.....	93

14.1.1. Synthèse peptidique.....	94
14.1.2. Caractérisation des analogues.....	96
14.1.3. Essais pharmacologiques.....	96
14.1.3.1. Effectués sur le récepteur ET _A	96
14.1.3.2. Effectués sur le récepteur ET _B	98
14.2. Dichroïsme circulaire.....	99
14.2.1. Généralité.....	99
14.2.2. Analyse des spectres.....	100
15. [lys ⁹]ET-1 (9-21).....	107
15.1. Synthèse peptidique.....	107
15.2. Caractérisation des analogues.....	107
15.3. Essais pharmacologiques.....	108
15.4. Vérification de la cyclisation	108
15.5. [lys ⁹ , βAsp ¹⁸]ET-1 (9-21) et [lys ⁹ , his ¹⁶]ET-1 (9-21).....	109
15.5.1. Synthèse peptidique.....	109
15.5.2. Caractérisation des analogues.....	109
15.5.3. Essais pharmacologiques.....	110
16. PTHrP.....	111
16.1. Synthèse peptidique.....	111
16.2. Caractérisation des analogues.....	111
16.3. Essais pharmacologiques.....	112
16.3.1. Effectués sur le récepteur ET _A	112
16.3.2. Effectués sur le récepteur ET _B	113
16.4. Essais de liaison.....	114
16.4.1. Effectués sur le récepteur ET _A	114
16.4.2. Effectués sur le récepteur ET _B	115
Chapitre 5 : Discussion.....	116
17. Stratégie et résultats de synthèse peptidique.....	117
17.1. Analogues modifiés aux positions 8, 9 et 10.....	117
17.2. Analogues des fragments 8-21, 9-21 et 10-21.....	121

17.3. Analogue [lys ⁹]ET-1 (9-21).....	124
17.4. Analogues contenant une ou plusieurs homocystéines.....	129
18. Essais pharmacologiques.....	131
18.1. Choix de l'aorte thoracique de rat.....	131
18.2. Résultats obtenus sur les préparations d'aorte de rat.....	131
18.3. Choix du parenchyme pulmonaire de cobaye.....	147
18.4. Résultats obtenus sur les préparations pulmonaires de cobaye.....	147
19. PTHrP.....	156
19.1. Stratégie et résultats de synthèse peptidique.....	157
19.2. Essais pharmacologiques et essais de liaison.....	157
Conclusions.....	159
Appendices.....	162
Appendice A.....	162
Appendice B.....	163
Appendice C.....	164
Appendice D.....	165
Appendice E.....	166
Appendice F.....	167
Appendice G	168
Appendice H	169
Appendice I	170
Appendice J.....	171
Références.....	172

Liste des figures

Figure 1 : Isoformes de l'endothéline-1	4
Figure 2 : Synthèse endogène de l'endothéline-1	6
Figure 3 : Structure de l' <i>endothelin-converting enzyme-1</i> (ECE-1)	8
Figure 4 : Les récepteurs de l'endothéline-1	12
Figure 5 : Structure du récepteur ET _A humain	13
Figure 6 : Comparaison de la structure primaire des récepteurs ET _A et ET _B d'origines humaine, bovine et de rongeur	14
Figure 7 : Mécanismes de transduction de signal	21
Figure 8 : Montage des tissus pour les essais pharmacologiques	52
Figure 9 : Exemple de tracé obtenu lors d'un essais pharmacologique effectué avec un agoniste (a) et un antagoniste (b) sur l'aorte de rat	53
Figure 10 : Représentation du segment chargé 8 à 10 de l'ET-1	59
Figure 11 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues, dans lesquels des résidus Ala ont été introduits aux positions 8, 9 et/ou 10, obtenues sur des préparations d'aorte de rat	63
Figure 12 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues, modifiés à la position 8, obtenues sur des préparations d'aorte de rat	63
Figure 13 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues, modifiés à la position 10, obtenues sur des préparations d'aorte de rat	64
Figure 14 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues, dans lesquels des résidus Ala ont été introduits aux positions 8, 9 et/ou 10, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye	65
Figure 15 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues modifiés à la position 8 obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye	66

Figure 16 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues modifiés à la position 10 obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye	66
Figure 17 : Représentation des fragments 8-21 (a), 9-21 (b) et 10-21 (c) de l'ET-1.....	68
Figure 18 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues du fragment 8-21 obtenues sur des préparations d'aorte de rat.....	71
Figure 19 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues du fragment 9-21 obtenues sur des préparations d'aorte de rat.....	72
Figure 20 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues du fragment 10-21 obtenues sur des préparations d'aorte de rat.....	72
Figure 21 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues du fragment 8-21 obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.....	73
Figure 22 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues du fragment 9-21 obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.....	74
Figure 23 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues du fragment 10-21 obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.....	74
Figure 24 : Courbes de compétition entre l' [¹²⁵ I]ET-1 (0,1 nM) et des concentrations croissantes d'ET-1 ou de l'analogue [lys ⁹]ET-1 (9-21) effectuées sur des cellules CHO exprimant le récepteur ET _A	76
Figure 25: Représentation des acides aminés Cys ¹¹ , Tyr ¹³ , Cys ¹⁵ , His ¹⁶ et Asp ¹⁸ du fragment 9-21 de l'ET-1.....	77
Figure 26 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues du fragment 9-21 ayant leur C-terminal modifié, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.....	82
Figure 27: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, de [lys ⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés aux positions 11 et 15, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.....	83

- Figure 28: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, de [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 dont la Tyr¹³ a été modifiée, obtenues sur des préparations d'aorte de rat..... 83
- Figure 29: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, de [lys⁹]ET-1 (9-21) et de ses analogues modifiés à la position 13, obtenues sur des préparations d'aorte de rat..... 84
- Figure 30: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 16, obtenues sur des préparations d'aorte de rat..... 85
- Figure 31: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 18, obtenues sur des préparations d'aorte de rat..... 85
- Figure 32 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et de ses analogues ayant leur C-terminal modifié, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye 86
- Figure 33 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés aux positions 11 et 15, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye..... 87
- Figure 34 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 dont la Tyr¹³ a été modifiée, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye..... 87
- Figure 35 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et de ses analogues modifiés à la position 13, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye..... 88
- Figure 36 : Courbes concentration-réponse de de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 16, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye..... 89

Figure 37 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys ⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1, modifiés à la position 18, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.....	90
Figure 38 : Structure de la cystéine et de l'homocystéine.....	94
Figure 39: Représentation des ponts disulfures reliant les positions 1-15 et 3-11 de l'ET-1	95
Figure 40 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues, dans lesquels l'un ou l'autre ou les deux ponts disulfures ont été allongés par l'introduction d'homocystéines, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.....	97
Figure 41 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues dans lesquels l'un ou l'autre ou les deux ponts disulfures ont été allongés par l'introduction d'homocystéines, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.....	98
Figure 42 : Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques des structures secondaires les plus fréquemment observées dans les peptides et les protéines soit l'hélice α (H), le feuillet β (β) et le coude β (β_t). La lettre R identifie, quant à elle, une structure aléatoire.....	101
Figure 43 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'analogue [lys ⁹]ET-1 (9-21) mesurés dans 20% et 40% HFIP.....	102
Figure 44 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'analogue N-Ac-ET-1 (9-21) mesurés dans 20% et 40% HFIP.....	103
Figure 45 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'analogue ET-1 (9-21) mesurés dans 20% et 40% HFIP.....	104
Figure 46 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'analogue [Ala ^{11,15}]ET-1 (9-21) mesurés dans 20% et 40% HFIP	105
Figure 47 : Spectres de dichroïsme circulaire de l'analogue [Ala ^{11,15} , Trp(For) ²¹]ET-1 (9-21) mesurés dans 20% et 40% HFIP.....	106
Figure 48 : Chromatogramme obtenu après co-injection de l'analogue [lys ⁹]ET-1 (9-21), issu de la synthèse utilisant la chimie t-Boc, et de l'analogue produit lors de la synthèse avec la chimie Fmoc.....	108

- Figure 49 : Chromatogrammes obtenus après co-injection de l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21), issu de la synthèse utilisant la chimie Fmoc et de a) [lys⁹,β-Asp¹⁸]ET-1 (9-21) et b) [lys⁹, his¹⁶]ET-1 (9-21).)..... 110
- Figure 50 : Courbes concentration-réponse de l'ET-1, effectuées en absence ou en présence de 1 μM de PTHrP (1-16) ou de PTHrP (1-23), obtenues sur des préparations d'aorte de rat..... 112
- Figure 51 : Courbes concentration-réponse de la SRTX-c, effectuées en absence ou en présence de 1 μM de PTHrP (1-16) ou de PTHrP (1-23), obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye..... 113
- Figure 52 : Courbes de compétition entre l' [¹²⁵I]ET-1 (0,1 nM) et des concentrations croissantes d'ET-1, de PTHrP (1-16) ou de PTHrP (1-23) effectuées sur des cellules CHO exprimant le récepteur ET_A..... 114
- Figure 53 : Courbes de compétition entre l' [¹²⁵I]ET-1 (0,1 nM) et des concentrations croissantes d'ET-1, de PTHrP (1-16) ou de PTHrP (1-23) effectuées sur des cellules CHO exprimant le récepteur ET_B 115

Liste des tableaux

Tableau 1 : Cycle de couplage d'un acide aminé en chimie t-Boc.....	40
Tableau 2 : Cycle de couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc	44
Tableau 3 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues de ET-1 modifiés aux positions 8, 9 et 10.....	61
Tableau 4 : EC ₅₀ de l'ET-1 et de ses analogues dont les acides aminés aux positions 8, 9 et/ou 10 ont été remplacés par une Ala.....	67
Tableau 5 : EC ₅₀ de l'ET-1 et de ses analogues dont l'acide aspartique-8 a été substitué.....	67
Tableau 6 : EC ₅₀ de l'ET-1 et de ses analogues dont l'acide glutamique-10 a été substitué.....	68
Tableau 7 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment C- terminal de ET-1.....	70
Tableau 8 : Charge nette du segment N-terminal des analogues des fragments 8-21, 9-21 et 10-21 de l'ET-1	70
Tableau 9 : EC ₅₀ de l'ET-1 et des analogues du fragment 8-21	75
Tableau 10 : EC ₅₀ de l'ET-1 et des analogues du fragment 9-21	75
Tableau 11 : EC ₅₀ de l'ET-1 et des analogues du fragment 10-21	75
Tableau 12 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment 9-21 de ET-1 ayant leur C-terminal amide	78
Tableau 13 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment 9-21 de ET-1 modifiés aux positions 11 et 15.....	79
Tableau 14 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment 9-21 de ET-1 dont la Tyr ¹³ a été modifiée.....	79
Tableau 15 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment 9-21 de ET-1 modifiés à la position 13.....	80
Tableau 16 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment 9-21 de ET-1 modifiés à la position 16.....	80

Tableau 17 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment 9-21 de ET-1 modifiés à la position 18.....	81
Tableau 18 : EC ₅₀ de l'ET-1, de [lys ⁹]ET-1 (9-21) et de ses analogues ayant leur C-terminal modifié	90
Tableau 19 : EC ₅₀ de l'ET-1, de [lys ⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés aux positions 11 et 15.....	91
Tableau 20 : EC ₅₀ de l'ET-1, du [lys ⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 dont la Tyr ¹³ a été modifiée.....	91
Tableau 21 : EC ₅₀ de l'ET-1, du [lys ⁹]ET-1 (9-21) et de ses analogues modifiés à la position 13.....	92
Tableau 22 : EC ₅₀ de l'ET-1, du [lys ⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 16.....	92
Tableau 23 : EC ₅₀ de l'ET-1, du [lys ⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 18.....	93
Tableau 24 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues de ET-1 dans lesquels l'un, l'autre ou les deux ponts disulfures ont été allongés par l'introduction d'homocystéines.....	96
Tableau 25 : EC ₅₀ de l'ET-1 et de ses analogues dans lesquels l'un ou l'autre ou les deux ponts disulfures ont été allongés par l'insertion d'homocystéines.....	99
Tableau 26 : Caractérisation par spectrométrie de masse des fragments PTHrP (1-16) et PTHrP (1-23).....	111

Liste des appendices

Appendice A : Déprotection de l'amine α en chimie t-Boc.....	162
Appendice B : Couplage d'un acide aminé en chimie t-Boc.....	163
Appendice C : Couplage de l'acide aminé en C-terminal à la résine de Wang.....	164
Appendice D : Déprotection de l'amine α en chimie Fmoc	165
Appendice E : Couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc.....	166
Appendice F : Formation de l'anhydride symétrique et couplage de Fmoc-Cys(Trt)-OH.....	167
Appndice G : Mécanismes de formation d'un acide β -aspartique (a) et de la racémisation de l'histidine (b)	168
Appendice H : Courbe concentration-réponse de l'ET-1 en présence de BQ610 (0,1 μ M) et de la SRTX-c	169
Appendice I : Étude de modélisation moléculaire des analogues [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For) ²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1 et [Cys(Acm) ^{3,11}](3-11)-Aca-(17-21)ET-1.....	170
Appendice J : Modèle montrant les éléments importants de l'analogue [lys ⁹]T-1 (9-21) pour la liaison et l'activation du récepteur ET _A élaboré à partir des résultats obtenus.....	171

Liste des abréviations

Aca	Acide aminocaproïque
Acm	Acétamidométhyle
AC	Acétyle
ACN	Acétonitrile
A.C.S	American Chemical Standard
ATP	Adénosine triphosphate
t-Boc	t-Butyloxycarbonyle
tBu	t-Butyle
BOP	Hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris-diméthylamino-phosphonium
Bzl	Benzyle
CGRP	Calcitonin gene related peptide
cHex	Cyclohexyle
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
2-Cl-Z	2-Chlorobenzoyloxycarbonyle
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMF	N,N-diméthylformamide
DMS	Diméthylsulfure
EC ₅₀	<i>Effective concentration</i>
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDCF	<i>Endothelium derived contracting factor</i>
EDRF	<i>Endothelium derived relaxing factor</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>

ET	Endothéline
Eq	Équivalent
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
Fmoc	9-Fluorènylméthoxycarbonyl
For ou (F)	Formyle
HBTU	Hexafluorophosphate de 2-(1-Hydroxy-benzotriazol-1yl)-1,1,3,3-métra-méthyluronium
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HMPA	Hexaméthylphosphoramide
HOBT	1-Hydroxybenzotriazole monohydraté
I	Iode
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IP ₃	Inositol-triphosphate
MALDI TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionization time of flight</i>
MBHA	Résine de 4-méthylbenzhydrylamine
Me	Méthyle
NEP	<i>Neutral endopeptidase</i>
NPY	Neuropeptide Y
NO	Monoxyde d'azote
OtBu	Ester de t-Butyle
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PGI ₂	Prostacycline
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PSA	<i>Prostate specific antigen</i>
PTHrP	<i>Parathyroid hormone-related protein</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SRTX	Sarafotoxine

TBTU	Tétrafluoroborate de 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3,- tétraméthyluronium
TFA	Acide trifluoroacétique
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tos	Tosyle
Trt	Triphénylméthyle
UPA	<i>Urokinase-type plasmogen activator</i>
VIC	<i>Vasoactive intestinal contractor</i>
VIP	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>

Chapitre 1 : L'endothéline

1.1. Découverte:

Déjà avant l'arrivée du XX^e siècle, Tigerstedt et Bergman avaient montré que l'injection d'un extrait de rein à un lapin provoquait une augmentation de la pression sanguine (Tigerstedt et Bergman, 1898). Cette substance vasoactive, extraite du rein, fut alors nommée rénine. L'idée que la pression sanguine pouvait être modulée par un ou plusieurs facteurs solubles est née de ces résultats. Par la suite, plusieurs études ont permis l'identification de facteurs peptidiques, comme l'angiotensine (Braun-Menendez *et al.*, 1940; Page et Helmer, 1940) et non peptidiques, comme le PGI₂ (Moncada *et al.*, 1976) ayant une influence directe ou indirecte sur le tonus vasculaire et la pression sanguine.

Cependant, jusqu'à la fin du XX^e siècle, le rôle crucial joué par l'endothélium vasculaire dans les mécanismes de régulation de la pression sanguine demeura méconnu. En effet, on croyait que le seul rôle de cette fine couche cellulaire était la protection du muscle sous-jacent. En 1980, l'équipe de Furchgott et Zawadzki démontra que la présence de l'endothélium à l'intérieur de l'aorte de rat était essentielle à la vasodilatation provoquée par l'acétylcholine. Ils proposèrent alors que cet effet vasodilatateur est relayé par le récepteur muscarinique, qui en réponse à l'acétylcholine, entraîne la sécrétion de facteurs, qui eux pourraient agir sur les cellules musculaires lisses du vaisseau sanguin pour entraîner sa dilatation. *Endothelium relaxing factors* (EDRF) fut le nom donné à ces facteurs. Sept ans plus tard, des travaux menés sur l'aorte de porc ont permis de démontrer qu'en réponse à des concentrations croissantes de bradykinine, il y avait sécrétion de monoxyde d'azote (NO), provoquant la dilation du vaisseau sanguin (Palmer, Ferrige et Moncada, 1987). Il fut alors proposé que l'EDRF était en fait le NO. Ce médiateur est maintenant connu non seulement pour ses effets vasodilatateurs, mais aussi pour inhiber l'agrégation plaquettaire, la prolifération des cellules musculaires vasculaires, l'adhésion des monocytes, etc. En fait, le NO aurait pour rôle de prévenir le développement de plusieurs pathologies telles que l'athérosclérose et la thrombose (Taddei *et al.*, 2001).

Simultanément, des travaux menés dans les laboratoires de De Mey et Vanhoutte ont suggéré qu'en plus de produire des facteurs relaxants, l'endothélium vasculaire sécréterait des facteurs constricteurs. En effet, leurs travaux ont montré que la destruction de cette couche cellulaire entraîne une diminution importante de la contraction induite par le potassium (De Mey et Vanhoutte, 1981). Des études menées sur des veines de chien montrèrent également que le retrait de l'endothélium conduit à une diminution de l'effet constricteur de l'acide arachidonique et de l'anoxie (De Mey et Vanhoutte, 1982 ; De Mey et Vanhoutte, 1983). O'Brien et McMurtry montrèrent, eux aussi, que l'endothélium vasculaire sécrétait, en plus de l'EDRF, une substance vasoconstrictrice : l'*Endothelium-derived contracting factor* (EDCF) (O'Brien et McMurtry, 1984). Bien qu'il fut montré que cette substance était sensible aux peptidases (Gillespie *et al.*, 1986), ce n'est qu'en 1988 que Yanagisawa et son équipe réussirent à isoler et caractériser cette substance protéique, à partir de surnageant de cellules endothéliales d'aorte de porc (Yanagisawa *et al.*, 1988b)

1.2. Caractéristiques moléculaires:

Le peptide isolé par Yanagisawa est constitué d'une chaîne de 21 acides aminés repliée par deux ponts disulfures, reliant les cystéines 1-15 et 3-11, lui conférant une structure bicyclique unique. De plus, les extrémités amino- et carboxy-terminales du peptide sont libres (Masaki et Yanagisawa, 1992; Yanagisawa *et al.*, 1988a). Puisque ce peptide n'appartenait à aucune famille connue et qu'il était issu de l'endothélium, ils le nommèrent endothéline (ET).

L'injection d'ET à un rat anesthésié entraîne une réponse biphasique sur la pression sanguine systémique. Dans un premier temps, on observe une diminution rapide, suivie de son élévation dans une progression lente, mais soutenue (Spokes, Ghatei et Bloom, 1989). L'ET était en fait, le plus puissant agent vasoconstricteur alors connu. Depuis, seule l'urotensine II est plus puissante. La vasoconstriction engendrée par cette dernière est cependant de moindre importance que celle provoquée par l'ET (Maguire et Davenport, 2002).

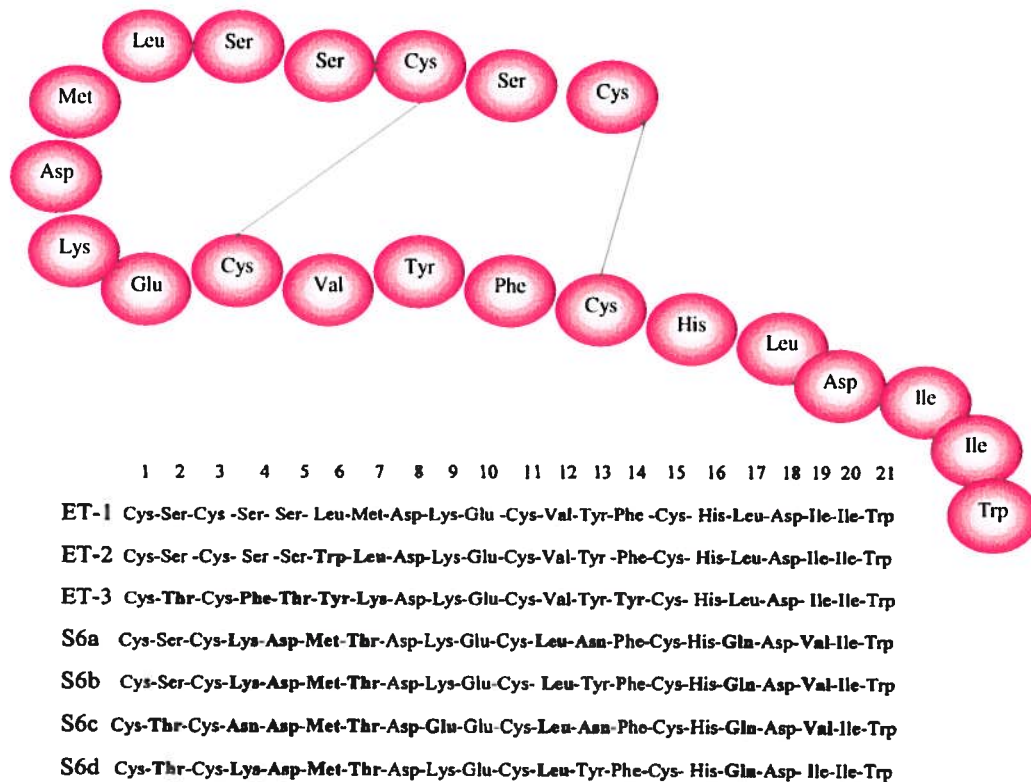


Figure 1 : Isoformes de l'endothéline-1.

1.3. Isoformes:

Des travaux menés sur des séquences du code génétique ont montré l'existence de trois isoformes de l'ET (Inoue *et al.*, 1989a). Ainsi la séquence identifiée par Yanagisawa (1988a) est aujourd'hui connue comme étant l'ET-1. Les deux autres isoformes furent nommées ET-2 et ET-3. L'ET-2 diffère de l'ET-1 seulement aux positions 6 et 7, alors que l'ET-3 possède six acides aminés différents (Figure 1). Ces peptides se distinguent au niveau de leur structure, mais aussi de leur activité biologique. En effet, l'ET-1 et l'ET-2 présentent une activité vasoconstrictrice supérieure à l'ET-3, laquelle semble plutôt agir comme agent vasodilatateur (Masaki et Yanagisawa, 1992).

Les sarafotoxines (SRTXs) et la bibtrotoxine, des cardiotoxines isolées du venin des vipères égyptiennes *Atractaspis engaddensis* et *Atractaspis bibroni*, présentent une étonnante homologie de structure avec les endothélines (Becker *et al.*, 1993; Kloog *et al.*, 1988). De plus, le VIC (*vasoactive intestinal contractor*), un peptide présent dans l'intestin de souris, ne diffère de l'ET-1 que par trois acides aminés (Saida *et al.*, 1989). Ces peptides sont tous des agents vasoactifs, dilatateurs, tels que les SRTX-c et -d, ou constricteurs, tels que le VIC et les SRTX-a et -b. Cette similarité structurale et fonctionnelle entre les endothélines et des peptides présents chez les reptiles suggère une même origine.

En fait, les peptides des familles des ETs et des SRTXs présentent entre 60% et 70% d'homologie au niveau de leur structure primaire. Les deux ponts disulfures retrouvés aux positions 1-15 et 3-11, le segment carboxy-terminal hydrophobe, la portion médiane chargée retrouvée entre les positions 8 à 10 ainsi que les extrémités N- et C-terminales libres sont des caractéristiques de tous les peptides de ces familles (Masaki et Yanagisawa, 1992). La comparaison des structures primaires de ces peptides montre que la région la plus variable est retrouvée entre les positions 4 à 7 du segment amino-terminal. De plus, le résidu sérine retrouvé en position 2 de l'ET-1 est présent dans l'ET-2, mais aussi dans les SRTX-a et -b. Cependant, dans l'ET-3 de même que dans les SRTX-c et -d cette position est plutôt occupée par un résidu thréonine. Bien que ces deux acides aminés portent tous deux un groupement hydroxyle sur leur chaîne latérale, cette différence pourrait expliquer la divergence entre les effets pharmacologiques de ces peptides; les premiers ayant une activité vasoconstrictrice alors que le second groupe agit plutôt comme agents vasodilatateurs. Il a été montré qu'une modification même conservative de la structure primaire pouvait avoir des répercussions importantes sur l'activité biologique d'une protéine aussi volumineuse que les canaux potassiques dépendant du voltage (Yellen *et al.*, 1991). La position 2, occupée soit par une sérine ou une thréonine, pourrait être cruciale pour discriminer entre l'effet constricteur et dilatateur (Bdolah *et al.*, 1989).

1.4. Biosynthèse:

Les cellules endothéliales vasculaires ne contiennent aucune vésicule servant à l'accumulation d'ET de sorte que la sécrétion de cet agent constricteur est régulée directement par la synthèse endogène du peptide. Les facteurs modifiant le taux de synthèse influencent donc directement les niveaux circulants d'ET. Parmi ces facteurs connus pour stimuler la synthèse de l'ET-1, on compte notamment l'adrénaline, la thrombine, la vasopressine, l'angiotensine II, l'insuline, certaines cytokines, des facteurs de croissance, le TNF- α (*tumor necrosis factor*) ainsi que certaines conditions physiologiques telles que l'ischémie. D'autre part, le monoxyde d'azote, les prostacyclines, le peptide natriurétique, l'héparine et certaines manifestations physiologiques telles que l'augmentation de la pression sanguine diminuent la sécrétion d'ET-1 (Emori *et al.*, 1989; Kourembanas *et al.*, 1991; Kurihara *et al.*, 1989; Masaki et Yanagisawa, 1992; Ortega Mateo et De Attinano, 1997; Ohta *et al.*, 1990; Yoshizumi *et al.*, 1989; Yoshizumi *et al.*, 1989).

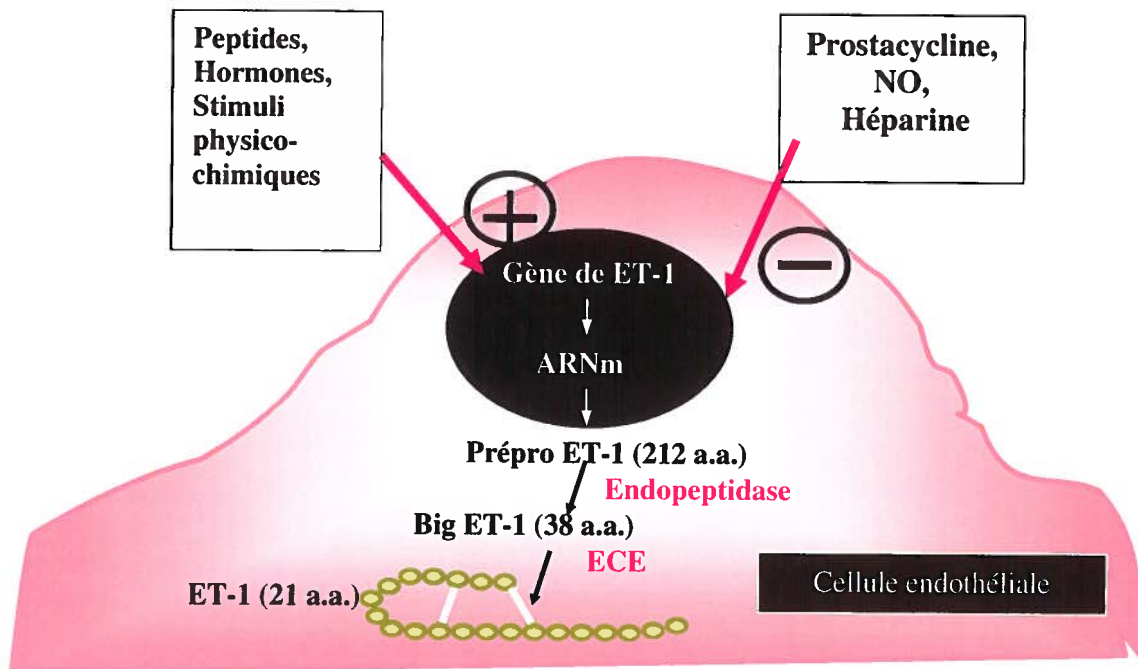


Figure 2 : Synthèse endogène de l'endothéline-1

Bien que les trois isoformes de l'endothéline soient issues de trois gènes distincts, leur biosynthèse implique le même processus enzymatique (Inoue *et al.*, 1989a; Inoue *et al.*, 1989b). Chacun de ces gènes est d'abord traduit en une protéine d'environ 200 acides aminés : la prépro ET-1. Celle-ci est clivée par la furine, une endopeptidase de type subtilisine spécifique pour les résidus dibasiques : Arg⁹²-Lys⁹³. La pro ET-1 (big ET-1) ainsi obtenue est constituée chez l'humain de 38 acides aminés. La big ET-2 et la big ET-3 sont, quant à elles constituées respectivement de 37 et 41 acides aminés (Doherty, 1992; Gray et Webb, 1996).

La dernière étape de maturation est effectuée par l'enzyme de conversion de l'ET (ECE), qui coupe le peptide entre Trp²¹ et Val²² (ou Ile²² pour ET-3). L'importance physiologique de ce dernier clivage a été démontrée par le fait que la big ET-1 est 140 fois moins puissante que l'ET-1 (Kimura *et al.*, 1989). La prépro ET-1 est quant à elle complètement inactive (Cade *et al.*, 1990).

1.5. L'ECE :

L'ECE fut découverte en 1990 après qu'on eut observé qu'un homogénat de cellules aortiques de bœuf en culture possédait la capacité de cliver la big ET-1 en ET-1 mature (Ohnaka *et al.*, 1990). De plus, la big ET-1 injectée *in vivo* est rapidement convertie, alors que le plasma sanguin *in vitro* est incapable de produire de l'ET-1 à partir de son précurseur (Hensen *et al.*, 1991). Des études menées à l'aide d'antagonistes spécifiques aux métalloprotéases ont permis de déterminer que le phosphoramidon [N-(α-(rhamnopyranosyloxyhydroxy-phosphonyl))-L-Leu-L-Trp] inhibait l'action de l'ECE de façon compétitive (Fukuroda *et al.*, 1990; Pollock *et al.*, 1993). Cependant, le thiorphan, un inhibiteur des endopeptidases neutres (NEP), n'a aucun effet sur la conversion de la big ET-1 (Doherty, 1992; Masaki et Yanagisawa, 1992; Okada *et al.*, 1990). L'ECE est donc une métalloendopeptidase membranaire fortement glycosylée retrouvée dans les cellules endothéliales ou musculaires lisses des vaisseaux sanguins.

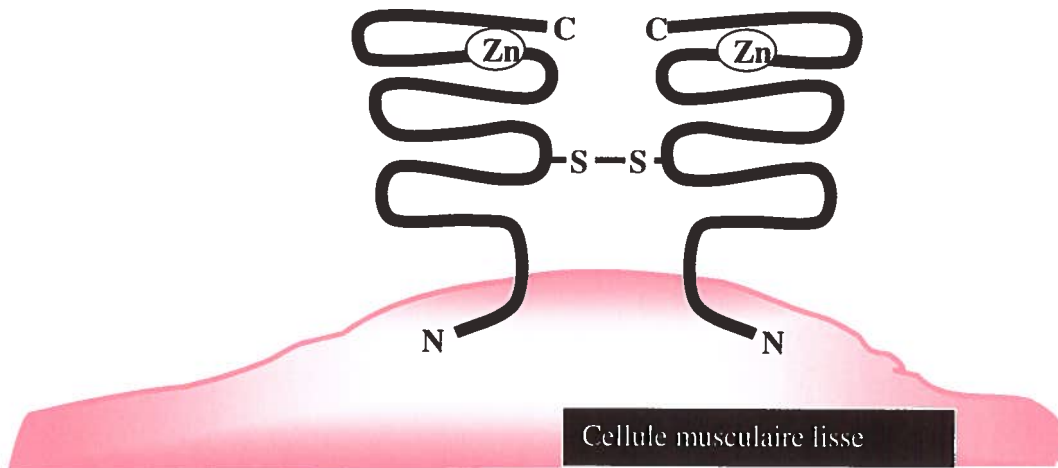


Figure 3 : Structure de l'*endothelin-converting enzyme-1* (ECE-1)

Il existerait deux isoformes de l'ECE : l'ECE-1 et l'ECE-2. Elles se différencieraient par leur structure moléculaire, leur distribution et par leur affinité pour les différentes formes de la big ET (Gray et Webb, 1996; Ortega Mateo et De Artinano, 1997; Okada *et al.*, 1990).

L'ECE- 1, retrouvée à la surface des cellules musculaires lisses, possède un pH optimal neutre et ne montre aucune spécificité entre les différentes isoformes de l'ET. Elle est sensible aux capteurs de métaux tels que l'acide éthylèneglycol-bis(β -aminoéthyléther)-N,N-tétraacétique et l'acide éthylènediamine tétraacétique, mais non à la pepstatine A. Elle existerait, en fait, sous la forme d'un dimère retenu par un lien disulfure (Emoto et Yanagisawa, 1995; Opgenorth, Wu-Wong et Shiosaki, 1992; Xu *et al.*, 1994) (Figure 3).

L'ECE-2, quant à elle, est plutôt retrouvée dans le cytosol des cellules endothéliales, probablement dans l'appareil de Golgi, et montre un pH optimal acide (5,5). Elle présente un patron de sensibilité aux inhibiteurs inverse à l'ECE-1, c'est à dire qu'elle est sensible à la pepsine A, mais non aux capteurs de métaux. De plus, elle est deux cents fois plus sensible au phosphoramidon que l'ECE-1. Enfin, à l'inverse de celle-ci, l'ECE-2 possède une affinité accrue envers big ET-1 par rapport à big ET-2 et big ET-3 (Emoto et

Yanagisawa, 1995; Opgenorth, Wu-Wong et Shiosaki, 1992).

L'ECE-2 semble avoir le rôle principal dans la conversion des big ETs en agissant directement à l'intérieur des cellules endothéliales afin de permettre la sécrétion majoritaire d'ET-1 sous sa forme mature. L'ECE-1, dans la membrane des cellules musculaires vasculaires, aurait plutôt un rôle secondaire en clivant de façon non sélective les big ETs en circulation. Les peptides matures pourraient ainsi agir directement sur ces cellules musculaires pour entraîner leur contraction (Opgenorth, Wu-Wong et Shiosaki, 1992).

1.6. Catabolisme:

L'ET n'est en fait probablement pas une hormone circulante puisque sa concentration plasmatique est d'environ 1 fmole/mL ce qui n'est pas suffisant pour induire la vasoconstriction (Battistini, D'Orléans-Juste et Sirois, 1993; Howard, Plumpton et Davenport, 1992). En fait, après la biosynthèse de l'ET, le peptide semble majoritairement sécrété à la surface basolatérale des cellules endothéliales (Wagner *et al.*, 1992; Yoshimoto *et al.*, 1991). Une fois libéré dans l'espace interstitiel, il agit sur les cellules musculaires pour générer la constriction. La concentration d'ET dans le liquide interstitiel baignant le tissu vasculaire est en fait cent fois plus élevée que la concentration plasmatique. Cependant, la majorité du peptide dans l'espace interstitiel est lié aux récepteurs (Battistini, D'Orléans-Juste et Sirois, 1993; Waggoner, Genova et Rash, 1992). L'ET semble être une hormone paracrine qui, une fois libérée par les cellules endothéliales, agit localement sur les cellules du muscle lisse sous-jacent.

Afin de conserver une concentration faible d'ET circulante, le peptide est rapidement dégradé. Abassi et son équipe (1992) ont montré que l'injection d'un inhibiteur de la NEP le SQ-29,072 à un rat avait pour effet d'augmenter la concentration plasmatique d'ET. En effet, l'ET, comme plusieurs autres hormones peptidiques telles que le peptide natriurétique, la substance P, la bradykinine et les enképhalines (Erdos et Skidgel, 1989), est dégradée par la métalloendopeptidase I, mieux connue sous le nom de NEP ou

enképhalinase. Cette enzyme présente à la surface plasmatique de plusieurs organes, clive de façon non sélective l'ET pour l'inactiver (Fagny *et al.*, 1991; Sokolovski, 1991; Vijayaraghavan *et al.*, 1990).

1.7. Récepteurs:

Suite à la libération d'ET dans l'espace interstitiel, le peptide se lie à son ou ses récepteurs situés soit sur les cellules endothéliales elles-mêmes ou sur les cellules musculaires sous-jacentes. Cette liaison engendre dans un premier temps une vasodilatation qui est rapidement suivie d'une vasoconstriction. Ces deux phases de la réponse à l'ET possèdent des caractéristiques pharmacologiques différentes. En effet, la réponse hypotensive semble être provoquée indifféremment par l'ET-1, l'ET-2 ou l'ET-3. Cependant, la réponse hypertensive est, quant à elle, engendrée préférentiellement par l'ET-1 et l'ET-2 plutôt que l'ET-3. Il était présagé que ces deux effets biologiques de l'ET étaient générés par des récepteurs distincts (Kloog *et al.*, 1989; Spokes, Ghatei et Bloom, 1989). Des essais de liaison faits non seulement sur différents tissus, tels que des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses de vaisseaux sanguins en culture, mais aussi sur des tissus extravasculaires tels que l'utérus et le cerveau, ont montré deux patrons de liaison distincts, renforçant ainsi l'idée de l'existence de deux récepteurs (Badr *et al.*, 1989; Fu *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1989; Kloog *et al.*, 1989; Loffler et Lohrer, 1991; Maggi *et al.*, 1989; Rovero *et al.*, 1990). Des études pharmacologiques menées sur le système vasculaire, mais à l'extérieur de l'aorte sont venues aussi renforcer cette idée. Par exemple, Cardell et son équipe ont observé que l'ET-3 est moins puissante que l'ET-1 et l'ET-2 pour induire la constriction de l'artère pulmonaire de cobaye, alors que les trois isoformes sont équipotentes pour engendrer la contraction de la trachée (Cardell, Uddman et Edvinsson, 1992).

En 1989, Maggi et son équipe identifièrent le premier analogue peptidique capable de discriminer les récepteurs de l'ET. Cet analogue, constitué du segment C-terminal 16-21 de l'ET-1, engendre la constriction de préparations de bronches de cobaye, mais est complètement inactif sur des préparations d'aortes de rat dénudées de leur endothélium.

On nomma donc ET_A le récepteur de l'ET retrouvé sur l'aorte et ET_B le récepteur responsable de la bronco-constriction (Doherty, 1992).

L'examen du génome de mammifères a permis effectivement d'identifier deux types de récepteurs de l'ET (Arai *et al.*, 1990; Hosoda *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1991; Nakamuta *et al.*, 1991; Ogawa *et al.*, 1991; Sakamoto *et al.*, 1991; Sakurai *et al.*, 1990). Ces deux récepteurs diffèrent autant au niveau de leur structure primaire, que de leur distribution, mais aussi en ce qui a trait à leur affinité pour les trois isoformes de l'ET. En effet, le récepteur ET_A se retrouve surtout sur les cellules musculaires lisses du système vasculaire. Il présente une affinité plus grande pour l'ET-1 et l'ET-2 que pour l'ET-3. Par exemple, chez l'homme ET_A possède une affinité mille fois supérieure pour ET-1 par rapport à ET-3 (Hosoda *et al.*, 1991). La stimulation de ce récepteur entraîne une puissante vasoconstriction (Doherty, 1992; Masaki et Yanagisawa, 1992). Le récepteur ET_B possède, quant à lui, une plus vaste distribution dans l'organisme, il ne présente aucune spécificité pour l'une ou l'autre des isoformes de l'endothéline (Sakamoto *et al.*, 1991). À l'origine, on croyait que le récepteur ET_B était responsable, dans le système vasculaire, de l'effet hypotenseur de l'ET-1. Cependant, à l'aide du segment ET-1 (16-21) et d'antagonistes spécifiques, il fut possible de démontrer l'existence de deux sous types de récepteurs ET_B dans le système vasculaire. Ces récepteurs, bien qu'ils soient issus du même gène et qu'ils possèdent donc la même structure primaire, diffèrent au niveau de leur distribution, mais aussi de leurs caractéristiques pharmacologiques : l'un étant vasodilatateur et l'autre causant plutôt un effet vasoconstricteur. En effet, on observa chez le lapin dans la veine jugulaire et dans la saphène, une vasoconstriction spécifique au récepteur ET_B (Moreland *et al.*, 1992; Sumner *et al.*, 1992). Il fait donc maintenant consensus que le récepteur ET_{B1}, situé sur les cellules endothéliales, est responsable de l'effet hypotenseur de l'ET via le relargage de facteurs tels que le NO et le PGI₂ (Doherty, 1992; Masaki et Yanagisawa, 1992). Ce récepteur est sensible à l'antagoniste PD142893 (Warner *et al.*, 1993). Le récepteur ET_{B2} est, quant à lui, situé sur les cellules musculaires lisses, et engendre une vasoconstriction (Doherty, 1992; Masaki et Yanagisawa, 1992). Celui-ci n'est pas affecté par le PD 142893 (Sudjarwo *et al.*, 1993).

Il existerait un troisième récepteur de l'ET : ET_C. Celui-ci semble posséder une affinité plus grande pour l'ET-3 que pour les deux autres isoformes. Cependant, ce récepteur n'a été cloné que chez la grenouille africaine *Xenopus laevis* (Karne, Jayawickreme et Lerner, 1993; Kloog *et al.*, 1989). Des études menées sur le génome de mammifères, incluant l'humain, n'ont jamais montré l'existence de ce récepteur (Haendler, Hechler et Schleuning, 1992; Sakamoto *et al.*, 1991).

Les récepteurs de l'endothéline sont constitués d'une chaîne, variant de 420 à 450 acides aminés, repliée de façon à former sept domaines transmembranaires chacun formé de 20 à 27 acides aminés. L'extrémité amino-terminale des récepteurs, comprenant entre 75 et 100 résidus, est orientée vers l'extérieur de la cellule alors que leur extrémité carboxy-terminale, retrouvée du côté cytoplasmique de la membrane, est couplée à une protéine G (Arai *et al.*, 1990; Karne, Jayawickreme et Lerner, 1993; Sakurai *et al.*, 1990). Les récepteurs de l'ET font donc partie de la superfamille des récepteurs de la rhodopsine (Birnbaumer, Abramowitz et Brown., 1990) (Figures 4 et 5).

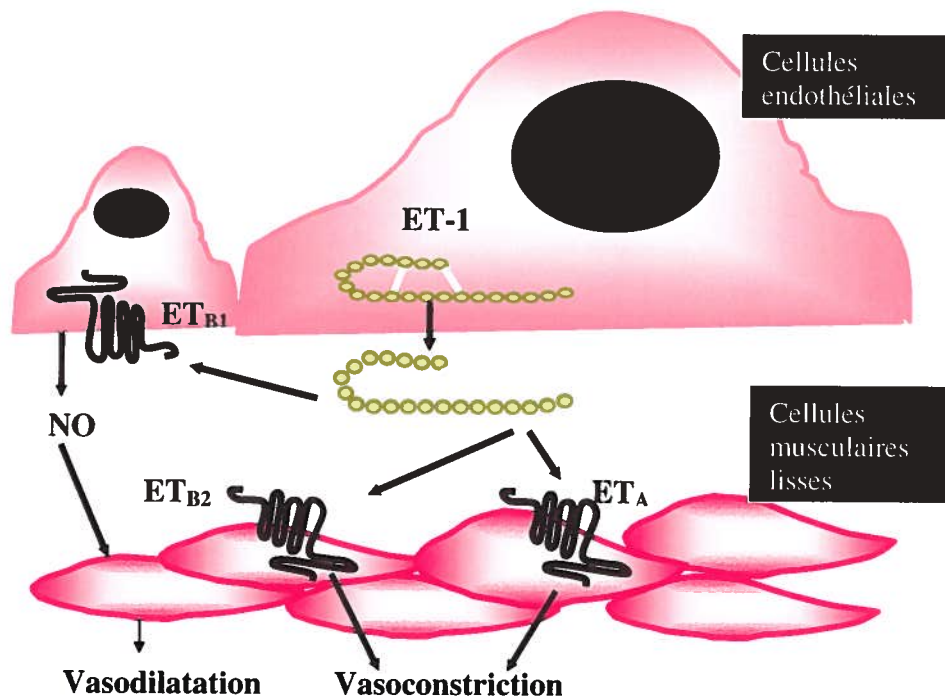


Figure 4 : Les récepteurs de l'endothéline-1

Il existe 60% d'homologie entre les séquences primaires des récepteurs ET_A et ET_B (Karne, Jayawickreme et Lerner, 1993). Chacune de ces séquences en acides aminés est hautement conservée entre les espèces. En effet, Haendler et son équipe (1992) ont observé 89% d'identité entre les récepteurs ET_B d'origine humaine et bovine, alors que la séquence issue du rat partage 88% d'identité avec celle d'origine humaine. Le récepteur ET_A humain, quant à lui, présente une identité de séquence supérieure à 92% avec celle du rat et du bœuf (Haendler, Hechler et Schleuning, 1992) (Figure 6). Des analyses par hybridation in situ ont montré des séquences retrouvées sur les chromosomes 4 et 13 codant pour les récepteurs ET_A et ET_B respectivement. Le patron d'épissage des exons versus celui des introns, très semblable pour les deux gènes, suggère une origine évolutive commune pour les deux récepteurs (Arai *et al.*, 1993; Hosoda *et al.*, 1992).

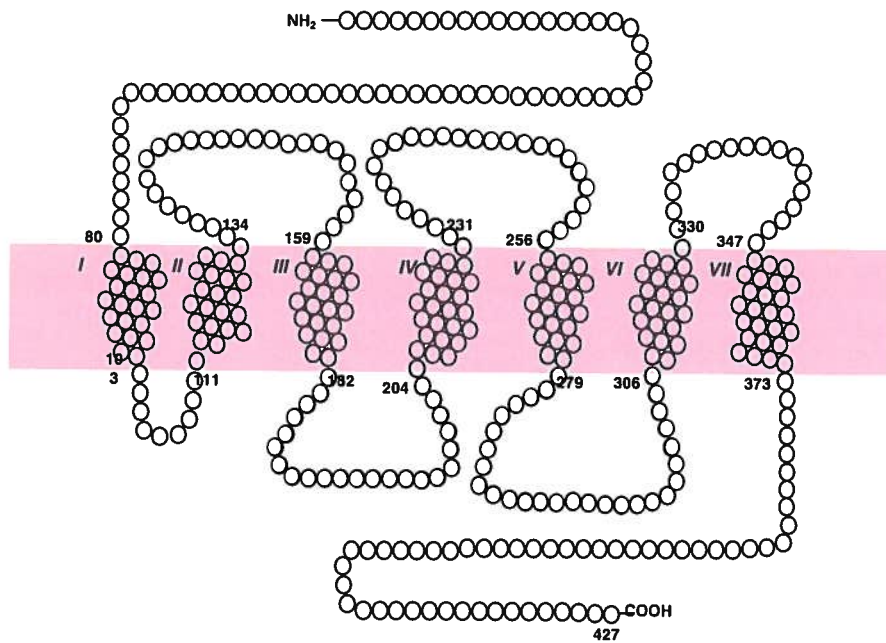


Figure 5 : Structure du récepteur ET_A humain.

I 80
Hu ETAmetlclrasfwlalgvcisdnperystnLshvddfttfrgT.....elsflvtthqptnlvl
Bo ETAmetfwlrifswvalvgvisdnpesystnLsihdsvatfhgT.....elsfvvtthqptnlal
Rt ETAmgvlcfilasfwlalgvgaiadnaerysanLshvedftpfpgT.....efdfllgttlrppnlal
Hu ETB mqpppslcgralvalilacglisriwgeergfppdratp.Llqtaiemtppktlwpkgsnaslarslapeavpkgdrtag
Bo ETB mqplpslcgralvalilacgvagiqaeerefpagatqplpgtgemmetpteTswpgrsnasdrssatpqiiprggrmag
Rt ETB mqssasrcgralvalilacgllgvwgekrgrfppaqatpslgtkevmtpptkTswtrgsnsslmrftrt.aevtkggrvag
Cons. -----L-----T-----

81 I II 160
Hu ETA psngsm.hnyCpqqtkItsaFKYINTviSctiFivGmvGNatLLRIIYqNKCMRNGPNALIASLALGDLiyvvIDIPInv
Bo ETA psngsm.hnyCpqqtkItsaFKYINTviSctiFivGmvGNatLLRIIYqNKCMRNGPNALIASLALGDLiyvvIDIPInv
Rt ETA psngsm.hgyCpqqtkIttaFKYINTviSctiFivGmvGNatLLRIIYqNKCMRNGPNALIASLALGDLiyvvIDIPInv
Hu ETB spprtispppCqgpieIketFKYINTvvsclvFvIgiGNsTLLRIIYqNKCMRNGPNiLIASLALGDLhihiIDiPiNa
Bo ETB ipprt...pppCdgpieIketFKYINTvvsclvFvIgiGNsTLLRIIYqNKCMRNGPNiLIASLALGDLhihiIDiPiNa
Rt ETB vpprsf.pppCqrkieInktFKYINTvvsclvFvIgiGNsTLLRIIYqNKCMRNGPNiLIASLALGDLhihiIDiPiNa
Cons. -----C-----I---FKYINT--SC--F--G--GN-TLLRIIY-NKCMRNGPN-LIASLALGDL----ID-PIN-

161 III IV
Hu ETA fKLLAgrWPfdhndFGvflCKLFPFIQKsSVGITVLnLCALSVDRYAVASWSRvqGIGiPlvTAiEIVsIWlSfiLai
Bo ETA fKLLAgrWPfeqndFGvflCKLFPFIQKsSVGITVLnLCALSVDRYAVASWSRvqGIGiPlvTAiEIVsIWlSfiLai
Rt ETA fKLLAgrWPfdhndFGvflCKLFPFIQKsSVGITVLnLCALSVDRYAVASWSRvqGIGiPlvTAiEIVsIWlSfiLai
Hu ETB yKLLAedWP....FGaemCKLvPFiQKaSVGITVLsLCALSiDRYAVASWSRikGIGvPkwTAVEIVlIWvvSvvLAV
Bo ETB yKLLAkdWP....FGvemCKLvPFiQKaSVGITVLsLCALSiDRYAVASWSRikGIGvPkwTAVEIVlIWvvSvvLAV
Rt ETB yKLLAgdWP....FGaemCKLvPFiQKaSVGITVLsLCALSiDRYAVASWSRikGIGvPkwTAVEIVlIWvvSvvLAV
Cons. -KLLA--WP-----FG---CKL-PF-QK-SVGITVL-LCAL-S-DRYAVASWSR--GIG-P--TA-EIV-IW--S--LA-

V 320
Hu ETA PEAiGFvmvpfeyrGeqhktCmLn..atskfMeFYqdvKDWWLFgFYFCmPLvcTAiFYTLMTCEMLnRrngslrIALse
Bo ETA PEAiGFvmvpfeykGaqrhtCmLn..atskfMeFYqdvKDWWLFgFYFCmPLvcTAiFYTLMTCEMLnRrngslrIALse
Rt ETA PEAiGFvmvpfeykGeqrhtCmLn..atrkfMeFYqdvKDWWLFgFYFCmPLvcTAiFYTLMTCEMLnRrngslrIALse
Hu ETB PEAiGFdiitmdykGsyliCiLhpvqktaFMqFYktaKDWWLFsFYFCiPLaiTAfFYTLMTCEML.RkksqmqIALnd
Bo ETB PEAvgFdiitsdhiGnkliCiLhptqktaFMqFYktaKDWWLFsFYFCiPLaiTAfFYTLMTCEML.RkksqmqIALnd
Rt ETB PEAiGFdvitsdykGkplrvCmLnfpqktaFMqFYktaKDWWLFsFYFCiPLaiTAfFYTLMTCEML.RkksqmqIALnd
Cons. PEA-GF-----G-----C-L-----FM-FY--KDWWLF-FYFC-PL--TA-FYTLMTCEML-R-----IAL--

321 VI VII 400
Hu ETA HLKQRREVAKTVFCLVvifALCWfPLHLSRILKkTvYnemdknRCElLSFLLmDYIGINlAtmNSCINPIALYfVSKkF
Bo ETA HLKQRREVAKTVFCLVvifALCWfPLHLSRILKkTvYdemdknRCElLSFLLmDYIGINlAtmNSCINPIALYfVSKkF
Rt ETA HLKQRREVAKTVFCLVvifALCWfPLHLSRILKkTvYdemdknRCElLSFLLmDYIGINlAtmNSCINPIALYfVSKkF
Hu ETB HLKQRREVAKTVFCLVvifALCWlPLHLSRILKlTlYnqndpnRCElLSFLLvDYIGINmAslNSCINPIALYlVSKrF
Bo ETB HLKQRREVAKTVFCLVvifALCWlPLHLSRILKlTlYdqhdprRCEfLSFLLvDYIGINmAslNSCINPIALYlVSKrF
Rt ETB HLKQRREVAKTVFCLVvifALCWlPLHLSRILKlTlYdqsnppRCElLSFLLvDYIGINmAslNSCINPIALYlVSKrF
Cons. HLKQRREVAKTVFCLV--FALCW-PLHLSRILK-T-Y-----RCE-LSFLL--DYIGIN-A--NSCINPIALY-VSK-F

401 451
Hu ETA KNCFqSCLCCcCyQskslmtSvpmngtsiqwKnhdqnnhNtdRSShKdSmn
Bo ETA KNCFqSCLCCcCyQskslmtSvpmngtsiqwKnhqnnhNterSShKdSin
Rt ETA KNCFqSCLCCcChQskslmtSvpmngtsiqwKneqnn.hNterSShKdSmn
Hu ETB KNCFkSCLCCwC.QsfeekqSleekqsklKfKandhgydNf.RSSnKySss
Bo ETB KNCFkSCLCCwC.QsfeekqSleekqsklKfKandhgydNf.RSSnKySss
Rt ETB KNCFkSCLCCwC.QtfeekqSleekqsklKfKandhgydNf.RSSnKySss
Cons. KNCF-SCLCC-C-Q-----S-----K-----N--RSS-K-S--

Figure 6: Comparaison de la structure primaire des récepteurs ET_A et ET_B d'origines humaine, bovine et de rongeur (Haendler, Hechler et Schleuning, 1992).

1.8. Identification des sites de liaison des récepteurs :

La structure tridimensionnelle des récepteurs permet la formation de sites d'interaction avec le peptide, mais aussi avec les différents constituants de la protéine G, en plus de former des points d'ancrage de la protéine dans la bicouche lipidique. Les sept segments hautement hydrophobes permettent non seulement de bien fixer le récepteur dans la membrane plasmique, mais aussi de stabiliser la structure tridimensionnelle de la chaîne protéique pour permettre la formation de ces sites d'interaction.

L'identification du site de liaison de l'ET sur chacun de ces récepteurs demeure un sujet d'étude de pointe. Des travaux menés sur les récepteurs ET_A et ET_B, ayant leur segment amino-terminal extracellulaire tronqué, montrent l'importance de ce segment pour le récepteur ET_A. En effet, lorsque ce récepteur est écourté de plus de 25 acides aminés, on observe alors une diminution radicale de l'affinité pour l'ET-1 (Hashido *et al.*, 1992). Les auteurs suggèrent alors que le récepteur ET_A doit conserver au minimum un site de glycosylation pour maintenir son affinité pour ET-1. Cette hypothèse est corroborée par l'équipe de Devesly (1991) qui ont observé une forte diminution de l'affinité de l'ET-1 pour des cellules exprimant le récepteur ET_A lorsque celles-ci sont exposées à l'agglutinine de germe de blé. Cependant, le profil pharmacologique de l'ET-1 semble inchangé lors du traitement de cellules exprimant le récepteur ET_A avec une endoglycosidase (Bousso-Mittler, Galron et Sokolovsky, 1991). Les sucres retrouvés sur le segment amino-terminal extracellulaire du récepteur ET_B ne semblent pas jouer de rôle important pour la liaison du ligand. Le retrait complet de cette portion ne semble pas affecter l'affinité de l'ET-1 pour ce récepteur (Akiyama *et al.*, 1992; Kozuka *et al.*, 1991). De plus, l'exposition de cellules exprimant ET_B à la sialidase de même que son expression dans des bactéries telles que *E. coli* ne changent pas son profil pharmacologique (Bousso-Mittler, Galron et Sokolovsky, 1991; Haendler *et al.*, 1993). Le segment carboxy-terminal du récepteur ET_B pourrait cependant avoir un rôle secondaire dans la stabilisation du complexe ligand-récepteur tel que suggéré par des études par mutagenèse dirigée (Takasuka *et al.*, 1994).

La fabrication et l'expression de récepteurs hybrides ou mutés permettent de suggérer quels sont les segments responsables de la liaison et de la sélectivité du récepteur ET_A envers les isoformes de l'ET. À ce titre, le second segment transmembranaire et sa boucle extracellulaire semblent jouer un rôle clé pour la liaison de l'ET-1. Plus précisément, la Lys¹⁴⁰ retrouvée à l'intérieur de ce segment serait essentielle puisque son remplacement par une Ile entraîne une importante diminution de la liaison de l'ET-1. De plus, cette mutation semble rendre le récepteur incapable d'interagir correctement avec la protéine G puisque aucune élévation de la concentration calcique intracellulaire n'était observée (Adachi, Furuichi et Miyamoto, 1994a). Cependant, le remplacement de l'His¹⁵⁰ dans ET_B homologue à la Tyr¹²⁹ dans ET_A, par une Ala ou une Tyr ne change pas le profil pharmacologique non sélectif du récepteur ET_B (Lee *et al.*, 1994b). Les travaux de Sakamoto et collaborateurs (1993a et b) ont aussi montré l'importance de ce segment pour la liaison du BQ123, un antagoniste compétitif spécifique au récepteur ET_A. De plus, le remplacement de la Tyr¹²⁹, également située dans le second segment transmembranaire, au moyen d'une Ala, Gln, Asn, Lys, His ou Ser, entraîne une augmentation de l'affinité du récepteur ET_A pour l'ET-3 ainsi que pour la SRTX-c. Ce résidu semble donc établir une interaction privilégiée avec l'ET-1 expliquant ainsi la sélectivité de ce récepteur (Lee *et al.*, 1994b). Ces résultats sont corroborés par l'équipe de Krystek (1994), qui eux avaient observé que le remplacement de Tyr¹²⁹ par Ala avait pour effet de diminuer la sélectivité du récepteur ET_A. En effet, ils ont observé que l'affinité de l'ET-3 et de la SRTX-c était augmentée alors que celle des antagonistes BQ123 et BMS182874 était diminuée. Finalement, les équipes de Adachi et coll. (1994b) et de Webb (1996) ont publié des résultats similaires en utilisant des antagonistes différents, spécifiques pour l'un ou l'autre des récepteurs ET_A et ET_B, sur le récepteur ET_A dans lequel la Tyr¹²⁹ avait été remplacée par une Ala. Ces études démontrent l'importance du résidu Tyr situé à l'extrémité C-terminale du deuxième segment transmembranaire. Cet acide aminé pourrait être impliqué dans une interaction entre résidus aromatiques et/ou pont hydrogène avec l'ET. La technique de photomarquage a récemment identifié le cinquième passage transmembranaire, plus précisément entre les résidus 257 et 278, comme étant aussi un élément important du site de liaison de l'ET au récepteur ET_A (Tessier *et al.*, 2005).

La construction de récepteurs chimériques fournit aussi des indices sur les éléments importants pour la sélectivité des récepteurs pour leurs ligands. Le remplacement du premier segment extracellulaire du récepteur ET_A par la même portion du récepteur ET_B entraîne une diminution importante de la liaison du BQ123 alors que le remplacement des autres segments extracellulaires n'affecte pas l'affinité de cet antagoniste pour le récepteur (Adachi *et al.*, 1992). De la même façon, Sakamoto et son équipe (1993b) ont montré que les passages transmembranaires 1, 2, 3 et 7 et leurs segments extracellulaires adjacents du récepteur ET_A sont importants pour la liaison et la sélectivité du ligand de même que pour l'activation de la protéine G. Il a été suggéré que le troisième segment intracellulaire joue un rôle crucial dans l'activation de cette dernière pour conduire à la vasoconstriction (Takagi *et al.*, 1995). Finalement, l'équipe de Hashido (1993) a corroboré cette hypothèse par l'expression de récepteurs tronqués à la surface de cellules COS-7 et CHO. Ils ont ainsi déterminé qu'une délétion de 16 acides aminés situés à l'extrémité C-terminale du troisième segment intracellulaire diminuait sévèrement l'activité biologique reliée à la liaison de l'ET-1.

Les études menées avec des chimère-s du récepteur ET_B ont conduit à l'identification des segments transmembranaires 4, 5 et 6 comme étant des éléments clés pour la liaison de l'ET-3, de l'IRL1620 et du BQ3020, trois agonistes spécifiques à ce récepteur (Krystek *et al.*, 1994; Sakamoto *et al.*, 1993b). La mutation de Lys¹⁸², située dans le troisième segment transmembranaire, par Arg, Ala, Met, Asp ou Glu a présenté des profils pharmacologiques semblables pour l'ET-1, mais l'ET-2, l'ET-3 et la SRTX-c se sont avérées entre 10 et 1000 fois moins puissantes sur les variants par rapport au récepteur naturel. Ces mêmes récepteurs mutés avaient pratiquement perdu toute affinité pour des antagonistes non peptidiques tels que le (±)-SB209670 et le Ro46-2005 (Lee *et al.*, 1994a). Ces résultats suggèrent que la chaîne latérale de Lys¹⁸² contribue directement à la liaison de haute affinité de ces antagonistes par la formation d'un lien hydrogène. Aussi, les antagonistes non peptidiques de la famille du (±)-SB209670 et du Ro46-2005 semblent partager le même site de liaison que les agonistes ET-2, ET-3 et SRTX-c. De plus, des études récentes de photomarquage, menées dans nos laboratoires, ont montré

que le cinquième passage transmembranaire comme site de liaison de l'IRL1620 (Boivin *et al.*, 2004).

Finalement, les segments intracellulaires 2 et 3 semblent importants à l'interaction entre le récepteur et la protéine G (Takagi *et al.*, 1995). Plus particulièrement, la Cys⁴⁰² située dans la portion C-terminale intracellulaire semble cruciale pour l'activation de cette dernière (Koshimizu *et al.*, 1995).

Globalement, il a été proposé que les récepteurs ET_A et ET_B puissent être séparés en 2 domaines : le domaine «message» composé des domaines transmembranaires I, II, III et VII, et le domaine «adresse» incluant les passages IV, V et VI (Sakamoto *et al.*, 1993a et b). Plus particulièrement, les études semblent indiquer que le second segment transmembranaire du récepteur ET_A, incluant la Tyr-129 et la Lys-140, et le troisième passage transmembranaire du récepteur ET_B comprenant la Lys-182, semblent importants pour le maintien de l'activation de ces récepteurs par l'ET.

1.9. Mécanismes de transduction de signal :

La liaison du ligand entraîne des modifications allostériques de la structure du récepteur stabilisant ce dernier dans sa conformation active. La protéine G qui lui est accrochée est ainsi altérée, ce qui entraîne soit l'activation, ou la désactivation de protéines effectrices situées à l'intérieur ou sous la membrane plasmique. Cette cascade d'événements intracellulaires est responsable des effets générés par le ligand tels que la vasoconstriction engendrée par l'ET-1.

L'augmentation de la tension vasculaires passe par l'activation de la phospholipase C (PLC). Cette enzyme une fois activée utilise le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), un phospholipide mineur de la membrane plasmique, pour produire deux seconds messagers : l'inositol-triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) (Araki *et al.*, 1989; Kasuya *et al.*, 1989b; Rapoport, Staudermann et Highsmith, 1990; Resink, Scott-Burden et Buhler, 1988; Van Renterghem *et al.*, 1988). Une fois l'IP₃ produit, celui-ci peut lier les

canaux calciques dont l'ouverture est responsable de la mobilisation du calcium du réticulum sarcoplasmique (Bialecki *et al.*, 1989; Kai *et al.*, 1989; Simpson et Ashley, 1989). La production de DAG, qui peut durer au-delà de vingt minutes (Muldoon *et al.*, 1989), ainsi que l'arrivée massive d'ions Ca^{++} activent à leur tour la protéine kinase C (PKC). Cette dernière enzyme, sous sa conformation active, transfère un groupement phosphate terminal de l'ATP à des résidus Ser ou Thr spécifiques situés sur des protéines cibles ce qui les active ou désactive à leur tour. Sur les cellules musculaires lisses vasculaires, les esters de phorbol miment l'effet de l'ET-1 en induisant une contraction forte et soutenue et on observe alors la phosphorylation de la même protéine effectrice de 76 kDa (Nishizuka, 1989). De plus, la staurosporine ainsi que d'autres inhibiteurs de la PKC bloquent complètement l'effet de l'ET-1 (Griendling, Tsuda et Alexander, 1989; Nishizuka 1989). La phosphorylation de certaines protéines effectrices via l'activation de la PKC semble donc être à l'origine de la transmission du message de l'ET-1 vers l'intérieur de la cellule pour ainsi engendrer les effets biologiques tels que la vasoconstriction (Figure 7).

La PKC, une fois activée, peut phosphoryler certaines protéines musculaires, les rendant plus sensibles aux effets du calcium, et ainsi potentialiser la contraction musculaire engendrée par ce dernier. En effet, l'ET-1 peut causer une vasoconstriction même en absence d'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, ce qui suggère qu'une sensibilisation de la machinerie contractile serait aussi responsable de la vasoconstriction (Sunako *et al.*, 1989). De plus, des études rapportent que certaines chaînes de la myosine et de la calmoduline seraient phosphorylées lors de l'exposition de cellules musculaires lisses vasculaires à l'ET-1 (Abe *et al.*, 1991; Adam *et al.*, 1990).

Suite à la liaison de l'ET-1, on observe dans un premier temps, une élévation rapide de la concentration calcique à l'intérieur de la cellule musculaire vasculaire qui ne semble pas dépendre de la concentration en ion Ca^{++} extracellulaire ni des canaux calciques (Bialecki *et al.*, 1989; Danthuluri et Brook, 1990; Iijima *et al.*, 1991; Kai *et al.*, 1989; Muldoon *et al.*, 1989). Puisque cet effet est inhibé par la caféine et la ryanodine, les ions calciques

proviennent vraisemblablement du réticulum sarcoplasmique (Kai *et al.*, 1989; Wagner-Mann et Sturek, 1991).

Cette première vague pourrait être secondée par un apport plus lent mais soutenu d'ions Ca^{++} provenant du milieu extracellulaire. Cependant, beaucoup d'études ont été menées sur le sujet et aucun consensus ne semble se dégager de celles-ci. À l'origine Yanagisawa et son équipe (1988a) rapportaient que la contraction de l'artère pulmonaire, engendrée par l'ET-1, était affectée par la concentration calcique extracellulaire et par le verapamil, un antagoniste des canaux calciques de type 2. Cependant, d'autres études faites sur différents tissus vasculaires et non vasculaires ont fourni des résultats contradictoires selon la dose d'ET-1 et les antagonistes utilisés. En effet, certaines études rapportent une diminution significative de l'effet de l'ET-1 par des antagonistes des canaux calciques (Egashira *et al.*, 1990; Encabo *et al.*, 1992; Sakata *et al.*, 1989), alors que d'autres recherches montrent plutôt un effet marginal (Blackburn et Highsmith, 1990; Chabrier *et al.*, 1989; Wallnofer *et al.*, 1989). Cependant, les résultats obtenus sur les canaux calciques eux-mêmes montrent clairement que l'ET-1 ne compétitionne pas avec les ligands naturels de ceux-ci (Gu *et al.*, 1989; Hamilton, Frew et Lundy, 1989; Kasuya *et al.*, 1989a; Kasuya *et al.*, 1989b). D'autre part, ces antagonistes des canaux calciques n'interfèrent pas non plus dans la liaison de l'ET-1 sur des cellules musculaires vasculaires en culture ni sur des préparations de vaisseaux sanguins (Clozel, 1989; Gardner *et al.*, 1992; Hirata *et al.*, 1988). Il semble donc que l'ET-1 n'interfère pas directement avec les canaux calciques de type 2 et que l'augmentation de la concentration d'ions Ca^{++} intracellulaire en provenance du milieu extracellulaire pourrait être la conséquence d'un effet indirect sur les canaux voltage dépendant (Danthuluri et Brook, 1990; Iijima *et al.*, 1991; Klochner et Isenberg, 1991; Lee, Leikauf et Sperelakis, 1990; Meyer Lehnert *et al.*, 1989; Naitoh *et al.*, 1990; Nakao *et al.*, 1990; Okada, Ishikawa et Saito, 1991; Van Renterghem *et al.*, 1988; Wallnofer *et al.*, 1989).

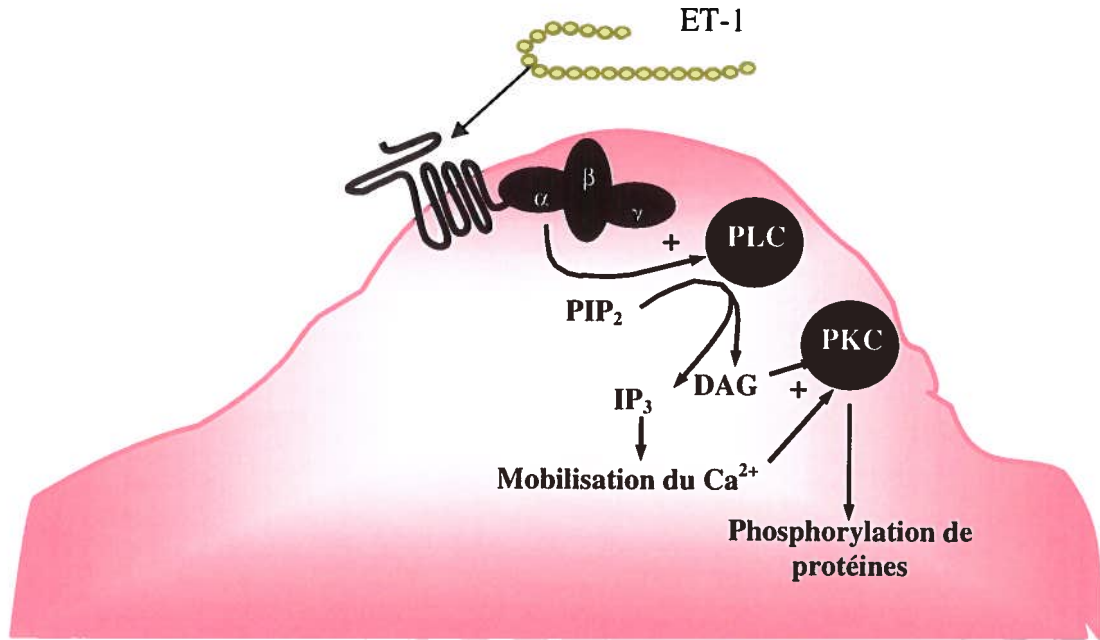


Figure 7 : Mécanismes de transduction de signal

La phosphorylation des canaux antiporteurs Na^+/H^+ par la PKC a pour effet de diminuer le pH intracellulaire (Koh *et al.*, 1990; Lonchampt *et al.*, 1991; Rosati *et al.*, 1990). L'abaissement du pH ainsi généré pourrait, par exemple, être à l'origine de l'effet isotropique positif de l'ET-1 (Ishikawa *et al.*, 1988; Watanabe *et al.*, 1989a; Watanabe *et al.*, 1989b).

L'effet mitogène de l'ET-1 suggère une action à plus long terme de l'ET-1 sur les fonctions cellulaires. Cette modulation passe vraisemblablement via la modification de l'expression de certains gènes engendrant ainsi des changements adaptatifs dans plusieurs tissus. Ces mécanismes pourraient expliquer l'implication de l'ET-1 dans divers phénomènes incluant le remodelage vasculaire et l'hypertrophie cardiaque de même que dans certaines physiopathologies telles que l'artériosclérose et l'asthme (Simonson et Dunn, 1990). L'ET-1 a effectivement été décrite comme étant un modulateur de plusieurs gènes dont c-Foc et Myc dans les cellules musculaires vasculaires et 3T3 dans les fibroblastes (Komuro *et al.*, 1988; Takuwa *et al.*, 1989).

1.10. Études structure-fonction:

Les pharmacophores sont les éléments du ligand essentiels à la liaison et à l'initiation des mécanismes de réponses par les récepteurs. Toutefois, l'arrangement tridimensionnel des pharmacophores est aussi très important puisque le ligand doit correspondre parfaitement à la topographie du récepteur afin de le stabiliser dans sa conformation active.

L'étude des pharmacophores d'une molécule peptidique débute généralement par l'exploration détaillée de la structure primaire. La contribution de chaque acide aminé à l'activité biologique peut être évaluée à l'aide d'analogues, contenant un ou plusieurs acides aminés différents de la molécule native, et/ou de fragments de celle-ci. Ainsi, plusieurs caractères physico-chimiques responsables des interactions avec le récepteur, tels que l'aromaticité, l'hydrophobicité, la chiralité, l'encombrement stérique et la charge électrique, peuvent ainsi être évalués. Ces études de structure-activité ont permis de déterminer les pharmacophores de plusieurs peptides tels que la substance P (Fournier *et al.*, 1982), le VIP (Fournier, Saunders et St-Pierre, 1984), le NPY (Forest et Fournier, 1990), le CGRP (Mimeault *et al.*, 1992), etc.

De la même façon, plusieurs études ont évalué certains des pharmacophores de la molécule d'endothéline. Il apparaît que ceux-ci sont différents pour chacun des deux types de récepteurs. En effet, les deux ponts disulfures ne semblent pas importants pour l'activation du récepteur ET_B. Des analogues linéaires, où des alanines remplacent les quatre cystéines, ont un pouvoir vasoconstricteur égal à l'ET-1 sur une préparation d'artère pulmonaire de lapin (tissu riche en récepteurs ET_B) (Pelton et Miller, 1991). Par contre, les ponts disulfures apparaissent importants pour le récepteur ET_A, puisque ces mêmes analogues linéaires sont inactifs sur ce dernier récepteur. (Aumelas *et al.*, 1991; Cody *et al.*, 1991; Dalgarno *et al.*, 1992; Forget *et al.*, 1996; Hirata *et al.*, 1989b; Hirata *et al.*, 1989c; Jones *et al.*, 1989; Kimura *et al.*, 1988; Kloog *et al.*, 1988; Pelton et Miller, 1991). Cependant, la présence du lien intramoléculaire reliant les positions 1 et 15 semble plus importante que celle du lien reliant les Cys 3 et 11 puisque l'analogue [Ala^{3,11}]ET-1 possède une certaine activité biologique alors que [Ala^{1,15}]ET-1 et [Ala^{1,3,11,15}]ET-1 sont

complètement inactifs sur des préparations riches en récepteurs ET_A (Lin et Lee, 1990; Nakajima *et al.*, 1989a). De plus, plusieurs études montrent que la formation des ponts croisés soit 1-11 et 3-15 est défavorisée et qu'elle conduit à des analogues inactifs (Kumagaye *et al.*, 1988; Kitazumi *et al.*, 1990; Tam *et al.*, 1994). Spinella et son équipe (1991) ont même suggéré qu'une cystéine libre sur le récepteur ET_A interagirait avec l'une des cystéines de l'endothéline pour ainsi stabiliser le complexe ligand-récepteur.

Il est important pour les deux types de récepteurs que l'extrémité N-terminale soit libre. En effet, l'acylation de cette extrémité mène à une molécule complètement inactive (Nakajima *et al.*, 1989b). L'extrémité carboxy-terminale libre semble aussi jouer un rôle dans l'activation du récepteur ET_A puisque l'amidation de l'ET-1 entraîne une forte diminution de l'activité biologique du peptide (Nakajima *et al.*, 1989a; Nakajima *et al.*, 1989b). Par contre, notre équipe a montré que la formylation du Trp²¹ ne diminue en rien l'activité vasoconstrictrice produite par l'ET-1 (Germain *et al.*, 1993). Cet analogue est cependant incapable de produire l'activité hypotensive transitoire qui précède normalement la constriction produite par l'ET-1. Pour expliquer le phénomène, il a été proposé que la présence du groupement formyle permettait de discriminer entre le récepteur ET_{B1} et ET_{B2} (Cardell, Uddman et Edvinsson., 1992; Filep *et al.*, 1992; Forget *et al.*, 1996). L'importance d'un résidu Trp en position C-terminale a été rapportée dans plusieurs études menées tant sur le récepteur ET_A que sur le récepteur ET_B (Kimura *et al.*, 1988; Kimura *et al.*, 1989; Nakajima *et al.*, 1989a; Rovero, Patacchini et Maggi, 1990; Tam *et al.*, 1994; Wanatabe *et al.*, 1991). Cependant, l'insertion d'un résidu aromatique à la position 21 semble tolérée. En effet, le remplacement de Trp par une Tyr ou une Phe entraîne une perte d'activité biologique d'un facteur 10 alors que l'insertion d'acides aminés aliphatiques tels que l'Ala ou l'Ile conduit à des analogues pratiquement inactifs (Koshi *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1989a).

Le segment 2 à 11 est la portion la plus variable entre les différentes isoformes de l'ET et des sarafotoxines. Il a été suggéré que ce segment pourrait être responsable de la discrimination entre les deux types de récepteurs (Sokolovsky, 1992). En effet, l'ET-1, l'ET-2, de même que les SRTX-a, -b et -d portent une charge nette de -1. Ceux-ci

présentent une affinité supérieure à celle de l'ET-3 et de la STRX-c qui ont respectivement une charge nette de 0 et -4. L'importance biologique du segment 8 à 10 chargé négativement a été démontrée en bloquant Asp⁸ et Glu¹⁰ par des fonctions amides. On observe alors une diminution importante de l'activité biologique sur des préparations d'artères pulmonaires de rat (Nakajima *et al.*, 1989a; Tam *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1991). De plus, la nécessité d'incorporer une fonction acide dans la structure des antagonistes des différents récepteurs démontre également le rôle essentiel joué par ce pôle (Jae *et al.*, 1997; Opgenorth, 1995).

Le remplacement successif des acides aminés du peptide par l'alanine ou l'isomère D de l'acide aminé a permis de déterminer l'importance de la nature et de l'orientation de la chaîne latérale de chaque résidu pour chacun des deux récepteurs. Ainsi Phe¹⁴, His¹⁶, Leu¹⁷, Asp¹⁸ et Trp²¹ ont été identifiés par plusieurs équipes comme étant des pharmacophores du récepteur ET_A (Galantino *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 1989a; Tam *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1991). Glu¹⁰, Phe¹⁴, Leu¹⁷, Asp¹⁸, Ile²⁰ et Trp²¹ seraient, quant à eux, essentiels à l'activation du récepteur ET_B (Galantino *et al.*, 1995; Saeki *et al.*, 1992, Tam *et al.*, 1994).

De façon plus globale, la portion N-terminale, incluant les ponts disulfures, et le segment hydrophobe 16-21 sont importants pour la liaison et l'activation du récepteur ET_A, de même que les extrémités carboxy- et N-terminales libres (Doherty, 1992; Ortega-Mateo et DeArtiana, 1997; Nakajima *et al.*, 1989b; Spinella *et al.*, 1991). Le segment hydrophobe 16-21 est également essentiel à l'activation du récepteur ET_B (Cody *et al.*, 1991, Forget *et al.*, 1996).

1.11. Structures secondaires

L'activité biologique des endothélines ainsi que leur affinité pour leurs récepteurs dépendent de la présence des pharmacophores. Toutefois, c'est l'orientation spatiale de ceux-ci qui leur permet d'interagir correctement avec les sites de liaison et d'activation des récepteurs. Plusieurs méthodes théoriques et spectroscopiques, telles que la

cristallographie, la résonance magnétique nucléaire (RMN), le dichroïsme circulaire et la modélisation moléculaire, permettent l'étude de la structure tridimensionnelle de protéines et de peptides. Un grand nombre d'études ont tenté de déterminer l'arrangement spatial de l'endothéline. Il n'y a cependant pas de consensus sur les structures secondaires et tertiaires qui composent la molécule, surtout au niveau du segment C-terminal.

Le segment 1 à 4 de la molécule d'ET est fortement contraint par la présence des deux ponts disulfures. Des études faites par RMN montrent que cette portion adopterait une structure globulaire rigide (Kuroda, Yamazaki et Taga, 1994). Cependant, par cristallographie, l'équipe de Wallace et Janes (1995) a plutôt proposé l'adoption d'une structure en feuillet β . Ce segment serait rattaché à un coude β induit par les deux ponts disulfures tel que démontré par RMN (Tamaoki *et al.*, 1991) mais aussi par dichroïsme circulaire (Aumelas *et al.*, 1991; Perkins, Hider et Barlow, 1990).

La partie médiane de la molécule adopterait une conformation en hélice α qui s'étendrait des résidus 9 à 15 (ou 16). La présence de cette conformation est suggérée par RMN (Krysteck *et al.*, 1991; Saudeck, Hoflack et Pelton, 1989; Tamaoki *et al.*, 1991), par dichroïsme circulaire (Perkins, Hider et Barlow, 1990), ainsi que par modélisation moléculaire. De plus, Aumelas et son équipe (1991) ont démontré par RMN et par prédiction géométrique des distances que cette hélice serait stabilisée par trois ponts hydrogènes impliquant les résidus 12, 13 et 14.

La conformation tridimensionnelle adoptée par la portion C-terminale semble varier beaucoup selon la méthode et le milieu utilisé pour l'investigation. Selon les travaux de Wallace et coll., (Wallace *et al.*, 1995; Wallace et Janes, 1995) cette portion serait plutôt flexible. En effet, la comparaison des différentes structures de l'ET-1 obtenues à l'aide de la diffraction des rayons X et par RMN, tout en respectant les contraintes imposées par les surfaces accessibles et l'encombrement stérique des chaînes latérales, montre de grandes différences de conformations. Certaines études par RMN d'analogues monosubstitués de l'ET-1 définissent plutôt la géométrie de la molécule comme étant étendue (Aumelas *et al.*, 1991; Dalgarno *et al.*, 1992). D'autres travaux de cristallographie avec l'ET-1

suggèrent même le prolongement de l'hélice α de la portion médiane jusqu'à la position 21 (Janes Peapus et Wallace, 1994). Finalement, d'autres encore proposent un repliement de la portion C-terminale vers le segment hydrophobe de la molécule de façon à ce que Trp²¹ soit près de Leu¹⁷ et Asp¹⁸ (Forget *et al.*, 1996; Saukek, Hoflack et Pelton, 1989). Ce postulat est corroboré par les études de l'équipe de Kuroda (1994) qui ont montré, à l'aide de la simulation de Monte-Carlo, la formation d'un environnement hydrophobe causé par le segment C-terminal replié vers l'hélice α de la partie N-terminale. Cet arrangement a aussi été observé lors d'une évaluation par RMN menée avec l'ET-3 (Mills *et al.*, 1992). La comparaison de la structure de l'ET-1 obtenue par cristallographie avec celle d'un antagoniste sélectif du récepteur ET_A, le BQ123, suggère aussi une juxtaposition spatiale des résidus Asp¹⁸ et Trp²¹ dans les deux molécules (Peishoff *et al.*, 1995).

1.12. Agonistes et antagonistes

Les études de structure-fonction ont mené au développement de plusieurs analogues peptidiques agonistes ou antagonistes sélectifs ou non envers les récepteurs ET_A et ET_B. D'abord, Maggi et son équipe (1989) ont identifié le premier fragment agoniste sélectif pour le récepteur ET_B. Cet analogue constitué du fragment 16-21 de l'ET-1, en plus de démontrer l'existence de deux récepteurs distincts, suggérait que 1) la molécule entière et que 2) les ponts disulfures ne sont pas nécessaires à l'activation des récepteurs. Partant de cette observation, plusieurs fragments linéaires ont été développés. Parmi ceux-ci on retrouve [Ala^{11,15}]ET-1 (6-21), [Ala^{11,15}]ET-1 (8-21) et Ac[Ala^{11,15}]ET-1 (10-21), tous présentant une activité antagoniste sélective envers ET_B (Saeki *et al.*, 1991). D'autres fragments, tels que le BQ3020 (Ac[Ala^{11,15}]ET-1 (6-21)), l'IRL1038 ([Ala^{11,15}]ET-1 (11-21)) et l'IRL1620 (Suc[Glu⁹,Ala^{11,15}]ET-1 (8-21)) ont, quant à eux, présenté les propriétés pharmacologiques d'agonistes sélectifs pour le récepteur ET_B (Ihara *et al.*, 1991; Karaki *et al.*, 1993; Takai *et al.*, 1992; Watanabe et Himori, 1992). Par la suite, des études faites à partir du fragment 16-21 ont montré que l'introduction d'un groupement acétyle à l'extrémité N-terminale de ce segment suffisait à produire un antagoniste non sélectif de l'ET-1. De plus, des études structure-fonction menées sur ce fragment ont permis de

montrer que le choix des deux acides aminés en N-terminal était crucial pour la sélectivité des récepteurs ET_A et ET_B (Cody et Doherty., 1995; Cody *et al.*, 1997; Doherty *et al.*, 1993a; Doherty *et al.*, 1993b). Il a ainsi été possible de développer plusieurs antagonistes sélectifs pour l'un ou l'autre des récepteurs de l'ET.

Fait étonnant, deux antagonistes sélectifs pour le récepteur ET_A ont été isolés à partir de cultures de *Streptomyces misakensis*. Ces deux peptides présentent une structure primaire en boucle semblable au segment C-terminal de l'ET-1 (Ihara *et al.*, 1991). L'étude systématique de leur chaîne peptidique a permis le développement du BQ123, l'un des plus connus parmi les antagonistes ET_A (Fukami *et al.*, 1995; Ihara *et al.*, 1991; Ishikawa *et al.*, 1992). La structure tridimensionnelle de celui-ci a été étudiée par cristallographie et les résultats ainsi obtenus suggèrent une superposition des chaînes latérales des résidus Asp et Trp du BQ123 avec celles retrouvées aux positions 18 et 21 de l'ET-1 (Peishoff *et al.*, 1995). D'autres fragments antagonistes ET_B sélectifs, isolés de *Streptomyces sp.* RE701, ont amené l'idée que des fragments encore plus courts pouvaient lier les récepteurs de l'ET. Ainsi, plusieurs tripeptides présentant une bonne affinité et sélectivité ont été développés (Ishikawa *et al.*, 1994). Parmi ceux-ci, le BQ610 ((N,N-hexaméthylène)carbamoyle-Leu-D-Trp(CHO)-D-Trp), antagoniste sélectif pour le récepteur ET_A, et le BQ788 (N-cis-2,6-diméthylpipéridinocarbonyl-L-méthyl-Leu-D-1-méthoxycarbonyl-Trp-D-Nle), antagoniste sélectif pour le récepteur ET_B, sont les plus connus.

À la lumière de ces études, plusieurs auteurs suggèrent qu'une structure centrale hydrophobe contenant plusieurs noyaux aromatiques chapeautés par une charge négative serait essentielle pour la liaison au récepteur ET_A (Astles *et al.*, 1998a; Astles *et al.*, 1998b; Astles *et al.*, 2000; Boss, Bolli et Weller, 2002; Dasgupta, Mukherjee et Gangadhar, 2002; Ishizuka *et al.*, 2002a; Ishizuka *et al.*, 2002b; Jae *et al.*, 1997; Opgenorth, 1995; Tomita *et al.*, 1991). La présence de la structure de l'hélice α de l'ET ne semble pas essentielle (Panek *et al.*, 1992; Tomita *et al.*, 1991), par contre l'arrangement tridimensionnel des noyaux aromatiques semble important (Ishizuka *et al.*, 2002b). Malgré tous les travaux menés sur l'ET-1 et ses récepteurs, aucun agoniste

sélectif pour le récepteur ET_A n'a encore été identifié. Les pharmacophores responsables de l'activation de celui-ci nous échappent donc toujours. Puisque le fragment ET-1(3-8) possède une certaine affinité pour ce récepteur sans toutefois induire la vasoconstriction, il est suggéré que les éléments essentiels à l'activation du récepteur ET_A sont contenus dans la portion C-terminale du peptide (Mc-Donald *et al.*, 1996).

1.13. Problématique et hypothèses de travail

Depuis sa découverte en 1988, l'ET-1 demeure un sujet d'étude important principalement à cause de sa puissance et de la nature de ses effets biologiques. Elle a d'ailleurs été impliquée dans le développement de plusieurs pathologies vasculaires, mais aussi rénales et pulmonaires. En effet, l'activité biologique de l'ET sur le tonus vasculaire et les fonctions rénales, de même que son implication dans l'hypertension artérielle ont été le sujet d'études intensives (Dasgupta, Mukherjee et Gangadhar, 2002; Fagan, McMurtry et Rodman, 2001; Moe *et al.*, 2003). De plus, un taux élevé d'ET a été associé à plusieurs pathologies telles que l'hypertension artérielle, l'hypertension pulmonaire, l'infarctus du myocarde, l'angine et l'urémie. Aussi, l'hypercholestérolémie, un problème de santé important au Québec, pourrait contribuer au développement de plaques artérioscléreuses. En effet, il a été montré que les patients atteints d'hypercholestérolémie ont aussi une concentration élevée d'ET en circulation (Cardillo *et al.*, 2000).

Les maladies cardiovasculaires ont été identifiées parmi les plus importants problèmes de santé à travers le monde, et elles touchent non seulement les personnes âgées, mais de plus en plus la classe des 35-50 ans. En fait, 20% des personnes décédées de maladies cardiovasculaires sont âgées de moins de 45 ans. De plus, il est estimé qu'en 2015, le nombre de personnes atteintes aura doublé. Le développement de traitements pour ces pathologies est donc un des enjeux majeurs de la prochaine décennie. À cet effet, six avenues ont été ciblées par l'industrie pharmaceutique, soit 1) les agents antithrombiques, 2) les agents antiarhythmiques, 3) les bloqueurs des récepteurs α -adrénergiques, 4) les bloqueurs des canaux calciques, 5) les bloqueurs de la voie de l'angiotensine tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les antagonistes AT₁, et

finalement, 6) les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'ET / antagonistes des récepteurs de l'ET (Dasgupta, Mukherjee et Gangadhar, 2002). Bien que plusieurs produits soient déjà sur le marché, et que d'autres soient en voie de l'être, l'industrie biomédicale est toujours à la recherche de médicaments efficaces et sans effet secondaire. Le développement de tels agents thérapeutiques passe par la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents et, à cet effet, les études structure-fonction de l'ET-1 demeurent un sujet de pointe.

Nous avons donc poursuivi ces études reliant la structure primaire du peptide à ses effets biologiques dans le but de mieux comprendre les interactions qui s'établissent entre l'ET-1 et les récepteurs ET_A et ET_B. Plus particulièrement, nous avons tenté d'identifier les éléments qui permettent de discriminer ces deux récepteurs dans le but de développer les premiers agonistes sélectifs pour le récepteur ET_A. De tels analogues seraient des outils précieux pour l'étude des mécanismes moléculaires conduisant au développement de pathologies.

Pour atteindre cet objectif, nous avons d'abord étudié plus attentivement l'importance des charges retrouvées à l'intérieur du segment médian de l'ET-1 soit entre les positions 8 à 10. En effet, plusieurs études suggèrent que la charge nette portée à cet endroit est importante pour la liaison et l'activation du récepteur ET_A (Sokolovsky, 1992; Tam *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1991). Ensuite, l'analyse des résultats des études de structure-fonction menées sur l'ET-1 ainsi que sur des fragments actifs suggère que le segment carboxy-terminal hydrophobe contient tous les éléments essentiels pour la liaison et l'activation du récepteur ET_A. Nous avons donc développé plusieurs séries d'analogues à partir des fragments 8-21, 9-21 et 10-21 de l'ET-1 basés sur le modèle proposé de l'hélice α hydrophobe précédée par un court segment chargé.

Chapitre 2 : PTHrP

2.1. Cancer de la prostate et métastases osseuses

Depuis longtemps, le concept entourant le développement spécifique de métastases dans certains tissus suite à une tumeur primaire est généralement accepté. Cette théorie selon laquelle le développement de métastases serait un processus non pas aléatoire, mais plutôt défini selon certaines lois se nomme *The seed and soil hypothesis*. Certains tissus possèdent donc certaines propriétés intrinsèques permettant aux cellules tumorales de s'y infiltrer et d'y prospérer. Les cancers de la prostate et du sein sont de bons exemples de ces principes. En effet, avec le temps, ces carcinomes finissent toujours par développer des métastases osseuses, ces lésions allant de l'ostéolyse légère à l'ostéopénie diffuse en passant par une résorption sévère de la matrice osseuse. Cependant, à des stades avancés, on retrouve souvent une combinaison de lésions ostéolytiques et ostéoblastiques chez les patients atteints du cancer de la prostate (Mundy, 1997). Bien que ce phénomène soit connu depuis longtemps, les mécanismes permettant aux cellules tumorales de la prostate d'envahir et de croître dans la matrice osseuse demeurent mal connus.

La résorption osseuse observée suite au cancer de la prostate est un processus relativement bien documenté. En effet, les cellules prostatiques cancéreuses, en réponse au micro-environnement osseux, augmentent grandement leur production de *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP), qui est un facteur connu pour stimuler les ostéoclastes (Guise et Mundy, 1996; Powell *et al.*, 1991). En réponse, la matrice osseuse produit le *transforming growth factor- β* (TGF- β) (Guise, 2000; Guise *et al.*, 1993). Ce dernier agit sur les cellules cancéreuses et immunitaires pour augmenter encore davantage la production de facteurs ostéolytiques tels que le TGF- α , les interleukines-1 et -6, le *tumor necrosis factor* (TNF) et le PTHrP lui-même. Ces facteurs entraînent directement ou indirectement la résorption osseuse et génèrent un cycle vicieux qui amplifie la destruction de la matrice osseuse (Mundy, 1997). Celle-ci est donc non seulement un environnement propice au développement de métastases suite aux cancers du sein et de la prostate, mais elle participe à l'expansion de celles-ci.

Si le développement de lésions ostéolytiques est relativement bien connu, les mécanismes conduisant à l'hypertrophie des os demeurent un sujet de controverse. Plusieurs facteurs ont été proposés pour stimuler la croissance osseuse dont les *insulin-like growth factor* (IGF) –1 et –2 (Koutsilieris *et al.*, 1993), le *prostate specific antigen* (PSA) (Thalmann *et al.*, 1994), l'*urokinase-type plasmogen activator* (uPA) (Achbarou *et al.*, 1994), les *fibroblastes growth factors* (FGF) –1 et –2 (Mayahara *et al.*, 1993), le *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Yi *et al.*, 2002), le TGF- β (Harris *et al.*, 1994) et l'ET-1 (Yin *et al.*, 2003; Guise et Mohammad, 2004).

En fait, en plus des effets sur le système vasculaire, l'ET-1 aurait un rôle important dans le développement et le maintien du squelette (Kitano *et al.*, 1998; Sasaki et Hong, 1993). En effet, des souris déficientes dans l'expression des gènes de l'ET-1 ou du récepteur ET_A montrent une sévère hypoplasie des os de la tête (Clouthier *et al.*, 2000). De plus, l'ET-1 est exprimé par différents types cellulaires retrouvés dans l'os tels que les ostéocytes, les ostéoclastes et les ostéoblastes. Ces dernières possèdent même les récepteurs ET_A et ET_B à leur surface et leur stimulation entraîne leur division (Guise, Yin et Mohammad, 2003; Stern *et al.*, 1995).

2.2. Implication de l'ET-1 dans le développement de lésions ostéoblastiques

Plusieurs études suggèrent donc l'implication de l'ET-1 dans le développement de lésions ostéoblastiques suite au cancer de la prostate. D'abord, les cellules cancéreuses du sein et de la prostate produisent de l'ET-1 et expriment le récepteur ET_A, suggérant ainsi un effet autocrine sur les cellules cancéreuses elles-mêmes, en plus de générer un effet paracrine sur les cellules osseuses (Guise, Yin et Mohammad, 2003). De plus, l'ET-1 induirait la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate et augmenterait l'effet de facteurs mitogènes tels que les IGF-1 et –2, le PDGF, l'*epidermal growth factor* (EGF) et le FGF-2 (Nelson *et al.*, 1996). Puisque les niveaux circulants d'ET-1 sont supérieurs chez les hommes souffrant d'un cancer de la prostate avancé et ayant développé des métastases osseuses par rapport aux hommes sans métastase, Nelson et son équipe (1995) ont

suggéré un lien entre le cancer de la prostate, l'ET-1 et le développement de métastases osseuses. Cette hypothèse est renforcée par des résultats d'une étude menée sur des souris développant des métastases dans les os suite au cancer du sein. Dans ce modèle, des antagonistes du récepteur ET_A ont diminué ou aboli la formation des lésions osseuses (Guisse et Mohammad, 2004; Guise, Yin et Mohammad, 2003; Yin *et al.*, 2003). Il semble donc que l'ET-1 joue un rôle majeur dans le développement de métastases ostéoblastiques suite au cancer du sein ou de la prostate.

Cependant, le mécanisme d'activation du récepteur ET_A conduisant au développement de ces lésions ostéoblastiques demeure inexpliqué. De plus, l'apparition de ces lésions semble paradoxale avec les niveaux élevés de PTHrP, un facteur ostéolytique sécrété par les cellules cancéreuses dans la matrice osseuse. Pour expliquer ce phénomène, Chirgwin et son équipe ont suggéré que des fragments du PTHrP, les PTHrP (1-16) et PTHrP (1-23), stimulent les ostéoblastes via l'activation du récepteur ET-A pour générer la croissance osseuse (Guisse et Mohammad, 2004). En effet, ce groupe rapporte la croissance d'une clavicule de souris et l'augmentation du nombre d'ostéoblastes suite à l'exposition du tissu à de faibles concentrations de PTHrP (1-16) et de PTHrP (1-23). Cet effet est bloqué par une préincubation du tissu à l'ABT-627, un antagoniste du récepteur ET_A. Ces résultats suggèrent donc que ces fragments sont des agonistes de ce récepteur.

2.3. Problématique et hypothèse de travail

L'intérêt pour ces fragments était donc important puisque les études menées sur l'activation du récepteur ET_A des ostéoblastes, en parallèle à celles menées sur l'ET-1, permettaient de dégager plus d'informations sur les pharmacophores des récepteurs de l'ET. Nous avons donc repris les fragments PTHrP (1-16) et PTHrP (1-23) pour les caractériser pharmacologiquement sur des préparations d'aortes de rat (ET_A) et de parenchymes pulmonaires de cobaye (ET_B).

Chapitre 3 : Matériel et méthodologies

3. Synthèse des analogues de l'ET-1

La synthèse peptidique sur phase solide est une méthode chimique développée par le Dr Bruce Merrifield (1986). Ce protocole utilise des acides aminés portant un groupement t-butyloxycarbonyle (t-Boc) attaché à leur amine α afin d'assurer l'ajout sélectif des différents résidus dans la séquence peptidique. Il a ainsi été possible de produire plusieurs peptides et même de courtes protéines telles que l'insuline. Plus récemment, un second protocole de synthèse peptidique a été développé utilisant, cette fois, le groupement 9-fluorènylméthylxycarbonyle (Fmoc) pour la protection de l'amine α . Selon la disponibilité commerciale des acides aminés, et le plan de protection orthogonale mis au point pour l'obtention des différents dérivés, l'une ou l'autre des deux approches a été utilisée pour l'obtention des analogues de l'ET-1.

3.1. Protocole de synthèse peptidique en chimie t-Boc

3.1.1. Réactifs et solvants utilisés

Les dérivés Trp(For), Leu, Cys(Acm), Arg(Tos) et Tyr(I) ont été achetés de la compagnie Chem Impex (Wood Dale, IL). Ile et D-Lys(2Cl-Z) provenaient de Propeptide (Vert-le-Petit, FR) tandis que Lys(2-Cl-Z), Glu(O-Bzl), His(Tos), his(Tos), Gln et Asp(cHex) ont été obtenus, quant à eux, de Richelieu Biotechnologies (Montréal, QC). Finalement, Tyr(OBzl), Val, Ser, Gly et Phe ont été achetés de Matrix-Innovation (Montréal, QC). L'His et la Tyr méthylées ont aussi été obtenues de la compagnie Matrix Innovation. La fonction α -aminé de ces dérivés était protégée par le groupe t-Boc.

La résine chlorométhylée et MBHA (1,2 méq/g, 200 à 400 mesh) a été fournie par la compagnie BioRad (Richmond, ON) et l'agent de couplage, hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris (diméthylamino)-phosphonium (BOP) a été obtenu de la compagnie Quantum (Montréal, QC). Les différents solvants de qualité A.C.S. utilisés

lors des synthèses et des purifications, soit le dichlorométhane (DCM), le diméthylformamide (DMF), le méthanol, l'éthanol, l'éther éthylique, l'acétonitrile (ACN) et le toluène provenaient de Fisher Scientific (Nepean, ON). L'acide trifluoroacétique (TFA) a été acheté de Halocarbon Products Corporation (River Edge, NJ). La diisopropyléthylamine (DIEA), le *m*-crésol, le diméthylsulfure (DMS) et le bicarbonate de césium (CsHCO_3) ont été obtenus de Aldrich (Milwaukee, WI). Finalement, l'acide fluorhydrique (HF) provenait de Matheson Gas Products (Ottawa, ON).

3.1.2. Fixation sur la résine de l'acide aminé en position C-terminale

Le résidu en position C-terminale est fixé à la résine sous forme de sel d'acide aminé. Celui-ci est formé à partir de 3 éq d'acide aminé (par rapport à la substitution de la résine) dissous dans une solution éthanol : H_2O (4 :1). Cette solution est titrée jusqu'à pH 7 à l'aide de bicarbonate de césium (2M $\text{CsHCO}_3/\text{H}_2\text{O}$). Le mélange est ensuite évaporé à sec. Le sel ainsi obtenu est dissous dans du DMF contenant la résine et 100 mg d'iodure de potassium par gramme de résine. Le mélange est agité pendant 24h à 50°C. La résine substituée est ensuite récupérée et lavée au DMF, au DCM et au méthanol.

3.1.3. Test à l'acide picrique

La substitution réelle de la résine est déterminée en utilisant le protocole décrit par Gisin (1972). Un aliquot (20 mg) de résine-Trp-Boc est d'abord lavé trois fois avec du DCM, ce qui permet son gonflement. Le groupement t-Boc est ensuite retiré à l'aide d'une solution 40% TFA / DCM. Une première réaction d'une minute est exécutée suivie d'une autre, après drainage du premier volume (4 mL). La réaction est poursuivie pendant 20 minutes dans un troisième volume de la même solution.

La résine est ensuite lavée plusieurs fois avec des volumes de 4 mL d'une solution 40% TFA / DCM, puis cinq fois avec du DCM, et finalement 2 fois avec un mélange DCM : dioxane (1 :1). L'amine du résidu est ensuite neutralisée avec une solution 5% DIEA/DCM. La résine est d'abord lavée deux fois avec cette solution puis la

neutralisation est complétée en laissant la résine 5 minutes dans un troisième volume.

L'étape suivante consiste à former le complexe entre l'acide picrique et l'amine α du résidu. La résine est lavée trois fois au DCM, puis une fois avec 4 mL d'une solution d'acide picrique 0,05 M dans du DCM. Ensuite, 4 autres mL de cette solution sont ajoutés et la réaction est poursuivie pendant 10 minutes. L'excès d'acide picrique est lavé au DCM, à l'éthanol, puis au DCM encore. Le picrate est finalement élué à l'aide de 10 mL d'une solution de DIEA (5% DIEA / DCM). La résine est lavée avec de l'éthanol jusqu'à la disparition complète de la coloration jaune. Les solutions d'élution et de lavage sont recueillies dans une fiole jaugée de 100 mL. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre réglé à 358 nm. La formule suivante basée sur l'équation de Beer-Lambert ($A = \epsilon cd$) permet de calculer le taux d'incorporation de l'acide aminé sur la résine :

$$\text{Substitution (mol/g)} = \frac{\text{Absorbance mesurée (D.O.}_{358 \text{ nm}})}{\epsilon (16250 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}) \times \text{poids de résine (g)} \times 1 \text{ cm}}$$

3.1.4. Cycle de couplage en chimie t-Boc

Le couplage de chaque acide aminé correspond à un cycle de quatre étapes : soit la déprotection de l'amine α (Appendice A), la neutralisation de ce groupement, le couplage du nouvel acide aminé (Appendice B) et finalement un test de Kaiser permettant de vérifier que le couplage est complet (Tableau 1). Un appareil de fabrication locale, comprenant six réacteurs a été utilisé pour les synthèses.

3.1.4.1. Déprotection de l'amine terminale

La fonction α aminé du résidu en position N-terminale est déprotégée par deux traitements en conditions acides (40% TFA / DCM). Après un premier traitement de 5 minutes, la solution est drainée et la réaction est ensuite poursuivie dans les mêmes

conditions pendant 20 minutes. Du DMS (1%) est ajouté à la solution de déprotection après l'introduction d'une Met afin de minimiser l'oxydation de ce résidu. La résine est ensuite lavée 2 fois au DCM, puis à l'éthanol, et encore au DCM pour permettre son regonflement (Appendice A).

3.1.4.2. Neutralisation de la résine

Puisque la déprotection de l'amine α est effectuée en milieu acide, celle-ci se retrouve sous sa forme ionisée. Sa neutralisation est amorcée par un traitement initial de 2 min avec une solution basique contenant 1% DIEA dans du DMF. La résine est ensuite lavée à deux reprises au DMF.

Lorsque l'acide aminé déprotégé est l'acide glutamique, cette étape de neutralisation est remplacée par un simple lavage de la résine avec du DMF afin d'éviter la formation d'une pyrrolydone.

3.1.4.3. Couplage des t-Boc-acides aminés

Pour le couplage des autres acides aminés, nous utilisons un protocole mis au point dans notre laboratoire (Forest et Fournier, 1990). Il prévoit l'utilisation de 3 éq de t-Boc-acide aminé, 3 éq de BOP (réactif de couplage) et 5 éq de DIEA (une base tertiaire). Les réactifs sont dissous dans un volume minimal de DMF et ajoutés dans le réacteur contenant la chaîne peptidique en croissance attachée à la résine (Appendice B). Après 30 min de réaction, plusieurs lavages sont effectués afin d'éliminer l'excès de réactifs et les produits de la réaction. Ainsi, deux premiers lavages sont effectués au DMF puis deux autres au DCM.

Ce cycle de synthèse est repris autant de fois qu'il y a d'acides aminés à ajouter à la chaîne peptidique. Chacun de ces cycles est suivi d'un test de Kaiser. Ce test qualitatif permet de vérifier l'achèvement de la réaction de couplage. En effet, ce test utilise la ninhydrine qui, en présence d'amines libres, réagit pour former le complexe de

Ruhemann de couleur bleu foncé (Kaiser *et al.*, 1970). Il arrive parfois que la réaction de couplage ne soit pas complète, souvent causée par l'encombrement stérique autour de l'amine terminale engendré par le repliement de la chaîne peptidique. Le couplage est repris dans les mêmes conditions, aussi suivi d'un test à la ninhydrine.

Lors du couplage du dernier acide aminé, le protocole doit être poursuivi afin de compléter la déprotection de l'amine terminale du peptide. Ensuite, les analogues sur résine sont retirés des réacteurs et lavés plusieurs fois au DMF, au DCM, à l'éthanol et à l'éther. Ils sont séchés au dessiccateur et conservés à -20°C .

3.1.5. Clivage du peptide de la résine

Puisque le lien ester retenant le peptide au support solide est protonable, le clivage est effectué avec de l'acide fluorhydrique liquide. Suite à ce traitement, on obtient le peptide libre de sa résine, sur lequel subsistent seulement les groupements Acn portés par les Cys et le formyle sur le noyau indole du Trp. Le clivage s'effectue en plaçant le peptide-résine dans un réacteur de Kel-F dans lequel on ajoute deux capteurs de carbocations : le *m*-crésol (1 mL/g) et le diméthylsulfide (1 mL/g). Ce dernier a aussi pour avantage d'être un antioxydant. Le réacteur est ensuite vissé au montage, mis sous vide puis refroidi à l'aide d'azote liquide. L'acide fluorhydrique est introduit dans le réacteur par condensation à raison de 10 mL/g de résine. La réaction est poursuivie pendant 1 heure à 4°C , avec agitation continue. Par la suite, l'acide fluorhydrique est évaporé rapidement.

L'éther éthylique est utilisé afin de récupérer le peptide. Cette étape est suivie de plusieurs lavages à l'éther éthylique pour éliminer les produits de réaction et les capteurs de carbocations. Le peptide est ensuite solubilisé dans un volume minimal de TFA afin de le séparer de la résine par filtration. Finalement, le TFA est évaporé sous vide et l'analogue est précipité à nouveau à l'aide d'éther éthylique. Les peptides, sous forme de poudre amorphe, sont séchés sous vide au dessiccateur et gardés à -20°C .

Tableau 1 : Cycle de couplage d'un acide aminé en chimie t-Boc

Étapes	Réactifs	Temps
Déprotection de l'amine terminale (Appendice A)	40% (v/v) TFA, 1% (v/v) DMS/DCM	1 x 5 min
	40% (v/v) TFA, 1% (v/v) DMS/DCM	1 x 20 min
Lavages	DCM	2 x 2 min
	Éthanol	1 x 2 min
	DCM	1 x 2 min
Neutralisation (amorce)	1% (v/v) DIEA/DMF	1 x 2 min
	DMF	1 x 2 min
Couplage (Appendice B)	3 éq Boc-AA-OH 3 éq BOP 5 éq DIEA dans un minimum de DMF	1 x 30 min
Lavages	DMF	2 x 2 min
	DCM	2 x 2min
Test de Kaiser	Ninhydrine	5 min

*Certains couplages ont excédé le temps de réaction de 30 min.

*Entre les couplages, la résine est conservée dans du DCM.

*Lorsque Glu est le dernier acide aminé couplé, la neutralisation est remplacée par un lavage au DMF.

3.2. Protocole de synthèse peptidique en chimie Fmoc

3.2.1. Réactifs et solvants utilisés

À moins d'indication contraire, tous les acides aminés étaient de configuration absolue L et portaient un groupement Fmoc sur leur amine α . Les dérivés Trp(Boc), Thr(tBu) et Leu ont été obtenus de la compagnie Richelieu Biotechnologies (Montréal, QC). Gln(Trt), Phe et Met ont été achetés chez Advanced Chemtech (Louisville, KY) et Asp(OtBu), His(Trt), Cys(Acm), Tyr(tBu), Val, Lys(Boc), Ser(tBu), Asn(Trt), Glu(OtBu), Ile, HoCys(Acm) ou HoCys(pMeBzl) et Cys(Trt) ont été fournis par la compagnie ChemImpex International (Wood Dale, IL). Fmoc-Tyr(PO_3H_2) et Fmoc-Tyr(SO_3H) ont été obtenus de Bachem Biosciences Inc (King of Prussia, PA). Finalement, Fmoc-Asp-O-tBoc de même que les HoCys (Trt) et HoCys(Acm) ont été achetés de la compagnie Novabiochem (EMD Biosciences, San Diego, CA).

La résine de Wang (1,2 méq/g, 200 à 400 mesh) provenait de la compagnie Chem Impex (Wood Dale, IL). Les réactifs utilisés pour le couplage de l'acide aminé en C-terminal, soit la pipéridine, la pyridine, le chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl et le chlorure de benzoyl ont été achetés chez Aldrich (Milwaukee, WI). Les solvants de qualité ACS utilisés lors de la synthèse ont été obtenus de Fisher Scientific (Nepean, ON). Le TFA provenait, quant à lui, de Halocarbon (Hackensack, NJ). L'hexafluorophosphate de 2-(hydroxybenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (HBTU) et le 1-hydroxybenzotriazole monohydraté (HOBt), tous deux utilisés lors du couplage, provenaient respectivement de chez Quantum Biotechnologies (Montréal, QC) et de Richelieu Biotechnologies (Montréal, QC).

3.2.2. Fixation sur la résine de l'acide aminé en C-terminal

La fixation du premier acide aminé à la matrice polymérique a été effectuée selon le protocole développé par l'équipe de Sieber (1987). Il a pour avantage de réduire la racémisation de l'acide aminé. Cette méthode utilise 2 éq d'acide aminé (Fmoc-Trp(Boc)-OH) qui sont dissous dans un volume minimal de DMF contenant la résine. Cette solution est agitée pendant 15 min puis 3,3 éq de pyridine et 2 éq de chlorure de 2,6-dichlorobenzoyl sont ajoutés sous atmosphère d'argon. La réaction se poursuit pendant 20 heures à la température ambiante avec agitation mécanique et sous argon (Appendice C). L'excès de réactifs est ensuite lavé avec du DMF. Contrairement à la résine de Merrifield, où la réaction de substitution requiert une température élevée, les sites non substitués de la résine de Wang doivent être bloqués pour éviter la synthèse de nouvelles chaînes peptidiques pendant le couplage des acides aminés subséquents. Cette réaction utilise un excès (40 éq) de chlorure de benzoyl et de pyridine, qui est ajouté à un volume minimal de DMF. La réaction est poursuivie pendant 2 heures à température ambiante, avec agitation. La résine est finalement lavée trois fois avec chacun des quatre solvants suivants : DMF, éthanol, DCM et méthanol, puis elle est séchée au dessiccateur.

3.2.3. Détermination du degré de substitution de la résine

Pour mesurer le rendement de la réaction de substitution, 10 mg de résine séchée sont prélevés et agités fortement pendant 3 min dans une solution de 3 mL contenant 20% pipéridine / DMF. L'absorbance du surnageant est mesurée à 290 nm. La formule suivante basée sur l'équation de Beer-Lambert ($A = \epsilon cd$) permet de calculer le taux d'incorporation de l'acide aminé sur la résine :

$$\text{Substitution (mol/g)} = \frac{\text{Absorbance mesurée (D.O.}_{290\text{ nm}})}{\epsilon (16705\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}) \times \text{poids de résine (g)} \times 1\text{ cm}}$$

3.2.4. Cycle de couplage en chimie Fmoc

Comme en chimie Boc, l'insertion de chaque acide aminé composant la chaîne peptidique débute par la déprotection de l'amine terminale (Appendice D). Après plusieurs lavages, un nouvel acide aminé est couplé (Appendice E). Finalement, les sous-produits et l'excès de réactifs sont lavés et un test de Kaiser permet de s'assurer que la réaction de couplage est complétée (Tableau 2).

3.2.4.1. Déprotection de l'amine terminale

Le groupement Fmoc porté par l'amine α du résidu en bout de chaîne est labile en milieu basique. Une solution à 20% de pipéridine dans le DMF est donc utilisée pour cette étape. Cette réaction est menée en deux étapes : on laisse d'abord réagir 2 min, les produits sont drainés et la réaction est poursuivie pendant 15 min (Appendice D). Le peptide-résine est ensuite lavé plusieurs fois : 2 fois au DMF, 1 fois à l'éthanol et finalement 2 fois au DMF.

Lorsque le dernier acide aminé couplé est un acide glutamique, la déprotection est faite en une seule étape de 10 min, ce qui permet de minimiser la formation de l'acide pyroglutamique en milieu basique.

3.2.4.2. Couplage des Fmoc-acides aminés

Le couplage d'un acide aminé à la chaîne peptidique est effectué en utilisant un excès de réactifs. Ainsi, 3 éq de Fmoc-acide aminé, 3 éq HBTU, 1 éq HOBt et 3 éq DIEA sont dissous dans un minimum de DMF (Appendice E). La réaction est poursuivie pendant 30 min sous atmosphère d'azote. Ensuite, l'excès de réactifs est lavé successivement au DMF et au DCM. Après quoi, un test de Kaiser est réalisé. Si le test montre la présence d'amines libres sur la résine, la réaction de couplage est alors reprise. Le cycle de

Tableau 2 : Cycle de couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc.

Étapes	Réactifs	Temps
Déprotection de l'amine terminale (Appendice D)	20% (v/v) Pipéridine / DMF	1 x 2 min
	20% (v/v) Pipéridine / DMF	1 x 15 min
Lavages	DMF	2 x 2 min
	Éthanol	1 x 2 min
	DMF	1 x 2 min
Couplage (Appendice E)	3 éq Fmoc-AA-OH 3 éq HBTU 1 éq HOBt 3 éq DIEA dans un minimum de DMF	1 x 30 min
Lavages	DMF	2 x 2 min
	DCM	2 x 2 min
	Éthanol	2 x 2 min
	DCM	1 x 2 min
	DMF	2 x 2 min

*Certains couplages ont nécessité plus de 30 min de temps de réaction.

*Entre les couplages, la résine est conservée dans du DCM.

*La déprotection de Glu est effectuée en une seule étape de 10 min.

couplage est repris autant de fois qu'il y a d'acides aminés additionnels à incorporer dans le peptide. À la fin de la synthèse, on doit effectuer la déprotection de l'amine terminale. Ensuite, des doubles lavages sont successivement réalisés avec : alcool *t*-amylique, acide acétique, alcool *t*-amylique et finalement de l'éther. Le peptide-résine est séché au dessiccateur puis est gardé à -20°C .

3.2.4.3. Couplage de Fmoc-Cys(Trt)-OH

Cet acide aminé est couplé au moyen d'un anhydride symétrique afin d'éviter sa racémisation. Cet anhydride est formé en utilisant 2 éq DCC (dicyclohexylcarbodiimide) et 4 éq Fmoc-Cys(Trt)-OH dissous dans un minimum de DCM (Appendice F). La réaction est poursuivie dans un bain de glace, sous atmosphère d'azote avec agitation pendant 5 min. Le dérivé dicyclohexylurée produit est éliminé par filtration. Le filtrat contenant l'anhydride est additionné d'un volume égal de DMF et ajouté à la résine. Après 30 min de réaction, les réactifs sont drainés et la résine est lavée au DMF et au DCM avant qu'un test de Kaiser ne soit effectué.

3.2.5. Clivage du peptide de la résine

La résine de Wang est relativement sensible aux conditions acides de sorte que le TFA est généralement utilisé pour le clivage du peptide de son support. Ces conditions permettent également le retrait des groupements protecteurs portés par les chaînes latérales de certains résidus. Seuls les groupements AcM portés par les cystéines 1 et 15 résistent aux conditions de clivage.

Le réactif K (King, Fields et Fields., 1990) a été utilisé pour le clivage des analogues de la résine. Ce réactif est constitué de 92% TFA avec 2,5% d'éthanedithiol, 2,5% H₂O et 3% de phénol. La réaction est poursuivie pendant 1 h avec agitation et sous atmosphère d'argon. La solution de clivage est filtrée et le TFA est évaporé sous vide. Après quoi le peptide est finalement précipité à l'éther éthylique et filtré de nouveau. Le peptide obtenu est séché et gardé à -20°C jusqu'à sa purification.

4. Modification chimique des analogues

4.1. Formation des ponts disulfures

4.1.1. Traitement au ferricyanure de potassium

Les cystéines ayant leurs chaînes latérales libres peuvent être reliées en conditions oxydantes douces. Le peptide est donc ajouté (0,05 mg/mL) à une solution, 10% ACN / H₂O contenant 20 éq de K₃Fe(CN)₆, dont le pH avait été ajusté à 9 avec du NH₄OH. Après 1,5 h, un aliquot est prélevé et utilisé pour vérifier l'avancement de la réaction par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) analytique sur phase inverse (voir sections 6.1). La solution est finalement acidifiée à pH 4 et injectée sur le système de CLHP préparative sur phase inverse (voir la section 5 pour la description de l'appareillage).

4.1.2. Traitement avec 50 éq d'iode

Le peptide portant des Cys(Acm) est d'abord solubilisé (0,5 mg/mL) dans une solution d'acide acétique à 80%. Une quantité pesée d'iode (50 éq), dissoute dans un minimum de méthanol, est ensuite ajoutée à la solution. Après 1h de réaction à la température de la pièce, sous agitation douce et atmosphère d'azote, un aliquot est prélevé et utilisé pour vérifier l'avancement de la réaction par spectrométrie de masse et par CHLP analytique (voir sections 6.1 et 6.2). Si la réaction est complète, une solution d'acide ascorbique (10% p/v) est ajoutée jusqu'à décoloration du mélange. Finalement la solution est injectée sur CHLP préparative pour purification (voir section 5).

4.1.3. Traitement avec 10 éq d'iode

Le retrait des groupements Acm et la formation du pont disulfure peuvent être effectués dans des conditions oxydantes plus douces nécessitant toutefois une plus longue période de réaction. Le peptide est alors solubilisé (0,5 mg/mL) dans une solution formée de 99% d'acide acétique et de 1% d'eau. Seulement 10 éq d'iode, dissous dans un minimum de DMF, sont ajoutés à la solution peptidique. La réaction est poursuivie pendant 12 heures à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Un aliquot est ensuite prélevé et utilisé pour vérifier l'avancement de la réaction par spectrométrie de masse et par CHLP analytique (voir sections 6.1 et 6.2). Si la réaction est complète, une solution d'acide ascorbique est ajoutée jusqu'à l'obtention d'une solution claire. Finalement, la solution est injectée sur CHLP préparative pour purification (voir section 5).

4.2. Déformylation des analogues

Le retrait de ce groupement requiert l'utilisation d'une base nucléophile telle que la pipéridine. Le peptide est donc dissous dans une solution aqueuse contenant 0,1 N pipéridine préalablement refroidie sur glace et dégazée. Après 15 minutes de réaction, un aliquot est prélevé afin de vérifier l'achèvement de la réaction par CLHP analytique et par spectrométrie de masse (voir sections 6.1. et 6.2.). La solution peptidique est finalement acidifiée à pH 9 pour sa purification. Celle-ci est effectuée comme il est décrit à la section 5. Puisque la solution peptidique injectée sur CHLP est basique, un premier gradient allant de H₂O : NH₄OH 0,05% vers H₂O : TFA 0,06% est d'abord effectué, suivi du gradient d'élution qui va de H₂O : TFA 0,06% vers 60% ACN / H₂O : TFA 0,06%.

4.3. Acétylation des analogues

Le groupement acétyle est introduit à la position N-terminale alors que le peptide est toujours sur la résine, mais à la toute fin de la synthèse. Après la déprotection finale de l'amine, 10 éq d'anhydride acétique sont ajoutés dans les réacteurs contenant suffisamment de DMF. Après 10 minutes de réaction, la résine est lavée à deux reprises avec du DCM. Un test de Kaiser est finalement effectué pour vérifier la complétion de la réaction.

5. Purification des analogues

Les différents analogues de l'ET-1 sont purifiés par CLHP préparative sur phase inverse. Nous utilisons un système Waters, modèle Prep LC500A jumelé à une pompe modèle 590 et à un détecteur d'absorbance modèle 441 (230 nm). Le matériel à purifier est d'abord mis en solution puis injecté sur une colonne contenant une résine Jupiter C₁₈ de la

compagnie Phenomenex (15 μm , 300Å) de dimension 4,7 x 30 cm. Le débit est maintenu à 20 mL/min. L'élution est effectuée au moyen d'un gradient linéaire allant de 0 à 60% ACN / H₂O : 0,06% TFA en 2 h.

La pureté des fractions recueillies est évaluée par CLHP à l'aide d'un système analytique (Beckman) comprenant un échantillonneur automatisé de modèle Gold 507E couplé à un contrôleur de gradient de modèle 128 ainsi qu'à un détecteur U.V. de modèle 168 (230 nm). Une colonne analytique Jupiter Proteo de la compagnie Phenomenex C₁₈ (5 μm , 110Å) est utilisée pour l'analyse. L'élution est obtenue au moyen d'un gradient linéaire de 20 min allant de 20 à 60% ACN dans de l'eau contenant 0,06% TFA. Le débit est ajusté à 1 mL/min. Les fractions pures sont regroupées, évaporées puis lyophilisées. Celles-ci sont finalement conservées à -20°C.

6. Caractérisation des analogues

6.1. CLHP analytique

La pureté des analogues obtenus est évaluée par CLHP analytique comme décrit à la section 5. Cependant, ces analyses sont réalisées à l'aide d'une colonne à haute résolution contenant une résine de C₁₈, 3,5 μm , 110Å provenant de la compagnie Phenomenex. Un gradient linéaire de 20 min allant de 20 à 60% ACN dans de l'eau acide (0,06% TFA) permet d'éluer le peptide à un débit de 1 mL/min. La détection est alors effectuée à 230 nm.

6.2. Spectrométrie de masse

Les analogues sont aussi caractérisés par spectrométrie de masse au moyen de la technologie MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*). Un appareil Voyager DE de la compagnie Perseptive Biosystem (Farmingham, MA) est utilisé pour les analyses. Le laser est alors réglé à 337 nm et le voltage d'accélération à 20 kV. L'acquisition est réalisée à 20 pulses/sec. Une matrice d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique est utilisée pour l'inclusion des peptides. L'appareil a été calibré au préalable avec une solution étalon contenant l'angiotensine-1, les fragments 7 à 38 et 18 à 39 de l'hormone adrénocorticotropique et l'insuline bovine.

7. Évaluation pharmacologique des analogues de l'ET-1

7.1. Animaux et produits utilisés

Des rats Sprague Dawley mâles d'environ 250g de même que des cobayes Dunkin Hartley mâles d'environ 350g ont été obtenus de la compagnie Charles River (St-Constant, QC). Ces animaux ont été traités selon les normes du Comité Canadien pour les soins aux animaux (CCAC).

L'histamine et le KCl utilisés comme témoins lors des essais provenaient respectivement des compagnies Sigma (St-Louis, MO) et Fisher Scientific (Nepean, ON). Les sels qui composent le tampon de Krebs ont également été achetés de Fisher Scientific (Nepean, ON). Le Somnotol a été obtenu de la compagnie CDMV (St-Hyacinthe, QC).

7.2. Évaluation pharmacologique des analogues sur le récepteur ET_A

Les rats sont d'abord anesthésiés au Somnotol (0,1 mg/g, intrapéritonéale) puis saignés par rupture de la veine cave. L'aorte thoracique est rapidement prélevée et placée dans un tampon de Krebs (NaCl 120 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucose 10 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 2,4 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM). L'endothélium est retiré manuellement en frottant l'artère doucement entre le pouce et l'index, après avoir nettoyé l'aorte du tissu conjonctif qui l'entoure. L'aorte est ensuite disséquée en 6 anneaux de 5 mm de long. Chacun des anneaux est installé dans un bain à organe isolé de 5 mL sous une tension de 1g (Figure 8). Chaque bain est rempli de tampon oxygéné (mélange 5%CO₂, 95% O₂) et gardé à 37°C.

Des transducteurs de force de modèle FT03 de la compagnie Grass (Quincy, MA) reliés à un polygraphe Grass 7E ont permis l'enregistrement isométrique des réponses des muscles lisses vasculaires circulaires des anneaux d'aorte de rat. Après une période d'équilibration de 60 min, la contractilité de chaque anneau est évaluée par l'addition de 80 mM de KCl. Une injection d'acétylcholine (1 µM), alors que le tissu est toujours contracté, permet de s'assurer que tout l'endothélium a été retiré. Une relaxation de moins de 10% est tolérée.

L'activité agoniste des analogues est évaluée par des additions cumulatives de peptide de concentrations allant de 10⁻¹⁰ M à 10⁻⁵ M. Chacune de ces doses sont espacées d'un minimum de deux minutes. S'il y a contraction, la concentration peptidique suivante est ajoutée dans le bain seulement lorsque le plateau de contraction est atteint (Figure 9a). Si le peptide ne possède aucune activité agoniste, l'activité antagoniste est vérifiée sur une nouvelle préparation d'aorte de rat. Pour ce faire, le tissu est exposé à une forte

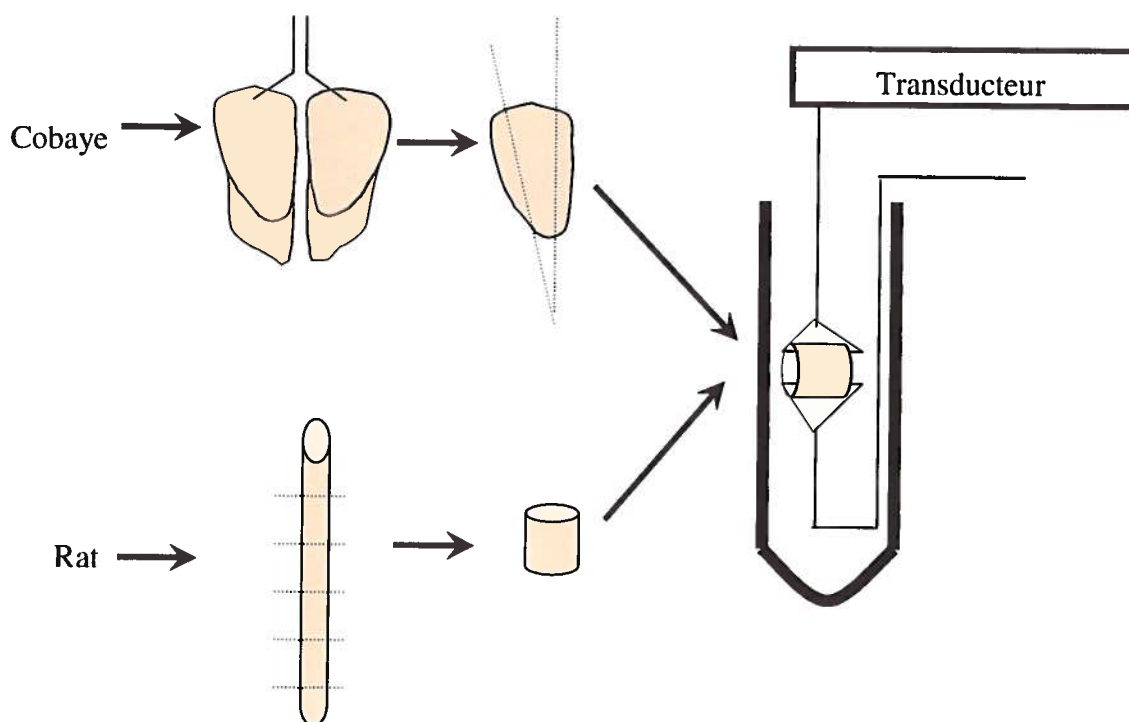


Figure 8 : Montage des tissus pour les essais pharmacologiques

concentration (10^{-7}M) de l'analogue pendant 10 min. Une courbe concentration-réponse de l'ET-1 est ensuite effectuée par l'addition cumulative d'ET-1 à des concentrations variant entre 10^{-10}M et 10^{-5}M (Figure 9b). L'activité agoniste et antagoniste de chaque analogue a été testée au minimum sur trois animaux différents. L'analyse par régression non linéaire pondérée des courbes concentration-réponse a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 3.02 et les résultats sont exprimés selon la moyenne $\pm$ l'écart type de la moyenne (s.e.m.)

La préparation des solutions peptidiques à des concentrations variant entre 10^{-8}M et 10^{-4}

M est effectuée à partir d'une solution mère à 2 mg/mL. L'ET-1 est simplement solubilisée dans l'eau alors que certains analogues nécessitent l'utilisation de DMSO (1%) pour leur solubilisation. Des courbes concentration-réponse du DMSO seul et de l'ET-1 avec DMSO ont été effectuées à des concentrations cinq fois supérieures à celles utilisées pour effectuer les essais pharmacologiques des analogues. Le DMSO seul n'engendre aucune contraction de l'aorte de rat et n'affecte pas celle causée par l'ET-1.

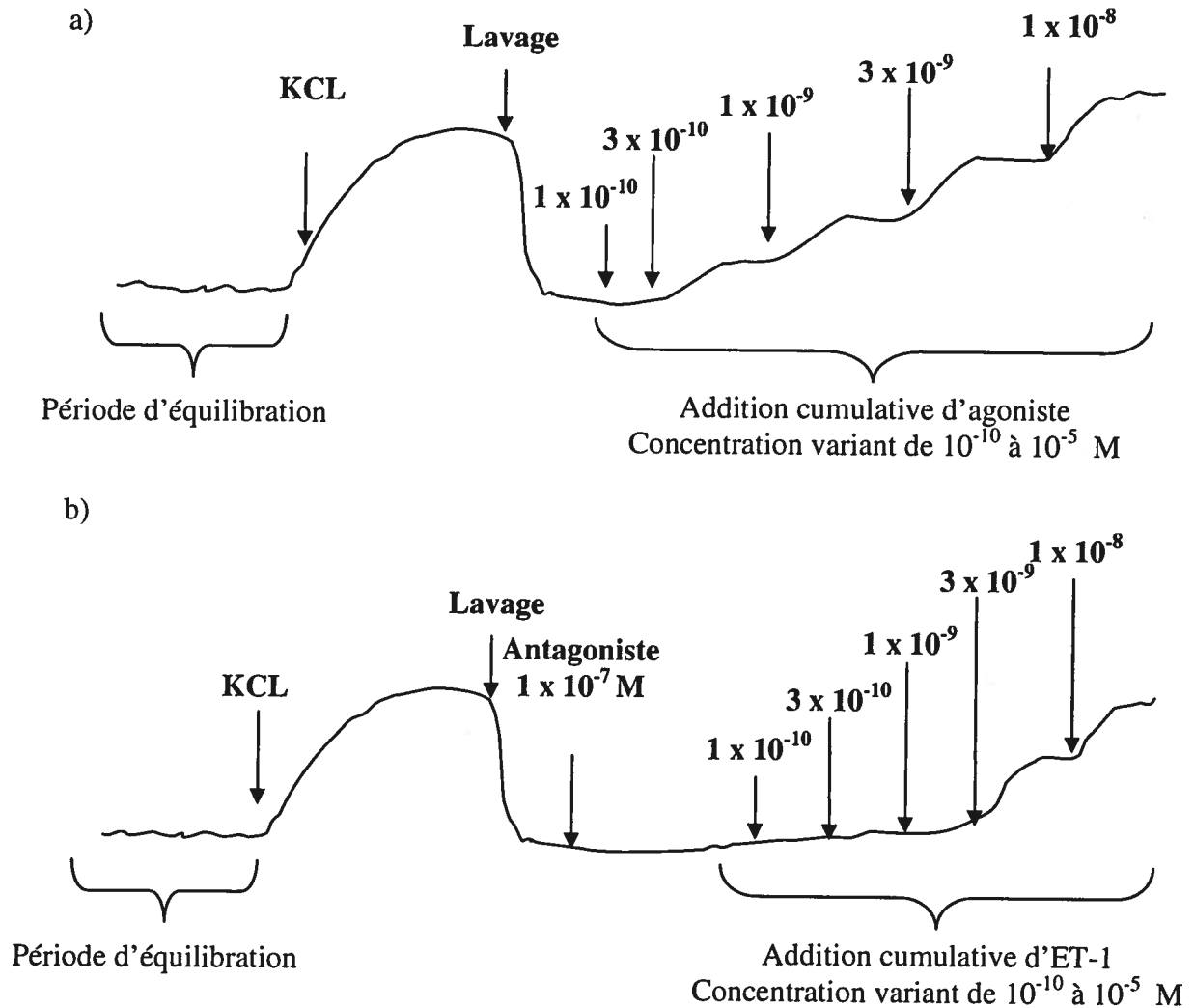


Figure 9 : Exemple de tracé obtenu lors d'un essai pharmacologique effectué avec un agoniste (a) et un antagoniste (b) sur l'aorte de rat.

7.3. Évaluation pharmacologique des analogues sur le récepteur ET_B

Les cobayes sont d'abord anesthésiés avec une dose de 0,1 mg/g intrapéritonéale de Somnotol. Ils sont ensuite saignés par rupture de la veine cave. Après quoi le système pulmonaire est retiré de la cage thoracique et rapidement plongé dans une solution de tampon de Krebs (NaCl 120 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucose 10 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 2,4 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM). Les quatre lobes pulmonaires sont ensuite séparés et les extrémités internes et externes sont disséqués en bandelettes (6) de 2 mm x 2 mm x 1,5 cm (Figure 8). Ces lanières sont montées dans six bains à organe isolé de 5 mL remplis de tampon oxygéné (5% CO₂, 95% O₂) à 37 °C. Chacune de ces bandelettes est attachée à une tige fixe et à un transducteur sous 1 g de tension (Figure 8). Après une période d'équilibration (1h), la contractilité des tissus est vérifiée avec l'addition d'histamine 10⁻⁶M. L'activité agoniste des analogues est vérifiée par des additions cumulatives de peptide dans les bains. Les concentrations peptidiques dans ceux-ci variaient entre 10⁻¹⁰ M à 10⁻⁵ M. Un minimum de deux minutes est laissé entre deux injections successives. S'il y a contraction du parenchyme, la concentration peptidique suivante est ajoutée dans le bain seulement lorsque la contraction a atteint son plateau. Si l'analogue ne présente aucune activité agoniste, l'activité antagoniste est alors vérifiée sur une nouvelle préparation. Pour ce faire, une lanière de parenchyme pulmonaire est d'abord exposée à une concentration élevée (10⁻⁷M) de l'analogue pendant 10 min. Après quoi une courbe concentration-réponse de la STRX-c est effectuée; c'est-à-dire que des additions cumulatives de SRTX-c sont effectuées afin d'obtenir des concentrations variant entre 10⁻¹⁰ et 10⁻⁵ M dans les bains. Si l'analogue possède une activité antagoniste, on observe un déplacement de la courbe concentration-réponse de la STRX-c. Celle-ci est utilisée plutôt que l'ET-1 afin d'éviter l'utilisation simultanée d'un antagoniste sélectif pour le récepteur ET_A en plus de l'analogue à tester. En effet, cette préparation contiendrait environ 20% de récepteurs ET_A. De plus, l'effet biologique engendré par l'ET-1, en présence de BQ610, et de la SRTX-c est semblable (Appendice H). L'activité agoniste ou antagoniste des analogues a été testée sur trois animaux différents. L'analyse des courbes concentration-réponse a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 3.02.

8. Radiomarquage de l'ET-1

L'iode-125 est incorporé sur la chaîne latérale de la Tyr¹³ de l'ET-1. Pour ce faire, le peptide est d'abord solubilisé à 2 mg/mL dans une solution tamponnée à pH 7,4 avec 0,05 M phosphate. La réaction est réalisée avec 50 µg ET-1, 1 mCi Na¹²⁵I (Amersham Biosciences, Montréal, QC) et 10 µg de chloramine-T (Fisher Scientifique, Montréal, QC) dans un volume final de 30 µL. Après 1 min d'agitation forte, la réaction est stoppée avec 200 µg de métabisulfite de sodium (Sigma, Mississauga, ON) dissous dans 100 µL de tampon. La solution est finalement injectée sur CLHP analytique afin de séparer le peptide portant un atome d'iode de celui bisubstitué et du peptide non iodé. Le peptide est élué à l'aide d'un gradient linéaire de 40 min allant de 20% ACN / H₂O : 0,06% TFA vers 60% ACN / H₂O : TFA 0,06%, et le débit est fixé à 1 mL/min. Un appareil de la compagnie Waters composé d'une pompe 600E et d'un contrôleur 600 muni d'une colonne à haute résolution de C₁₈, 3,5 µm, 110 Å de la compagnie Phenomenex est utilisé. Les fractions sont collectées à toutes les 30 secondes et le patron d'élution est déterminé à l'aide d'un compteur-γ de la compagnie Packard (Downers Grove, IL). Les fractions contenant l'['¹²⁵I]ET-1 sont diluées 1 : 10 dans une solution tamponnée de 50 mM phosphate de sodium à pH 7,4 et gardées à -20°C. Pour évaluer la concentration des fractions, l'activité spécifique de l'¹²⁵I est estimée à 2200 mCi/mmol.

9. Essais de compétition entre les analogues et l'['¹²⁵I]ET-1

9.1. Culture cellulaire

Les cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) transfectées de manière stable avec le gène du récepteur ET_A ou ET_B proviennent de la compagnie Euroscreen (Bruxelles, BE) (B max

60 à 150 pmol/mg de protéines et 7,3 à 10,9 pmol/mg de protéines respectivement). Les cellules sont cultivées à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% CO₂ dans un milieu de culture Ham-F12 supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal, 400 µg/mL de G418, 100 U/mL d'ampicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 2,5 g/mL de fongizone (tous ces produits ont été achetés de la compagnie Aldrich (Mississauga, ON)).

9.2. Essais de compétition sur le récepteur ET_A

Dans une plaque à 12 puits, 3 x 10⁵ cellules CHO exprimant le récepteur ET_A ont été mises en culture dans le milieu décrit à la section 9.1. Après 16 heures d'incubation, alors que chaque puit avait atteint une confluence d'environ 90%, les cellules sont lavées avec une solution tamponnée à pH 7,4 contenant 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂ et 100 mM NaCl. Celles-ci sont ensuite incubées pendant 16 heures à 4°C avec 0,1 nM [¹²⁵I]ET-1 en présence de concentrations croissantes d'ET-1 ou d'analogues non marqués allant de 1 x 10⁻¹¹ M à 7 x 10⁻⁶ M dans un volume final de 0,5 mL de tampon de liaison à pH 7.4 (50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1% (p/v) BSA en plus de 0,01 % (v/v) d'un mélange d'inhibiteurs de protéases contenant AEBSF, aprotinine, leupeptine, bestatine, pepstatine A et E-64). Le lendemain, les cellules sont lavées à nouveau deux fois avec le tampon phosphate 50 mM pH 7,4 afin de retirer l'['¹²⁵I]ET-1 non lié. Finalement, une solution 1N NaOH est utilisée pour décoller les cellules de la plaque et celles-ci sont mises dans des tubes au compteur-γ pour évaluer la radioactivité liée à ces dernières. Les résultats sont analysés à l'aide du programme informatique GraphPad Prism 3.02. Trois essais différents sont effectués pour chaque analogue et chacun d'eux est fait en duplicata, les résultats sont exprimés selon la moyenne ± s.e.m..

9.3. Essais de compétition sur le récepteur ET_B

Les essais de liaison ont été accomplis sur des cellules CHO transfectées avec le gène du récepteur ET_B de la même façon que sur les cellules exprimant le récepteur ET_A tel que décrit à la section 9.2.

10. Dichroïsme circulaire

L'appareil CD6 de la compagnie Jobin Yvon (ISA) (Edison, NJ) est d'abord calibré à l'aide d'une solution 1,25 mg/mL épiandrosterone solubilisée dans du dioxane et placé dans une cellule de 1,0 cm. Deux étalons sont ensuite analysés, d'abord une solution aqueuse d'acide camphorsulfonique 0,6 mg/mL, et ensuite le NPY 0,25 mg/mL solubilisé dans une solution 25% hexafluoroisopropanol (HFIP). Ces échantillons sont alors placés dans une cellule dont le parcours optique est de 1,0 mm. Les analyses structurales des analogues de l'ET-1 ont ensuite été exécutées à une concentration de 0,25 mg/mL dans une solution aqueuse contenant 20% ou 40% HFIP. Chaque spectre représente la superposition de trois acquisitions. Les spectres des solutions 20% et 40% HFIP ont été effectués dans les mêmes conditions puis soustraits des données spectrales de chaque analogue. Le traitement informatique des données recueillies est obtenu avec le programme CD6.

Chapitre 4 : Résultats

11. Étude du segment 8 à 10 de l'ET-1

Plusieurs analogues ont été synthétisés afin de mesurer l'importance du segment chargé Asp⁸-Lys⁹-Glu¹⁰ retrouvé dans la partie médiane de l'ET-1 (Figure 10). D'abord, nous avons remplacé chacun de ces acides aminés par une Ala. Ensuite, une Ser ou une Tyr a été insérée aux positions 8 ou 10 afin d'introduire des groupements phosphate ou sulfate sur la chaîne latérale de ces résidus. Puisque les pKa de ces groupements sont de 2,2 et 1,7 respectivement, ces modifications avaient pour but de mesurer l'impact d'une amplification de la charge négative retrouvée à ces positions.

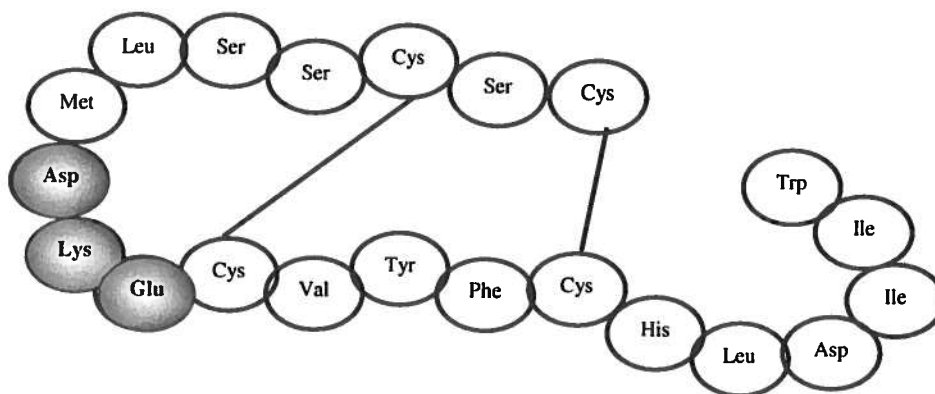


Figure 10: Représentation du segment chargé 8 à 10 de l'ET-1.

11.1. Synthèse peptidique

Ces analogues ont été obtenus par synthèse peptidique sur résine de Wang à l'aide de la stratégie de chimie Fmoc. Le protocole de Sieber (1987) utilisé pour le couplage du premier acide aminé sur ce support a pour effet de minimiser la racémisation du résidu ainsi introduit. De plus, il procure d'excellents rendements de réaction ce qui permet l'obtention d'un niveau de substitution de la résine très satisfaisant. Le protocole de chimie Fmoc, basé sur des cycles de déprotection, de neutralisation et de couplage, a donc été suivi pour l'incorporation des différents résidus dans la chaîne peptidique. Toutefois,

l'insertion des Fmoc-Cys(Trt)-OH en utilisant le protocole usuel de couplage de chimie Fmoc entraîne un fort taux de racémisation (Han, Albericio et Barany, 1997). Cette réaction secondaire est facilement évitée si le couplage est obtenu au moyen de l'anhydride symétrique de l'acide aminé (Appendice F). Celui-ci peut réagir directement avec l'amine terminale de la chaîne peptidique. Finalement, le clivage du peptide de son support, à l'aide du réactif K, a permis l'obtention d'un seul produit majoritaire pour chacun des analogues. Ceux-ci correspondent dans tous les cas au produit désiré tel que montré par CLHP analytique et par spectrométrie de masse.

L'endothéline contient deux ponts disulfures reliant les cystéines 1-15 et 3-11. Bien que la littérature rapporte la formation préférentielle des ponts dans cet arrangement dans une proportion atteignant environ 80% (Tam *et al.*, 1994), nous avons procédé à la formation sélective des deux liens intramoléculaires de l'ET-1. L'utilisation d'un plan de protection orthogonale a permis la déprotection sélective des chaînes latérales des cystéines et la formation de l'un puis de l'autre pont disulfure. Ainsi, il a été possible de maximiser les rendements de synthèse des différents dérivés peptidiques. Les Cys(Trt), suite au clivage du peptide de la résine, avaient leur chaîne latérale libre. Le premier pont disulfure a donc été formé par une simple oxydation au ferricyanure de potassium. Les Cys(Acm), introduites aux positions 1 et 15, ont conservé ces groupements sur leur chaîne latérale lors de l'étape de clivage. Leur retrait, de même que la formation du second pont disulfure, ont par conséquent été effectués à l'aide d'un traitement utilisant de l'iode (50 éq) comme nucléophile et oxydant.

Lors de la synthèse des dérivés sulfatés et phosphatés, quatre Cys(Trt) ont été introduites puisque les conditions de cyclisation utilisées pour le traitement des Cys(Acm) ont pour effet de cliver ces groupements (Perich *et al.*, 1994; Yagami *et al.*, 2000). Les deux ponts disulfures ont donc été formés lors d'un seul traitement au ferricyanure de potassium. La purification subséquente a permis de séparer le produit correctement cyclisé, entre les Cys 1-15 et 3-11, de celui avec les ponts croisés.

11.2. Caractérisation des analogues

Sauf pour les analogues contenant un groupement sulfate ou phosphate, les analyses par CLHP analytique et par spectrométrie de masse faites après clivage du peptide de la résine et à la suite de chacune des étapes de cyclisation ont montré la formation d'un seul produit majoritaire dont la masse correspondait au produit désiré (Tableau 3). Celui-ci a pu être isolé avec une pureté de plus de 90%. Lors de la cyclisation des analogues contenant des groupements chargés aux positions 8 ou 10, deux produits majoritaires ont été obtenus et isolés, tous deux ayant la même masse correspondant au produit attendu. Lors des essais pharmacologiques, le produit le plus actif a été considéré comme étant le peptide ayant le bon alignement de ses Cys.

Tableau 3 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues de l'ET-1 modifiés aux positions 8, 9 et 10.

	Masse attendue (Da)	Masse mesurée (Da)
[Ala ⁸]ET-1	2448	2444
[Ala ⁹]ET-1	2435	2432
[Ala ¹⁰]ET-1	2434	2431
[Ala ^{8,9}]ET-1	2391	2391
[Ala ^{9,10}]ET-1	2381	2381
[Ser ⁸]ET-1	2464	2466
[Tyr ⁸]ET-1	2544	2544
[Tyr(SO ₃ H ₂) ⁸]ET-1	2620	2618
[Tyr(PO ₃ H ₂) ⁸]ET-1	2620	2624
[Ser ¹⁰]ET-1	2450	2454
[Tyr ¹⁰]ET-1	2526	2530
[Tyr(SO ₃ H ₂) ¹⁰]ET-1	2606	2608

11.3. Essais pharmacologiques

11.3.1. Effectués sur le récepteur ET_A

Les essais pharmacologiques menés sur des préparations d'aorte de rat ont fourni les courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues nécessaires pour mesurer l'effet des modifications sur «l'activité biologique» de l'ET-1. Ces résultats montrent que le remplacement de l'acide aspartique retrouvé à la position 8 de l'ET-1 par une Ala entraîne une perte de puissance relative d'un facteur d'environ 20 par rapport au peptide natif sans avoir d'impact majeur sur l'activité intrinsèque. La position 9, occupée par une Lys, est également sensible aux modifications puisque l'introduction d'une Ala à cette position donne un agoniste partiel du récepteur ET_A ayant la même puissance que l'ET-1. Par contre, c'est la position 10 qui est la plus affectée par l'incorporation d'une Ala puisque cette modification entraîne la perte complète de l'activité biologique de l'ET-1 (Figure 11 et Tableau 4).

L'introduction d'un groupement hydroxyle ou phénolique à la place de la fonction carboxylique retrouvée naturellement à la position 8 affecte passablement l'activité biologique de l'ET-1. En effet, le remplacement de l'Asp⁸ par des résidus Ser ou Tyr entraîne une perte de puissance relative de facteurs environnant 50 et 115 respectivement. L'ajout d'un groupement phosphate sur la chaîne latérale de Tyr⁸ améliore d'environ 2 fois la puissance de cet analogue. Par contre, lors de l'introduction d'un sulfate, plus acide mais aussi plus gros que le phosphate, on observe une diminution de puissance relative d'un facteur 2,5 par rapport à l'analogue [Tyr⁸]ET-1 (Figure 12 et Tableau 5).

Tout comme lors du remplacement de Glu¹⁰ par une Ala, l'introduction de résidus Ser et Tyr n'est pas tolérée à cette position. En effet, ces modifications ont fourni un agoniste de très faible puissance (Ser) ou un analogue ne possédant aucune activité agoniste ou antagoniste (Tyr). Enfin, l'ajout d'un groupement sulfate sur la chaîne latérale de Tyr¹⁰ n'améliore pas l'activité biologique de l'analogue (Figure 13 et Tableau 6).

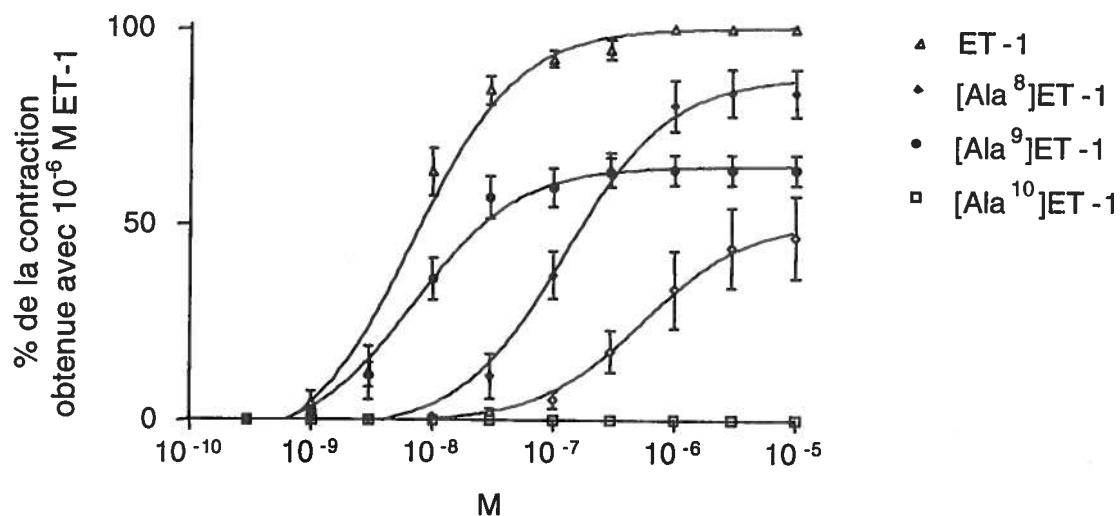


Figure 11: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues, dans lesquels des résidus Ala ont été introduits aux positions 8, 9 et/ou 10, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

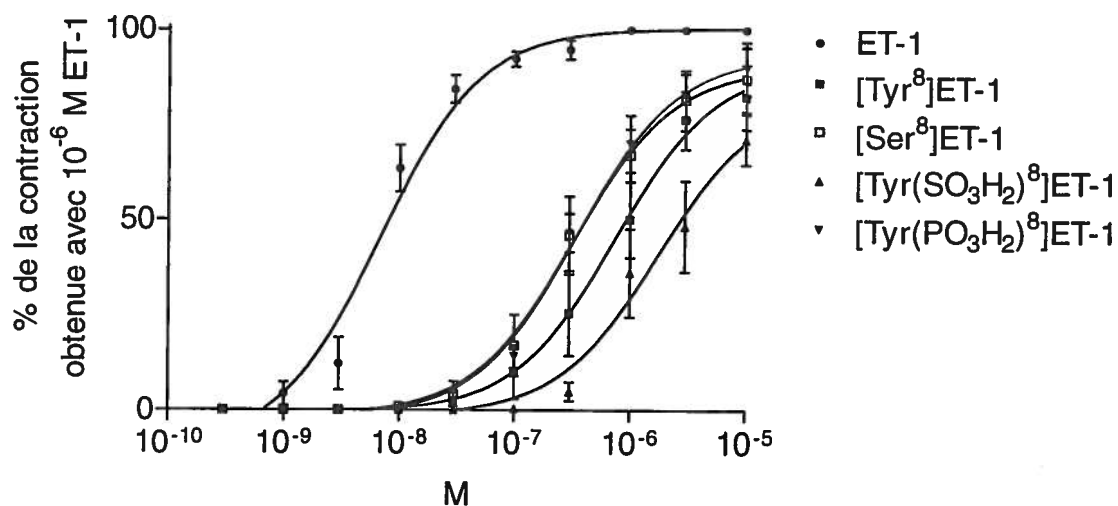


Figure 12: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues, modifiés à la position 8, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

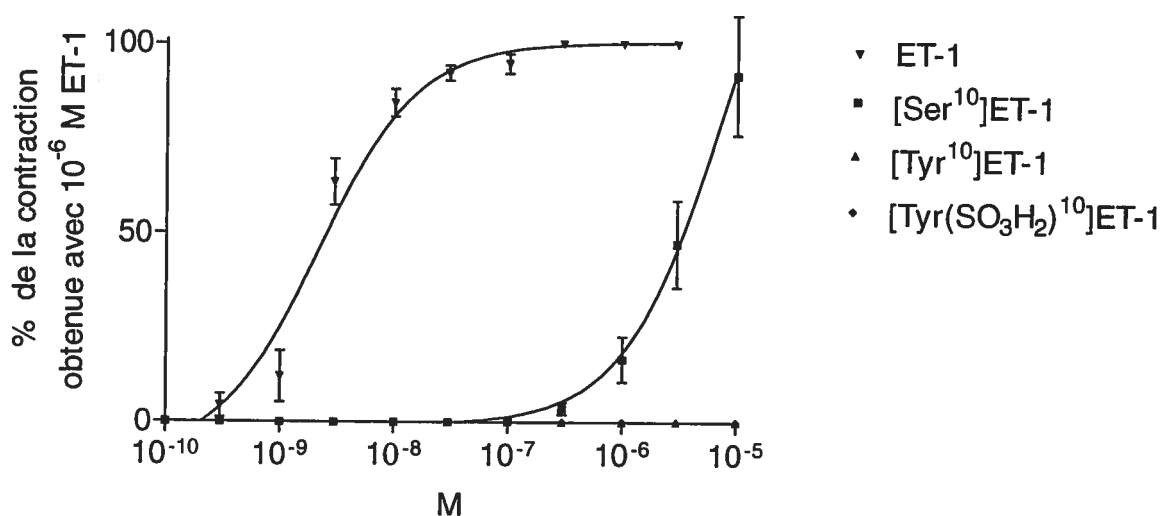


Figure 13: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues, modifiés à la position 10, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

11.3.2. Effectués sur le récepteur ET_B

Les essais pharmacologiques menés sur des bandelettes de parenchyme pulmonaire de cobaye permettent de mesurer l'impact des modifications de l'ET-1 sur le récepteur ET_B. Ainsi, on peut observer que globalement, la modification du segment chargé médian de l'ET-1 n'a affecté que légèrement la puissance relative du peptide sur le récepteur ET_B. En effet, l'introduction d'une Ala à la position 8, 9 ou 10 a produit des analogues quasi équipotents à l'ET-1. Toutefois, ceux-ci se sont révélés des agonistes partiels du récepteur ET_B avec des activités intrinsèques environ 50% inférieures à celle du peptide natif (Figure 14 et Tableau 4). Lors de l'insertion d'un résidu Tyr ou Ser à la position 8 ou 10, on observe une perte de puissance relative variant entre des facteurs de 1 à 5 (Figures 15 et 16 ainsi que Tableaux 5 et 6). Cependant, ces modifications en position 8 ont produit des agonistes partiels du récepteur ET_B montrant, eux-aussi, une perte d'activité intrinsèque d'environ 50% (Figure 15 et Tableau 5). L'introduction de groupements phosphate ou sulfate, sur la chaîne latérale de Tyr en position 8 n'a pas causé d'impact

majeur sur la puissance relative des analogues correspondants (Figure 15 et Tableaux 5). Par contre, l'activité intrinsèque a été fortement diminuée chez l'analogue $[\text{Tyr}(\text{SO}_3\text{H}_2)^8]\text{ET-1}$ par rapport à celle mesurée avec le $[\text{Tyr}^8]\text{ET-1}$. Finalement, contrairement à ce qui a été observé sur le récepteur ET_A , la substitution de l'acide glutamique-10 par une Ser ou une Tyr ou même une $\text{Tyr}(\text{SO}_3\text{H}_2)$ n'a pas eu d'impact majeur sur la puissance ou l'activité intrinsèque de l'ET-1 sur le récepteur ET_B (Figure 16 et Tableau 6).

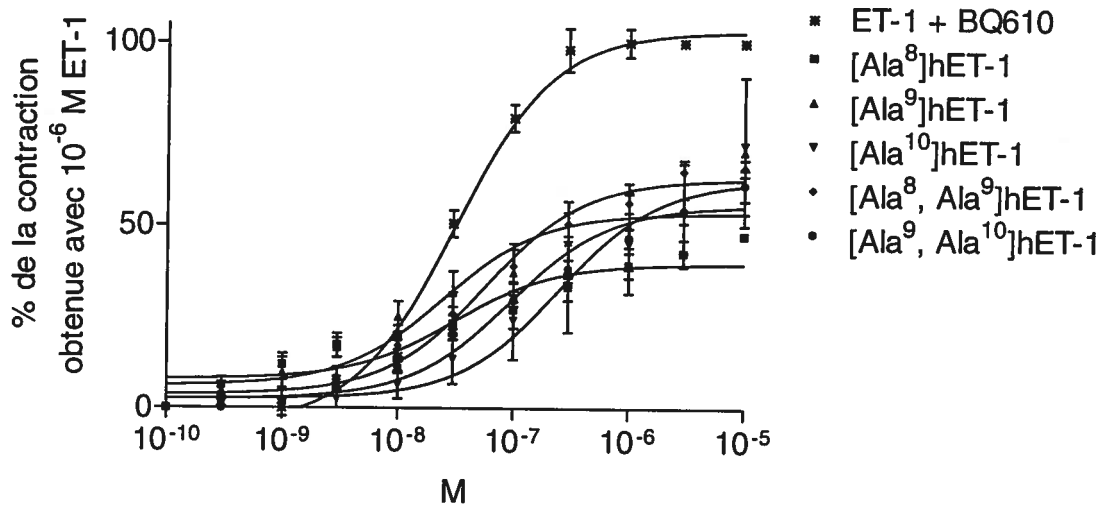


Figure 14: Courbes concentration-réponse de la ET-1 et de ses analogues dans lesquels des résidus Ala ont été introduits aux positions 8, 9 et/ou 10, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

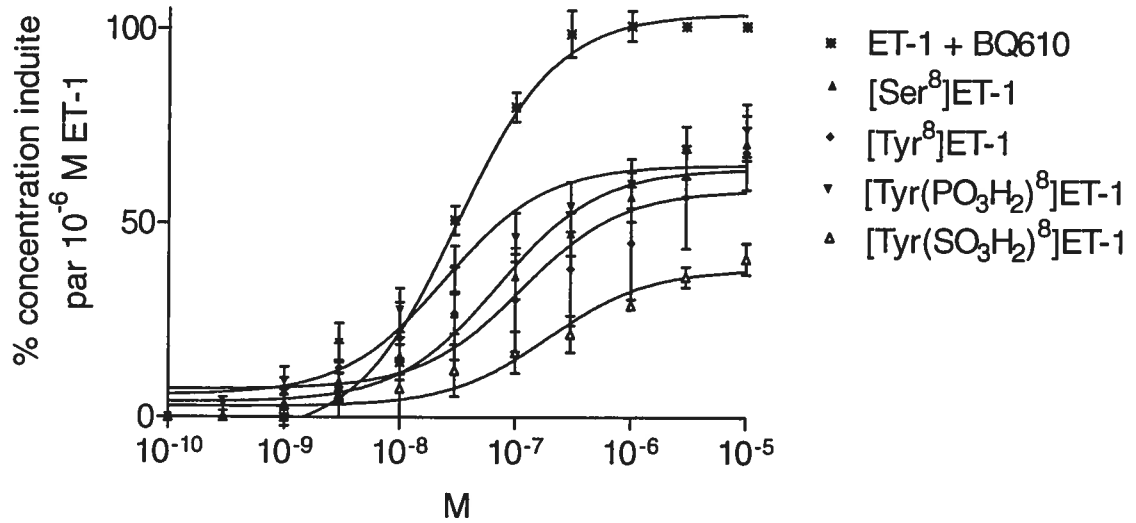


Figure 15: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues modifiés à la position 8, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

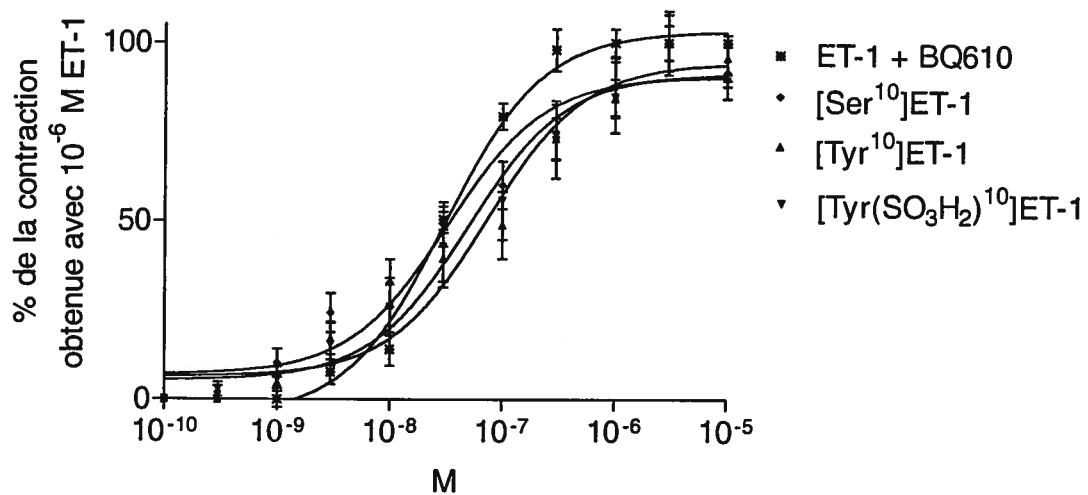


Figure 16: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues modifiés à la position 10 obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

Tableau 4: EC₅₀ de l'ET-1 et de ses analogues dont les acides aminés aux positions 8, 9 et/ou 10 ont été remplacées par une Ala.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	$6,5 \times 10^{-9} \pm 0,1$	$2,9 \times 10^{-8} \pm 0,1$
[Ala ⁸]ET-1	$1,3 \times 10^{-7} \pm 0,1$	$3,1 \times 10^{-8} \pm 0,2$
[Ala ⁹]ET-1	$7,0 \times 10^{-9} \pm 0,1$	$2,4 \times 10^{-8} \pm 0,2$
[Ala ¹⁰]ET-1	inactif	$2,5 \times 10^{-7} \pm 0,2$
[Ala ⁸ , Ala ⁹]ET-1	$5,6 \times 10^{-7} \pm 0,2$	$6,3 \times 10^{-8} \pm 0,1$
[Ala ⁹ , Ala ¹⁰]ET-1	inactif	$1,2 \times 10^{-7} \pm 0,1$

Tableau 5: EC₅₀ de l'ET-1 et de ses analogues dont l'acide aspartique-8 a été substitué.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	$6,5 \times 10^{-9} \pm 0,1$	$2,9 \times 10^{-8} \pm 0,1$
[Ser ⁸]ET-1	$3,2 \times 10^{-7} \pm 0,1$	$2,4 \times 10^{-8} \pm 0,1$
[Tyr ⁸]ET-1	$7,5 \times 10^{-7} \pm 0,1$	$1,1 \times 10^{-7} \pm 0,3$
[Tyr(PO ₃ H ₂) ⁸]ET-1	$3,4 \times 10^{-7} \pm 0,1$	$7,1 \times 10^{-8} \pm 0,1$
[Tyr(SO ₃ H ₂) ⁸]ET-1	$1,8 \times 10^{-6} \pm 0,1$	$1,9 \times 10^{-9} \pm 0,2$

Tableau 6: EC₅₀ de l'ET-1 et de ses analogues dont l'acide glutamique-10 a été substitué.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	$6,5 \times 10^{-9} \pm 0,1$	$2,9 \times 10^{-8} \pm 0,1$
[Ser ¹⁰]ET-1	$7,7 \times 10^{-6} \pm 0,2$	$3,2 \times 10^{-8} \pm 0,1$
[Tyr ¹⁰]ET-1	Inactif	$7,1 \times 10^{-8} \pm 0,1$
[Tyr(SO ₃ H ₂) ¹⁰]ET-1	Inactif	$5,0 \times 10^{-8} \pm 0,2$

12. Fragments 8-21, 9-21 et 10-21

Les études structure-fonction effectuées sur l'ET-1 fournissent plusieurs indices suggérant que le segment C-terminal en hélice α chapeauté par une ou plusieurs charges seraient suffisant pour lier et même activer les récepteurs de l'ET. Nous avons donc poursuivi l'étude des charges retrouvées dans le segment médian de l'ET-1 en synthétisant des analogues des fragments 8-21, 9-21 et 10-21 (Figure 17).

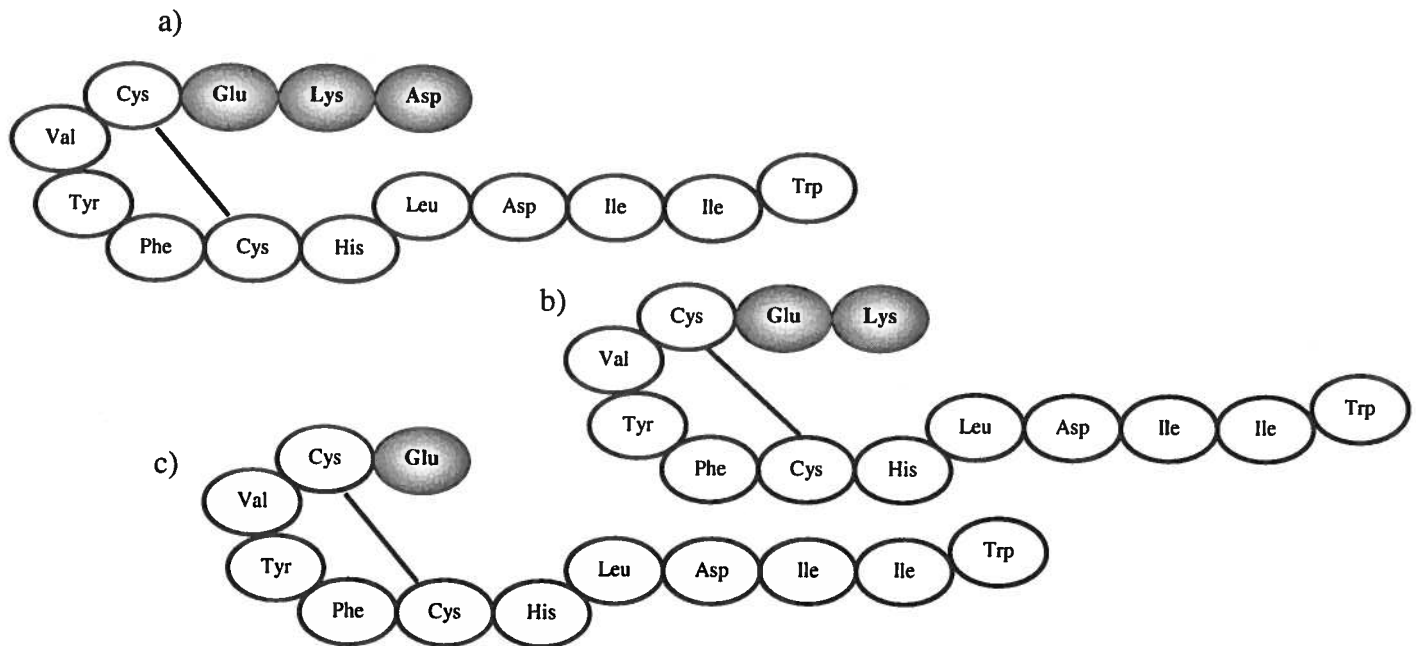


Figure 17 : Représentation des fragments 8-21 (a), 9-21 (b) et 10-21 (c) de l'ET-1

12.1. Synthèse peptidique

Cette fois, la chimie t-Boc sur une résine de polystyrène pontée avec du divinylbenzène et fonctionnalisée par des groupements chlorométhyles a été utilisée pour l'obtention de ces analogues du segment C-terminal de l'ET-1. Bien que cette approche nécessite des conditions de synthèse et de clivage plus vigoureuses, elle a pour avantage d'être moins onéreuse. À la fin de la synthèse, les analyses effectuées par CLHP analytique et par spectrométrie de masse ont révélé l'obtention d'un seul produit majoritaire pour chacun des analogues dont la masse correspondait à celle du produit attendu.

Le plan de protection orthogonale utilisé prévoyait qu'une fois libérés de la matrice solide, ces analogues porteraient des groupements AcM sur les chaînes latérales des cystéines 11 et 15 et un groupement formyle sur le noyau indole du Trp en position 21. Le pont disulfure a été mis en place lors d'un traitement à l'iode. Ce traitement permet en une seule étape de cliver les groupements AcM et de former le lien disulfure. Ensuite, le groupement formyle a été retiré par une courte exposition des peptides à la pipéridine 0,1 N.

12.2. Caractérisation des analogues

Chacune de ces étapes de cyclisation et de déformylation a été suivie par CLHP analytique et par spectrométrie de masse. Ces analyses montrent que la méthode utilisée a permis l'obtention des analogues désirés avec une pureté supérieure à 90%.

Tableau 7: Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment C-terminal de l'ET-1

	Masse attendue (Da)	Masse mesurée (Da)
ET-1 (8-21)	1782	1784
N-Ac-ET-1 (8-21)	1825	1826
N-Ac-[lys ⁹]ET-1 (8-21)	1825	1827
[lys ⁹]ET-1 (8-21)	1782	1784
ET-1 (9-21)	1667	1669
N-Ac-ET-1 (9-21)	1710	1712
N-Ac-[lys ⁹]ET-1 (9-21)	1710	1755
[lys ⁹]ET-1 (9-21)	1667	1669
ET-1 (10-21)	1539	1541
N-Ac-ET-1 (10-21)	1582	1584

Tableau 8: Charge nette du segment N-terminal des analogues des fragments 8-21, 9-21 et 10-21 de l'ET-1

	Charge nette du segment 8 à 10
ET-1 (8-21)	0
N-Ac-ET-1 (8-21)	-1
N-Ac-[lys ⁹]ET-1 (8-21)	-1
[lys ⁹]ET-1 (8-21)	0
ET-1 (9-21)	+1
N-Ac-ET-1 (9-21)	0
N-Ac-[lys ⁹]ET-1 (9-21)	0
[lys ⁹]ET-1 (9-21)	+1
ET-1 (10-21)	0
N-Ac-ET-1 (10-21)	-1

12.3. Essais pharmacologiques

12.3.1. Effectués sur le récepteur ET_A

Tous les analogues ont été testés pour leur activité agoniste et, en l'absence de celle-ci, pour leur activité antagoniste possible sur des préparations d'aorte de rat. Les résultats obtenus ont montré que les analogues des fragments 8-21 et 10-21 se sont avérés incapables d'induire la contraction des tissus. De plus, ces dérivés peptidiques n'ont présenté aucune activité antagoniste (Figures 18 et 20 ainsi que Tableaux 9 et 11).

Les analogues du segment 9-21 de l'ET-1 se sont avérés les plus actifs de cette série avec des valeurs de EC_{50} de $2,8 \times 10^{-7}$ M pour l'analogue dans lequel une D-Lys a été introduite en position 9 et de $1,8 \times 10^{-6}$ M pour l'analogue acétylé en N-terminal (Figure 19 et Tableau 10).

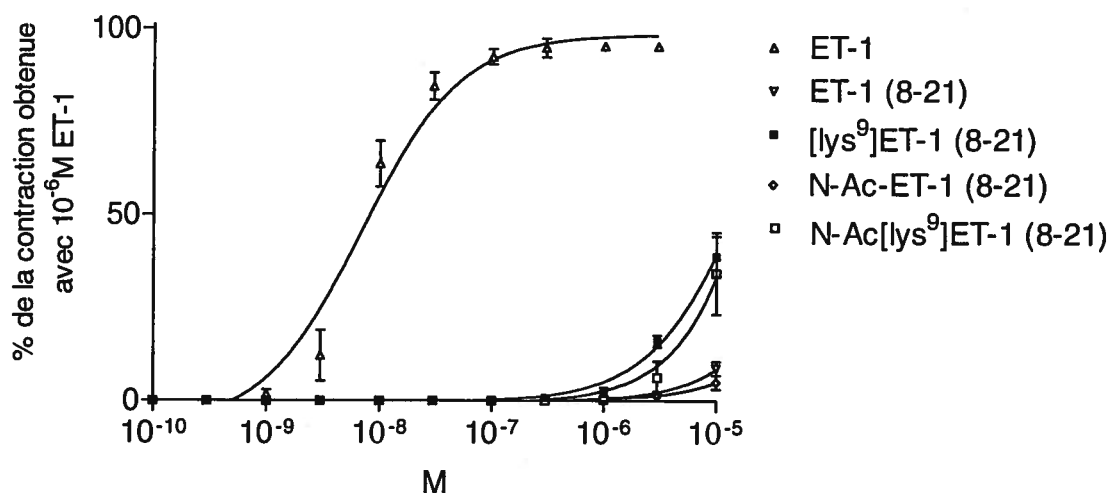


Figure 18: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues du fragments 8-21 obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

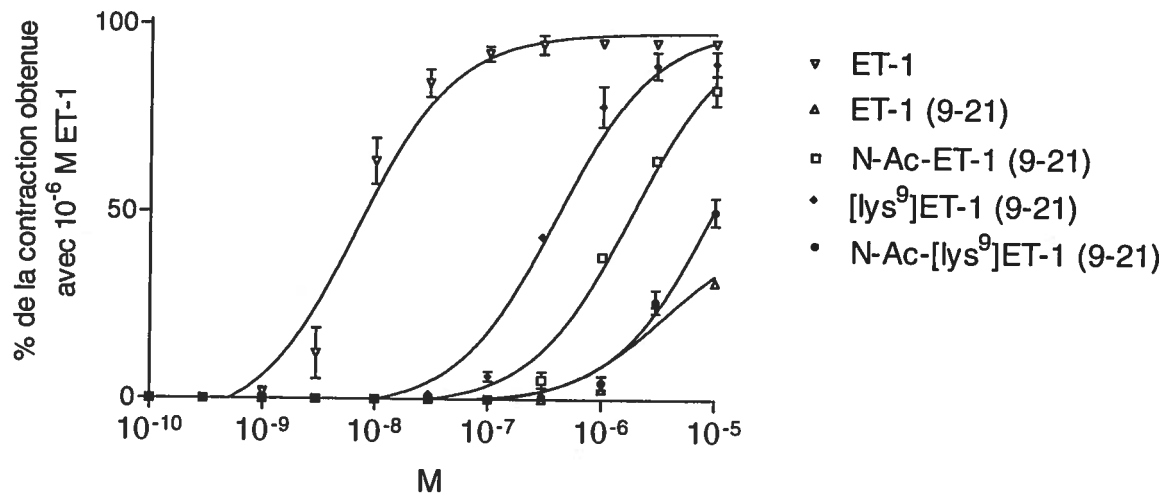


Figure 19: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

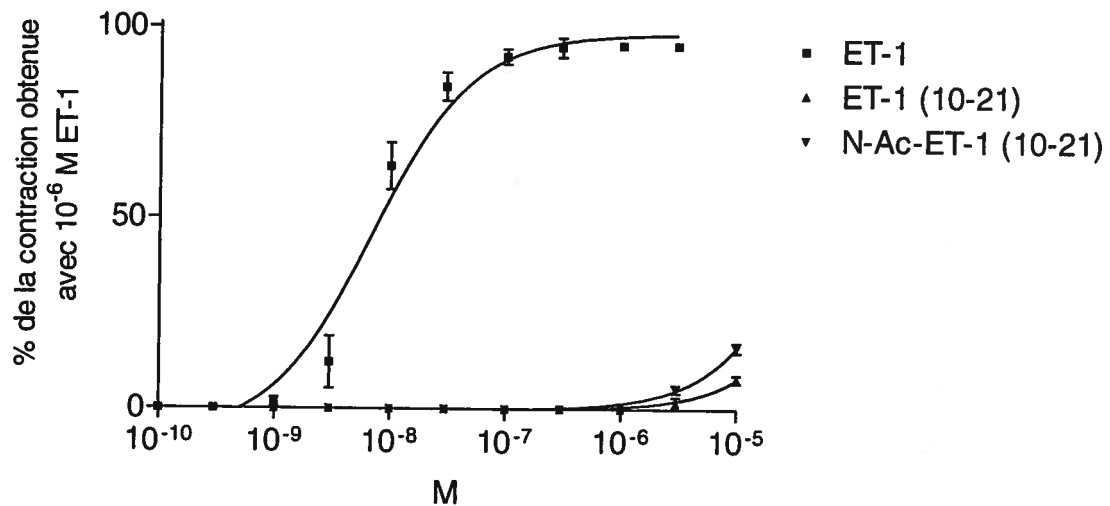


Figure 20: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues du fragment 10-21 de l'ET-1 obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

12.3.2. Effectués sur le récepteur ET_B

Les courbes concentration-réponse obtenues sur les préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye montrent qu'aucun analogue des fragments 8-21 et 9-21 de l'ET-1 n'a été capable d'induire la contraction de ce tissu (Figures 21 et 22 ainsi que Tableaux 9 et 10). De plus, ces peptides n'ont montré aucune activité antagoniste.

Cependant, le fragment ET-1 (10-21) a, quant à lui, montré une certaine capacité constrictrice sur la préparation modèle du récepteur ET_B avec un EC₅₀ de $1,3 \times 10^{-6}$ M. L'ajout d'un groupement acétyle en N-terminal du segment a provoqué une diminution importante de la puissance de l'analogue le rendant pratiquement inactif (Figure 23 et Tableau 11).

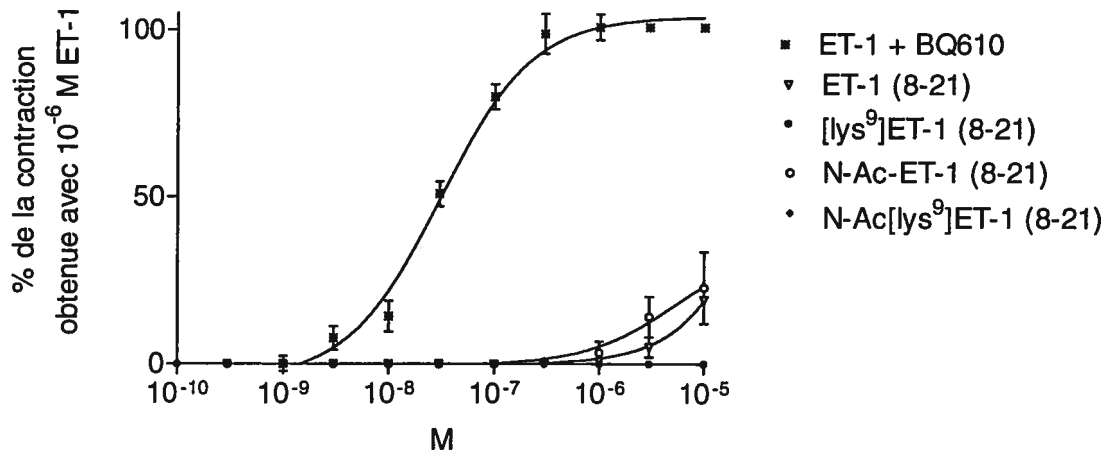


Figure 21: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues du fragment 8-21 obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

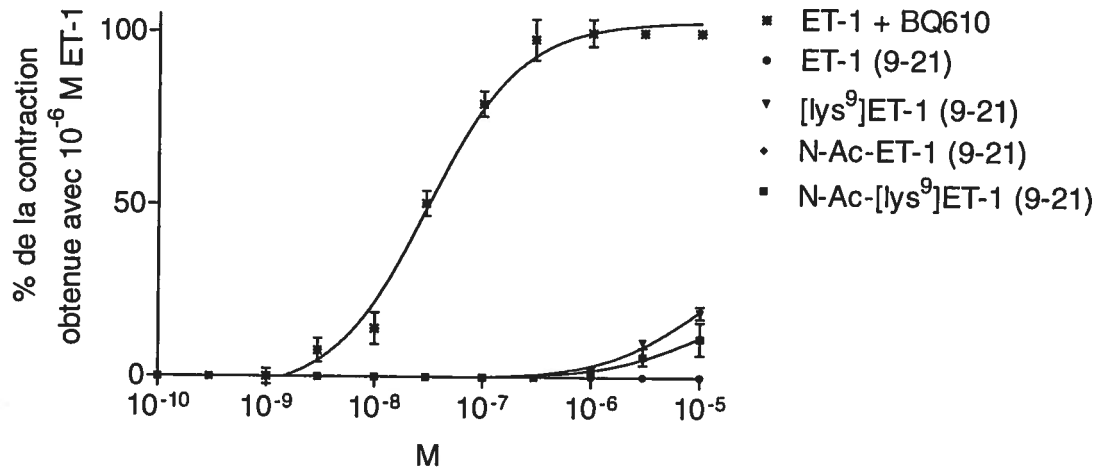


Figure 22: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues du fragment 9-21 obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

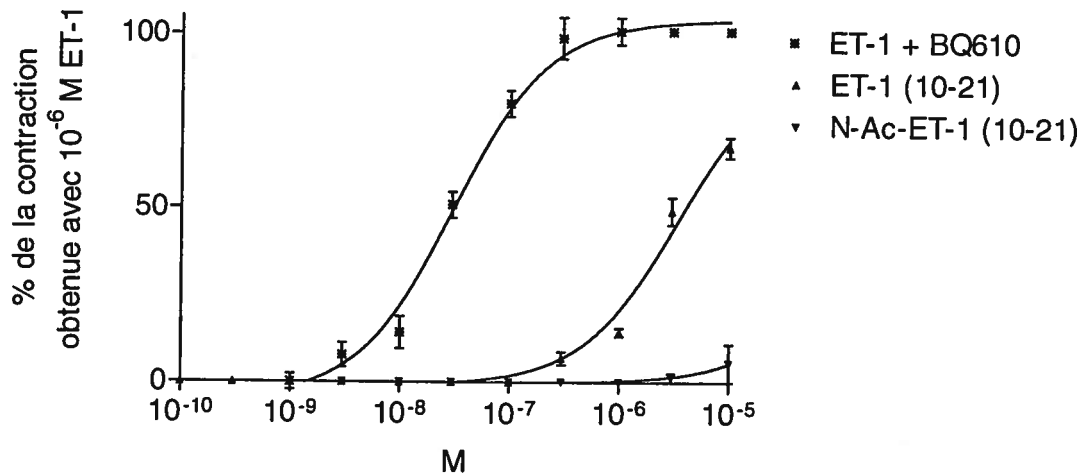


Figure 23: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues du fragment 10-21 l'ET-1 obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

Tableau 9 : EC₅₀ de l'ET-1 et des analogues du fragment 8-21.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	6,5 x 10 ⁻⁹ ± 0,1	2,9 x 10 ⁻⁸ ± 0,1
ET-1 (8-21)	>10 ⁻⁵	>10 ⁻⁵
[lys ⁹] ET-1 (8-21)	>10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵
N-Ac-ET-1 (8-21)	>10 ⁻⁵	>10 ⁻⁵
N-Ac-[lys ⁹] ET-1 (8-21)	>10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵

Tableau 10: EC₅₀ de l'ET-1 et des analogues du fragment 9-21.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	6,5 x 10 ⁻⁹ ± 0,1	2,9 x 10 ⁻⁸ ± 0,1
ET-1 (9-21)	5,1 x 10 ⁻⁶ ± 0,2	inactif
[lys ⁹] ET-1 (9-21)	2,8 x 10 ⁻⁷ ± 0,1	>10 ⁻⁵
N-Ac-ET-1 (9-21)	1,8 x 10 ⁻⁶ ± 0,1	>10 ⁻⁵
N-Ac-[lys ⁹] ET-1 (9-21)	9,5 x 10 ⁻⁶ ± 0,1	>10 ⁻⁵

Tableau 11: EC₅₀ de l'ET-1 et des analogues du fragment 10-21.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	6,5 x 10 ⁻⁹ ± 0,1	2,9 x 10 ⁻⁸ ± 0,1
ET-1 (10-21)	>10 ⁻⁵	1,3 x 10 ⁻⁶ ± 0,1
N-Ac-ET-1 (10-21)	>10 ⁻⁵	>10 ⁻⁵

12.4. Essais de liaison

12.4.1. Effectués sur le récepteur ET_A

Les courbes de compétition entre l'ET-1 marquée à l'iode-125 (0,1 nM) et l'ET-1 ou le [lys⁹]ET-1 (9-21) ont été effectuées sur des cellules CHO exprimant le récepteur ET_A. Ces résultats montrent que, bien qu'il ait peu d'affinité, l'analogue du fragment 9-21 compétitionne avec l'ET-1 pour le même site de liaison sur le récepteur ET_A (Figure 24). Cependant, puisque l' [¹²⁵I]ET-1 (0,1 nM) n'a pu être complètement déplacé par des concentrations élevées d'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21) (1×10^{-5} M) et que la disponibilité du matériel peptidique était limitée, nous n'avons pu calculer le pA₂ de celui-ci.

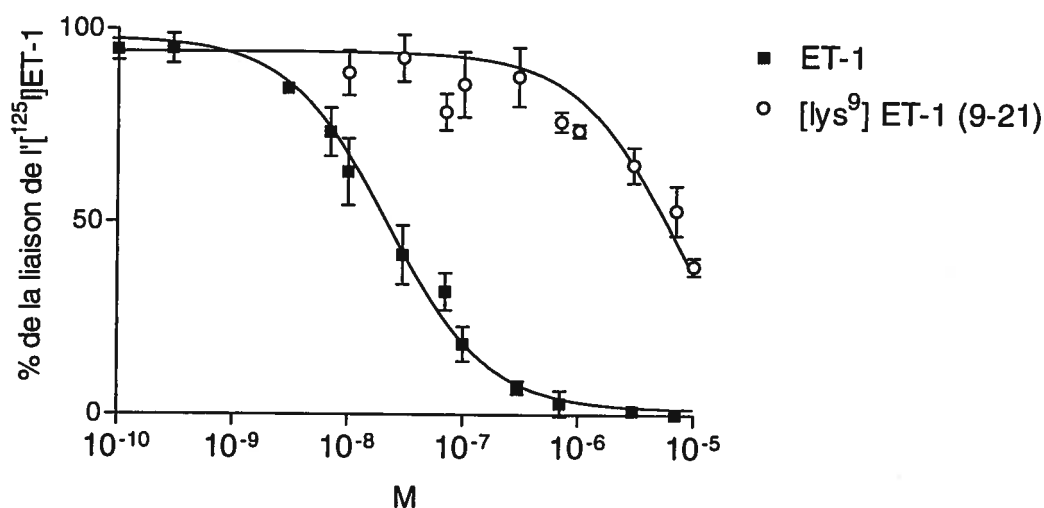


Figure 24: Courbes de compétition entre l' [¹²⁵I]ET-1 (0,1 nM) et des concentrations croissantes d'ET-1 ou de l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21) effectuées sur des cellules CHO exprimant le récepteur ET_A.

13. Étude structure-fonction du fragment 9-21

Puisque deux analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 ont montré une affinité faible mais préférentielle envers le récepteur ET_A, nous avons synthétisé plusieurs analogues de ce fragment. Ces analogues avaient pour but de déterminer les éléments essentiels contenus dans le segment 9-21 de l'ET-1 pour la liaison et l'activation du récepteur ET_A, mais aussi d'identifier ceux responsables de la sélectivité du peptide envers ce récepteur. Ainsi des analogues amides et linéaires ont été synthétisés afin de mesurer l'importance du groupement carboxylique terminal et du lien intramoléculaire non-naturel fermé entre les Cys 11 et 15. Enfin, les positions 13, 16 et 18 ont aussi été modifiées pour mesurer l'influence des résidus Tyr, His et Asp dans le processus d'activation des récepteurs de l'ET (Figure 25).

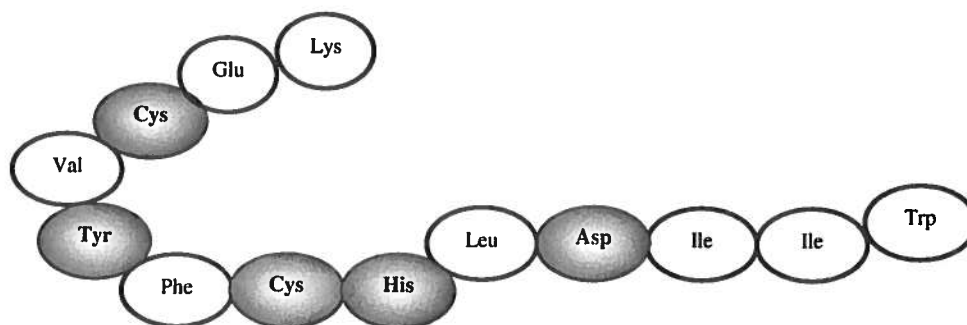


Figure 25: Représentation des acides aminés Cys¹¹, Tyr¹³, Cys¹⁵, His¹⁶ et Asp¹⁸ du fragment 9-21 de l'ET-1

13.1. Synthèse peptidique

Lors de la synthèse des premiers analogues du segment C-terminal nous avons obtenu les dérivés peptidiques désirés avec de bons rendements. Nous avons procédé de la même manière pour développer ces nouveaux analogues. Les synthèses ont donc été effectuées

suivant le protocole de la chimie t-Boc sur une matrice chlorométhylée. Des Cys(Acm) ont été introduites aux positions 11 et 15 ainsi qu'un Trp(For) à la position 21. Suite au clivage des analogues de leur support solide, chacun de ceux-ci a été cyclisé suivant la méthode utilisant l'iode moléculaire. Après purification, un deuxième traitement a été effectué, utilisant cette fois 0,1 N pipéridine, ce qui nous a permis d'obtenir les analogues ayant la chaîne latérale de Trp²¹ libre. Seuls les analogues ayant leur C-terminal amide ont différé de cette approche. En effet, une résine MBHA a plutôt été utilisée, puisque celle-ci permet l'obtention du peptide amide après clivage au HF. Le couplage de l'acide aminé en position C-terminale est alors effectué de la même manière que lors de l'insertion des autres acides aminés de la chaîne peptidique.

13.2. Caractérisation des analogues

Comme lors des premières synthèses, les analogues ont tous été obtenus de façon majoritaire. La caractérisation de ceux-ci, par CLHP analytique a montré une pureté supérieure à 90% et les analyses de spectrométrie de masse montrent l'obtention des produits désirés (Tableaux 12 à 17).

Tableau 12: Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment [lys⁹]9-21 de l'ET-1 ayant leur C-terminal amide.

	Masse attendue (Da)	Masse mesurée (Da)
[lys ⁹] ET-1 (9-21) – NH ₂	1666	1669
[lys ⁹ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21) – NH ₂	1695	1697

Tableau 13: Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés aux positions 11 et 15.

	Masse attendue (Da)	Masse mesurée (Da)
[Ala ^{11,15}] ET-1 (9-21)	1603	1606
[Ala ^{11,15} , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	1632	1633
[Cys(Acm) ^{11, 15}] ET-1 (9-21)	1811	1814
[Cys(Acm) ^{11, 15} , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	1840	1843
[cys ¹¹] ET-1 (9-21)	1667	1668
[cys ¹⁵] ET-1 (9-21)	1667	1667
[cys ^{11,15}] ET-1 (9-21)	1667	1668

Tableau 14 : Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 dont la Tyr¹³ a été modifiée.

	Masse attendue (Da)	Masse mesurée (Da)
[lys ⁹ , Tyr (OMe) ¹³] ET-1 (9-21)	1682	1686
[lys ⁹ , Tyr (OMe) ¹³ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	1711	1712
[lys ⁹ , tyr ¹³] ET-1 (9-21)	1667	1667
[lys ⁹ , tyr ¹³ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	1696	1699
[Tyr (I) ¹³] ET-1 (9-21)	1793	1795
[lys ⁹ , Tyr (I) ¹³] ET-1 (9-21)	1793	1794

Tableau 15: Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment [lys⁹]9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 13.

	Masse attendue (Da)	Masse mesurée (Da)
[lys ⁹ , Ser ¹³] ET-1 (9-21)	1590	1594
[lys ⁹ , Ser ¹³ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	1619	1622
[lys ⁹ , Phe ¹³] ET-1 (9-21)	1653	1656
[lys ⁹ , Phe ¹³ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	1682	1681

Tableau 16: Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 16.

	Masse attendue (Da)	Masse mesurée (Da)
[lys ⁹ , His(1Me) ¹⁶] ET-1 (9-21)	1681	1683
[lys ⁹ , His(1Me) ¹⁶ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	1710	1712
[lys ⁹ , His(3Me) ¹⁶] ET-1 (9-21)	1681	1684
[lys ⁹ , His(3Me) ¹⁶ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	1710	1713
[Ala ¹⁶] ET-1 (9-21)	1601	1602
[lys ⁹ , Ala ¹⁶] ET-1 (9-21)	1601	1603
N-Ac-[Ala ¹⁶] ET-1 (9-21)	1644	1647

Tableau 17: Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 18.

	Masse attendue (Da)	Masse mesurée (Da)
[Asn ¹⁸] ET-1 (9-21)	1666	1667
[lys ⁹ ,Asn ¹⁸] ET-1 (9-21)	1666	1668
[Gly ¹⁸] ET-1 (9-21)	1609	1612
[lys ⁹ , Gly ¹⁸] ET-1 (9-21)	1609	1610
N-Ac-[Gly ¹⁸] ET-1 (9-21)	1652	1654

13.3. Essais pharmacologiques

13.3.1. Effectués sur le récepteur ET_A

L'activité vasoconstrictrice de chacun de ces analogues a été évaluée à l'aide de préparations d'anneaux d'aorte thoracique de rat. Lorsque les peptides s'avéraient incapables d'induire la contraction des tissus, une courbe concentration-réponse de l'ET-1 étaient effectuée pour évaluer leur activité antagoniste. Ces résultats ont montré, dans un premier temps, que le groupement carboxyl-terminal est important pour maintenir l'activité biologique du fragment [lys⁹]ET-1 (9-21) sur le récepteur ET_A. En effet, l'amidation du C-terminal a conduit à des analogues inactifs (Figure 26 et Tableau 18). De même, le pont disulfure non-naturel reliant les Cys 11 et 15 semble important pour maintenir l'activité vasoconstrictrice du fragment puisque tous les analogues, à l'exception d'un seul, sont inactifs. En effet, l'analogue [Ala^{11,15}, Trp(F)²¹]ET-1(9-21) est capable d'induire la contraction des anneaux d'aorte, celui-ci est cependant 10 fois moins puissant que l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21) avec une valeur de EC₅₀ de 1,6 x 10⁻⁶ M par rapport à 2,8 x 10⁻⁷ M respectivement (Figure 27 et Tableau 19). L'évaluation de

l'activité biologique des analogues a révélé qu'ils ne possèdent aucune activité antagoniste et que ceux-ci ne sont pas reconnus par le récepteur car ils sont incapables de déplacer la courbe concentration-réponse de l'ET-1.

Toutes modifications de la chaîne latérale de la Tyr en position 13, telles que l'introduction d'un groupement méthyle ou d'un atome d'iode, ont produit également des analogues n'ayant aucune affinité pour le récepteur ET_A. De plus, lorsque l'on modifie simplement l'orientation spatiale de la chaîne latérale de ce résidu, on obtient également des analogues inactifs (Figure 28 et Tableau 20). Lors du remplacement de la Tyr, un acide aminé aromatique sur lequel on retrouve un groupement hydroxyle en para, par une Phe, ayant une chaîne latérale aromatique, ou par une Ser, un résidu hydroxylé, on observe alors que ces analogues n'ont aucune activité vasoactive sur le récepteur ET_A (Figure 29 et Tableau 21).

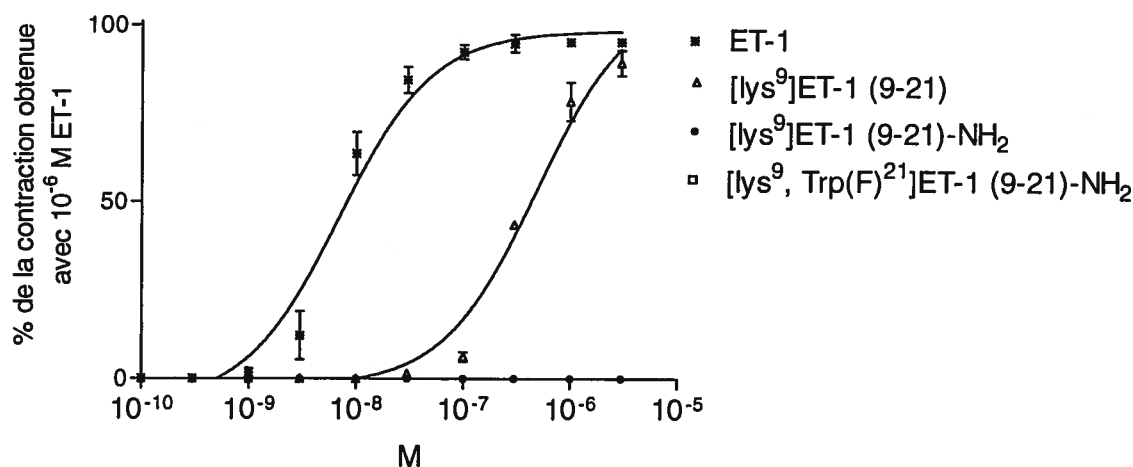


Figure 26: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du fragment [lys⁹]ET-1 (9-21) et de ses analogues ayant leur C-terminal modifié, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

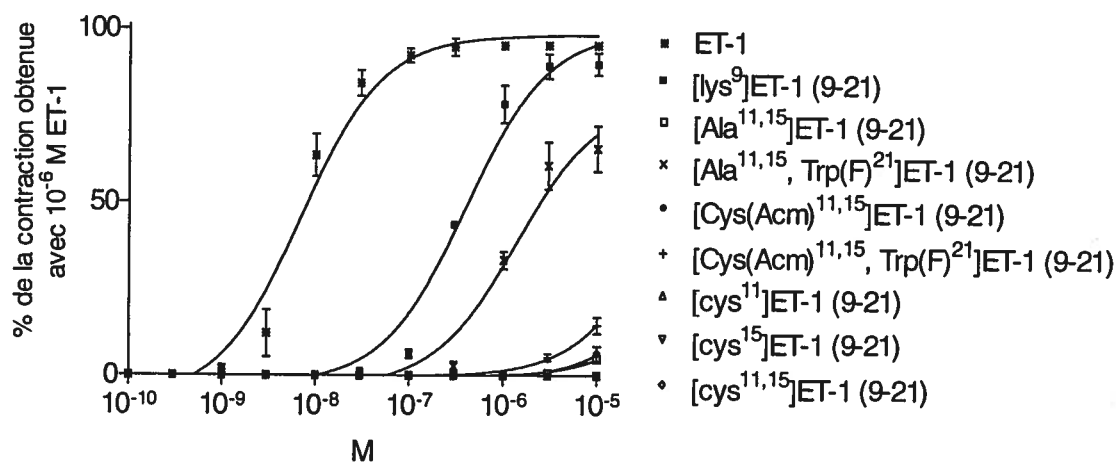


Figure 27: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, de [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés aux positions 11 et 15, obtenues sur des préparations d'aorte de rat

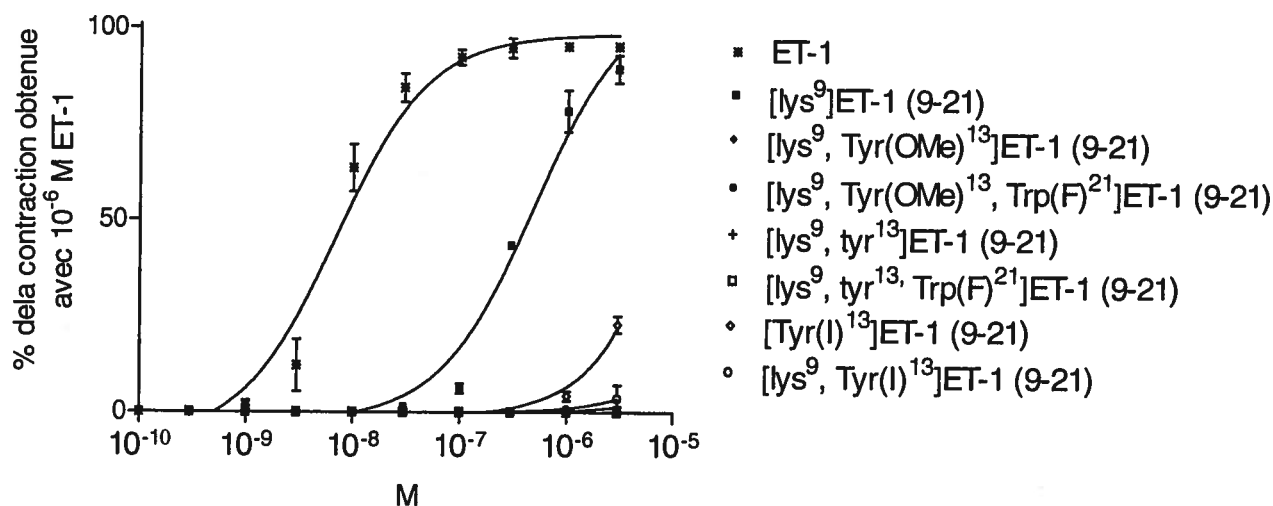


Figure 28: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, de [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 dont la Tyr¹³ a été modifiée, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

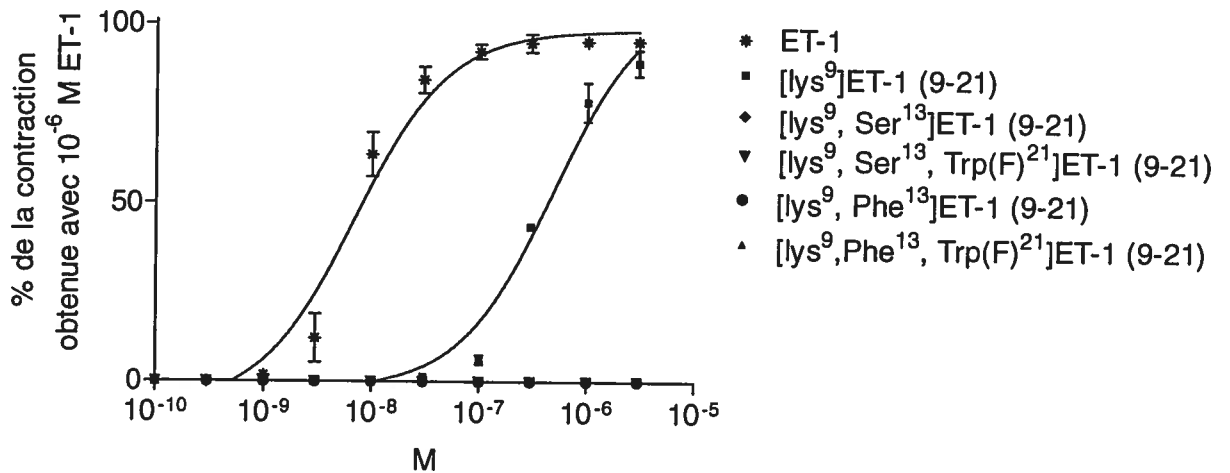


Figure 29: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, de $[\text{lys}^9]\text{ET-1 (9-21)}$ et de ses analogues modifiés à la position 13, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

La position 16, naturellement occupée par une His semble également sensible aux modifications. En effet, lorsque l'on remplace ce résidu par une Ala on observe alors une perte complète de l'activité agoniste des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1. De plus ces analogues n'ont montré aucune activité antagoniste sur les préparations d'aorte de rat. Enfin, l'incorporation de groupements méthyles sur la chaîne latérale de l'His¹⁶, que ce soit sur l'azote 1 ou 3, donne lieu à l'inactivation de l'analogue $[\text{lys}^9]\text{ET-1 (9-21)}$ (Figure 30 et Tableau 22).

Finalement, nous avons étudié l'importance de la charge négative portée par la chaîne latérale de l'acide aspartique retrouvé à la position 18 du segment carboxy-terminal de l'ET-1. Les résultats obtenus montrent que le remplacement de ce résidu par une asparagine ou une glycine entraîne la perte de l'activité constrictrice des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 contenant ou non une D-Lys à la position 9 (Tableau 23). Les courbes concentration-réponse de l'ET-1 effectuées en présence de 1 μM de ces analogues montrent que ceux-ci sont incapables de déplacer la courbe de l'ET-1 sur le récepteur ET_A (Figure 31).

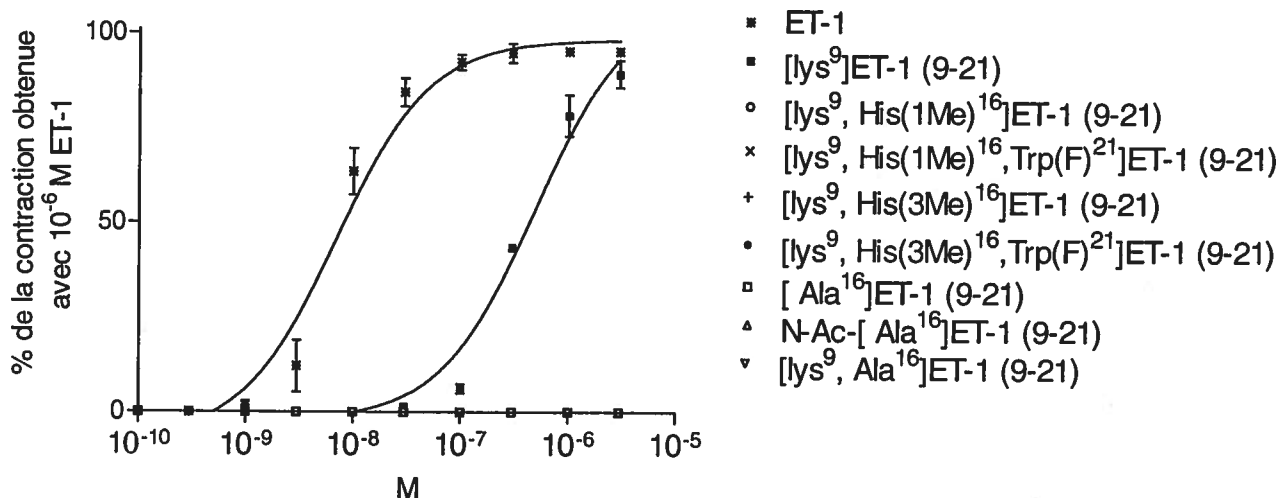


Figure 30: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 16, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

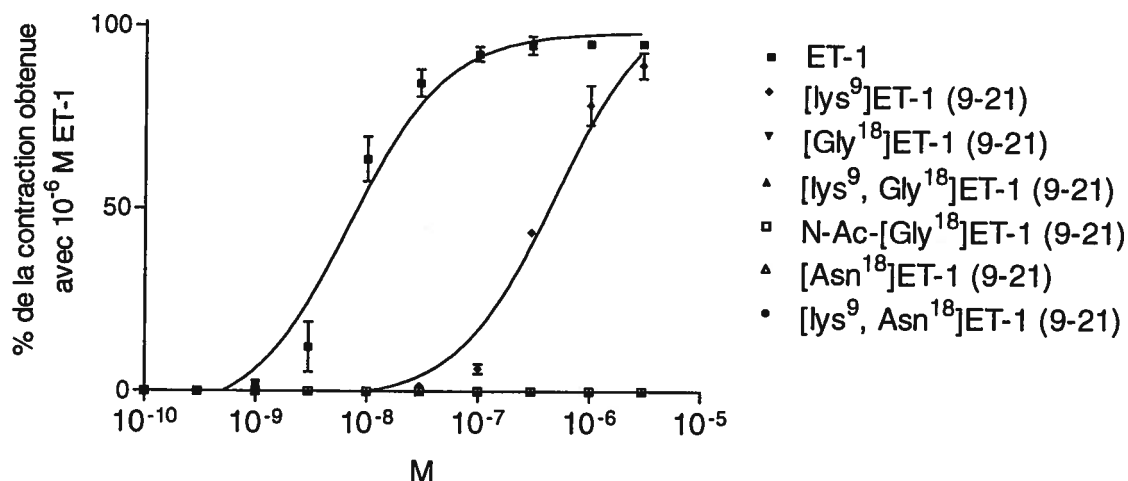


Figure 31: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 18, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

13.3.2. Effectués sur le récepteur ET_B

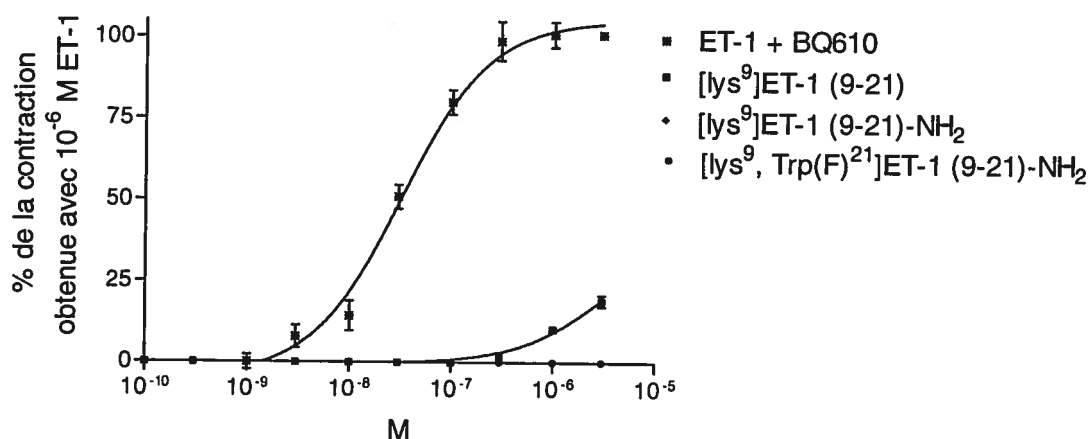


Figure 32: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et de ses analogues ayant leur C-terminal modifié, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

Les essais pharmacologiques menés sur le parenchyme pulmonaire de cobaye ont montré que les dérivés peptidiques ayant leur groupement carboxylique terminal amide ne possèdent aucune activité agoniste ou antagoniste sur le récepteur ET_B, tout comme il avait été observé sur les préparations d'aorte de rat riches en récepteurs ET_A (Figure 32 et Tableau 18).

Le retrait du lien intramoléculaire non-naturel, reliant les Cys 11 et 15, soit par l'insertion de groupement Acm sur les chaîne latérales de ces résidus ou par leur remplacement par des Ala, n'améliore pas l'activité biologique du fragment 9-21 de l'ET-1, contenant ou non une D-Lys à la position 9, sur le récepteur ET_B. L'inversion de la chiralité de l'une, de l'autre ou des deux Cys conduit également aux mêmes résultats. En effet, comme les analogues N-Ac-ET-1 (9-21) et [lys⁹]ET-1 (9-21), ces dérivés ne montrent qu'une faible activité constrictrice dont la valeur de EC₅₀ est supérieure à 10⁻⁵ M (Figure 33 et Tableau 19).

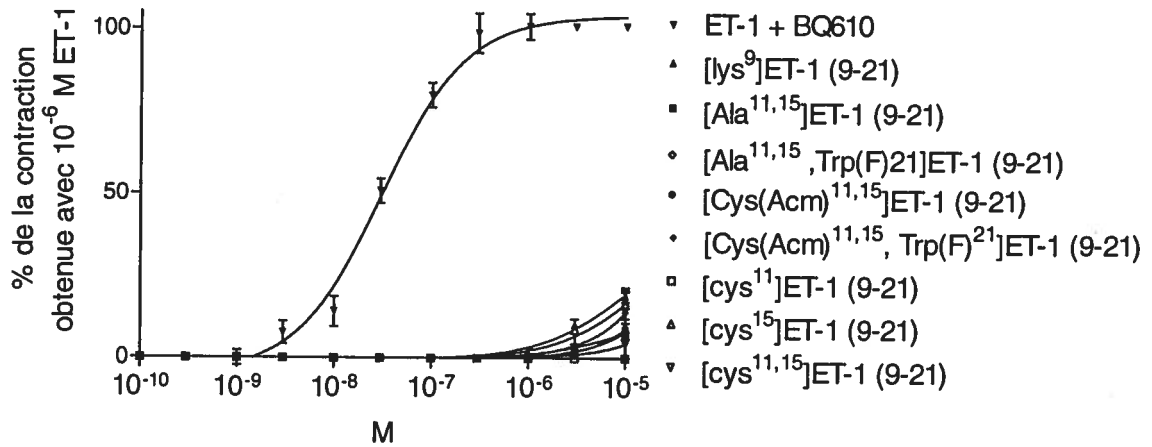


Figure 33: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés aux positions 11 et 15, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

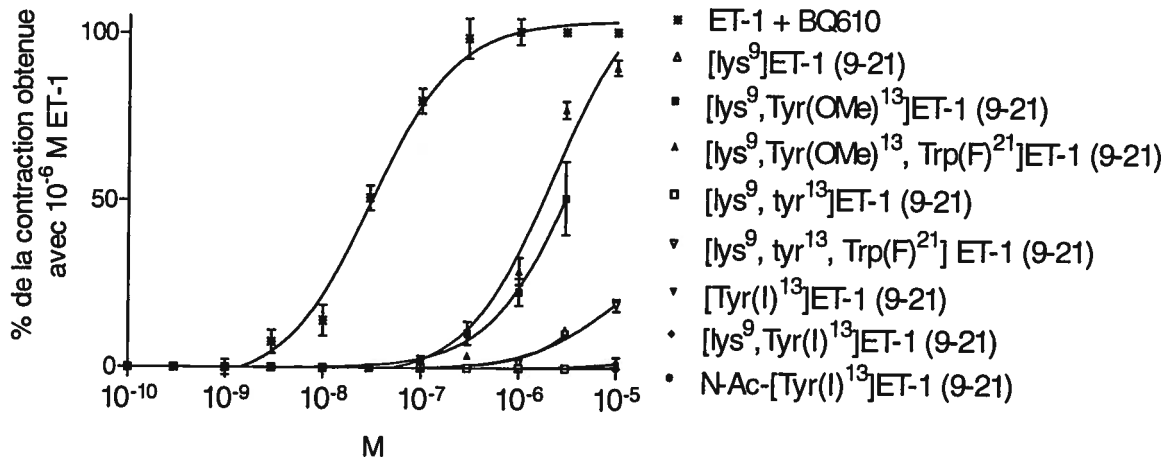


Figure 34: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 dont la Tyr¹³ a été modifiée, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

L'incorporation d'un groupement méthyle sur la chaîne latérale de Tyr¹³ a entraîné une augmentation non seulement de l'activité intrinsèque, mais aussi de la puissance relative de l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21), sur les lanières de parenchyme pulmonaire. Cependant, l'insertion d'un atome d'iode ou la modification de l'orientation spatiale de la chaîne latérale de Tyr¹³ a conduit à des analogues, à toute fins utiles, inactifs. Le groupement formyle porté par le noyau indole du Trp en position 21 a semblé améliorer légèrement la puissance relative des analogues sur le récepteur ET_B. En effet, le dérivé [lys⁹,Tyr(OMe)¹³]ET-1 (9-21) possède un EC₅₀ de $3,8 \times 10^{-6}$ M alors que [lys⁹,Tyr(OMe)¹³,Trp(F)²¹]ET-1 (9-21) présente plutôt un EC₅₀ de $2,7 \times 10^{-6}$ M (Figure 34 et Tableau 20).

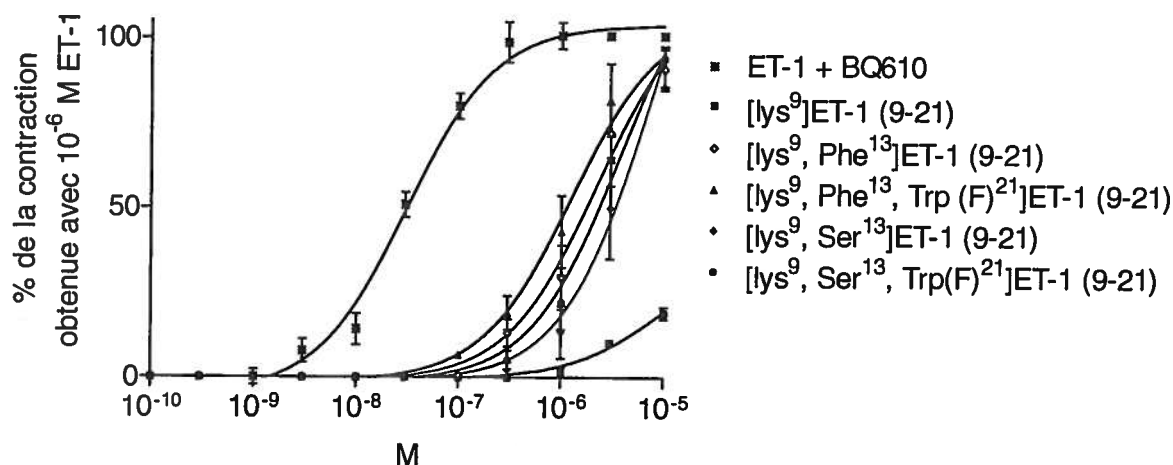


Figure 35: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et de ses analogues modifiés à la position 13, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

Le remplacement de Tyr, retrouvée naturellement à la position 13, par une Ser ou une Phe a conduit à une augmentation à la fois de l'activité intrinsèque et de la puissance relative de l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21) de façon comparable à celle observée lors de l'insertion d'un groupement méthyle. En effet, les analogues [lys⁹, Phe¹³]ET-1 (9-21) et

[lys⁹,Ser¹³]ET-1 (9-21) ont produit des valeurs de EC₅₀ de 4,8 x 10⁻⁶ M et de 3,2 x 10⁻⁶ M respectivement. De plus, l'insertion d'un groupement formyle en position 21 a favorisé la liaison et l'activation du récepteur ET_B d'un facteur d'environ 2 (Figure 35 et Tableau 21).

Pour terminer, lorsque les résidus His et Asp, retrouvés naturellement aux positions 16 et 18, sont remplacés par Ala et Asn ou Gly respectivement, on obtient alors des analogues inactifs sur le récepteur ET_B. Seul l'analogue, portant à la fois un groupement méthyle sur le N³ de l'imidazole de His¹⁶ et un formyle sur l'indole de Trp²¹, a présenté une certaine activité agoniste sur les préparations de poumons (Figures 36 et 37 ainsi que Tableau 22 et 23).

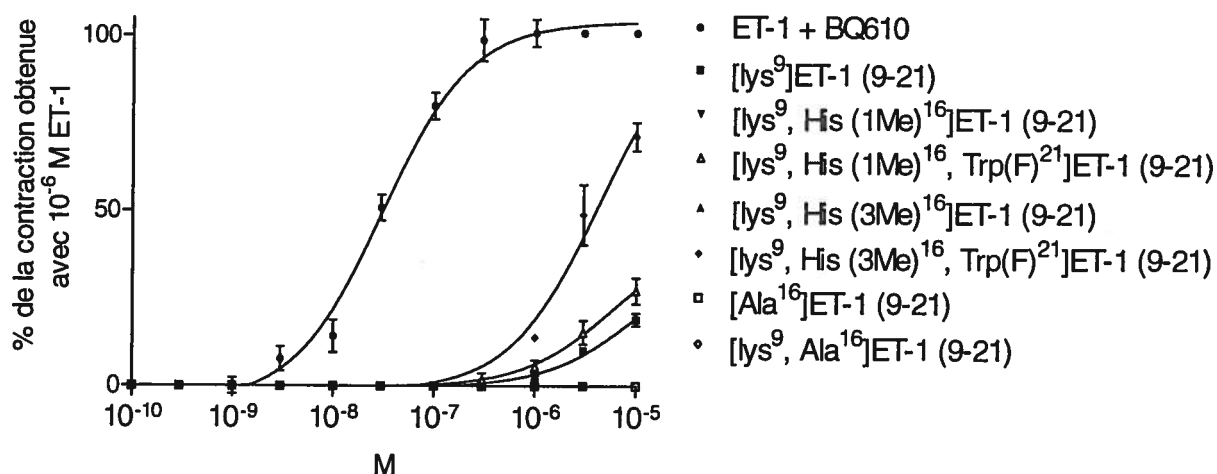


Figure 36: Courbes concentration-réponse de de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 16, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

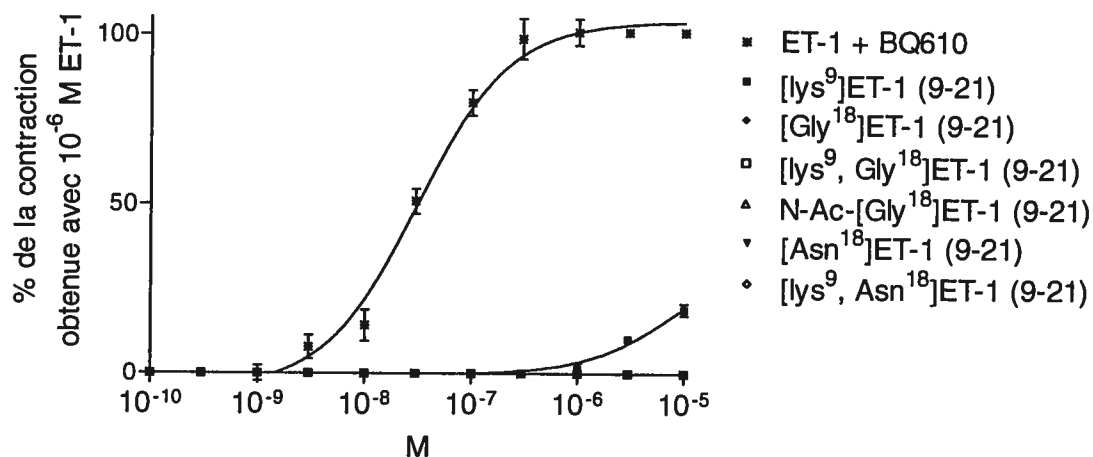


Figure 37: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1, modifiés à la position 18, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

Tableau 18: EC_{50} de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et de ses analogues ayant leur C-terminal modifié.

	ET _A EC_{50} (M) $\pm$ s.e.m.	ET _B EC_{50} (M) $\pm$ s.e.m.
ET-1	$6,5 \times 10^{-9} \pm 0,1$	$2,9 \times 10^{-8} \pm 0,1$
[lys ⁹]ET-1 (9-21)	$2,8 \times 10^{-7} \pm 0,1$	$>10^{-5}$
[lys ⁹] ET-1 (9-21) – NH ₂	Inactif	Inactif
[lys ⁹ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21) – NH ₂	Inactif	Inactif

Tableau 19: EC₅₀ de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés aux positions 11 et 15.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	6,5 x 10 ⁻⁹ ± 0,1	ND2,9 x 10 ⁻⁸ ± 0,1
[lys ⁹]ET-1 (9-21)	2,8 x 10 ⁻⁷ ± 0,1	>10 ⁻⁵
[Ala ^{11,15}] ET-1 (9-21)	>10 ⁻⁵	>10 ⁻⁵
[Ala ^{11,15} , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	1,6 x 10 ⁻⁶ ± 0,1	>10 ⁻⁵
[Cys(Acm) ^{11,15}] ET-1 (9-21)	>10 ⁻⁵	>10 ⁻⁵
[Cys(Acm) ^{11,15} , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	>10 ⁻⁵	>10 ⁻⁵
[cys ¹¹] ET-1 (9-21)	Inactif	>10 ⁻⁵
[cys ¹⁵] ET-1 (9-21)	Inactif	>10 ⁻⁵
[cys ^{11,15}] ET-1 (9-21)	Inactif	>10 ⁻⁵

Tableau 20 : EC₅₀ de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 dont la Tyr¹³ a été modifiée.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	6,5 x 10 ⁻⁹ ± 0,1	2,9 x 10 ⁻⁸ ± 0,1
[lys ⁹]ET-1 (9-21)	2,8 x 10 ⁻⁷ ± 0,1	>10 ⁻⁵
[lys ⁹ , Tyr (OMe) ¹³] ET-1 (9-21)	Inactif	3,8 x 10 ⁻⁶ ± 0,2
[lys ⁹ , Tyr (OMe) ¹³ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	Inactif	2,7 x 10 ⁻⁶ ± 0,1
[lys ⁹ , tyr ¹³] ET-1 (9-21)	Inactif	>10 ⁻⁵
[lys ⁹ , tyr ¹³ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	Inactif	>10 ⁻⁵
[Tyr (I) ¹³] ET-1 (9-21)	>10 ⁻⁶	>10 ⁻⁵
[lys ⁹ , Tyr (I) ¹³] ET-1 (9-21)	>10 ⁻⁵	>10 ⁻⁵

Tableau 21: EC₅₀ de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et de ses analogues modifiés à la position 13.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	6,5 x 10 ⁻⁹ ± 0,1	2,9 x 10 ⁻⁸ ± 0,1
[lys ⁹]ET-1 (9-21)	2,8 x 10 ⁻⁷ ± 0,1	>10 ⁻⁵
[lys ⁹ , Ser ¹³] ET-1 (9-21)	Inactif	3,2 x 10 ⁻⁶ ± 0,1
[lys ⁹ , Ser ¹³ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	Inactif	2,3 x 10 ⁻⁶ ± 0,1
[lys ⁹ , Phe ¹³] ET-1 (9-21)	Inactif	4,8 x 10 ⁻⁶ ± 0,1
[lys ⁹ , Phe ¹³ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	Inactif	1,2 x 10 ⁻⁶ ± 0,1

Tableau 22: EC₅₀ de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 16.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	6,5 x 10 ⁻⁹ ± 0,1	2,9 x 10 ⁻⁸ ± 0,1
[lys ⁹]ET-1 (9-21)	2,8 x 10 ⁻⁷ ± 0,1	>10 ⁻⁵
[lys ⁹ , His(1Me) ¹⁶] ET-1 (9-21)	Inactif	>10 ⁻⁵
[lys ⁹ , His(1Me) ¹⁶ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	Inactif	>10 ⁻⁵
[lys ⁹ , His(3Me) ¹⁶] ET-1 (9-21)	Inactif	>10 ⁻⁵
[lys ⁹ , His(3Me) ¹⁶ , Trp(F) ²¹] ET-1 (9-21)	Inactif	3,1 x 10 ⁻⁶ ± 0,1
[Ala ¹⁶] ET-1 (9-21)	Inactif	>10 ⁻⁵
[lys ⁹ , Ala ¹⁶] ET-1 (9-21)	Inactif	>10 ⁻⁵
N-Ac [Ala ¹⁶] ET-1 (9-21)	Inactif	>10 ⁻⁵

Tableau 23: EC₅₀ de l'ET-1, du [lys⁹]ET-1 (9-21) et des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 modifiés à la position 18.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	6,5 x 10 ⁻⁹ ± 0,1	2,9 x 10 ⁻⁸ ± 0,1
[lys ⁹]ET-1 (9-21)	2,8 x 10 ⁻⁷ ± 0,1	>10 ⁻⁵
[Asn ¹⁸] ET-1 (9-21)	Inactif	Inactif
[lys ⁹ ,Asn ¹⁸] ET-1 (9-21)	Inactif	Inactif
[Gly ¹⁸] ET-1 (9-21)	Inactif	Inactif
[lys ⁹ , Gly ¹⁸] ET-1 (9-21)	Inactif	Inactif
N-Ac-[Gly ¹⁸] ET-1 (9-21)	Inactif	Inactif

14. Étude de l'impact de la structure tridimensionnelle de l'ET-1

14.1. Analogues contenant une ou plusieurs homocystéines

Afin de déterminer si la compacité de la structure tridimensionnelle de l'ET-1 a une incidence sur la sélectivité des ligands envers les récepteurs ET_A et ET_B, nous avons synthétisé des analogues peptidiques de l'ET-1 dans lesquels nous avons sélectivement allongé le lien 1-15, le lien 3-11 ou les deux ponts disulfures. Pour ce faire nous avons remplacé une, deux ou les quatre cystéines par des homocystéines (HoCys) possédant une chaîne latérale plus longue d'un méthylène (Figure 38)

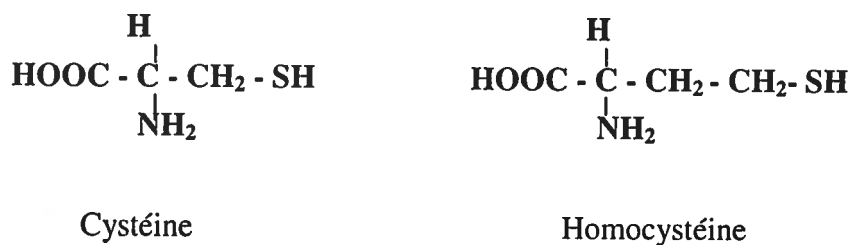


Figure 38: Structure de la cystéine et de l'homocystéine.

14.1.1. Synthèse peptidique

La synthèse peptidique de ces analogues a été effectuée selon le protocole de chimie Fmoc décrit précédemment. De façon à maximiser les rendements de synthèse, le même plan de protection orthogonale des chaînes latérales des Cys et des HoCys a été utilisé. Cet approche prévoit l'insertion de ces résidus avec leur chaîne latérale portant un groupement trityle ou un groupement acétamidométhyle. Le premier, étant labile dans les conditions utilisées pour le clivage du peptide de la résine, nécessite des conditions oxydantes douces pour la formation du premier lien disulfure. Le second groupe résiste aux conditions de clivage et requiert des conditions oxydantes plus vigoureuses pour son retrait et la cyclisation du peptide.

Ainsi les analogues suivants ont été synthétisés :

- [HoCys(Trt)¹, Cys(Acm)^{3,11}, Cys(Trt)¹⁵]ET-1
- [HoCys(Trt)³, Cys(Trt)¹¹, Cys(Acm)^{1,15}]ET-1
- [HoCys(Trt)^{1,15}, Cys(Acm)^{3,11}]ET-1
- [Cys(Acm)^{1,15}, HoCys(Trt)^{3,11}]ET-1
- [HoCys(Acm)^{1,15}, HoCys(Trt)^{3,11}]ET-1

La substitution de la résine de Wang, que ce soit par une Cys(Acm), une HoCys(Trt) ou une HoCys(Acm) a été effectuée en suivant le protocole décrit par Sieber (1987). L'incorporation des résidus Cys ou HoCys portant le groupement protecteur trityle aux positions 1, 3, 11 ou 15 a été effectuée selon le protocole des anhydrides symétriques, ce qui a pour avantage de minimiser la racémisation de ces résidus. Cette approche utilisée pour la synthèse de ces dérivés peptidiques nous a permis d'obtenir les analogues désirés, comme montré par CLHP analytique et par spectrométrie de masse.

La formation du premier lien disulfure a été effectuée telle que décrit précédemment soit par la cyclisation des Cys et/ou HoCys libres avec le ferricyanure de potassium. Ensuite deux approches ont été expérimentées pour la cyclisation des Cys(Acm) et/ou HoCys(Acm). D'abord, nous avons tenté de former le second pont disulfure en suivant le protocole usuel utilisant 50 éq d'iode dans une solution aqueuse contenant 80% d'acide acétique. La réaction se poursuivait pendant 1 heure. Cependant, les analyses par CLHP analytique effectuées après ce traitement ont montré une détérioration importante du produit.

Un second protocole de cyclisation a été développé; utilisant cette fois-ci 10 éq d'iode dans une solution formée de 99% acide acétique et de 1% H₂O. Ce protocole a eu pour avantage de minimiser les réactions secondaires. Toutefois, après un traitement de 20 heures, seulement environ 50% de la réaction avait été obtenu.

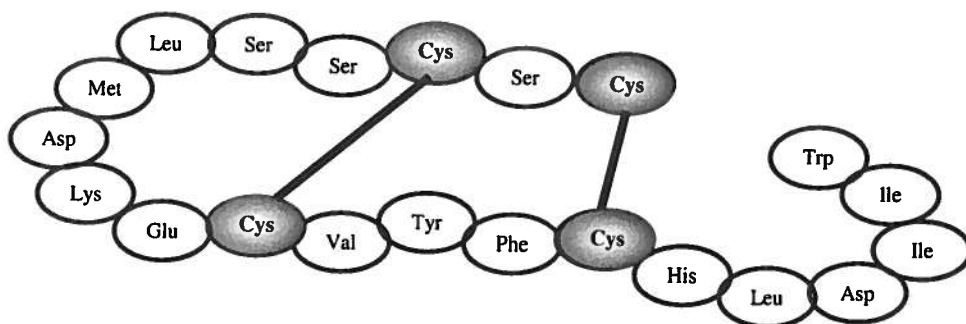


Figure 39: Représentation des ponts disulfures reliant les positions 1-15 et 3-11 de l'ET-1

14.1.2. Caractérisation des analogues

L'approche utilisée a permis l'obtention des produits désirés de façon majoritaire. La caractérisation de ceux-ci, par CLHP analytique a montré une pureté chimique supérieure à 90% et les analyses de spectrométrie de masse ont confirmé les masses.

Tableau 24: Caractérisation par spectrométrie de masse des analogues de l'ET-1 dans lesquels l'un ou l'autre ou les deux ponts disulfures ont été allongés par l'introduction d'homocystéines

	Masse attendue (Da)	Masse mesurée (Da)
[HoCys ¹]ET-1	2506	2507
[HoCys ³]ET-1	2506	2506
[HoCys ^{1,15}]ET-1	2520	2522
[HoCys ^{3,11}]ET-1	2520	2521
[HoCys ^{1,3,11,15}]ET-1	2548	2548

14.1.3. Essais pharmacologiques

13.1.3.1. Effectués sur le récepteur ET_A

Les essais pharmacologiques effectués sur les préparations d'aorte thoracique de rat ont montré que la perte de puissance relative la plus importante a été observée lors de l'allongement du lien disulfure externe soit entre les Cys 1 et 15, où l'introduction d'une HoCys à la position 1 a conduit à un analogue 500 fois moins puissant que l'ET-1.

Curieusement, cette perte de puissance est supérieure lorsque seule la Cys¹ est remplacée par une HoCys (EC_{50} $3,2 \times 10^{-6}$ M) par rapport à l'analogue contenant deux HoCys aux positions 1 et 15 ($8,4 \times 10^{-7}$) (Figure 40 et Tableau 25). La force de contraction engendrée par ces analogues sur les anneaux d'aorte de rat était cependant équivalente à celle de l'ET-1.

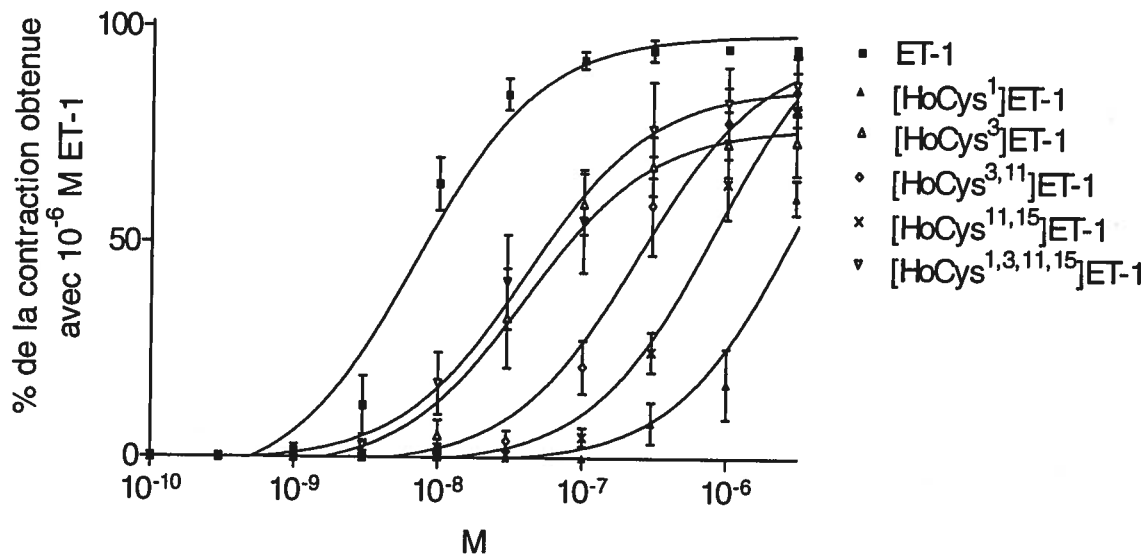


Figure 40: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et des analogues, dans lesquels l'un ou l'autre ou les deux ponts disulfures ont été allongés par l'introduction d'homocystéines, obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

L'allongement du pont disulfure interne affecte de façon moins importante la puissance relative de l'ET-1 par rapport à celle observée lors de l'insertion d'HoCys dans le lien externe. Cette fois, l'allongement du lien par deux HoCys, aux positions 3 et 11, a entraîné une plus forte diminution de puissance que lors de l'allongement du lien par une seule HoCys introduite à la position 3 (EC_{50} de $4,2 \times 10^{-8}$ M et de $2,4 \times 10^{-7}$ M respectivement) (Figure 40 et Tableau 25).

Curieusement, l'insertion de quatre HoCys, c'est-à-dire l'allongement des deux ponts disulfures d'une longueur équivalente à deux liens carbone-carbone, a donné l'analogue

le plus puissant de cette série. En effet, ce peptide présente une valeur de EC_{50} de $4,0 \times 10^{-8}$ M. Ce dérivé est donc moins puissant que l'ET-1 d'à peine un facteur légèrement inférieur à 10 (Figure 40 et Tableau 25). Encore une fois, l'activité intrinsèque est de la même ordre de grandeur que celle de l'ET-1.

14.1.3.2. Effectués sur le récepteur ET_B

Les résultats obtenus à partir des essais pharmacologiques effectués sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye ont montré que l'allongement de l'un ou l'autre ou des deux ponts disulfures ont conduit à des pertes de puissance relative des analogues de facteurs variant entre 2,5 et 6 fois par rapport à l'ET-1. Cependant à l'inverse de ce qui avait été observé sur le récepteur ET_A , l'activité intrinsèque de certains analogues s'est avérée de beaucoup inférieure à celle du peptide natif. L'analogue $[HoCys^1]ET-1$ se distingue par une perte de plus de 50% dans sa capacité à induire une réponse hypertensive par rapport à l'ET-1 (Figure 41 et Tableau 25).

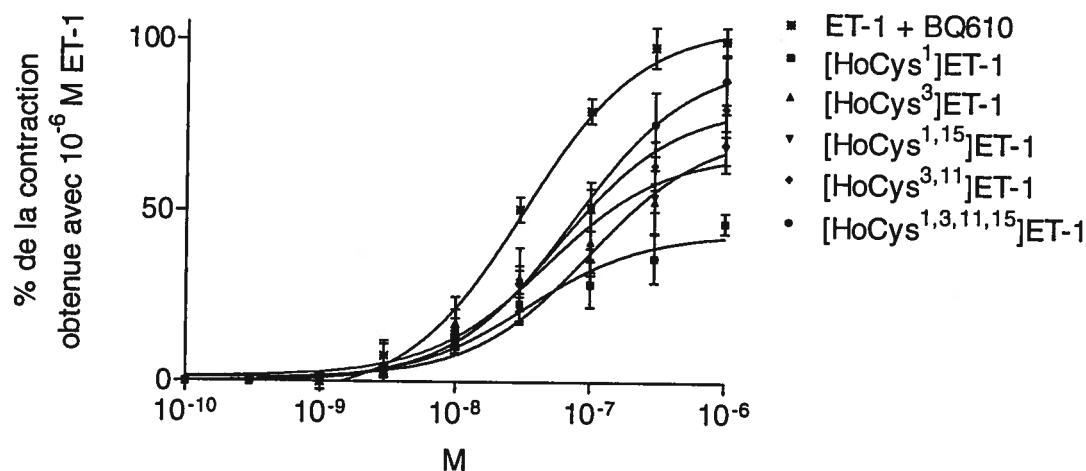


Figure 41: Courbes concentration-réponse de l'ET-1 et de ses analogues dans lesquels l'un ou l'autre ou les deux ponts disulfures ont été allongés par l'introduction d'homocystéines, obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

Tableau 25: EC₅₀ de l'ET-1 et de ses analogues dans lesquels l'un ou l'autre ou les deux ponts disulfures ont été allongés par l'insertion d'homocystéines.

	ET _A EC ₅₀ (M) ± s.e.m.	ET _B EC ₅₀ (M) ± s.e.m.
ET-1	6,5 x 10 ⁻⁹ ± 0,1	2,9 x 10 ⁻⁸ ± 0,1
[HoCys ¹]ET-1	3,2 x 10 ⁻⁶ ± 0,1	5,4 x 10 ⁻⁸ ± 0,2
[HoCys ³]ET-1	4,0 x 10 ⁻⁸ ± 0,1	4,7 x 10 ⁻⁸ ± 0,2
[HoCys ^{1,15}]ET-1	8,4 x 10 ⁻⁷ ± 0,1	9,9 x 10 ⁻⁸ ± 0,1
[HoCys ^{3,11}]ET-1	2,4 x 10 ⁻⁷ ± 0,1	5,8 x 10 ⁻⁸ ± 0,1
[HoCys ^{1,3,11,15}]ET-1	4,0 x 10 ⁻⁸ ± 0,1	7,1 x 10 ⁻⁸ ± 0,1

14.2. Dichroïsme circulaire

14.2.1 Généralité

Le dichroïsme circulaire est une méthode d'analyse qui consiste en un balayage spectral variant généralement pour les peptides entre 190 et 250 nm, au moyen d'une lumière polarisée de façon circulaire. Puisque les acides aminés, à l'exception de la glycine, possèdent au minimum un centre asymétrique, ceux-ci absorbent et dévient cette lumière modifiant ainsi la trajectoire circulaire. Les spectres résultants sont le reflet des structures secondaires adoptées par la chaîne peptidique. La Figure 36 montre les spectres caractéristiques obtenus par dichroïsme circulaire pour les structures les plus couramment adoptées par ceux-ci.

Nous avons donc utilisé cette technologie afin de déterminer l'impact de certaines modifications de la structure primaire des analogues du fragment 9-21 de l'ET-1 en relation avec leurs propriétés pharmacologiques observées sur les préparations d'aorte de rat et de parenchyme pulmonaire. Ainsi le fragment 9-21 cyclisé entre les positions 9 et 11 ainsi que ses quatre analogues N-Ac-ET-1 (9-21), [lys⁹]ET-1 (9-21), [Ala^{9,11}]ET-1 (9-21) et [Ala^{9,11}, Trp(For)²¹]ET-1 (9-21) ont été analysés par dichroïsme circulaire.

14.2.2 Analyse des spectres

Les figures 43 et 44 présentent les spectres des analogues [lys⁹]ET-1 (9-21) et N-Ac ET-1 (9-21) obtenus par dichroïsme circulaire. Ceux-ci, bien qu'ils soient différents, montrent tous deux un maximum d'ellipticité moléculaire obtenu à une longueur d'onde de 192 nm. Un premier minimum, le plus important en amplitude, est observé à 208 nm alors que le second se situe à environ 222 nm. Ce patron d'ellipticité suggère l'adoption d'une structure relativement bien organisée, probablement formée d'un repliement ressemblant à un tour d'hélice plus ou moins régulière ou à un coude. Le fragment ET-1(9-21) présente des spectres dont le maximum a disparu mais dont le minimum se situe toujours à 208 nm (Figure 45). Le peptide présente probablement une structure moins stable que l'analogue N-Ac-ET-1 (9-21).

Le retrait du lien disulfure intramoléculaire entre les Cys 11 et 15 semble modifier l'arrangement spatial du fragment 9-21 de l'ET-1. En effet, les spectres du dérivé [Ala^{11,15}]ET-1 (9-21) montrent cette fois les caractéristiques spectrales d'une structure complètement aléatoire avec un minimum d'ellipticité moléculaire se situant avant 200 nm et aucun maximum (Figure 46). L'insertion d'un groupement formyle sur l'indole du Trp²¹ semble avoir un impact majeur sur l'arrangement tridimensionnel de l'analogue linéaire. En effet, les spectres de [Ala^{11,15}, Trp(For)²¹]ET-1 (9-21), à 40% HFIP, présentent les mêmes caractéristiques spectrales que les analogues [lys⁹]ET-1 (9-21) et N-Ac-ET-1 (9-21) (Figures 43, 44 et 47). On observe d'abord un maximum à environ 192 nm suivi d'un minimum situé à 210 nm.

Ces résultats suggèrent l'existence d'un lien étroit entre la capacité d'un analogue à induire la contraction des anneaux d'aorte de rat et l'adoption d'une structure secondaire organisée par la chaîne peptidique. Les spectres des différents analogues ne présentent cependant pas les caractéristiques d'une hélice α , ni celles d'un feuillet β , mais plutôt celles d'un repliement irrégulier du squelette peptidique.

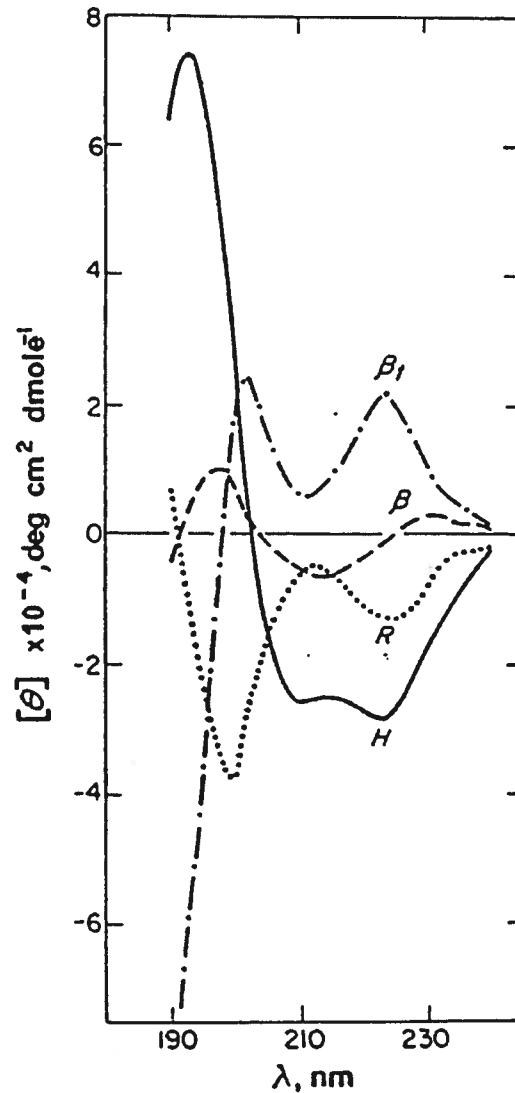


Figure 42 : Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques des structures secondaires les plus fréquemment observées dans les peptides et les protéines soit l'hélice α (H), le feuillet β (β) et le coude β (βt). La lettre R identifie, quant à elle, une structure aléatoire.

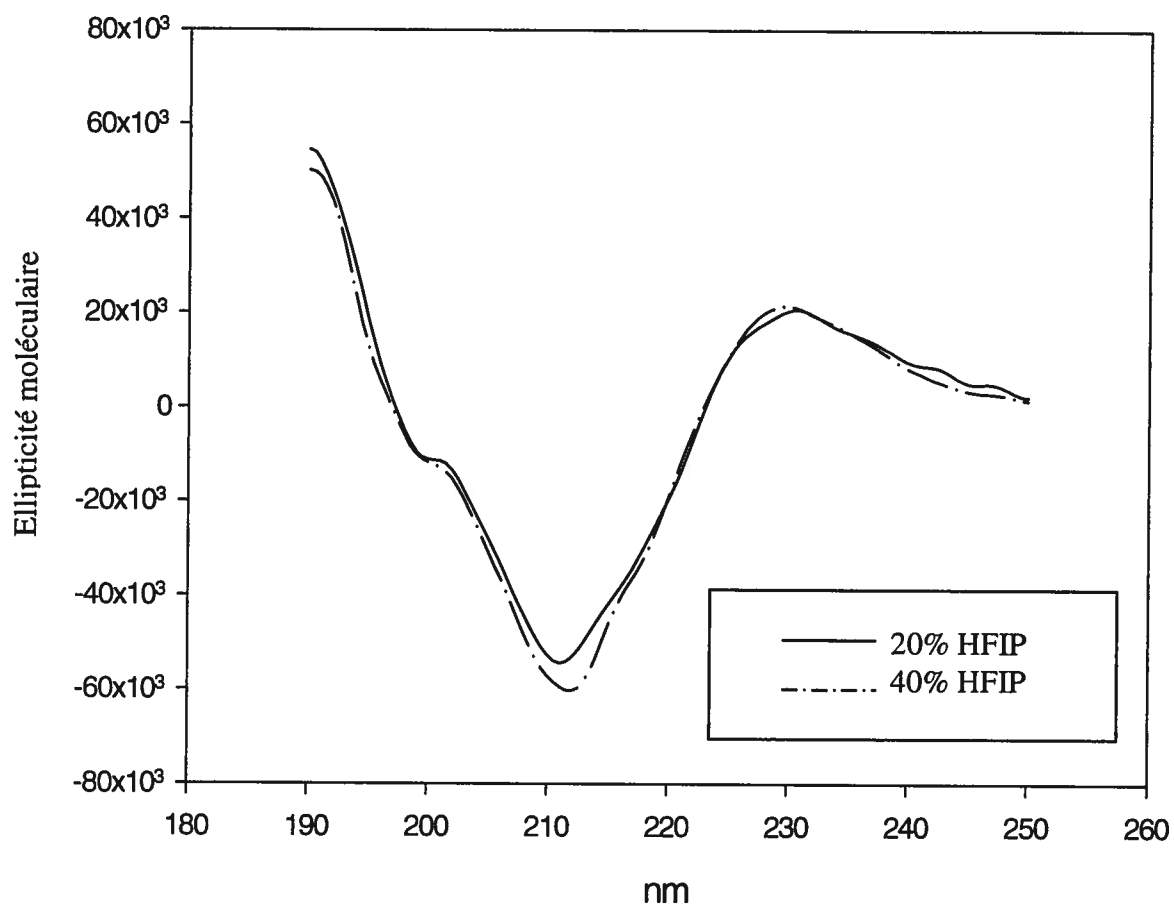


Figure 43: Spectres de dichroïsme circulaire de l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21) mesurés dans 20% et 40% HFIP.

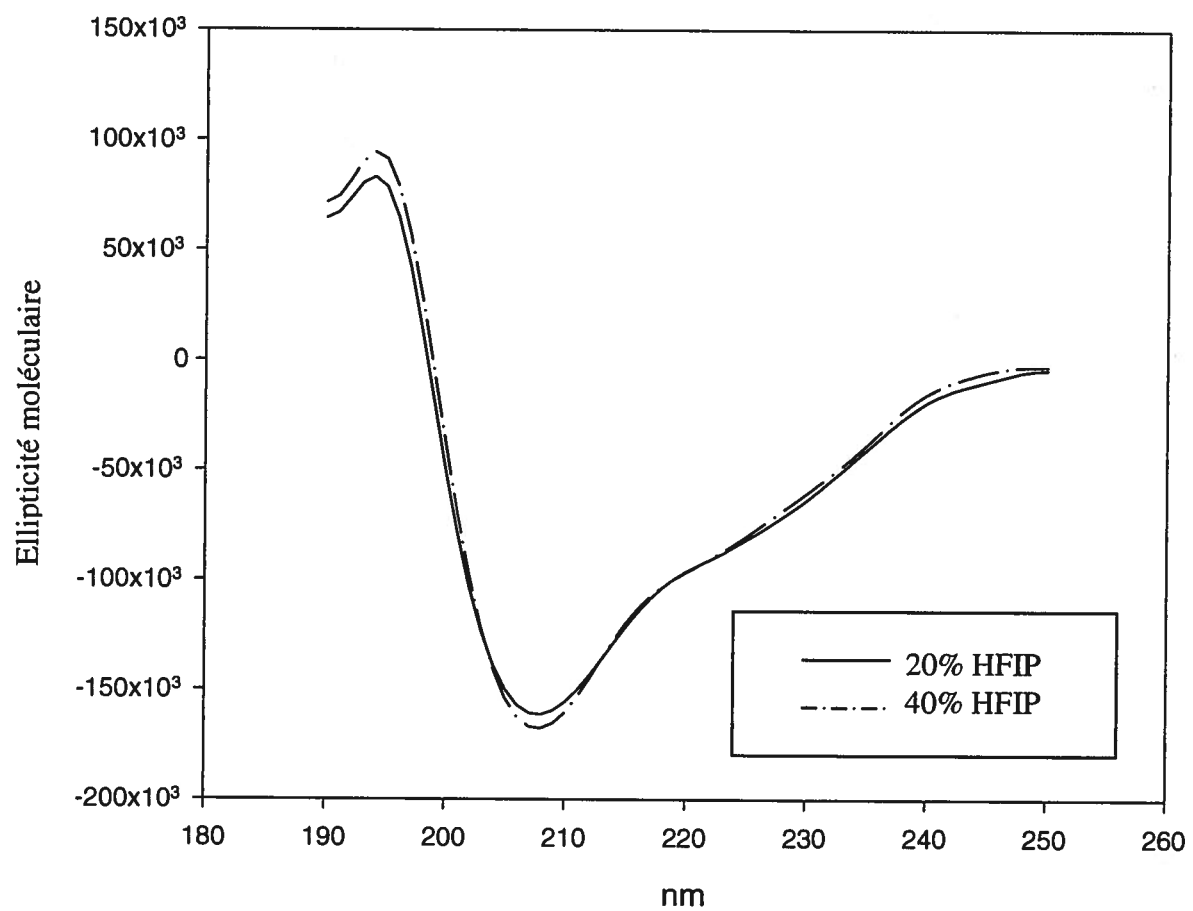


Figure 44: Spectres de dichroïsme circulaire de l'analogue N-Ac-ET-1 (9-21) mesurés dans 20% et 40% HFIP.

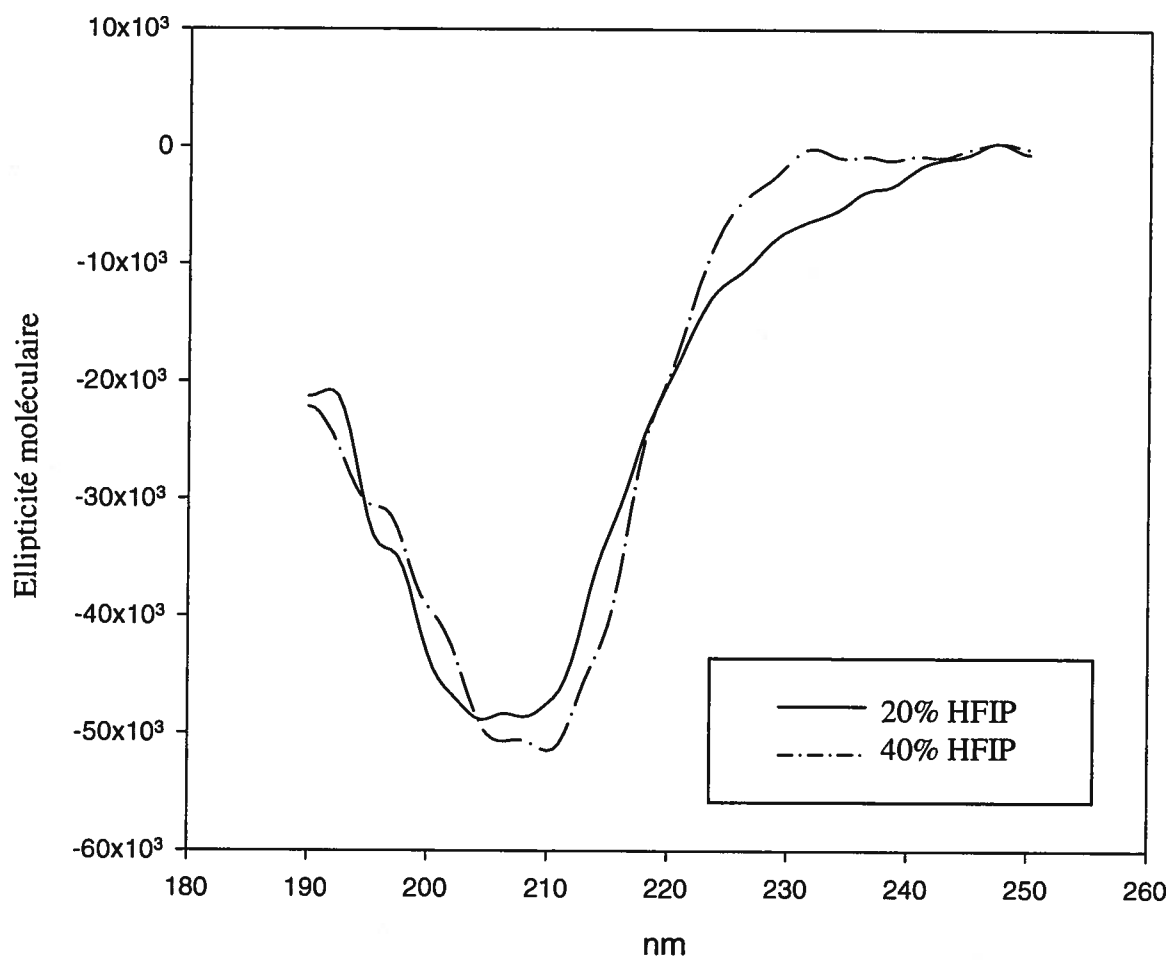


Figure 45: Spectres de dichroïsme circulaire de l'analogue ET-1 (9-21) mesurés dans 20% et 40% HFIP.

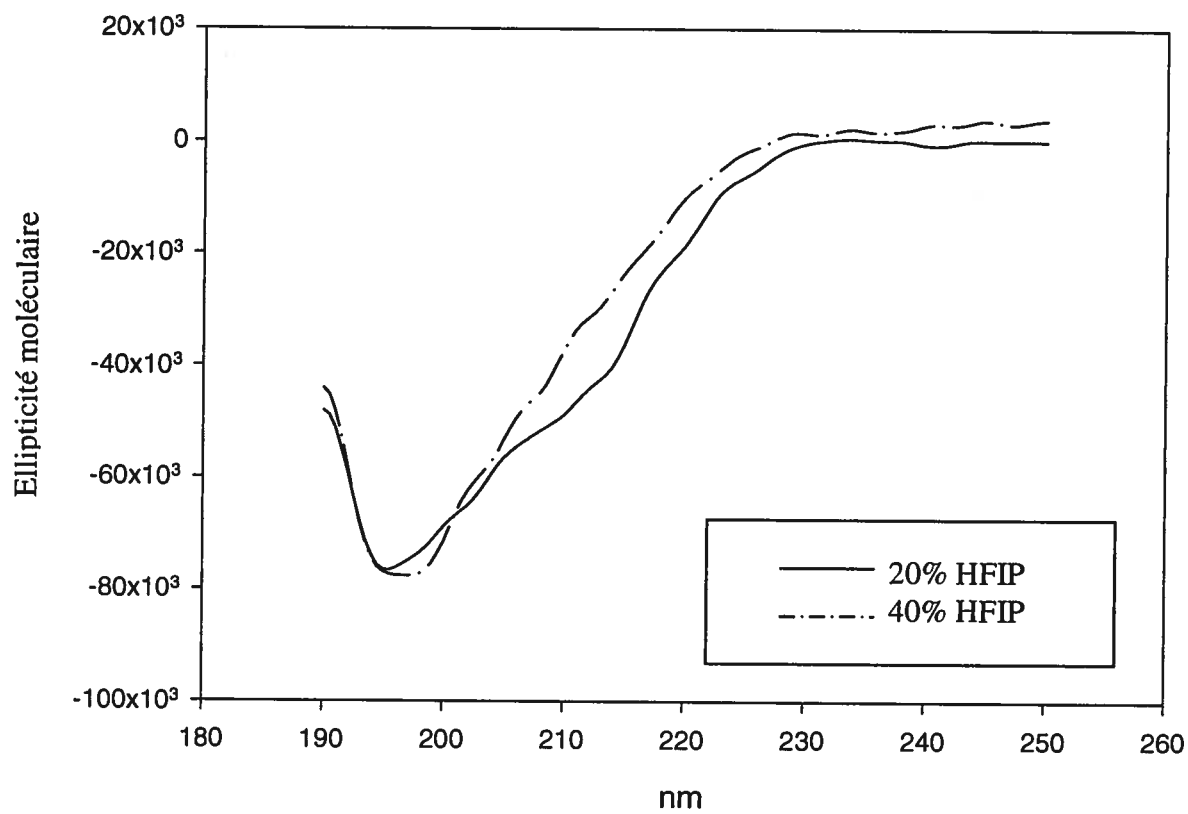


Figure 46: Spectres de dichroïsme circulaire de l'analogue [Ala^{11,15}]ET-1 (9-21) mesurés dans 20% et 40% HFIP.

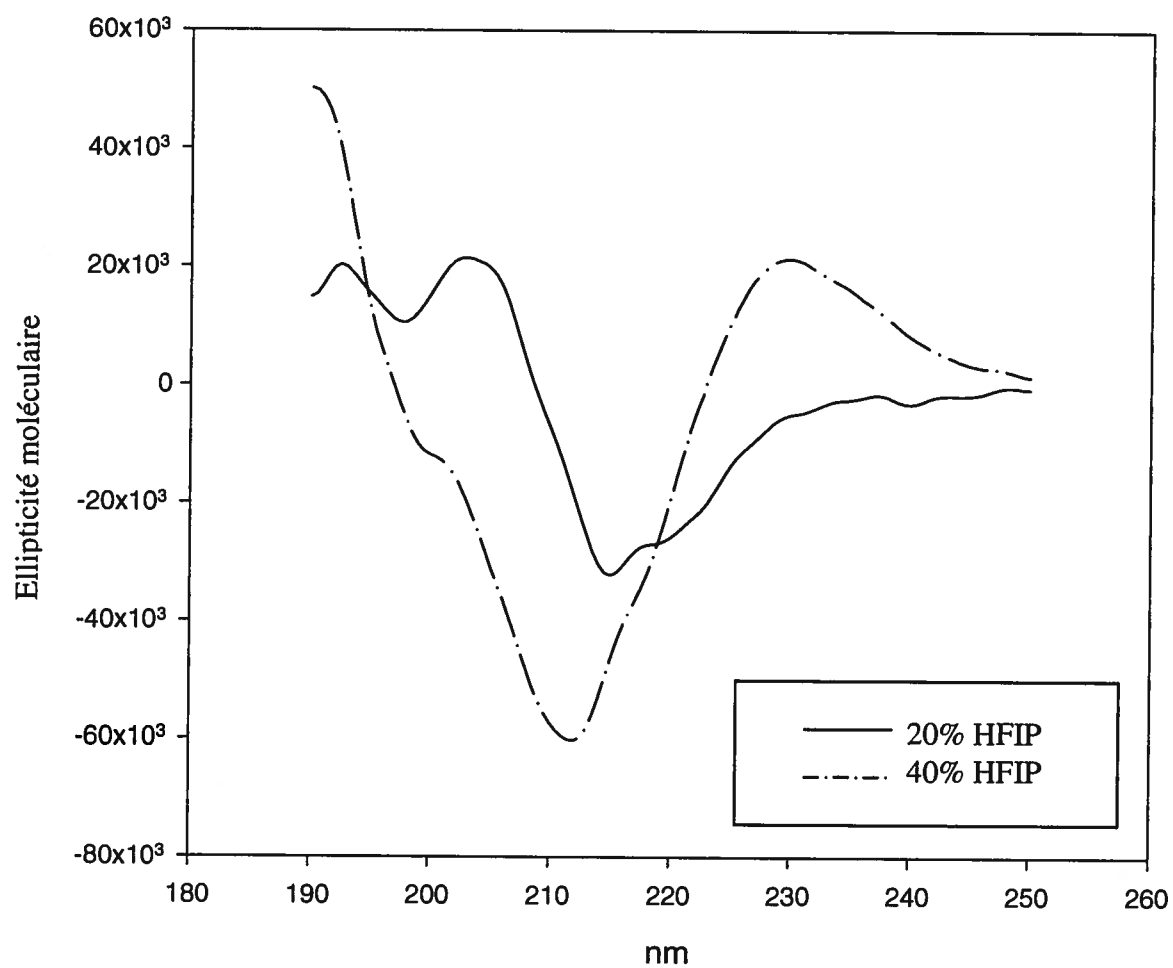


Figure 47: Spectres de dichroïsme circulaire de l'analogue $[Ala^{11,15}, Trp(For)^{21}]ET-1$ (9-21) mesurés dans 20% et 40% HFIP.

15. [lys⁹]ET-1 (9-21)

Compte tenu du manque de matériel pour l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21), nous avons dû reprendre la synthèse.

15.1. Synthèse peptidique

Puisque nous avons développé un nouveau protocole pour la formation de ponts disulfures utilisant seulement 10 eq d'iode, nous avons opté pour cette approche. En plus de sa simplicité, l'avantage majeur de ce protocole est qu'il permet l'oxydation de Cys(Acm) contenues dans des peptides ayant un Trp libre (non-formylé). Il est donc compatible avec le protocole de chimie Fmoc sur une résine de Wang. L'insertion de Cys(Acm) aux positions 11 et 15 permet de contrôler la formation du lien disulfure en plus de minimiser la racémisation de la Cys, par rapport au groupement protecteur Trt, lors d'un couplage utilisant les réactifs de usuels tels que le BOP. Donc, cette approche a permis l'obtention d'un matériel brut de qualité qui a ensuite été traité cyclisé, entre les positions 11 et 15, avec 10 eq d'iode puis purifié sur CLHP préparative. On élimine ainsi l'étape de déformylation nécessaire lors de la synthèse précédente en chimie BOC.

15.2. Caractérisation des analogues

Les analyses par CLHP analytique et par spectrométrie de masse ont montré la formation d'un seul produit majoritaire dont la masse de 1667 Da correspondait à celle du produit attendu. Le processus de purification a permis l'obtention de l'analogue avec une pureté de plus de 90%. Étonnamment, le produit de cette synthèse n'a pas présenté le même temps de rétention que le produit de la première synthèse (Figure 48).

15.4. Vérification de la cyclisation :

Les travaux de Han et collaborateurs (1997) ont montré une certaine propension des Cys(Acm) à la racémisation lors de leur insertion dans la chaîne peptidique via la formation d'un ester actif. Aussi avons-nous effectué des analyses par CLHP analytique de l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21) inactif, synthétisé en chimie Fmoc, et des analogues du fragment 9-21, dans lesquelles l'une ou l'autre ou les deux Cys ont été remplacées par des D-Cys. Ces analyses ont montré qu'aucun de ces analogues ne possédaient les caractéristiques physico-chimiques de l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21) inactif.

De plus, des analyses par CLHP analytique des analogues [lys⁹]ET-1 (9-21) actif et inactif ont été faites en présence d'un agent réducteur afin de déterminer l'état d'oxydation des Cys. Ainsi, lors du traitement de ces analogues avec le dithiothréitol (DTT), nous avons observé l'apparition d'un second produit sur le chromatogramme. Puisque les Cys ont été réduites par le DTT, ces résultats suggèrent ainsi qu'elles soient cyclisées

15.5. [lys⁹, β-Asp¹⁸]ET-1 (9-21) et [lys⁹, his¹⁶]ET-1 (9-21)

La formation d'un β-Asp, de même que la racémisation de l'His, sont des réactions secondaires relativement fréquentes qui ne modifient pas la masse du peptide mais qui occasionnent généralement un changement du profil CLHP. Nous avons donc synthétisé deux analogues, le [lys⁹, βAsp¹⁸]ET-1 (9-21) et le [lys⁹, his¹⁶]ET-1 (9-21) pour des fins de comparaison avec les caractéristiques CLHP analytique et pharmacologiques des analogues [lys⁹]ET-1 (9-21).

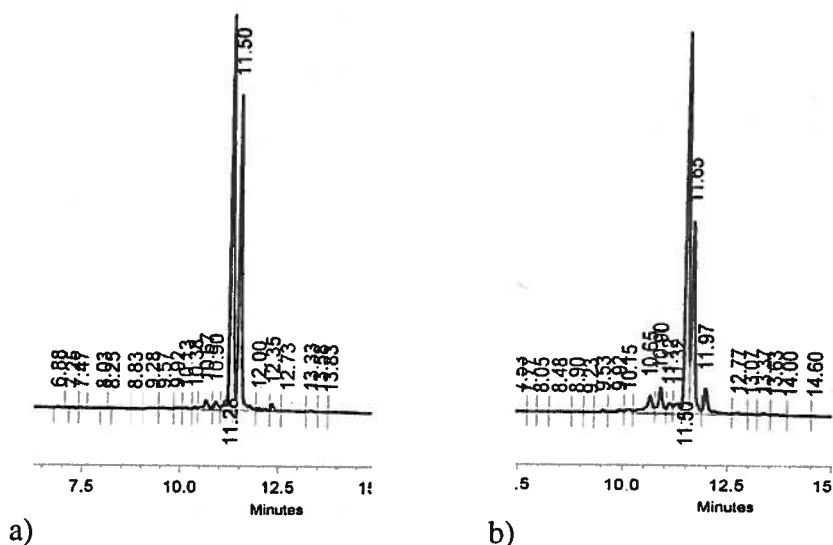
15.5.1. Synthèse peptidique

La synthèse de ces analogues a été effectuée par chimie Fmoc sur une résine de Wang en suivant les protocoles de synthèse, de couplage et de clivage décrits précédemment. La cyclisation des Cys(Acm) a été réalisée en utilisant 10 éq d'iode dans une solution aqueuse contenant 99% d'acide acétique. Dans les deux cas, cette approche a donné un produit majoritaire présentant la masse attendue.

15.5.2. Caractérisation des analogues

La caractérisation par CLHP analytique des analogues [lys⁹,β-Asp¹⁸]ET-1 (9-21) et [lys⁹, his¹⁶]ET-1 (9-21) a montré une pureté supérieure à 90% après purification. Les deux peptides présentent la même masse de 1668 Da, correspondant à celle attendue. Cependant, aucun des deux analogues ne co-élue avec les dérivés [lys⁹]ET-1 (9-21) actifs,

produits en chimie Boc, et inactifs, produits en chimie Fmoc. La Figure 49 montre les résultats obtenus en co-éluant les analogues contenant le β -Asp ou la D-His avec le produit [lys⁹]ET-1 (9-21) issu de la synthèse en chimie Fmoc. Des résultats similaires ont été observés avec le produit de la synthèse réalisée au moyen de la chimie t-Boc. Puisque les produits ne co-éluent pas, il n'y a vraisemblablement pas eu formation d'un β -Asp¹⁸ ou racémisation de l'His¹⁶ lors de la synthèse de [lys⁹]ET-1 (9-21) en chimie Fmoc.



16. PTHrP

Suite à la publication par le groupe de Guise de résultats suggérant que les fragments 1-16 et 1-23 du PTHrP avaient la capacité de lier et d'activer le récepteur ET_A, notre attention s'est portée sur ces peptides. En effet, nous avons tenté de déterminer les propriétés pharmacologiques de ceux-ci dans nos modèles d'étude des récepteurs ET_A et ET_B.

16.1. Synthèse peptidique

Le fragment PTHrP (1-16) étant disponible commercialement, nous avons synthétisé uniquement le fragment 1-23. Pour ce faire, nous avons utilisé l'approche usuelle de la chimie t-Boc. Puisque le peptide ne contient aucun pont disulfure ni autre modification, aucun plan de protection orthogonale particulier n'a été employé. Après le clivage du peptide de son support solide, celui-ci a simplement été purifié. Nous avons ainsi obtenu le peptide sans générer de sous-produit important, tel qu'observé par CLHP analytique et par spectrométrie de masse. La purification de celui-ci a permis d'obtenir ce dérivé avec une pureté supérieure à 95%.

16.2. Caractérisation des analogues

Les deux fragments, soit les PTHrP(1-16) et PTHrP(1-23), ont été caractérisés par CLHP analytique et par spectrométrie de masse (Tableau 25).

Tableau 26: Caractérisation par spectrométrie de masse des fragments PTHrP(1-16) et PTHrP(1-23).

	Masse attendue (Da)	Masse mesurée (Da)
PTHrP (1-16)	1790	1790
PTHrP (1-23)	2780	2781

16.3. Essais pharmacologiques

16.3.1. Effectués sur le récepteur ET_A

L'activité biologique des fragments PTHrP (1-16) et (1-23) a été évaluée sur des préparations d'aorte de rat. Contrairement aux attentes, les deux segments du PTHrP se sont avérés incapables d'engendrer la constriction des anneaux d'aorte ni d'interférer dans celle provoquée par l'ET-1 (Figure 50).

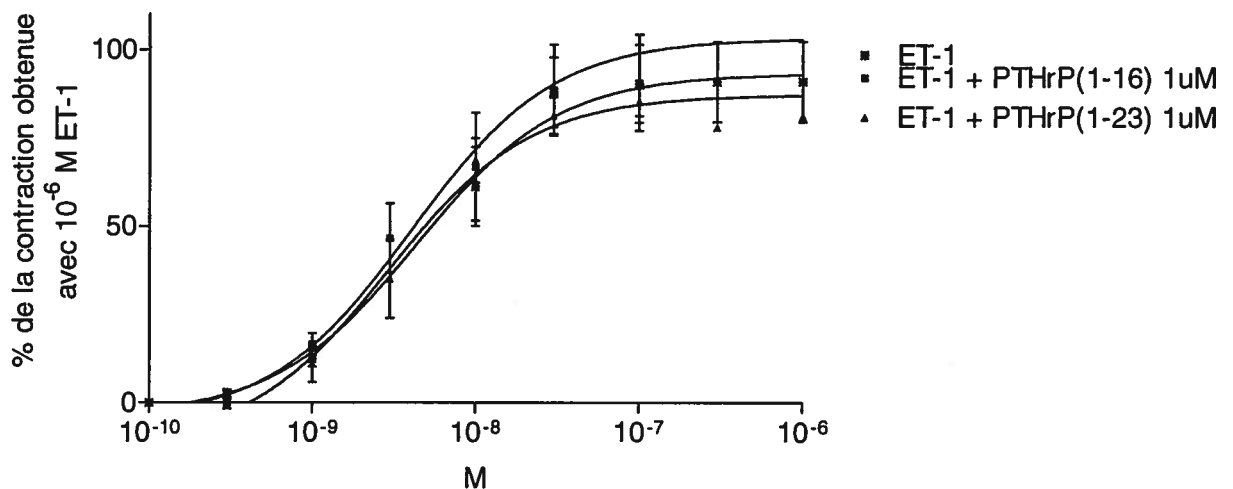


Figure 50: Courbes concentration-réponse de l'ET-1, effectuées en absence ou en présence de 1 μ M de PTHrP (1-16) ou de PTHrP (1-23), obtenues sur des préparations d'aorte de rat.

16.3.2. Effectués sur le récepteur ET_B

Les résultats obtenus sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye montrent que les fragments 1-16 et 1-23 du PTHrP sont complètement inactifs. En effet, aucune activité agoniste n'a été observée et ces peptides n'ont pu déplacer la courbe concentration-réponse engendrée par l'ET-1 (Figure 51).

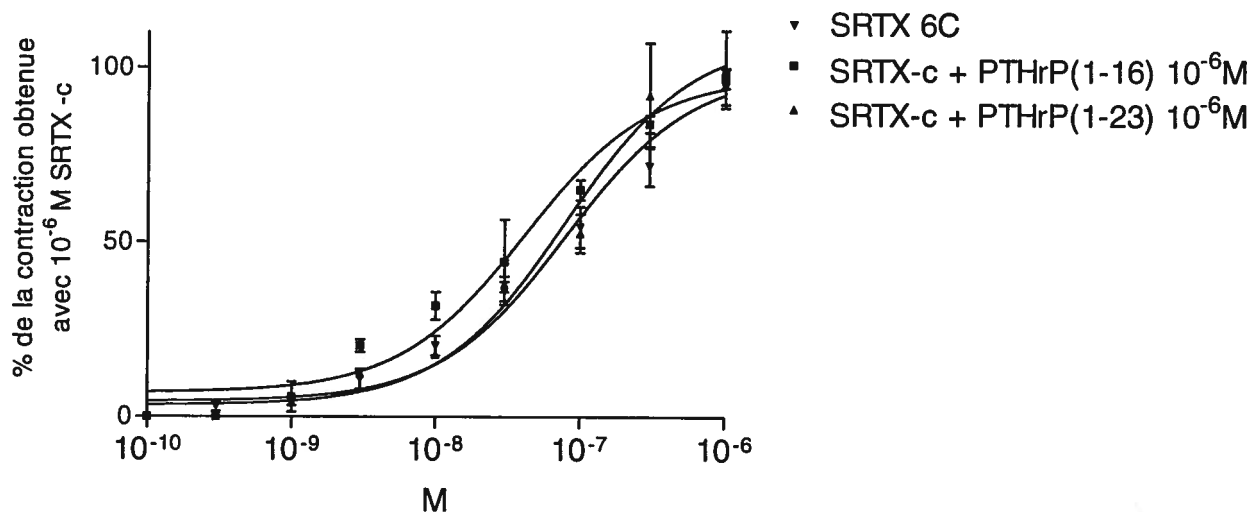


Figure 51: Courbes concentration-réponse de la SRTX-c, effectuées en absence ou en présence de $1 \mu\text{M}$ de PTHrP (1-16) ou de PTHrP (1-23), obtenues sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye.

16.4. Essais de liaison

16.4.1. Effectués sur le récepteur ET_A

Des courbes de compétition entre le PTHrP(1-16) ou le PTHrP(1-23) contre l'['¹²⁵I]ET-1 (0,1 nM) ont été réalisées sur des cellules CHO transfectées avec le gène du récepteur ET_A. Ces résultats montrent que les deux fragments PTHrP 1-16 et 1-23 sont incapables de déplacer l'ET-1 de son site de liaison sur le récepteur (Figure 52).

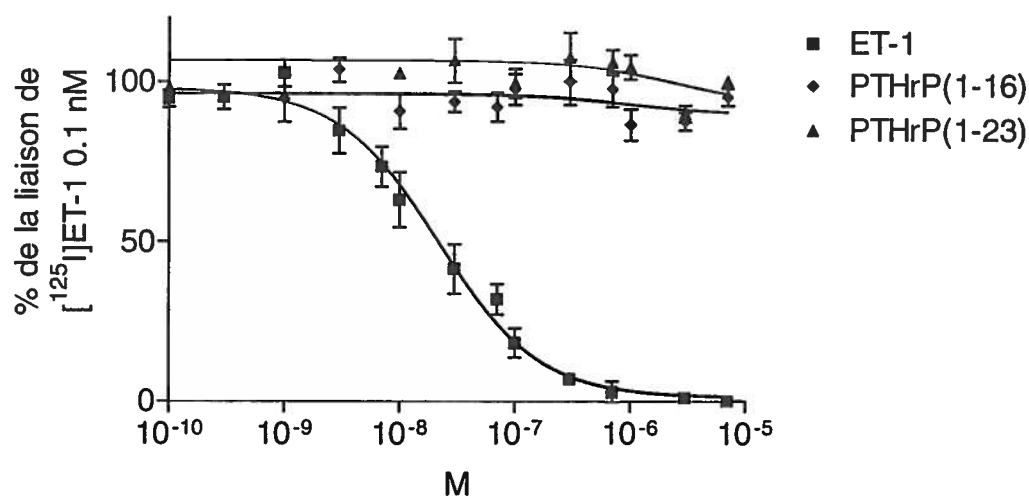


Figure 52: Courbes de compétition entre l'['¹²⁵I]ET-1 (0,1 nM) et des concentrations croissantes d'ET-1, de PTHrP (1-16) ou de PTHrP (1-23) effectuées sur des cellules CHO exprimant le récepteur ET_A.

16.4.2. Essais de liaison sur le récepteur ET_B

De la même façon que sur le récepteur ET_A, les résultats obtenus des courbes de compétition entre les fragments PTHrP(1-16) ou PTHrP(1-23) et l'ET-1 radiomarquée, effectuées sur des cellules CHO exprimant le récepteur ET_B, ont montré que ces fragments sont incapables d'interférer dans la liaison de l'ET-1 (Figure 53).

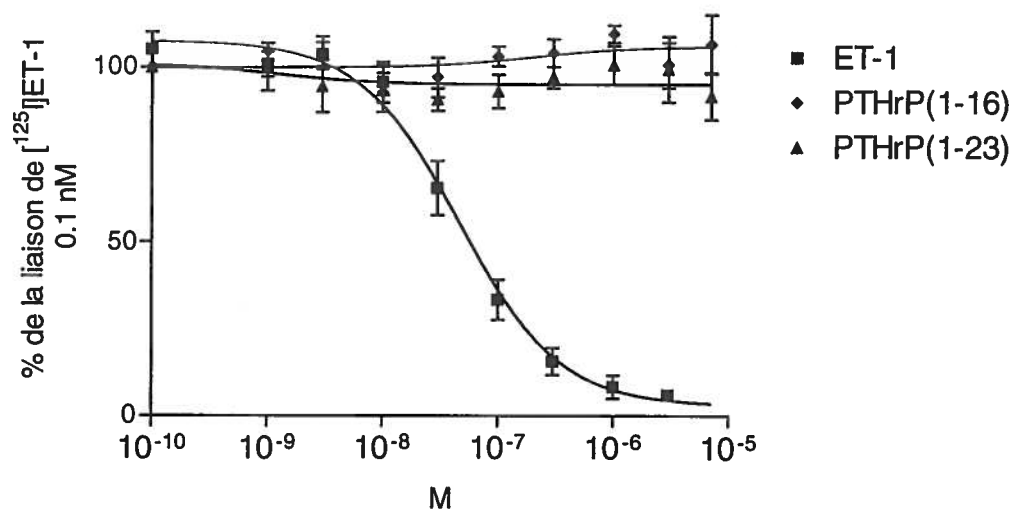


Figure 53: Courbes de compétition entre l' $[^{125}\text{I}]\text{ET-1}$ (0,1 nM) et des concentrations croissantes d'ET-1, de PTHrP (1-16) ou de PTHrP (1-23) effectuées sur des cellules CHO exprimant le récepteur ET_B.

Chapitre 5 : Discussion

L'endothéline est un peptide vasoactif puissant impliqué dans plusieurs processus physiologiques. Par conséquent, elle est aussi associée à de nombreuses pathologies des systèmes cardiaque, pulmonaire et rénal. Il est essentiel, afin d'améliorer nos approches thérapeutiques, de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ce peptide agit. Les études de structure-fonction visent, d'une part, à définir la contribution de chaque résidu à la stabilité de la conformation tridimensionnelle adoptée par la molécule, et d'autre part, à établir leur(s) rôle(s) pour l'affinité et l'activité biologique de cette dernière. Ainsi, ces études permettent de définir plus précisément les interactions qui s'établissent entre un peptide et ses récepteurs. Un moyen d'y arriver consiste à modifier un ou plusieurs résidus de façon à réduire ou à amplifier certaines propriétés physico-chimiques de la molécule. La synthèse peptidique permet d'obtenir les dérivés voulus, et ce, relativement rapidement.

17. Stratégie et résultats de synthèse peptidique

17.1. Analogues modifiés aux positions 8, 9 et 10

Le principe général de la synthèse peptidique sur phase solide est simple. Le premier acide aminé est d'abord fixé à une matrice insoluble. Ensuite, la chaîne peptidique est allongée par l'incorporation séquentielle et spécifique de chaque dérivé d'acide aminé jusqu'à l'extrémité N-terminale. Pendant le processus, le peptide en élongation demeure attaché à la matrice insoluble ce qui facilite le changement des solvants et l'isolation du peptide, accélérant ainsi le procédé.

Dans le but de contrôler l'incorporation d'un seul acide aminé à la fois, l'amine α de ceux-ci doit être bloquée. À cette fin, deux groupements sont couramment utilisés : le t-Boc et le Fmoc. Le premier est labile en milieu acide, habituellement composé de 40% d'acide trifluoroacétique (TFA). Son utilisation nécessite donc une résine relativement stable en milieu acide, ce qui entraîne l'utilisation d'un acide plus fort pour le clivage du

peptide de la résine : l'acide fluorhydrique (HF) anhydre (Merrifield, 1986). Le groupement Fmoc est, pour sa part, labile en milieu basique, généralement une solution contenant 20% de pipéridine est utilisée. Une résine plus sensible aux milieux acides peut donc être utilisée pour ce type d'approche, de sorte que le clivage du peptide de la résine peut se faire par exemple à l'aide du TFA (King *et al.*, 1990). On évite ainsi d'exposer le peptide de façon répétitive à des conditions acides, ce qui diminue la formation de produits secondaires. D'autre part, l'absence d'usage d'acide fluorhydrique, la source principale de sous-produits de réaction, contribue également à améliorer dans bon nombre de synthèses la qualité du matériel peptidique produit.

La synthèse des analogues de l'ET-1 modifiés aux positions 8, 9 et 10 a été exécutée en utilisant la stratégie Fmoc laquelle est généralement supérieure à celle de la chimie t-Boc. De plus, l'expertise développée dans nos laboratoires a montré que la chimie Fmoc permet l'obtention de meilleurs rendements lors de la synthèse de l'ET-1. Le Fmoc-Trp(t-Boc)-OH a été attaché à une résine insoluble de Wang (polystyrène ponté avec 1% de divinylbenzène) en suivant le protocole de Sieber (1987). Cette matrice est fonctionnalisée avec des groupes hydroxyméthyles, permettant l'obtention d'un peptide ayant son extrémité C-terminale libre après clivage. Elle est en outre la matrice la plus communément utilisée en chimie Fmoc.

Certains acides aminés portent, en plus de leurs groupes α -aminé et acide carboxylique, une autre fonction sur leur chaîne latérale (amine, acide carboxylique de même qu'hydroxyle ou amide). Afin d'éviter que ces groupements ne réagissent avec les réactifs de synthèse, ces acides aminés doivent être protégés lors de leur insertion dans la chaîne peptidique. Ainsi, les chaînes latérales de l'acide aspartique et de l'acide glutamique étaient protégées par des groupements ester de tBu. La formation d'une aspartimide ou d'une lactame à partir de l'acide aspartique et d'un acide pyroglutamique avec l'acide glutamique ont ainsi été très largement évités. Le groupement éther de tBu a été choisi pour protéger les acides aminés hydroxylés, tels que la sérine et la tyrosine. Ces groupements empêchent l'acylation de ces résidus lors de l'étape du couplage. Quant à la

deuxième fonction amine portée par la chaîne latérale de la lysine, elle concurrencerait avec l'amine α lors de l'addition d'un résidu, et par conséquent, cet acide aminé a été protégé par un groupe t-Boc. L'indole du tryptophane a également été protégé de l'oxydation et de l'alkylation par un groupement t-Boc, tandis que l'histidine, l'asparagine, la glutamine et les cystéines 3 et 11 portaient, quant à eux, des groupements Trt. Enfin, la phénylalanine, la méthionine, la leucine, la valine et l'isoleucine ont été introduites sans protection autre que le groupement Fmoc sur l'amine- α . Bien que la méthionine porte un atome de soufre sur sa chaîne latérale, ce résidu est introduit sans protection sur celle-ci puisque l'oxydation de cet atome est facilement réversible, si besoin est, par un traitement au NaBH_4 (Gailit, 1993).

L'ET-1 possède deux ponts disulfures reliant les Cys 1-15 et 3-11. Les équipes de Aumelas (Aumelas *et al.*, 1998; Aumelas *et al.*, 1999), Kumagaye (1998) et de Tam (1994) avaient rapporté que lors de la formation simultanée des deux ponts disulfure de l'ET-1 ou de la SRTX-b, on obtient 75% du produit sous sa forme native (1-15, 3-11). De la même façon, notre équipe a observé la formation d'un produit très majoritaire lors de la cyclisation de la SRTX-c ayant ses quatre Cys libres (Langlois *et al.*, 2000). Ce produit co-élue avec la SRTX-c obtenue commercialement et a montré les mêmes propriétés pharmacologiques que celle-ci. De plus, selon Aumelas *et al.* (1998 et 1999) les peptides de la famille des ETs seraient, à toutes fins utiles, inactifs lorsqu'ils sont dans leur conformation non naturelle, c'est-à-dire, cyclisés entre les Cys 1-11 et 3-15. Finalement, la conformation reliant les Cys 1-3 et 11-15 est fortement défavorisée.

Bien qu'il soit possible d'obtenir les analogues de l'ET-1 dans leur conformation naturelle sans utiliser de plan de protection orthogonale, celui-ci permet de maximiser les rendements de synthèse. En effet, l'introduction de Cys(Trt) aux positions 3 et 11, et de Cys(Acm) aux positions 1 et 15, permet la formation sélective du premier puis du second lien disulfure. Les groupements Acm résistent aux conditions de clivage, alors que les groupes Trt sont labiles en milieu acide. Le peptide peut donc être cyclisé entre les Cys 3 et 11 en conditions douces après clivage. Par la suite, un traitement à l'iode permet le retrait des groupements Acm et la formation du deuxième pont disulfure aux positions 1-

15. Ainsi, il est possible de maximiser les rendements de réaction et de s'assurer de l'adoption de la conformation désirée par les différents analogues.

Le plan de protection orthogonal utilisé lors de cette synthèse prévoyait le retrait de tous ces groupements protecteurs lors du clivage. Seuls les groupements AcM portés par les cystéines 1 et 15 devaient résister à l'acide trifluoroacétique. Toutefois, les analogues contenant une Tyr sulfatée ou phosphatée ont dérogé à ce plan, puisque les équipes de Perich (1994) et de Yagami (2000) avaient montré que ces groupements étaient clivés dans les conditions utilisées pour le retrait des AcM. Quatre Cys(Trt) ont donc été introduites dans ces analogues. Ceux-ci ont été cyclisés en une seule étape engendrant ainsi la formation de deux produits de conformations différentes. Les essais pharmacologiques, menés sur des préparations d'aorte de rat et de parenchyme pulmonaire de cobaye, ont montré qu'un seul produit était actif et, sur la base des résultats de Aumelas et son équipe (1998 et 1999), nous avons assumé que celui-ci était le produit cyclisé de façon naturelle entre les Cys 1-15 et 3-11.

En prévision de la synthèse, l'insertion de groupements protecteurs, sur les chaînes latérales des acides aminés portant des groupements fonctionnels, permet d'éviter la formation de réactions secondaires. Cependant, la modification du protocole de couplage est parfois nécessaire. Aussi, l'insertion de Fmoc-Cys(Trt)-OH en utilisant le protocole usuel de chimie Fmoc entraîne un taux élevé de racémisation dû à la formation favorisée du dérivé cyclique de 5,4-H-oxazolone et de l'utilisation du DIEA, une amine tertiaire servant de base organique (Kaiser *et al.*, 1996). Cette réaction secondaire est considérablement réduite si le couplage est obtenu au moyen de l'anhydride symétrique de l'acide aminé (Han *et al.*, 1997) (Appendice F).

Dans l'ensemble, les stratégies de synthèse ont permis l'obtention des analogues peptidiques désirés. Ainsi, les analyses par CLHP analytique effectuées suite au clivage du peptide de la résine, mais aussi après chacune des étapes de cyclisation ont permis de confirmer les réactions de cyclisation, et aussi de s'assurer qu'aucun sous-produit n'était formé de façon importante. Les analyses effectuées par spectrométrie de masse, de type

MALDI TOF, ont montré les masses attendues pour chacun des analogues de cette étude.

Pour des raisons de disponibilité de l'acide aminé Fmoc-Tyr(PO₃H₂)-OH, et étant donné les résultats obtenus avec les analogues sulfatés et phosphatés à la position 8 et avec l'analogue [Tyr(SO₃H₂)¹⁰]ET-1, l'analogue [Tyr(PO₃H₂)¹⁰]ET-1 n'a pas été synthétisé.

17.2. Analogues des fragments 8-21, 9-21 et 10-21

Cette fois, pour effectuer la synthèse de ces analogues, nous avons privilégié la stratégie de chimie t-Boc. Une étude menée sur des analogues tronqués de l'ET-1, avait montré que la conservation du groupement protecteur formyle, sur le noyau indole du Trp en C-terminal, avait pour effet d'induire un repliement de la chaîne peptidique. Cet arrangement avait favorisé la liaison et l'activation du récepteur ET_B (Forget *et al.*, 1996; Boulanger *et al.*, 1999). Puisque ce groupement est labile en milieu basique, il est incompatible avec la chimie Fmoc. La synthèse de ces analogues avait donc été exécutée suivant la chimie t-Boc. De façon à induire un effet semblable à l'intérieur de nos analogues, nous avons procédé à la synthèse des analogues des fragments 8-21, 9-21 et 10-21 par la stratégie de synthèse t-Boc. Une partie du matériel obtenu a conservé le groupement formyle, alors que l'autre a subi un traitement à la pipéridine pour ainsi générer les analogues avec l'indole du Trp²¹ libre.

En chimie t-Boc, la résine la plus fréquemment utilisée pour des peptides de petite taille est celle de Merrifield. Comme la résine de Wang, celle-ci est constituée d'un polymère de polystyrène réticulé avec 1% de divinylbenzène. Cette fois cependant, des groupements chlorométhyles y sont rattachés. Après le clivage et la déprotection finale, ce support laisse les extrémités amino- et carboxy-terminales libres. Les analogues ayant leur extrémité C-terminale sous forme amide ont été synthétisés, quant à eux, sur une résine de MBHA qui consiste aussi en un support solide de polystyrène réticulé avec 1% de divinylbenzène. Celle-ci est cependant fonctionnalisée au moyen de groupements 4-méthylbenzhydrylamine qui laissent le peptide, après clivage au HF, sous une forme amide. L'ajout du groupement méthyle sur la fonction BHA permet de rendre cette résine

légèrement plus sensible aux conditions acides et ainsi obtenir de meilleurs rendements au clivage (Matsueda *et al.*, 1981). En outre, l'introduction du premier acide aminé sur ce support est effectuée dans les mêmes conditions que les couplages usuels en chimie t-Boc, ce qui permet l'obtention rapide d'un taux quantitatif de substitution.

La fixation du premier acide aminé sur la résine de Merrifield diffère des couplages subséquents. Un sel est d'abord formé par titrage du groupement carboxylique de l'acide aminé à l'aide du bicarbonate de césium. Le groupement chlorométhyle peut ensuite être attaqué par le sel d'acide aminé, ce qui entraîne la formation de chlorure de césium et laisse l'acide aminé attaché à la résine par le biais d'un lien ester. Le rayon atomique élevé de l'ion césium diminue la densité de charge autour du sel, ce qui permet une meilleure pénétration de ce dernier dans la matrice hydrophobe de la résine. On obtient ainsi un meilleur taux de substitution.

De la même façon qu'en chimie Fmoc, les acides aminés portant des groupements fonctionnels sur leur chaîne latérale doivent être protégés afin d'éviter la formation de réactions secondaires indésirables. Ainsi, les chaînes latérales de l'acide aspartique et de l'acide glutamique ont été protégées respectivement par des groupements ester de cHex et de Bzl. La Tyr portait un groupement 2-Br-Z afin d'empêcher l'acylation et l'alkylation de sa chaîne latérale. La Lys, quant à elle, était protégée sur son amine ε par le groupement 2-Cl-Z et l'His portait un groupe Tos. À l'exception de ce dernier, tous ces groupements sont résistants aux conditions acides utilisées pour la déprotection de l'amine terminale (40% TFA). Ils sont cependant sensibles au HF utilisé pour le clivage du peptide de la résine. Afin de contrôler la formation du lien disulfure, et de conserver certains analogues sous leur forme linéaire, la fonction thiol des Cys 11 et 15 a été bloquée par des groupements AcM. De plus, le formyle, porté par le noyau indole du tryptophane-21, est également résistant à ces conditions. Ce groupement protecteur permet d'éviter l'oxydation et l'alkylation du Trp pouvant survenir lors de la synthèse par chimie t-Boc, au moment du clivage du peptide, mais aussi pendant la formation des ponts disulfures.

Contrairement à la chimie de type Fmoc, la stratégie de synthèse utilisant le groupement t-Boc entraîne l'exposition répétitive du peptide à un acide de force intermédiaire comme l'acide trifluoroacétique. Ces conditions sont connues pour catalyser plusieurs réactions secondaires telles que l'oxydation de la méthionine et du tryptophane et la formation d'aspartimides. L'expertise développée dans notre laboratoire a permis d'éviter ou de minimiser la formation de tels produits secondaires. Les analyses par CLHP analytique et par spectrométrie de masse montrent l'obtention de produits de bonne qualité, grâce à l'utilisation d'un plan de protection orthogonal approprié jumelé à un bon contrôle des conditions de réactions.

Certaines difficultés ont été identifiées lors de la synthèse des analogues de l'ET-1. Par exemple, pendant le couplage de l'acide aminé suivant un acide glutamique, l'amorce de neutralisation du peptide-résine (pré-traitement avec 1% DIEA/DMF) a été omise de façon à éviter la formation d'un acide pyroglutamique. L'utilisation du réactif de couplage BOP diminue souvent la fréquence des réactions secondaires en comparaison à l'utilisation d'agents usuels tels que le DCC (Fournier *et al.*, 1989) ou les agents de nouvelle génération comme le HBTU ou le TBTU (résultats du laboratoire non publiés).

Lors du clivage du peptide de la résine, à l'aide de l'acide fluorhydrique, le maintien de la température à 4°C est primordial. En effet, l'incidence des réactions secondaires augmente rapidement avec une élévation de la température (Stewart et Young, 1984). De même, l'évaporation du HF à la fin du temps de réaction doit aussi se faire rapidement. Lors de cette étape, la plupart des groupements protecteurs portés par les acides aminés sont retirés, ce qui rend les résidus vulnérables à plusieurs réactions secondaires. L'oxydation et/ou l'alkylation des cystéines, méthionine et tyrosine sont des exemples de réaction qui peuvent alors survenir. Deux types d'agents protecteurs ont été ajoutés au milieu réactionnel de façon à minimiser ces réactions. Dans notre laboratoire, l'éthanedithiol et le *m*-crésol sont couramment utilisés à cette fin. De plus, le thiol possède aussi des propriétés antioxydantes. L'équipe de Matsueda (1981) a toutefois démontré que le groupement formyle, stable en milieu acide, avait tout de même tendance

à se retirer sous l'action nucléophile de l'éthanedithiol. L'utilisation du DMS comme antioxydant et capteur de carbocations a donc été privilégiée pour le clivage des analogues. Son ajout a considérablement réduit l'incidence de la réaction de déformylation de telle sorte que les analyses par spectrométrie de masse ne montrent aucune présence notable de peptide déformylé.

La formation du lien disulfure non naturel reliant les Cys 11 et 15 a été effectuée par une réaction utilisant 50 éq d'iode dans une solution aqueuse contenant 80% d'acide acétique. Ce protocole évalué dans notre laboratoire pour la synthèse de l'endothéline et de ses analogues permet le retrait des groupements Acn et la formation du lien disulfure en une seule étape.

17.3. Analogue [lys⁹]ET-1 (9-21)

Le matériel peptidique disponible de [lys⁹]ET-1 (9-21) étant épuisé, nous avons refait la synthèse de cet analogue. Pour des raisons de disponibilité des acides aminés et de rapidité, cette fois, la chimie Fmoc a été privilégiée. En effet, en chimie Fmoc, le Trp en position 21 est introduit dans la chaîne peptidique avec un groupement t-Boc sur sa chaîne latérale. Contrairement au groupement formyle, celui-ci est sensible aux conditions utilisées pour le clivage du peptide de la résine (95% TFA). On évite ainsi l'étape de déformylation.

Le Fmoc-Trp(Boc)OH a donc été introduit sur une résine de Wang suivant le protocole de Sieber (1987). Par la suite, les autres résidus de la chaîne peptidique ont été ajoutés, un à un, en suivant le protocole usuel de la chimie Fmoc. Les acides aminés ayant des groupements fonctionnels sur leur chaîne latérale portaient des groupements protecteurs afin de minimiser l'incidence de réactions secondaires. Ainsi, en plus du Trp, la Lys avait aussi un groupement t-Boc sur son amine ε. Les groupements acides de Asp et de Glu, de même que l'hydroxyle du Tyr, portaient des groupements tBu lors de leur incorporation dans la chaîne peptidique. Quant à l'His, elle était protégée par un groupement Tos. Afin de simplifier la synthèse encore davantage, des Cys(Trt) ont été introduites et, une fois le

peptide libéré de son support solide, le lien disulfure a été effectué par une simple oxydation au ferricyanure de potassium.

Étonnamment, bien que le peptide ait présenté la masse attendue en spectrométrie de masse, celui-ci ne possédait pas le même temps de rétention sur CLHP analytique, ni les mêmes caractéristiques pharmacologiques que l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21) original. Quelques réactions secondaires pourraient expliquer ce résultat.

Tout d'abord, nous avons examiné le lien disulfure. En effet, la réduction des Cys 11 et 15 aurait pour effet de modifier légèrement la masse, mais cette différence serait à l'intérieur de la marge d'erreur acceptée sur l'appareil de type MALDI TOF utilisé. Toutefois, les analyses par CLHP analytique faites sur le peptide et sur le peptide ayant subi un traitement de réduction utilisant du DTT ont montré que les deux analogues [lys⁹]ET-1 (9-21) étaient sous leur forme cyclisée.

La majorité des réactions secondaires répertoriées en synthèse peptidique sur phase solide entraîne une modification de la masse du peptide. Par exemple, la formation d'un pyroglutamate entraîne l'arrêt de l'élongation de la chaîne peptidique. Le matériel ainsi obtenu a donc une masse inférieure à celle attendue. L'oxydation du Trp en position 21 aurait également pour effet de modifier le poids du peptide. Alors que l'acylation des chaînes latérales de Glu, Asp, His ou Tyr augmenterait la masse mesurée par spectrométrie de masse.

La racémisation, c'est-à-dire la modification de la chiralité d'un acide aminé (Appendice G), représente une réaction secondaire observée, tant en chimie t-Boc qu'en chimie Fmoc. De plus, cette réaction n'a pas d'impact sur le poids d'un peptide. Les acides aminés les plus susceptibles à ce réarrangement sont l'His et la Cys. L'utilisation de groupements protecteurs, tels que le groupe tosylé sur l'His, a pour effet de diminuer l'incidence de cette réaction (Sieber et Riniker, 1987). Cependant, les études menées par les équipes de Jones et Ramage (1978) et de Jones, Ramage et Witty (1980) ont montré que la protection de l'azote π serait plus efficace que la protection de l'azote τ pour prévenir

l'énantiomérisation de l'His. Or, les dérivés disponibles commercialement, tels que Boc-His(Tos)-OH et Fmoc-His(Trt)-OH, sont protégés sur l'azote en position τ . Il était donc vraisemblable que l'un ou l'autre des analogues de [lys⁹]ET-1 (9-21) puisse avoir subi cette réaction secondaire et c'est pourquoi nous avons procédé à la synthèse de l'analogue [lys⁹, his¹⁶]ET-1 (9-21). Toutefois, les résultats obtenus, tant par CLHP analytique que par essais pharmacologiques, écartent cette hypothèse.

La racémisation possible, de l'une, l'autre ou des deux Cys retrouvées aux positions 11 et 15, a elle aussi été éliminée. L'incorporation des Cys(Trt) sous la forme d'anhydride symétrique défavorise le réarrangement de cet acide aminé autour de son carbone α (Han *et al.*, 1997). De plus, bien que Han (1997) et son équipe aient montré que la Cys(Acm) est susceptible à la racémisation, celle-ci atteint un taux de 11% seulement, semble-t-il, lorsqu'il y a préactivation (5 min) de l'acide aminé par le BOP en présence d'une base tertiaire telle que le DIEA. Nous avons alors évité cette étape de préactivation de sorte que les réactifs en solution ont été ajoutés directement dans les réacteurs contenant le peptide en élongation lié à son support solide. Ce procédé aurait donc pour effet de minimiser la réaction de racémisation des Cys(Acm) à moins de 2% (Han *et al.*, 1997). De plus, les analyses par CLHP analytique, effectuées avec les analogues dans lesquels nous avons remplacé l'une ou l'autre ou les deux Cys par des D-Cys (ou cys), montrent que ces analogues ne possèdent pas les mêmes propriétés physico-chimiques que les analogues [lys⁹]ET-1 (9-21) actif ou inactif.

La formation d'un β -Asp résulte d'une attaque nucléophile de l'acide carboxylique de la chaîne latérale de Asp par l'azote porté par le carbone α du résidu introduit précédemment dans la chaîne peptidique. Le succinimide résultant est bien sûr sensible à l'hydrolyse, et par conséquent, celui-ci s'ouvrira pour régénérer l'acide aspartique ou pour engendrer la formation d'un β -Asp (Appendice G). Celui-ci est, en fait, une structure réarrangée dont la masse est identique à celle du peptide souhaité. L'utilisation de groupements protecteurs tels que l'ester de t-butyle, en chimie Fmoc, et l'ester de cyclohexyle, en chimie t-Boc, a pour effet de diminuer l'incidence de ces réactions. Toutefois, des études menées plus récemment ont montré l'importance de cette réaction

secondaire, et ce, malgré l'utilisation de ces groupements protecteurs (Dölling *et al.*, 1994; Lauer, Fields et Fields, 1995; Yang *et al.*, 1994). Certaines séquences en acides aminés semblent plus susceptibles à cette réaction. Ainsi lorsque Asp est suivi de Gly, Thr(tBu), Cys(Acm), Asn(Trt) ou d'elle-même on observe alors un plus haut taux de formation de succinimide (Lauer, Fields et Fields, 1995). Donc, afin de les éliminer, des groupements protecteurs plus raffinés ont été développés tels que le β -3-méthylpent-3-yle (Mpe) (Karlström et Undén, 1996). Ces dérivés d'acides aminés sont cependant difficiles à se procurer et leur utilisation entraîne des coûts importants. Le contrôle des conditions de réactions peut aussi contribuer à minimiser l'incidence de cette réaction. En effet, la formation du succinimide est favorisée lors clivage du peptide de la résine, où Asp est alors déprotégé. Les travaux menés par l'équipe de Tam (1988) démontrent que le contrôle de la température et du temps de réaction lors du clivage à l'aide du HF permet de prévenir la formation de cet intermédiaire. Afin de minimiser la formation du succinimide, la réaction avec le HF est effectuée à 4°C. Le traitement du peptide à la pipéridine, lors de la réaction de déformylation, pourrait également conduire au réarrangement de Asp puisque sa chaîne latérale est alors libre de groupement protecteur.

La synthèse d'un analogue dans lequel un β -Asp a été introduit à la position 18 nous a permis d'éliminer cette hypothèse pour expliquer la formation de deux produits différents, lors de la synthèse de l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21). En effet, comme mentionné ci-haut, cette réaction secondaire n'altère pas la masse du peptide, mais modifie les propriétés physico-chimiques de celui-ci. Nous avons observé que, l'analogue [lys⁹, β -Asp¹⁸]ET-1 (9-21) ne possédait ni les caractéristiques de l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21) actif ni de celui inactif, tant sur CLHP analytique que sur les préparations riches en récepteurs ET_A et ET_B.

Pour les mêmes raisons de rapidité de synthèse et de disponibilité des acides aminés, l'élaboration des analogues [lys⁹, β -Asp¹⁸]ET-1 (9-21) et [lys⁹, his¹⁶]ET-1 (9-21) a été effectuée en chimie Fmoc, en suivant la même approche décrite précédemment. Le couplage de Fmoc-Trp(Boc)OH sur une résine de Wang a été réalisé selon le protocole de Sieber (1987). Par la suite, les couplages des dérivés d'acides aminés suivants ont été

effectués en procédant tel que décrit par le protocole usuel de la chimie Fmoc. Comme lors des synthèses précédentes, les acides aminés portant des fonctions sur leur chaîne latérale ont été introduits dans la chaîne peptidique sous une forme doublement protégée afin de minimiser l'incidence de réactions secondaires. Finalement, à la fin de la synthèse, le clivage a laissé les analogues libres de tous groupements protecteurs à l'exception des Acn portés par les Cys. Celles-ci ont pu être cyclisées à l'aide de la méthode utilisant l'iode 10 éq dans une solution d'acide acétique glacial contenant 1% d'eau. Cette approche avait pour avantage d'assurer la formation du lien disulfure. Enfin, l'avancement de la réaction est facilement observable par spectrométrie de masse, puisque sa formation entraîne la perte de 144 Da, soit une masse équivalente à la perte des deux groupements Acn.

Nous avons finalement refait la synthèse de l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21) en suivant, cette fois, le même protocole que celui utilisé la première fois. C'est-à-dire, en utilisant la chimie de type t-Boc sur une résine chlorométhylée de Merrifield telle que décrite précédemment. Les mêmes dérivés d'acides aminés ont été utilisés : Boc-lys(2ClZ)-OH, Boc-Glu(OBzl)-OH, Boc-Tyr(Bzl)-OH, Boc-His(Tos)-OH, Boc-Asp(OBzl)-OH et Boc-Trp(For)-OH. Les Val, Phe, Leu et Ile ont été introduites dans la séquence sans aucune autre protection que le t-Boc sur leur amine α . Après l'introduction de Glu, l'étape de neutralisation préliminaire a été omise de façon à éviter la formation d'un acide pyroglutamique. Des Cys(Acn) ont été introduites aux positions 11 et 15, et leur retrait, de même que la formation simultanée du pont disulfure, a été accomplie au moyen de la méthode utilisant 50 éq d'iode dans une solution aqueuse d'acide acétique à 80%. Ensuite, le peptide a subi un traitement à la pipéridine 0,1 N de façon à retirer le groupement formyle porté par la chaîne latérale de Trp. Les analyses effectuées sur le matériel ainsi obtenu n'ont montré qu'un seul produit majoritaire dont la masse correspondait à celle attendue. Cependant, les analyses effectuées par CLHP analytique ont montré que ce produit ne co-élue pas, ni avec le [lys⁹] ET-1 (9-21) issu de la synthèse en Fmoc, ni avec les analogues [lys⁹, β Asp¹⁸] ET-1 (9-21) et [lys⁹, his¹⁶] ET-1 (9-21).

Les essais pharmacologiques menés sur des anneaux d'aorte thoracique de rat, de même que ceux effectués sur le parenchyme pulmonaire de cobaye, ont révélé que ce nouveau produit avait les mêmes propriétés pharmacologiques que l'analogue original. Ces résultats suggèrent que le peptide [lys⁹] ET-1 (9-21) issu de cette dernière synthèse en chimie t-Boc correspond au produit original. Toutefois, une analyse plus élaborée serait nécessaire pour en avoir la certitude.

17.4. Analogues contenant une ou plusieurs homocystéines

Puisque de meilleurs résultats sont obtenus lorsque la chimie Fmoc est utilisée pour la production d'ET-1, ces analogues ont été synthétisés en utilisant ce protocole de synthèse. Tout comme lors de la synthèse des analogues modifiés aux positions 8, 9 et 10, le dérivé Fmoc-Trp(Boc)-OH a été introduit sur une résine de Wang en suivant le protocole de Sieber (1987). Par la suite, les autres acides aminés ont été introduits un à un suivant le protocole de la chimie Fmoc. Les acides aminés portant des groupements fonctionnels sur leur chaîne latérale portaient, en plus du groupement Fmoc, des groupements protecteurs tels qu'ester de t-butyle, pour les acides aminés ayant une fonction carboxylique, ester de t-butyle pour le résidu hydroxylé, t-Boc pour la Lys et le Trp, et trityle pour l'His.

Tout comme lors de la synthèse des analogues modifiés aux positions 8, 9 et 10, nous avons eu recours à un plan de protection orthogonal, utilisant les groupements AcM et Trt. Ce plan prévoyait le retrait de tous les groupes protecteurs des chaînes latérales à l'exception des Cys(AcM). Les HoCys (Trt) de même que les Cys(Trt) ont été introduites sous forme d'anhydride symétrique afin d'éviter leur racémisation. En effet, l'introduction de ces résidus sous la forme d'ester activé, tel que décrit par le protocole usuel de couplage des acides aminés, entraîne un fort taux de racémisation (Han *et al.*, 1997).

Cette stratégie de synthèse était appropriée puisque les analyses, par CLHP analytique et par spectrométrie de masse, effectuées sur les peptides obtenus après clivage de la résine, ont montré l'obtention de produits majoritaires dont la masse correspondait à celle

attendue. La formation du premier pont disulfure entre les Cys et/ou HoCys libres au moyen du ferricyanure de potassium a donné des produits purs dont la masse correspondait à celle attendue.

Le traitement à l'iode, employé pour le retrait des groupements AcM, en utilisant une solution contenant 80% d'acide acétique et 20% d'eau, à laquelle sont ajoutés 50 éq d'iode, a donné lieu à d'importantes réactions secondaires. La méthionine et le tryptophane retrouvés dans la séquence de l'ET-1 sont tous deux sensibles à l'oxydation. Bien qu'un traitement au NaBH_4 permet de réduire la Met, l'oxydation de Trp aboutit à la production de plusieurs sous-produits qui ne peuvent être réduits. De plus, les résidus Tyr et His permettent l'incorporation d'un atome d'iode sur leur chaîne latérale. Bien que l'utilisation d'un milieu acide, pour le retrait des groupements AcM, défavorise cette réaction, l'iodation de ces acides aminés demeure possible.

Nous avons donc procédé à la mise au point de nouvelles conditions pour le retrait des groupements AcM. Des sels d'argent et de mercure peuvent être utilisés pour ce faire. Cependant, ces protocoles ne permettent pas la formation simultanée du lien disulfure. De plus, ceux-ci impliquent une étape de retrait de métal chélaté à l'atome de soufre au moyen d'un thiol aux propriétés électronégatives supérieures à celle des Cys. Cette réaction aurait pour effet de réduire le premier pont disulfure et de générer le peptide ayant quatre Cys libres. Un sel de thallium aurait aussi pu être utilisé, mais la manipulation de ce réactif présente un risque important. Nous avons donc procédé à la révision des conditions de réaction utilisant l'iode. Ce réactif a pour avantage de permettre le retrait des groupements AcM et la formation du pont intramoléculaire en une seule étape. De plus, la manipulation de ce réactif ne présente pas de risque élevé.

Les meilleurs résultats ont été obtenus lors du traitement des analogues avec seulement 10 éq d'iode ajoutés à une solution d'acide acétique glacial contenant seulement 1% d'eau. Bien que le temps de réaction soit long (16 heures) et que l'on n'obtienne pas une réaction quantitative, celle-ci ne semble pas engendrer de réactions secondaires. En effet, les analyses par CLHP analytique et par spectrométrie de masse ont montré l'obtention

d'un produit de qualité présentant la masse attendue. Tous les analogues de cette série ont donc été traités de cette façon, et dans tous les cas, nous avons obtenu le produit désiré tel que montré par les analyses par CLHP et spectrométrie de masse.

18. Essais pharmacologiques

18.1. Choix de l'aorte thoracique de rat

Il existe deux types de récepteurs de l'endothéline soit les récepteurs ET_A et ET_B. Ceux-ci se distinguent par leur structure primaire (60% d'identité) et leur distribution, mais aussi par leurs propriétés pharmacologiques envers les trois isoformes de l'endothéline (Doherty, 1992 ; Haendler, Hechler et Schleuning, 1992). Des préparations d'aorte thoracique de rat, dénudée de leur endothélium, ont été utilisées pour l'évaluation pharmacologique des analogues de l'ET-1 sur le récepteur ET_A. Cette préparation tissulaire possède plusieurs avantages. D'abord, les cellules musculaires lisses de l'aorte thoracique expriment uniquement le récepteur ET_A à leur surface. L'ajout d'antagonistes sélectifs au récepteur ET_B n'est donc pas nécessaire. Ensuite, l'utilisation de cette préparation est répandue, et par conséquent, bien caractérisée, en plus d'être relativement facile à manipuler et peu coûteuse. Finalement il existe plus 92% d'identité entre le récepteur ET_A d'origine humaine et de rat (Haendler, Hechler et Schleuning, 1992).

18.2. Résultats obtenus sur les préparations d'aorte de rat

Depuis la découverte de l'ET-1 par Yanagisawa (1988a et b), plusieurs études ont été menées dans le but d'identifier les éléments essentiels pour la liaison et l'activation de chacun des récepteurs de l'ET. Ces études ont d'ailleurs mené à l'identification de plusieurs molécules peptidiques et non peptidiques connues pour leur activité agoniste ou antagoniste. En fait, leur développement est le résultat de travaux menés sur des dizaines d'analogues de l'ET-1 dans lesquels certaines propriétés physico-chimiques ont été augmentées ou diminuées ou même complètement éliminées. Dans la poursuite de ces

travaux, nous avons développé des analogues dans lesquels le segment chargé formé de Asp⁸, de Lys⁹ et de Glu¹⁰ a été modifié afin de mesurer leur importance dans les mécanismes d'interactions entre l'ET-1 et chacun de ses récepteurs.

Les essais pharmacologiques menés sur les préparations d'aorte de rat ont montré, dans un premier temps, que l'introduction d'une Ala à la position 10 affecte davantage l'activité biologique de l'ET-1, par rapport aux résultats obtenus lorsque ce résidu est introduit à la position 8. En effet, le retrait de l'acide carboxylique de la position 10 entraîne la perte complète de l'activité biologique de l'ET-1, puisque l'analogue [Ala¹⁰]ET-1 n'a montré aucune activité agoniste et antagoniste. Toutefois, cette même modification de la position 8 n'a pas engendré d'impact majeur sur l'activité intrinsèque de l'ET-1, mais a plutôt entraîné une perte de puissance relative d'un facteur 20. Il semble donc que la charge négative portée par l'acide glutamique-10 soit un élément clé pour permettre à l'ET-1 d'activer le récepteur ET_A. Ces résultats sont corroborés par l'introduction de résidus Ser ou Tyr, qui sont mieux tolérés à la position 8 qu'à la position 10. Le remplacement de la fonction carboxylique (Asp) par un groupement hydroxyle (Ser ou Tyr) est cependant moins bien toléré que l'introduction d'une chaîne aliphatique (Ala) à la position 8. Toutefois, le phénomène inverse se produit à la position 10, où l'insertion d'une Ser dans l'analogue inactif [Ala¹⁰]ET-1 conduit à un analogue ayant une faible puissance relative ($EC_{50} > 1 \mu M$), tout en conservant l'activité intrinsèque de l'ET-1. Puisque l'insertion d'un acide aminé hydroxylé est tolérée à la position 8, mais non à la position 10, ces résultats suggèrent que Glu¹⁰ pourrait interagir par l'intermédiaire d'un pont hydrogène, alors que Asp⁸ participerait plutôt à un lien ionique.

Cette hypothèse est appuyée par l'insertion de groupements phosphate ou sulfate sur la chaîne latérale d'une Tyr introduite aux positions 8 ou 10. Ces modifications avaient pour but d'amplifier la charge négative retrouvée à ces positions. En effet, les valeurs de pKa de ces groupements sont de 2,2 et de 1,7 respectivement, alors que le pKa de l'acide carboxylique porté par la chaîne latérale de Asp est de 3,9. L'insertion d'un groupement phosphate à la position 8 engendre un analogue 2 fois plus puissant que l'analogue [Tyr⁸]ET-1, alors que le sulfate diminue la puissance relative de celui-ci d'un facteur 2,5.

En position 10, l'analogue contenant une Tyr sulfatée est, tout comme l'analogue [Tyr¹⁰]ET-1, complètement inactif. Bien que ces modifications entraînent une amplification de la charge négative, elles génèrent également une augmentation importante de l'encombrement stérique à ces positions. Or, le segment 8 à 10 est impliqué dans le premier tour de l'hélice α . L'augmentation de l'encombrement à ce niveau pourrait nuire à la stabilité de celle-ci, et ainsi compromettre la liaison du peptide au récepteur ET_A (diminution de l'affinité). Cette structure secondaire en hélice α retrouvée au long de ce segment chargé est importante pour le bon alignement des pharmacophores (Appendice J).

Bien que les études initiales, menées sur différents modèles *in vitro*, aient montré l'importance des positions 8 et 10 occupées par des résidus chargés négativement, les rôles respectifs de celles-ci n'ont pas fait consensus (Faraci *et al.*, 1989; Warner *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1991). Toutefois, les travaux menés par Wallace et al. appuient l'hypothèse mise de l'avant dans notre laboratoire et selon laquelle l'ET-1 interagirait avec son récepteur ET_A *via*, entre autres, le groupement carboxylique de la position 10. En effet, la comparaison de la surface accessible de l'ET-1 libre, avec celle mesurée lorsque l'ET-1 est liée à son récepteur ET_A, montre que les changements les plus importants se produisent surtout au niveau de Glu¹⁰, en conjonction avec les résidus Tyr¹³, Phe¹⁴, Leu¹⁷, Asp¹⁸ et Trp²¹ (Orry et Wallace, 2000). Nos résultats concordent également avec ceux obtenus par l'équipe de Nakajima (1990) qui avait observé que le remplacement de Glu¹⁰ par une Gln entraîne la perte complète de l'activité biologique de l'ET-1.

Nos résultats suggérant le rôle prédominant de l'acide glutamique-10 pour l'activation du récepteur ET_A diffèrent cependant de ceux publiés par les équipes de Tam et de Hunt (Hunt et al., 1993 ; Tam et al., 1994). En effet, ces équipes ont effectué l'étude de la structure primaire de l'ET-1 en remplaçant chacun des acides aminés par une Ala. L'utilisation de l'Ala plutôt que de la Gly, plus petite, est justifiée par le fait que cette dernière ne possède pas de centre chiral sur son carbone α , ce qui génère une plus grande liberté de rotation et qui défavorise la stabilité de structures secondaires. Ainsi, les études

menées par Tam ont montré que lors du remplacement de l'acide aspartique en position 8 par une Ala, on obtient une diminution de plus de 90% de l'activité biologique de l'ET-1, tout en conservant une affinité comparable à l'ET-1 pour le récepteur ET_A. Comme le groupe de Tam, l'équipe de Hunt a montré une diminution importante de la liaison et de l'activation du récepteur ET_A lors de l'insertion d'une Ala à la position 10. Cependant, tout comme nous, cette équipe suggère que la position 10 jouerait aussi un rôle de premier plan dans l'activation du récepteur, car son remplacement par une Ala a entraîné une importante diminution de l'activité contractile tout en conservant une affinité équivalente à l'ET-1 pour le récepteur ET_A. En contradiction avec ces résultats, l'équipe de Tam a plutôt montré plutôt que l'analogue [Ala¹⁰]ET-1 est plus actif et possède plus d'affinité que l'ET-1 pour le récepteur ET_A.

Ces différences entre les résultats des groupes de Tam (Tam et al., 1994) et de Hunt (Hunt et al., 1993), par rapport aux nôtres, peuvent s'expliquer par la différence entre les modèles *in vitro* utilisés pour effectuer les essais. D'abord, l'équipe de Tam a exécuté le remplacement des différents acides aminés dans l'ET-1 sous sa conformation naturelle, alors que l'équipe de Hunt on fait les mêmes mutations ponctuelles, mais dans l'ET-1 cyclisée seulement entre les positions 1 et 15. De plus, les tissus utilisés pour effectuer leurs essais différaient. Les premiers ont utilisé des cellules musculaires vasculaires humaines et des bandelettes de veine cave de lapin alors que les seconds ont utilisé des cellules musculaires d'aorte de rat et des anneaux d'artère carotide de lapin pour effectuer leurs essais de liaison et leurs essais pharmacologiques respectivement. En fait, l'étude pharmacologique de l'ET est grandement compliquée puisque les récepteurs ET_A et ET_B semblent posséder une distribution hétérogène en fonction des espèces, des tissus vasculaires, mais aussi au long d'un même vaisseau sanguin. Par exemple, il a été montré que, chez l'Homme, la constriction des artères coronaires est engendrée tant par le récepteur ET_A que par le récepteur ET_B. Bien que le premier soit principalement retrouvé dans les grosses artères, le second se retrouve en majorité dans la partie distale de ces vaisseaux sanguins (Dashwood *et al.*, 1995), il est difficile d'obtenir une homogénéité de récepteurs. De plus, la plasticité de l'expression des récepteurs de l'ET, principalement du récepteur ET_B dont l'expression est modulé par plusieurs facteurs tels que le stress, vient

compliquer davantage l'étude pharmacologique de ces récepteurs (Barber *et al.*, 1996; Dagassan *et al.*, 1995; Cannan *et al.*, 1996). Dans plusieurs tissus, la réponse induite par l'ET-1 varie donc en fonction du tissu lui-même, mais aussi de l'état physiologique ou pathologique de l'animal. Les études effectuées dans nos laboratoires se distinguent puisque nous utilisons des anneaux d'aorte de rat dénudée de son endothélium, une préparation fréquemment utilisée contenant une préparation homogène de récepteurs ET_A. De plus, l'utilisation d'un plan de protection orthogonal approprié, lors de la synthèse des analogues de notre étude, a permis d'obtenir ceux-ci dans leur conformation naturelle, c'est-à-dire cyclisée entre les positions 1-15 et 3-11.

L'hypothèse selon laquelle Asp⁸ aurait seulement un rôle secondaire dans le processus d'activation de l'ET-1 est appuyée par plusieurs travaux. D'abord, il est suggéré que le rôle de l'Asp⁸ dans l'ET-1 serait de favoriser l'adoption de la bonne conformation lors de la formation endogène des ponts disulfures. En effet, lors de l'oxydation de l'ET-1 ayant ses quatre Cys libres, on observe l'adoption de la conformation naturelle des ponts disulfures à un taux variant entre 75% et 80% par rapport à la conformation croisée (1-11 et 3-15). Ce ratio s'élève à 96% lors de la cyclisation, dans les mêmes conditions, des analogues [Lys⁻², Arg⁻¹]ET-1 et de [Lys⁻², Arg⁻¹]SRTX-b (Aumelas *et al.*, 1995; Aumelas *et al.*, 1999). Les études par RMN de ces analogues ont montré la présence d'un lien ionique reliant les chaînes latérales des résidus Arg⁻¹ et Asp⁸. Ce lien stabiliserait l'hélice α retrouvée au long de la portion médiane de l'ET-1, et favoriserait ainsi la formation des ponts disulfures dans leur conformation naturelle, soit entre les Cys 1-15 et 3-11 (Aumelas *et al.*, 1995; Aumelas *et al.*, 1999). Ainsi, selon ces études, Asp⁸ aurait un rôle dans la stabilisation de la structure secondaire du précurseur de l'ET-1 plutôt que dans le mécanisme d'activation des récepteurs de l'ET.

Une hypothèse avait été émise concernant la sélectivité du récepteur ET_A pour les isoformes ET-1 et ET-2 par rapport à l'isoforme ET-3. Effectivement, la comparaison des structures primaires des ETs et des SRTXs au niveau du segment chargé laisse entendre qu'une charge nette de -1 serait un élément essentiel pour l'activation du récepteur ET_A. En effet, l'ET-1, l'ET-2 de même que les STRX-a, -b et -d portent une charge nette de -1

dans leur cycle interne, c'est-à-dire entre les Cys 3 et 11, alors que l'ET-3 et la SRTX-c, sélectives pour les récepteurs ET_B, possèdent respectivement une charge nette de -4 et de 0 (Sokolovsky, 1992). Nos résultats obtenus avec les fragments de l'ET-1 viennent infirmer cette hypothèse. En effet, l'analogue N-Ac-ET-1 (8-21) présente une charge nette de -1. Il est cependant inactif sur les préparations d'aorte de rat. Alors que les analogues [lys⁹]ET-1 (9-21) et N-Ac ET-1 (9-21), ayant une charge nette de +1 et de 0 respectivement, sont actifs sur cette préparation riche en récepteurs ET_A. La présence de la charge négative en position 10 semble donc avoir une importance supérieure à la charge totale du segment médian de l'ET-1.

L'inactivité des analogues 8-21 sur le récepteur ET_A vient aussi renforcer cette dernière hypothèse. Le segment 10-21 n'est cependant pas suffisant pour lancer le processus biologique conduisant à la contraction des anneaux d'aorte de rat. Le rôle de la Lys en position 9 semble donc important. De fait, deux analogues du fragment 9-21 se sont avérés actifs sur le récepteur ET_A. Bien qu'ils soient relativement peu puissants, entre 43 et 78 fois moins puissants que l'ET-1, ces analogues constituent les premiers agonistes de structure réduite pour le récepteur ET_A. Aussi, les études de liaison ont montré qu'ils compétitionnent pour le même site de liaison que l'ET-1. Ces analogues démontrent donc que contrairement à ce qui avait été suggéré, le segment N-terminal de l'ET-1 n'est pas essentiel à l'activation (Doherty *et al.*, 1991; Hey *et al.*, 1993; Mc Donald *et al.*, 1996; Pelton *et al.*, 1997). Ce dernier semble plutôt jouer un rôle dans le processus de liaison de l'ET-1, tel que suggéré par la faible affinité envers le récepteur ET_A présenté par nos analogues tronqués. De plus, il avait été montré que le segment 3-8 de l'ET-1 avait la capacité de lier, mais non d'activer, ce récepteur (Mc Donald *et al.*, 1996).

Pour conserver sa capacité contractile sur les préparations d'aorte de rat, le fragment 9-21 doit cependant être modifié à son extrémité N-terminale, soit par l'introduction d'une D-Lys ou par l'insertion d'un groupement N-acétyle. En fait, l'inversion de la chiralité de ce résidu entraîne une augmentation importante de la puissance relative du fragment 9-21. Des résultats similaires avaient été observés avec l'ET-1 complète. En effet, l'analogue [lys⁹]ET-1 avait montré une affinité deux fois supérieure sur les cellules musculaires

vasculaires humaines, et une capacité contractile de 4 fois supérieure à l'ET-1 sur les bandelettes spiralées de veine cave de lapin (Galantino *et al.*, 1995).

L'importance relative de la Lys⁹ avait été suggérée par Tam et collaborateurs qui ont substitué cette position par l'Ala dans l'ET-1 (Tam *et al.*, 1994). En effet, l'analogue [Ala⁹]ET-1 a montré une puissance relative comparable à celle de l'ET-1 pour le récepteur ET_A, cependant une diminution de l'intensité maximale de la contraction était alors observée. Des résultats similaires avaient été obtenus lors du remplacement de cet acide aminé par une Leu (Nakajima *et al.*, 1990). Les résultats que nous avons obtenus sur les anneaux d'aorte de rat sont, en fait, différents puisque le remplacement de la Lys⁹ par une Ala dans l'ET-1 engendre un analogue de puissance relative et d'activité contractile inférieure à celle de l'ET-1. Ici encore, la différence entre l'activité biologique observée pour l'analogue [Ala⁹]ET-1, pourrait s'expliquer par la différence entre les tissus utilisés pour effectuer les essais pharmacologiques. Tel qu'expliqué précédemment, les équipes de Tam et de Nakajima ont utilisé respectivement des préparations de veine cave et d'artère pulmonaire de lapin, alors que nos résultats ont été obtenus sur des préparations d'aorte thoracique de rat.

L'ajout d'un groupement azidobenzoyl, sur l'amine ε de la chaîne latérale de la Lys⁹ dans l'ET-1, n'entraîne pas de perte substantielle d'affinité (Kundu et Misono, 1991). Cependant, le remplacement de celle-ci par une Leu, tout comme son remplacement par une Ala, modifie la puissance relative et/ou la capacité contractile de l'ET-1. Sans être un élément essentiel, il semble donc que cet acide aminé joue un certain rôle dans l'activation du récepteur ET_A. En fait, plusieurs études suggèrent que ce résidu serait responsable de la sélectivité de ce récepteur envers les différentes isoformes d'ETs et de SRTXs (Kitazumi *et al.*, 1990; Takasaki *et al.*, 1990; Takasaki *et al.*, 1991). En effet, l'équipe de Lamthanh (1994) a montré que la position 9 était plus importante que la position 2 pour expliquer la sélectivité des SRTX-a et -b envers le récepteur ET_A par rapport aux SRTX-c et -d de même que l'ET-3, qui elles sont sélectives pour le récepteur ET_B. En effet, l'insertion d'une Thr à la position 2 de la SRTX-b conduit à un analogue toujours aussi puissant que l'ET-1, mais environ 35% moins efficace. La sélectivité du

récepteur ET_A semble donc être principalement relayée par la mutation ponctuelle de la position 9 entre les différents membres de la famille des ETs et des SRTXs. Ce résidu semble donc interagir dans le processus d'activation du récepteur ET_A, probablement dans la stabilisation du complexe ligand-récepteur.

Plusieurs études de RMN montrent d'ailleurs que la Lys⁹ interagit avec la Val en position 12, et que cette interaction longue distance participerait à la stabilisation de l'hélice α (Mills *et al.*, 1992; Andersen *et al.*, 1992; Aumelas *et al.*, 1991; Hewage *et al.*, 1997; Hewage *et al.*, 1999). Le remplacement de la Lys par une Ala pourrait engendrer un relâchement de la structure de l'ET-1 et ainsi diminuer la capacité contractile du peptide. De la même façon, l'insertion d'une D-Lys pourrait resserrer la structure tridimensionnelle et ainsi favoriser l'activation de ce récepteur. Cet acide aminé positif pourrait former un lien ionique avec Asp¹⁸ pour ainsi générer le repliement du segment carboxy-terminal dans un arrangement compact. Cette structure permettrait au fragment de lier et d'activer le récepteur ET_A (Appendice J).

Plusieurs études avaient démontré l'importance de l'extrémité amino-terminale libre pour maintenir l'activité biologique de l'ET-1 tant sur le récepteur ET_A qu'ET_B. En effet, l'ajout des résidus Lys et Arg, respectivement retrouvés en position -1 et -2 de la Big ET-1, entraîne la perte complète de l'activité biologique du peptide (Nakajima *et al.*, 1989a; Nakajima *et al.*, 1989b). L'encombrement stérique à l'intérieur de la poche de liaison empêche probablement l'analogue d'interagir correctement avec ses récepteurs. Cependant, puisque le fragment 9-21 ne compte que 13 acides aminés, l'ajout du groupement acétyle en N-terminal ne devrait pas gêner le processus de liaison et d'activation. De plus, il a été montré que l'ajout de petits groupements pouvait influencer fortement l'arrangement tridimensionnel des fragments de l'ET-1. En effet, des études menées par RMN avaient montré que l'incorporation d'un groupement formyle sur le noyau indole du Trp avait complètement modifié la structure du segment C-terminal d'analogues tronqués de l'ET-1 (Forget *et al.*, 1996; Boulanger *et al.*, 1999) (Appendice I). De la même façon que l'insertion d'une D-Lys, le groupement acétyle en N-terminal pourrait agir en stabilisant une structure compacte du fragment 9-21 et ainsi favoriser

l'activité contractile de cet analogue.

Cette hypothèse est renforcée par des études structure-fonction menées sur des antagonistes peptidiques, formés du segment 16-21. Celle-ci ont montré que le choix des acides aminés en position N-terminale permettait d'augmenter l'affinité envers le récepteur ET_A. Ainsi, il a été montré que l'insertion d'un groupement acétyle a généralement pour effet d'améliorer l'affinité envers ce récepteur (Cody *et al.*, 1995; Cody *et al.*, 1997; Doherty *et al.*, 1993a).

Comme le fragment 9-21 de l'ET-1 représentait le plus court agoniste du récepteur ET_A, nous avons tenté de modifier certaines propriétés physico-chimiques du peptide de façon à déterminer les éléments essentiels pour l'activation des récepteurs, mais aussi ceux responsables de la sélectivité de ceux-ci.

Dans un premier temps, nous avons déterminé l'importance du groupement carboxy-terminal en produisant des analogues amides du fragment 9-21. Tout comme l'ET-1 amide, ces analogues se sont avérés inactifs sur les préparations d'aorte de rat (Nakajima *et al.*, 1989a; Nakajima *et al.*, 1989b). Le groupement carboxylique en fin de chaîne peptidique semble donc jouer un rôle important dans l'activation du récepteur ET_A. Les mesures de la surface accessible de l'ET-1 seule, en comparaison avec celle mesurée lorsque l'ET-1 est liée à son récepteur, montrent une différence marquée au niveau du Trp²¹ (Orry et Wallace, 2000). En plus d'interactions aromatiques, ce résidu pourrait interagir, *via* le groupement C-terminal, avec une charge positive du récepteur. En fait, une autre étude de l'équipe de Wallace suggère l'importance d'une promiscuité entre le noyau indole du Trp et d'une charge négative pour la liaison au récepteur ET_A (Peishoff, Janes et Wallace, 1995). Cette charge négative pourrait être le groupement C-terminal, mais aussi celle portée par la chaîne latérale de l'Asp¹⁸. Effectivement, dans une structure hélicoïdale, telle que proposée par cristallographie, les chaînes latérales de Asp¹⁸ et de Trp²¹ seraient projetées vers l'extérieur du même côté de l'hélice.

Beaucoup d'études ont montré l'importance des résidus Asp¹⁸ et Trp²¹ (Kimura *et al.*,

1989; Kimura *et al.*, 1988; Tam *et al.*, 1994, Watanabe *et al.*, 1991; Orry et Wallace, 2000). À l'intérieur du fragment 9-21, l'Asp¹⁸ semble également jouer un rôle de premier plan, puisque le retrait de la charge négative portée par la chaîne latérale de ce résidu, par l'incorporation d'une Asn, entraîne la perte complète de l'activité biologique des analogues ET-1 (9-21), N-Ac-ET-1 (9-21) et [lys⁹]ET-1 (9-21). Contrairement aux résultats rapportés par l'équipe de Katahira (1998), qui avait montré que l'introduction d'une Gly à la position 18 dans l'IRL1620 avait pour effet d'améliorer l'activité biologique du peptide, cette modification n'a pas entraîné l'amélioration de la puissance relative ni de l'activité intrinsèque du fragment 9-21. La charge négative retrouvée en position 18 pourrait agir de concert avec l'indole du Trp²¹ pour activer le récepteur ET_A. D'ailleurs, Orry et son équipe ont construit un modèle d'arrimage entre l'ET-1 et le récepteur ET_A où l'Asp¹⁸ et le Trp²¹, en plus de la Leu¹⁷, interagiraient respectivement avec la chaîne peptidique, avec les résidus Phe-153 et -158 et avec la Leu-142 (Orry et Wallace, 2000).

Une étude publiée par Moore *et al.* suggère que l'angiotensine, un peptide partageant plusieurs similitudes avec l'ET-1, interagirait avec son récepteur AT₂, un récepteur couplé aux protéines G, par un mécanisme moléculaire ressemblant à celui des sérine protéases (Turner, Matsoukas et Moore, 1991; Moore *et al.*, 1994). Ce même mécanisme pourrait exister dans le fragment 9-21 où le carboxy-terminal, les azotes de la chaîne latérale de His¹⁶ et finalement le noyau phénol de Tyr¹³ pourraient s'aligner et ainsi former un relais de charge. Celui-ci permettrait d'abaisser le pK_a du noyau phénol de la Tyr¹³, normalement situé à une valeur de 10,2, pour ainsi favoriser l'interaction entre le peptide et son récepteur ET_A (Appendice J). Un tel mécanisme d'interaction a d'ailleurs été suggéré pour l'activation du récepteur de l'urotensine II (UII) (Kinney *et al.*, 2002). De plus, un article récemment publié, à partir d'antagonistes non peptidiques du récepteur ET_A, rapporte que les trois noyaux aromatiques, dont l'un porte une charge négative, adoptent un arrangement tridimensionnel en L. Selon les auteurs, celui-ci serait, en fait, l'élément clé pour la liaison au récepteur (Ishizuka *et al.*, 2002a).

Afin de montrer l'existence d'un pareil relais de charge, une série d'analogues des

fragments ET-1 (9-21), N-Ac-ET-1 (9-21) et [lys⁹]ET-1 (9-21) ont été synthétisés en modifiant les positions 13 et 16. De cette série, les analogues contenant une His¹⁶ méthylée a conduit à la perte complète de l'activité biologique sur les préparations d'aorte de rat, et ce, lorsque le méthyle a été introduit tant en position 1 qu'en position 3. De plus, l'insertion d'un groupement méthyle sur l'hydroxyle du noyau phénolique de la Tyr¹³ entraîne également l'incapacité du fragment 9-21 à engendrer la vasoconstriction. Ces résultats, en plus de ceux obtenus avec les analogues amides, suggèrent que le fragment 9-21 pourrait activer le récepteur ET_A et ainsi générer l'activation de la protéine G sous jacente *via* un mécanisme similaire aux sérine protéases (Appendice J).

L'importance du résidu Tyr¹³ pour l'activation du récepteur ET_A a d'ailleurs été montrée. En effet, l'équipe de Tam (1994), lors du remplacement de cet acide aminé par une Ala, a montré que le retrait du groupement phénolique engendre la perte quasi totale de la liaison et de l'activation de ce récepteur. En plus, certains auteurs suggèrent que Tyr¹³ serait un élément clé dans le phénomène de sélectivité de ce récepteur envers les isoformes ET-1 et ET-2. En effet, le remplacement de l'Asn¹³ par une Tyr dans la SRTX-c entraîne une augmentation de l'activité biologique du peptide sur des préparations d'aorte de rat, suggérant l'importance du noyau phénol retrouvé à la position 13 de l'ET-1 pour l'activation du récepteur ET_A (Kitazumi *et al.*, 1990).

Finalement, à partir des études structure-fonction menées sur des antagonistes peptidiques et non peptidiques du récepteur ET_A, plusieurs études ont montré qu'une structure hydrophobe, formée de plusieurs noyaux aromatiques, chapeauté par une charge négative étaient nécessaires pour obtenir une liaison spécifique (Tomita *et al.*, 1991, Astles *et al.*, 1998a, Astles *et al.*, 1998b; Dasgupta *et al.*, 2002, Ishizuka *et al.*, 2002a). Les noyaux aromatiques retrouvés en positions 13, 14 et 21 de l'ET-1 ont d'ailleurs été identifiés comme étant des éléments importants pour le maintien de l'activité contractile de l'ET-1 (Kimura *et al.*, 1988; Nakajima *et al.*, 1989a; Kitazumi *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1994; Tam *et al.*, 1994; Doherty *et al.*, 1991; Galantino *et al.*, 1995). Nos études indiquent que l'acide glutamique retrouvé en position 10 représente dans les analogues du fragment 9-21, et peut-être même dans l'ET-1, le site cationique nécessaire à la liaison au

récepteur ET_A. D'ailleurs, le retrait de la charge négative à cette position, par l'incorporation d'un résidu Gln, entraîne la perte de l'activité biologique du fragment. De plus, tel que montré précédemment, le simple remplacement de l'acide glutamique en position 10 de l'ET-1 suffit à rendre cette dernière complètement inactive. Le rôle crucial de ce résidu dans le fragment 9-21, mais aussi dans l'ET-1 elle-même, suggère que cette charge négative représente un point d'ancrage du peptide dans le site de liaison du récepteur ET_A, tel que suggéré par Orry et Wallace (2000). La formation du tyrosinate, *via* le relais de charge impliquant l'His¹⁶ et le groupement carboxy-terminal, viendrait activer le récepteur pour ainsi engendrer la contraction des anneaux d'aorte (Appendice J).

La présence de ces pharmacophores est essentielle pour l'activation de ce récepteur, mais l'organisation spatiale de ces éléments est tout aussi cruciale puisqu'elle leur permet d'interagir correctement entre eux pour ainsi amorcer le processus d'activation. À ce titre, le pont disulfure non naturel reliant les positions 11 et 15 dans le fragment 9-21 a été investigué. D'abord, le retrait de ce lien intramoléculaire entraîne globalement la perte de l'activité biologique du fragment. Seul l'analogue [Ala^{11,15}, Trp(For)²¹]ET-1 (9-21) a montré une activité contractile sur les préparations d'aorte de rat (EC₅₀ 1,6 µM). Or il avait été montré que le groupement formyle, introduit sur le noyau indole du Trp en position 21 d'analogues tronqués de l'ET-1, avait pour effet d'induire un repliement dans la portion C-terminale (Forget *et al.*, 1996, Boulanger *et al.*, 1999) (Appendice I). La nécessité d'induire un repliement de la chaîne peptidique, soit par la formation d'un lien disulfure reliant les Cys 11 et 15 ou par l'incorporation d'un groupement formyle, suggère que le site de liaison du récepteur ET_A accommode un ligand de structure compacte. Ce repliement semble plus important que la présence des Cys elles-mêmes. Ceci contredit l'hypothèse de Spinella selon laquelle l'ET-1 interagirait avec le récepteur ET_A *via* un lien disulfure (Spinella *et al.*, 1991). De plus, le remplacement de l'une, ou de l'autre ou des deux Cys par des D-Cys conduit à une perte de l'activité contractile du fragment 9-21. Le lien disulfure reliant les positions 11 et 15 est donc important pour contraindre la chaîne peptidique dans un arrangement compact, mais aussi, il oriente vraisemblablement les résidus Glu¹⁰, Tyr¹³, His¹⁶, Asp¹⁸ et Trp²¹ de façon à induire les

mécanismes d'activation du récepteur ET_A.

Ces résultats sont corroborés par les études de dichroïsme circulaire qui montrent, dans un premier temps, un lien direct entre la présence de structures secondaires et la capacité à induire la contraction des préparations d'anneaux d'aorte de rat. En effet, les spectres des analogues [lys⁹]ET-1 (9-21) (EC₅₀ 2,8 x 10⁻⁷ M) et N-Ac ET-1 (9-21) (EC₅₀ 1,3 x 10⁻⁶ M) présentent un maximum avoisinant 192 nm suivie d'un minimum situé à environ 210 nm. Le spectre du fragment 9-21, présentant une EC₅₀ supérieure à 5 µM ne présente aucun maximum, mais conserve le minimum à 210 nm. Finalement, l'analogue [Ala^{11,15}] ET-1 (9-21), complètement inactif, présente un spectre ne présentant qu'un seul minimum à moins de 200 nm, ce qui est caractéristique d'une structure désordonnée.

Les spectres des analogues [lys⁹]ET-1 (9-21) et N-Ac ET-1 (9-21) présentent tous deux un maximum situé à 192 nm qui est caractéristique de l'hélice α. Cependant, ceux-ci ne se conforment pas complètement au spectre attendu par cette structure. Nous proposons l'adoption d'une hélice irrégulière par ces deux analogues. Celle-ci pourrait être une hélice de type 3/10 qui est caractérisée par un pas droit de 0,60 nm formé de 3 résidus par tour. Cette structure serait favorisée par l'inversion de la chiralité de Lys⁹ ou par la présence du groupement acétyle en N-terminal. En effet, le retrait de celui-ci, de même que l'insertion d'une L-Lys, entraîne la perte de ce maximum à 192 nm, et ce, malgré la présence du lien disulfure. Ce dernier a certainement un rôle stabilisateur de la structure puisque son retrait a pour effet de déplacer le minimum de 210 nm vers 198 nm tel que montré par les spectres des analogues ET-1 (9-21) et [Ala^{11,15}] ET-1 (9-21). Le lien disulfure reliant les Cys 11 et 15, de même que le tour d'hélice en N-terminal des analogues du fragment 9-21, pourraient induire le repliement du segment terminal de façon à aligner correctement les pharmacophores et ainsi permettre au fragment d'activer le récepteur ET_A (Appendice J).

Cette hypothèse est corroborée par les résultats obtenus avec l'analogue linéaire [Ala^{11,15}, Trp(For)²¹]ET-1 (9-21). Celui-ci doit porter le groupement formyle pour conserver son activité biologique. Comme nous l'avons précédemment souligné, le groupement formyle

porté sur la chaîne latérale de Trp a induit un repliement du segment C-terminal d'analogues tronqués et linéaires de l'ET-1 (Forget *et al.*, 1996; Boulanger *et al.*, 1999) (Appendice I). Ce groupement semble agir de la même façon dans l'analogue linéaire du fragment 9-21, puisque son retrait, en plus d'engendrer la perte de l'activité biologique, entraîne également la perte de la structure secondaire du peptide. En effet, les spectres de dichroïsme circulaire montrent d'abord la perte du maximum à 190 nm, mais aussi le déplacement du minimum de 210 nm à 198 nm. Il semble donc que l'adoption d'une structure secondaire en hélice, par le fragment 9-21 de l'ET-1, favorise l'activation du récepteur ET_A. Cette structure serait présente tout au long du peptide, et celle-ci est vraisemblablement induite par la modification de la structure primaire du fragment aux extrémités N- et C-terminales.

L'adoption d'une structure en hélice α s'étendant entre les résidus 9 à 15 (ou 16) fait maintenant consensus. Les études menées par RMN dans différents milieux montrent effectivement des interactions longues distances caractéristiques à cette structure (Aumelas *et al.*, 1991; Mills *et al.*, 1992; Andersen *et al.*, 1992; Hewage *et al.*, 1997; Aumelas *et al.*, 1995). Cependant, la structure tridimensionnelle du segment carboxy-terminal est, selon ces mêmes études, complètement aléatoire. Ce segment présente une grande flexibilité de telle sorte que très peu d'interactions longues distances sont observées par RMN. Certains auteurs suggèrent que le segment C-terminal serait replié vers la portion N-terminale (Saudek *et al.*, 1989; Saudek *et al.*, 1991; Bortmann *et al.*, 1991; Krystek *et al.*, 1991; Katahira *et al.*, 1998). Cette structure compacte serait importante pour l'activation du récepteur ET_A. Cependant, cette hypothèse ne fait pas consensus (Mills *et al.*, 1992; Munro *et al.*, 1991; Tamaoki *et al.*, 1991).

Par cristallographie, l'équipe de Wallace (1994) a prédit le prolongement de l'hélice, de façon irrégulière, jusqu'à l'extrémité C-terminale de l'ET-1. S'il y a des différences importantes entre les études de RMN, faites lorsque l'ET-1 est en solution, et les études cristallographiques, où le peptide est à l'état solide, c'est la structure du peptide lorsqu'il est en contact avec le récepteur qui est importante pour l'activité biologique. En effet, nombre de peptides ont un arrangement tridimensionnel plutôt flexible ou indéfini en

condition aqueuse, et c'est probablement la structure adoptée par le peptide lorsqu'il est dans les liquides corporels. Cependant, au contact avec la membrane plasmique, et dans le site de liaison du récepteur, l'environnement hydrophobe catalyse l'adoption d'une conformation permettant au peptide d'interagir avec ce dernier. Aussi, faut-il rechercher la structure la plus révélatrice pour l'activité biologique. En ce sens, les travaux menés par l'équipe de Wallace sont très intéressants, puisque cette équipe a testé son modèle structural pour l'ET-1 avec les données disponibles (Orry et Wallace, 2000).

D'abord, les acides aminés 10, 14, 18 et 21 ont été identifiés comme étant des résidus importants pour l'activité biologique de l'ET-1 sur le récepteur ET_A (Tam *et al.*, 1994). Ceux-ci sont séparés par trois ou quatre résidus, et dans une structure en hélice, ils seraient exposés du même côté, alignés les uns avec les autres. Aucune autre structure ne permettrait un tel arrangement (Wallace et Janes, 1995). De plus, la surface accessible de ces résidus, calculée à partir de leur modèle pour l'ET-1 seule, mais aussi pour l'ET-1 lié au récepteur, est cohérente avec les résultats obtenus lors de l'Ala scan de Tam et collaborateurs (1994), mais également avec les données de plusieurs études de structure-fonction (Kimura *et al.*, 1989; Kimura *et al.*, 1988; Tam *et al.*, 1994; Nakajima *et al.*, 1989a; Koshi *et al.*, 1991, Watanabe *et al.*, 1991,; Orry et Wallace, 2000).

De plus, la comparaison entre la structure obtenue par RMN du BQ123, un antagoniste sélectif pour le récepteur ET_A, et du modèle structural de l'ET-1 montre une étonnante superposition du groupement carboxylique de la chaîne latérale de Asp et du noyau indolique du Trp retrouvés dans ces deux molécules (Peishoff, Janes et Wallace, 1995). La proximité entre ces groupements serait, selon les auteurs, un élément important pour l'affinité de l'ET-1 et du BQ 123 pour le récepteur ET_A.

La pertinence de ce modèle structural de l'ET-1 peut également être validée par la modélisation, par minimisation d'énergie, des isoformes de l'ET. En effet, le modèle ainsi construit pour l'ET-2, qui diffère de l'ET-1 aux positions 6 et 7, ne diverge que légèrement de celui de l'ET-1 et ce malgré la substitution de la Leu⁶ par un résidu Trp beaucoup plus gros. Le modèle construit pour l'isoforme ET-3, présentant une affinité

pour le récepteur ET_A beaucoup plus faible que l'ET-1 et l'ET-2, montre d'importantes différences entourant le segment N-terminal. Celles-ci, en plus des mutations ponctuelles de la séquence en acides aminés et de la différence de la charge nette du peptide, pourraient contribuer à inhiber l'affinité de l'ET-3 pour le récepteur ET_A (Wallace et Janes, 1995).

En outre, le modèle proposé par Wallace et collaborateurs est le seul à identifier une structure secondaire définie pour le segment C-terminal de l'ET-1 complète. Ce modèle est cohérent avec les résultats obtenus des études de structure-fonction, et peut expliquer, en partie, la sélectivité accrue du récepteur ET_A pour les isoformes ET-1 et ET-2 par rapport à l'ET-3. Finalement, nos résultats cadrent très bien avec le modèle théorique proposé. Nous proposons donc l'adoption d'une structure en hélice irrégulière par le fragment [lys⁹]ET-1 (9-21) de l'ET-1. Cet arrangement compact permettrait le bon alignement des éléments essentiels pour la liaison tels que Lys⁹ et Glu¹⁰ mais aussi des éléments ayant un rôle dans l'activation tels que Tyr¹³, His¹⁶, Asp¹⁸, Trp²¹ et l'acide terminal (Appendice J).

Finalement, l'importance de l'adoption d'un arrangement spatial compact pour l'activation du récepteur ET_A est corroborée par les analogues dans lesquels nous avons remplacé l'un ou l'autre ou les deux ponts disulfures par l'insertion d'homocystéines. En effet, une diminution de la compacité de la molécule, par l'allongement des liens disulfures intramoléculaires entraîne une perte importante de la capacité contractile de l'ET-1 sur des préparations d'aorte de rat. Cette perte est plus importante lors de l'allongement du pont disulfure externe, reliant les Cys 1-15, que lors de l'allongement du lien interne en position 3-11. Ces résultats corroborent ceux publiés par l'équipe de Nakajima (1989b) qui avait montré que le pont 1-15 avait une importance supérieure à l'autre lien intramoléculaire. De plus, l'ET-1 linéaire a été identifié par plusieurs auteurs comme étant un agoniste sélectif pour le récepteur ET_B (Kimura *et al.*, 1988; Hirata *et al.*, 1989a; Hirata *et al.*, 1989b; Hirata *et al.*, 1989c).

18.3. Choix du parenchyme pulmonaire de cobaye

Le parenchyme pulmonaire de cobaye est une préparation largement utilisée comme modèle *in vitro* des muscles lisses des voies pulmonaires. Des études histologiques menées par Wai-shiu et son équipe (1996) suggèrent que trois types cellulaires contractiles causent la constriction du parenchyme soit : les cellules contractiles pleurales, alvéolaires et interstitielles. Nous avons utilisé seulement les bandelettes distales des lobes pulmonaires, puisque la surface pleurale y est supérieure, celles-ci montrent donc une meilleure contractilité. La contribution des cellules musculaires lisses des bronches, des bronchioles et des vaisseaux sanguins serait quant à elle marginale. De plus, Uchida et son équipe (1996) rapportent que les deux types de récepteurs de l'ET se retrouvent tout au long du système pulmonaire. Les voies respiratoires centrales exprimeraient majoritairement le récepteur ET_A, alors que dans les voies respiratoires périphériques, le rapport ET_A/ET_B serait inversé. Puisque le parenchyme pulmonaire de cobaye ne contient pas une homogénéité de récepteurs de l'endothéline, l'évaluation pharmacologique des analogues a nécessité l'emploi d'un inhibiteur du récepteur ET_A le BQ610 à une concentration de 0,1 µM.

En conclusion, cette préparation est bien caractérisée en plus d'être relativement facile à manipuler et peu coûteuse. Finalement, même si l'homologie de la structure primaire du récepteur humain et celle issue du cobaye ne sont pas connue, le récepteur d'origine humaine est à 88% identique à celui retrouvé chez le rat.

18.4. Résultats obtenus sur les préparations pulmonaires de cobaye

La caractérisation pharmacologique des isoformes de l'ET dans différents tissus et les résultats des études structure-fonction menées après la découverte de l'ET-1 suggéraient l'existence de deux récepteurs distincts. Mais ce n'est qu'un an plus tard que l'équipe de Maggi (1989) réussit à identifier les récepteurs ET_A et ET_B, par la découverte d'un

agoniste sélectif pour ce dernier récepteur. En effet, le fragment 16-21 de l'ET-1 suffit à stimuler le récepteur ET_B. Depuis, plusieurs fragments du segment C-terminal ont été identifiés comme agonistes ou antagonistes sélectifs pour le récepteur ET_B.

L'étude détaillée de ces fragments a permis d'identifier plusieurs pharmacophores essentiels à la liaison et à l'activation du récepteur ET_B. Ces résultats sont relativement cohérents et suggèrent fortement que le segment terminal hydrophobe, comprenant les résidus Phe¹⁴ Leu¹⁷ et Ile²⁰, terminé par un résidu Trp, seraient l'élément clé pour l'activité biologique sur ce récepteur (Saeki *et al.*, 1992; Forget *et al.*, 1996; Galoppini *et al.*, 1999). Mais ce serait l'environnement hydrophobe entourant la chaîne latérale de Trp²¹ qui serait la clé de l'activation du récepteur ET_B (Forget *et al.*, 1996). Une étude de notre laboratoire menée conjointement avec un autre groupe (Filep *et al.*, 1992) suggère que l'ajout d'un groupement formyle au tryptophane en position 21 permettrait de discriminer entre les sous-types ET_{B1} et ET_{B2}. En effet, le peptide [Trp(For)²¹]ET-1 induit la constriction d'anneaux de trachée de cobaye mais il semble incapable de provoquer la vasodilatation transitoire observée avec une artère de rat. Selon le modèle actuel, [Trp(For)²¹]ET-1 se lierait aux récepteurs ET_{B2}, mais serait incapable d'activer le récepteur ET_{B1}.

Les études par RMN ont mis en évidence la grande flexibilité de la portion C-terminale de l'ET (Forget *et al.*, 1996). En effet, le retrait d'un groupement aussi petit que le formyle (CHO) induit le repliement complet des analogues linéaires sur eux-mêmes, les rendant complètement inactifs (Appendice I). La présence du formyle sur le tryptophane permettrait à ces peptides d'exposer davantage leurs groupements fonctionnels qui, grâce à leur flexibilité, pourraient s'orienter de façon à s'adapter au site de liaison du récepteur ET_B.

Ainsi le groupement formyle semble jouer un rôle important pour l'activation du récepteur en induisant un repliement en coude de la portion terminale de façon à ce que le noyau indole du tryptophane se retrouve près de la leucine-17. Ce repliement semble jouer un rôle clé dans l'activation du récepteur ET_B (Boulanger *et al.*, 1999; Forget *et al.*,

1996). Cette conformation est aussi rapportée dans d'autres études (Saudek, Miller et Pelton, 1989; Mills *et al.*, 1992).

Bien que le segment C-terminal suffise à induire l'activation du récepteur ET_B, la modification du segment chargé 8 à 10 dans l'ET-1 complète et cyclisée dans sa conformation naturelle, a eu un impact majeur sur l'activité biologique sur le récepteur ET_B. En fait, en plus d'une perte de puissance, ces analogues se sont avérés des agonistes partiels (environ 60% de la contraction maximale de l'ET-1) sur les préparations de parenchyme pulmonaire. La perte d'efficacité a été particulièrement importante lors de la modification de la position 8. De plus l'insertion de résidus Ser, Tyr, Tyr(PO₃H₂) ou Tyr(SO₃H₂) a maintenu cette perte d'activité intrinsèque. Le remplacement des résidus Lys⁹ et Glu¹⁰ par une Ala entraîne aussi une baisse importante de l'activité contractile de l'ET-1. Cette modification du segment chargé, qui est impliqué dans le premier tour d'hélice, agit probablement en déstabilisant l'arrangement spatial du C-terminal en coude β qui serait l'élément clé de l'activation du récepteur ET_B. Seule l'introduction à la position 10 de groupements portant un groupement hydroxyle ou carboxylique rétablit tant la puissance, que la capacité contractile de l'ET-1 sur le parenchyme pulmonaire de cobaye. La présence d'un atome d'oxygène pouvant former un lien hydrogène semble donc favorable à la position 10. Ce type d'interaction pourrait jouer un rôle dans la stabilisation du complexe ligand-récepteur, expliquant ainsi que le retrait des groupements carboxyliques aux positions 8 ou 10 entraînerait une perte d'efficacité lors de la contraction des tissus.

Ces résultats sont cohérents avec ceux de Takai et collaborateurs (1992), qui ont synthétisé des analogues linéaires des fragments 8-21. Selon cette étude, le remplacement de l'Asp⁸ par une Ala dans l'analogue [Ala^{11,15}]ET-1 (8-21) entraîne une perte d'affinité importante (83 pM et 5 nM). De plus, à partir d'analogues de l'ET-1, Miasiro et son équipe (1995) avaient suggéré l'importance de Glu¹⁰ pour l'activation du récepteur ET_B.

L'insertion d'une Ala à la position 9 affecte l'activité biologique de l'ET-1 sur les préparations pulmonaires. Ces résultats sont, en fait, inattendus puisque cette position, qui

est naturellement occupée par une Lys dans l'ET-1, est occupée par une Glu dans la SRTX-c. De plus, le remplacement de la Lys⁹ par une Ala dans l'analogue Suc[Ala^{11,15}]ET-1 (9-21) a eu pour effet d'améliorer l'affinité du peptide pour le récepteur ET_B (Takai *et al.*, 1992). L'introduction d'une Ala à la position 9 semble donc affecter davantage la capacité d'activation de l'ET-1 plutôt que l'affinité. En fait, puisque l'introduction de résidus Ala dans le segment chargé entraîne une perte importante de l'activité contractile de l'ET-1, ce segment pourrait jouer un rôle dans le processus d'activation du récepteur. Et puisque le segment C-terminal semble être le segment minimum pour induire cette activation, nous proposons que ce segment agisse en stabilisant la conformation du segment terminal plutôt que d'agir directement au niveau du récepteur.

Puisque plusieurs fragments de différentes longueurs avaient déjà été identifiés comme antagonistes et même comme agonistes du récepteur ET_B, il est surprenant que tous les analogues des fragments 8-21 et 9-21 soient complètement inactifs. D'ailleurs, l'IRL1620, un agoniste spécifique du récepteur ET_B, quasi équipotent à l'ET-1 et à l'ET-3, est formé du segment 8-21 de l'ET-1. Cependant, celui-ci possède plusieurs modifications de la chaîne primaire du fragment pouvant expliquer la différence d'activité biologique. En effet, les Cys 11 et 15, de même que la Lys⁹, ont été remplacés par des Ala et un Glu respectivement. De plus, cet analogue porte à son extrémité N-terminale un groupement succinimide (Takai *et al.*, 1992). Ces modifications pourraient expliquer la différence d'activité biologique obtenue entre les analogues du fragment 8-21 et ceux obtenus avec l'IRL1620. D'abord, il est connu depuis longtemps que la présence des liens disulfures de l'ET-1 n'est pas essentiels pour l'activation du récepteur ET_B (Saeki *et al.*, 1991). En fait, plusieurs analogues linéaires de l'ET-1, ou de fragments de celle-ci, ont montré des propriétés pharmacologiques intéressantes sur différentes préparations riches en récepteurs ET_B (Saeki *et al.*, 1992; Takai *et al.*, 1992; Hey *et al.*, 1993; Forget *et al.*, 1996; Hewage *et al.*, 1998; Galoppini *et al.*, 1999). Certains de ces auteurs ont même montré que la cyclisation de fragments du segment C-terminal de l'ET-1 avait pour effet de diminuer l'affinité et/ou l'activité biologique de ceux-ci sur le récepteur ET_B (Hey *et al.*, 1993; Forget *et al.*, 1996). De plus l'insertion d'un groupement succinimide,

comprenant deux carbonyles, en position N-terminale, a pour effet d'améliorer l'affinité des analogues linéaires du segment 8-21 (Takai *et al.*, 1992). Finalement, cette étude suggère également que le remplacement de la Lys⁹ par une Glu entraînerait l'augmentation de l'affinité de l'analogue pour le récepteur ET_B, mais aussi améliorerait grandement la sélectivité de celui-ci envers ce récepteur.

De la série d'analogues du fragment 9-21, la plupart se sont également avérés, à toutes fins utiles, inactifs sur les préparations pulmonaires. Ces résultats font donc des fragments [lys⁹]ET-1 (9-21) et N-Ac ET-1 (9-21) les premiers agonistes présentant une sélectivité accrue pour le récepteur ET_A. Bien qu'ils soient faiblement actifs sur les préparations d'aorte de rat, ces analogues représentent un point de départ pour des travaux subséquents afin de produire de nouveaux outils pharmacologiques qui seront utiles pour l'étude des récepteurs de l'ET.

En ce sens, plusieurs analogues du fragment 9-21 ont été produits. De ceux-ci, seuls les analogues modifiés aux positions 13 et 16 ont montré une certaine activité biologique sur les récepteurs ET_B. En effet, l'insertion de groupes méthyles sur le groupement phénol de la Tyr, de même que sur l'azote-3 du noyau imidazole, entraîne une augmentation de l'activité biologique du fragment 9-21 cyclisé. Ces résultats suggèrent, bien que la Tyr ait un pKa de 10,2, que lorsque l'on bloque l'ionisation de celle-ci, par l'introduction d'un groupement méthyle par exemple, on obtient de meilleurs agonistes ET_B. De plus, lors de l'insertion d'une Ser, un acide aminé hydroxylé, ou d'une Phe, possédant un noyau aromatique, on obtient des analogues équipotents à [lys⁹, Tyr(OMe)¹³]ET-1 (9-21). Ces résultats sont cohérents avec notre hypothèse selon laquelle, à l'intérieur du fragment 9-21, le pKa de la Tyr serait abaissé, un état qui semble défavoriser l'activation du récepteur ET_B. Une étude de la portion C-terminale de l'endothéline-1, menée par l'équipe de Cody (1991) avec des octapeptides analogues du segment C-terminal, avait d'ailleurs suggéré que la portion médiane de la molécule interagirait avec le récepteur, *via* une poche hydrophobe, puisque le retrait de la charge positive de His¹⁶ favoriserait la liaison au récepteur. Huggins, Pelton et Miller (1993) ont aussi suggéré l'existence de ce type d'interactions entre l'ET et ses récepteurs pour expliquer la stabilité de la liaison. De

plus, d'autres travaux ont montré que la tyrosine en position 13 ne semble pas importante pour l'activation du récepteur ET_B (Forget *et al.*, 1996; Maggi *et al.*, 1990, Saeki *et al.*, 1992). Les résultats des études pharmacologiques, menées avec les analogues modifiés aux positions 13 et 16, apparaissent être en accord avec cette hypothèse. Ainsi, la charge positive portée par l'histidine-16 de même que le tyrosinate pourraient nuire à l'interaction entre le fragment 9-21 et le récepteur ET_B en abaissant l'hydrophobicité de ce segment..

Cependant, ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus au cours de mes études pour l'obtention du grade de maîtrise. Lors de ces travaux, nous avons tenté de mesurer l'impact d'une augmentation ou d'une diminution du niveau d'hydrophobicité du segment médian de l'ET-1. En fait, des acides aminés plus ou moins hydrophobes, voire carrément hydrophiles, ont été introduits avant ou après l'espaceur aliphatique dans l'analogue [[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1. Les résultats alors obtenus ont suggéré qu'il n'y a pas de lien direct entre l'hydrophobicité, estimée à partir de l'échelle publiée par Parker et coll. (1986), et l'activité biologique des peptides sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye. L'introduction d'une chaîne aliphatique, telle que l'acide aminocaproïque (Aca), amène une grande mobilité de la chaîne peptidique au niveau C-terminal (Boulanger *et al.*, 1999). Celle-ci pourrait réduire l'impact causé par l'introduction de résidus hydrophiles dans le segment C-terminal et ainsi expliquer les résultats obtenus.

Les résultats entourant l'importance relative de l'His¹⁶ dans le processus de liaison et d'activation du récepteur ET_B sont plus controversés. En effet, les travaux de Forget et coll. (1996) suggèrent que ce résidu favoriserait l'activité contractile, dans le parenchyme pulmonaire de cobaye, d'analogues tronqués et cyclisés entre les positions 3 et 11. Alors qu'à l'intérieur des mêmes analogues, mais cette fois sous leur forme linéaire, l'His¹⁶ défavoriserait l'activation des récepteurs ET_B. Aussi, le remplacement de cet acide aminé dans l'analogue N-Ac-[Ala^{11,15}]ET-1 (10-21) par une Ala, n'avait pas montré de perte importante d'activité biologique, alors que l'inversion de la chiralité de celui-ci la modifie de façon importante (Saeki *et al.*, 1992). De plus, le segment minimal identifié pour

maintenir une certaine activité sur le récepteur ET_B est formé du segment 16-21 (Maggi *et al.*, 1990). Et finalement, à partir de l'étude du segment 16-21, Doherty et collaborateurs (1991) ont mis en évidence l'importance de cet acide aminé basique. Ces résultats suggèrent que cette position, bien que non essentielle, aurait un rôle secondaire dans l'activation du récepteur ET_B. Nous proposons que celle-ci pourrait agir en stabilisant l'arrangement tridimensionnel de certains analogues, expliquant ainsi que l'orientation spatiale de ce résidu soit importante, et que la séquence primaire, de même que la présence d'un lien disulfure, affectent grandement les résultats pharmacologiques obtenus lors de la modification de cette position. La charge positive ainsi occupée à la stabilisation de la structure du segment C-terminal, ne nuirait pas aux interactions hydrophobes entre le peptide et le récepteur.

L'insertion d'un groupement formyle sur le noyau indole de Trp²¹ conduit également à une augmentation de la capacité contractile des analogues du fragment 9-21 sur le parenchyme pulmonaire de cobaye. Le même phénomène avait été observé lors des travaux de Forget et coll. (1996), qui avaient décrit que l'insertion de ce groupement sur l'indole du Trp avait pour effet d'augmenter la puissance relative d'analogues linéaires de l'ET-1 d'un facteur supérieur à 100 sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye. Cependant, cette même modification, à l'intérieur d'analogues cyclisés n'avait que peu ou pas d'effet. Par la suite, des études de RMN sur ces analogues ont montré que ce groupement avait pour effet d'induire l'allongement de la structure globale du peptide terminé par le repliement du segment C-terminal (Boulanger *et al.*, 1999). Les auteurs ont aussi montré un lien direct entre la présence de ce repliement en coude β et l'activité biologique des analogues linéaires sur le récepteur ET_B. Bien qu'aucun pont hydrogène ne soit apparent par RMN, les auteurs suggèrent que cette structure soit stabilisée par l'augmentation de la polarité du noyau indole du Trp²¹, facilitant ainsi son interaction avec l'acide aspartique-18. Cet arrangement spatial permettrait de placer la chaîne latérale indolique dans l'environnement immédiat de la Leu¹⁷ formant ainsi une protubérance pouvant interagir avec une poche hydrophobe tel que proposé par Cody *et al.* (1991) et Huggins, Pelton et Miller (1993).

Cette hypothèse est corroborée, d'une part, par les résultats obtenus de cette étude, mais aussi, par ceux de la littérature. D'abord, le remplacement de Asp¹⁸ par une Gly ou une Asn a complètement inactivé les analogues ET-1 (9-21), N-Ac-ET-1 (9-21) et [Lys⁹]ET-1 (9-21). Le retrait de la charge négative ou l'augmentation de la flexibilité, tel qu'observé par l'introduction d'une Gly, entraîne une perte de la capacité d'activation du fragment 9-21 sur le parenchyme pulmonaire. De plus, les résultats obtenus de l'étude pharmacologique des analogues [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹] (3-11)-Aca-(18-21) ET-1 et [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹] (3-11)-Aca-(19-21) ET-1 montrent une perte de puissance relative d'un facteur 7 lors du retrait de Asp¹⁸ (Forget *et al.*, 1996). De plus, l'inversion de la chiralité de Asp¹⁸ dans un analogue linéaire et acétylé en N-terminal du fragment 10-21 entraîne une importante perte d'activité biologique. En fait, cette perte était supérieure à celle observée lors du remplacement de cet acide aminé par une Ala (Saeki *et al.*, 1992). Il apparaît donc que le résidu Asp du segment C-terminal n'est pas essentiel à l'activation du récepteur ET_B, mais qu'il contribue à l'activité biologique lorsqu'il est correctement aligné dans l'espace tridimensionnel. Ainsi, dans des analogues linéaires, l'Asp¹⁸ pourrait avoir un rôle dans la stabilisation de l'arrangement tridimensionnel de ce segment tel que suggéré par Boulanger et collaborateurs (1999).

Un arrangement tridimensionnel plutôt allongé de la chaîne peptidique, terminé par un repliement permettant de placer le Trp²¹ dans un environnement hautement hydrophobe, semble être l'élément clé de l'activation du récepteur ET_B. À ce sujet, les articles de Forget et coll. (1996) et de Boulanger et coll. (1999) fournissent des indices majeurs. De plus, les analogues peptidiques sélectifs pour le récepteur ET_B sont souvent formés de fragments linéaires plus ou moins longs du segment C-terminal (Maggi *et al.*, 1990; Saeki *et al.*, 1992; Takai *et al.*, 1992; Miasiro *et al.*, 1995). Aussi, l'inactivité des analogues linéaires du fragment 9-21 semble donc, à prime abord, surprenante. En effet, l'introduction aux positions 11 et 15 d'Ala ou de Cys(Acm) ne conduit pas à une augmentation de la capacité contractile du fragment 9-21 sur le parenchyme pulmonaire de cobaye. Or, parmi les analogues des fragments 8-21, 9-21 et 10-21, ce sont ces derniers qui ont montré la plus forte activité biologique sur le récepteur ET_B. Le rôle joué par la Lys⁹ semble donc important dans le processus de sélectivité des fragments 9-21

pour le récepteur ET_A, puisque cet acide aminé en position N-terminale défavorise l'activation du récepteur ET_B, et ce même dans des analogues linéaires. Ces résultats sont également en accord avec la littérature. En effet, la présence d'une charge positive en position amino-terminale dans des analogues du segment C-terminal semble interférer de façon importante dans le processus d'activation. Les travaux de Takai et coll. (1992) ont montré que l'ajout d'un groupement succinimide en N-terminal des fragments 8-21 avait pour effet d'améliorer l'affinité de ceux-ci pour le récepteur ET_B. Des résultats similaires avaient été observés lors de l'insertion d'un groupement acétyle en N-terminal du fragment linéaire 10-21 (Saeki *et al.*, 1992). Les analogues linéaires formés du fragment 9-21, portant en plus de la charge positive N-terminal, une deuxième charge sur la chaîne latérale de Lys⁹, montrent à quel point un tel arrangement est mal toléré par le récepteur ET_B.

Les résultats que nous avons obtenus des travaux menés sur l'ET-1, dans laquelle l'un ou l'autre ou les deux ponts disulfures ont été allongés, apportent des indices supplémentaires appuyant l'hypothèse selon laquelle le récepteur ET_B accommoderait un ligand de structure plutôt relâchée. D'abord, cette modification de la longueur de l'un ou de l'autre ou des deux ponts disulfures, par l'insertion d'HoCys, affecte davantage la capacité contractile de l'ET-1 sur les préparations d'aorte de rat, que sur les bandelettes de parenchyme pulmonaire de cobaye. L'insertion d'une homocystéine en position 1 entraîne une perte de puissance relative d'un facteur supérieur à 500 sur le récepteur ET_A. Aussi, l'allongement du lien disulfure externe de l'ET-1 mène-t-il au développement d'une sélectivité envers le récepteur ET_B. En effet, l'analogue [HoCys¹]ET-1 est environ 35 fois plus actif sur le parenchyme pulmonaire que sur l'aorte. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par plusieurs équipes qui suggèrent que les ponts disulfures sont essentiels à l'activation du récepteurs ET_A, mais non pour le récepteur ET_B (Kimura *et al.*, 1988; Hirata *et al.*, 1989a; Hirata *et al.*, 1989b; Hirata *et al.*, 1989c; Nakajima *et al.*, 1989b).

Ainsi, il semble que le site de liaison de l'ET sur le récepteur ET_B accommode un ligand de structure allongée ayant un repliement dans son segment C-terminal de façon à former

une protubérance hydrophobe qui agirait *via* une poche hydrophobe. Les résidus Phe¹⁴, Leu¹⁷, Ile²⁰ et Trp²¹ seraient les éléments clés pour la liaison et l'activation de ce récepteur, alors que His¹⁶ et Asp¹⁸ auraient des rôles secondaires dans la stabilisation de la structure secondaire du segment C-terminal afin d'obtenir le bon alignement des pharmacophores. Finalement, la présence de charges tant en position N-terminale, qu'aux positions 13 et 16 d'analogues formés du fragment C-terminal semblent défavoriser l'activation du récepteur ET_B.

19. PTHrP

Le développement de métastases est un processus complexe se déroulant en plusieurs étapes. Chacune de celles-ci dépend d'interactions spécifiques s'établissant entre la cellule cancéreuse et le tissu hôte, dont le résultat est la multiplication de celles-ci. Chacune de ces étapes représente, pour la recherche bio-médicale une cible potentielle pour l'interruption du processus métastatique et l'avancement du cancer. La compréhension de ces interactions est donc primordiale.

Bien que le processus métastatique du cancer de la prostate soit lent, celui-ci aboutit toujours au développement de métastases osseuses, surtout au niveau des grands os plats comme la hanche. Des lésions ostéolytiques sont d'abord observées, mais avec le temps, une croissance osseuse est aussi observée. Puisque l'on retrouve des niveaux élevés de PTHrP, une protéine connue pour stimuler les ostéoclastes, celle-ci semble directement impliquée dans la résorption osseuse observée. Cependant, les mécanismes conduisant au développement anarchique de la matrice osseuse demeurent incompris. Récemment, des travaux menés sur des clavicules de souris ont suggéré l'implication probable des ETs dans ce processus. Selon l'hypothèse avancée par Chirgwin *et al.* (2003), les fragments PTHrP (1-16) et PTHrP (1-23) auraient la capacité de lier et d'activer le récepteur ET_A à la surface des ostéoblastes et de générer ainsi la croissance osseuse (Chirgwin *et al.*, 2003). Ce croisement entre les voies du PTHrP et des ETs viendrait ainsi expliquer le paradoxe entourant le développement de la matrice osseuse, et ce, malgré les niveaux élevés de PTHrP.

Dans la poursuite de notre objectif, c'est-à-dire l'identification des pharmacophores requis pour la liaison et l'activation du récepteur ET_A, l'étude des fragments PTHrP 1-16 et 1-23 avait un intérêt important. Ainsi, le PTHrP (1-16) a été obtenu commercialement, alors que le PTHrP (1-23) a été synthétisé dans nos laboratoires.

19.1. Stratégie et résultats de synthèse peptidique

Puisque le PTHrP (1-23) est un peptide linéaire ne comportant aucune difficulté particulière, nous avons procédé par l'approche utilisant la chimie Fmoc telle que décrite précédemment. Les acides aminés portant des groupements fonctionnels sur leur chaîne latérale ont été introduits dans la séquence peptidique avec des groupes protecteurs, en plus du Fmoc porté par leur amine α . Ainsi, nous avons pu minimiser l'incidence de réactions secondaires, et nous avons obtenu du matériel de qualité qui a pu être directement purifié par CLHP préparative.

Les analyses effectuées par CLHP analytique de même que par spectrométrie de masse confirment l'obtention du peptide désiré avec une bonne pureté. Nous avons effectué les mêmes analyses sur le PTHrP (1-16) obtenu du commerce et nous avons obtenu les résultats attendus.

19.2. Essais pharmacologiques et essais de liaison

Contrairement à ce qui était attendu, les deux fragments se sont avérés incapables d'engendrer la contraction des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye, mais aussi des anneaux d'aorte thoracique de rat. De plus, les courbes concentration-réponse de l'ET-1 effectuées en présence de 1 μ M de PTHrP (1-16) ou de PTHrP (1-23) ne montrent aucune différence significative avec celle effectuée avec l'ET-1 seule. Ces peptides ne possèdent donc aucune activité agoniste ou antagoniste sur les récepteurs ET_A et ET_B.

Les essais de compétition entre l'['¹²⁵I] ET-1 (0,1 nM) et des concentrations croissantes de PTHrP (1-16) et PTHrP (1-23) montrent également que ces peptides ne présentent aucune affinité pour les récepteurs de l'ET. En effet, ceux-ci sont incapables de déplacer l'ET-1 radiomarquée de son site de liaison tant sur le récepteur ET_A que le récepteur ET_B et ce malgré des concentrations plus de dix mille fois supérieures à celle de l'ET-1.

L'équipe de Chirgwin explique leurs résultats avec une certaine homologie de séquences entre l'ET-1 et les fragments PTHrP. En effet, le segment 6 à 9 de l'ET-1 comprenant les acides aminés Leu-Met-Asp-Lys est retrouvé, en partie, entre les positions 8 à 11 du PTHrP qui comprend les résidus Leu-His-Asp-Lys. Cependant, depuis la découverte de l'ET-1, plusieurs pharmacophores des récepteurs ET_A et ET_B ont été identifiés. Ces pharmacophores ne se retrouvent pas dans les fragments PTHrP. D'abord, mis à part l'analogue [Ala^{11,15}, Trp(For)]ET-1 (9-21), aucun analogue linéaire de l'ET-1 n'a montré d'affinité pour le récepteur ET_A. Ensuite, le segment C-terminal hydrophobe terminé par le résidu Trp, a été identifié comme étant un élément clé pour l'activation des récepteurs de l'ET. De plus, nos résultats montrent que le segment chargé retrouvé dans la partie médiane de l'ET-1, mais surtout Glu¹⁰, est essentiel à l'activation du récepteur ET_A. Ces éléments structuraux ne sont pas contenus dans les segments 1-16 et 1-23 du PTHrP, ce qui explique que ceux-ci ne soient pas reconnus par les récepteurs de l'ET.

Les résultats obtenus sur les clavicules de souris en culture sont probablement le résultat d'un effet indirect des fragments PTHrP qui pourraient stimuler la libération d'ET-1 par le tissu et ainsi stimuler le récepteur ET_A pour engendrer la croissance osseuse. Nous ne pouvons aussi exclure la possibilité de l'implication d'un récepteur non caractérisé de la voie des ETs, qui lui pourrait être stimulé par les fragments PTHrP.

Conclusions

Depuis sa découverte en 1988, par Yanagisawa et coll., l'endothéline a fait l'objet d'une multitude de travaux qui, malgré leur portée, n'ont pas encore complètement élucidé le mode d'action de ce peptide à l'échelle moléculaire. L'intérêt pour ce peptide continue donc à se manifester d'autant plus que ce médiateur chimique est maintenant associé à plusieurs pathologies des systèmes cardiovasculaire, rénal et pulmonaire. Par conséquent, la compréhension des mécanismes permettant au peptide d'interagir avec ses récepteurs demeure un objectif essentiel au développement d'agents pharmacologiques pour l'étude de la voie de l'ET.

Dans le cadre de notre étude, nous avons développé plusieurs séries d'analogues dans le but de déterminer l'implication du segment chargé et de la portion C-terminale de l'ET-1 dans les mécanismes d'activation des récepteurs, mais aussi dans le processus de sélectivité de ceux-ci. Ces études nous ont permis d'identifier les premiers analogues à structure réduite montrant une sélectivité envers le récepteur ET_A. En effet, bien que les analogues [lys⁹]ET-1 (9-21), N-Ac-ET-1(9-21) et [Ala^{11,15}, Trp(For)²¹]ET-1 (9-21), se sont montrés modérément puissants sur des préparations d'aorte de rat, ils se sont avérés inactifs sur des préparations de parenchyme pulmonaire de cobaye. Ces résultats font conséquemment de ceux-ci les premiers agonistes du récepteur ET_A, infirmant ainsi le concept faisant consensus, à savoir que la chaîne complète de l'ET-1 est requise pour activer ce récepteur. Donc contrairement à ce qui a été publié dans la littérature, ces résultats suggèrent que tous les pharmacophores du récepteur ET_A sont contenus dans la portion 9-21 de l'ET-1. En fait, nos résultats indiquent que le segment N-terminal agirait plutôt dans le processus de liaison du peptide, puisque les analogues de fragment 9-21 ne possèdent qu'une faible affinité pour ce récepteur (Langlois *et al.*, 2003).

Les études de structure-fonction menées sur l'ET-1 et sur des analogues du fragment C-terminal ont montré que la charge négative portée par l'acide glutamique à la position 10 serait un élément clé pour la liaison et l'activation du récepteur ET_A. De plus, nous proposons que le fragment 9-21 active ce récepteur via un mécanisme moléculaire

similaire à celui retrouvé au site catalytique des sérines protéases. En effet, le groupement carboxylique terminal, le noyau imidazole de l'histidine-16 et le groupement phénolique de la Tyr¹³ seraient importants pour le processus d'activation puisque leur retrait entraîne une perte de l'activité contractile des analogues du fragment 9-21 sur les préparations d'aorte de rat. Ces groupements fonctionnels pourraient former un relais de charge permettant la formation d'un ion tyrosinate qui lui pourrait interagir directement au niveau du récepteur ET_A. Toutefois, un tel mécanisme d'activation n'est possible que si le peptide possède une structure bien organisée et compacte. Les résultats obtenus des études de dichroïsme circulaire suggèrent effectivement l'adoption d'un arrangement tridimensionnel en coude ou en hélice irrégulière par le segment C-terminal, tel qu'il avait été suggéré par l'équipe de Wallace suite à des études par cristallographie.

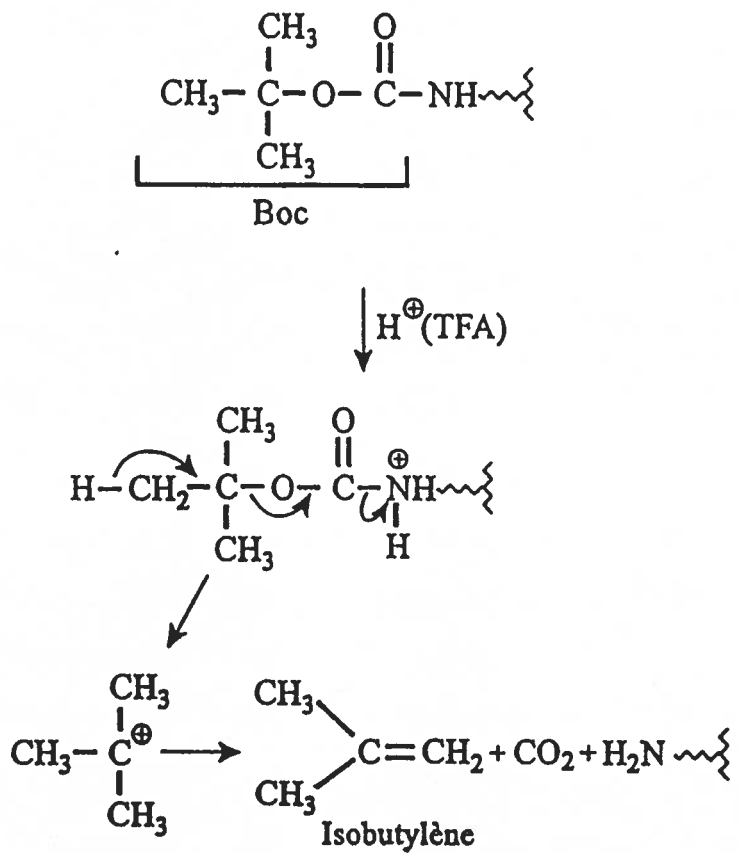
La lysine-9 de son côté interviendrait dans le processus de sélectivité des récepteurs. En effet, elle participerait à l'activation du récepteur ET_A et sa présence en position N-terminale des fragments 9-21 serait un élément défavorable pour l'activation du récepteur ET_B. Donc, à la lumière de nos résultats, la présence des charges positives à l'extrémité N-terminale jumelées à celles portées par les chaînes latérales de la Lys⁹ et de l'His¹⁶ nuiraient à l'activation de ce récepteur. De plus, comme montré par le remplacement de la tyrosine-13 au moyen d'un acide aminé non ionisable, une modification qui a entraîné une augmentation de l'activité biologique du fragment 9-21 sur les préparations pulmonaires, nous croyons que l'arrangement moléculaire menant à la formation du tyrosinate est unique pour le récepteur ET_A. De plus, nos travaux convergent vers la conclusion que le récepteur ET_B s'accommoderait d'un ligand à structure allongée se terminant par un repliement en coude qui placerait le noyau indole du Trp²¹ dans un environnement hautement hydrophobe.

Pour terminer, nous avons testé les fragments PTHrP (1-16) et PTHrP (1-23) sur les préparations d'aorte de rat et de parenchyme pulmonaire de cobaye. Des travaux récents avaient proposé que ceux-ci agiraient comme agonistes du récepteur ET_A. Selon cette hypothèse, ces fragments du PTHrP stimuleraient les ostéoblastes pour ainsi générer la croissance osseuse observée lors du développement de métastases suite au cancer de la

prostate. Nos résultats ont montré que le PTHrP (1-16) et le PTHrP (1-23) ne possèdent pas la capacité de lier ni d'activer tant le récepteur ET_A, que le récepteur ET_B. L'effet rapporté serait donc relayé par le biais d'une voie indirecte des récepteurs de l'ET, ou encore de récepteurs non caractérisés.

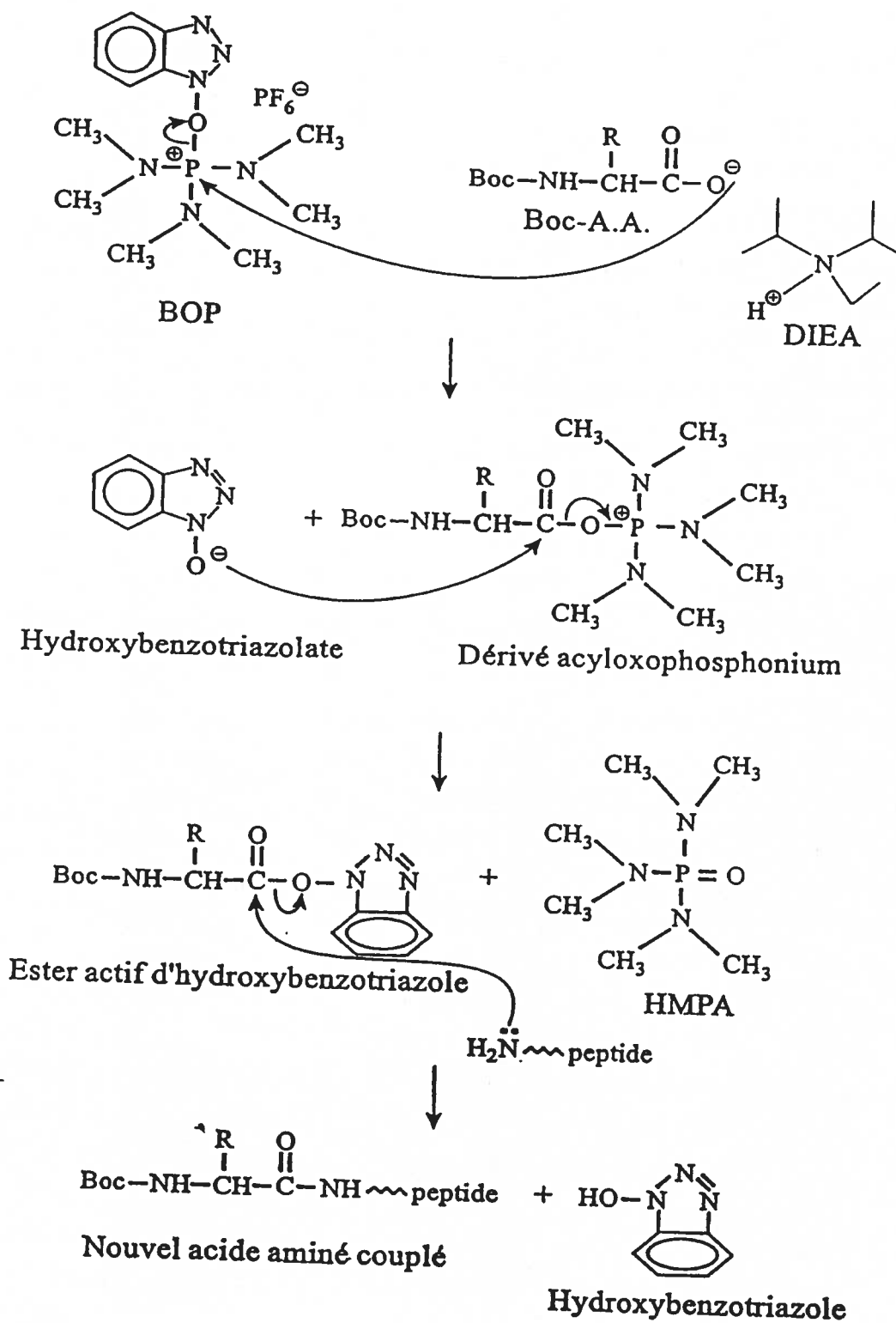
Appendice A

Déprotection de l'amine α en chimie t-Boc



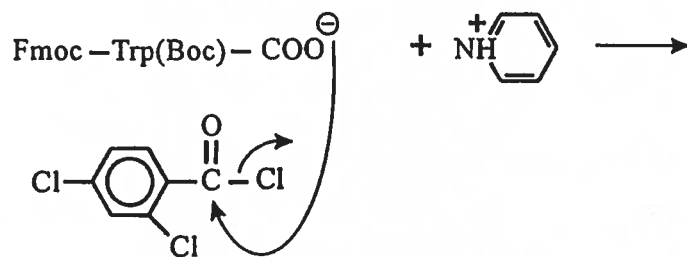
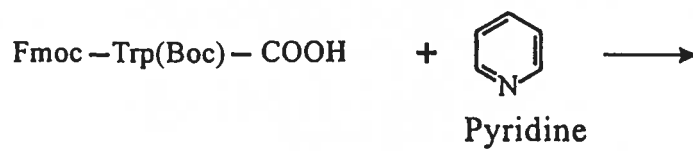
Appendice B

Couplage d'un acide aminé en chimie t-Boc

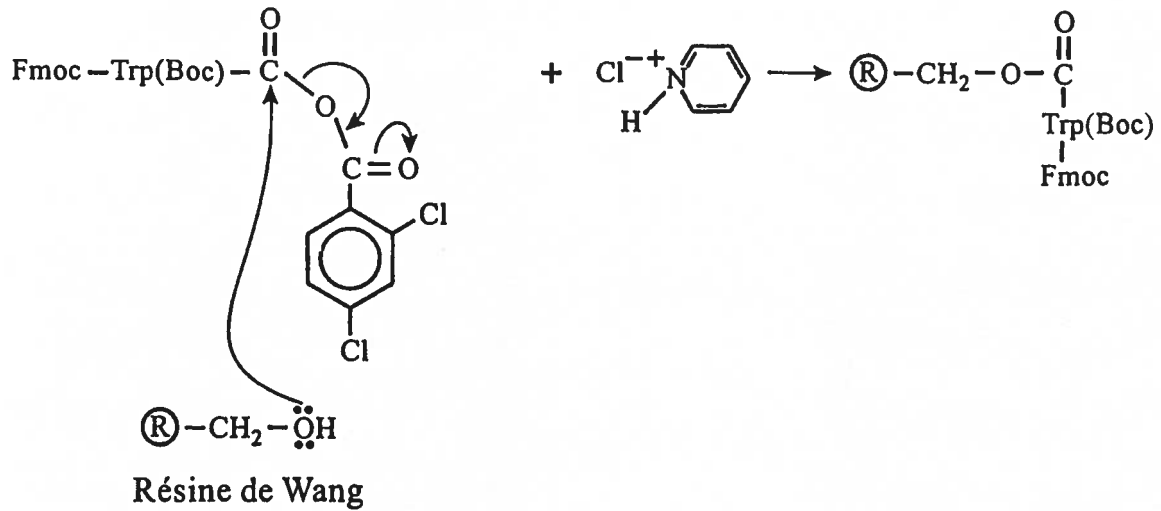


Appendice C

Couplage de l'acide aminé en C-terminal à la résine de Wang

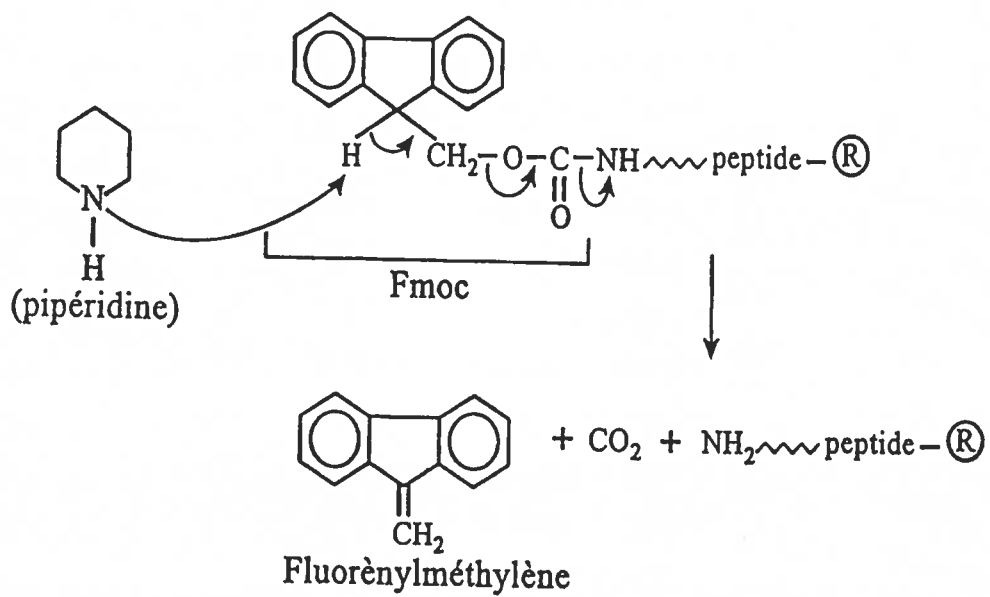


Chlorure de 2,6-dichlorobenzoyle



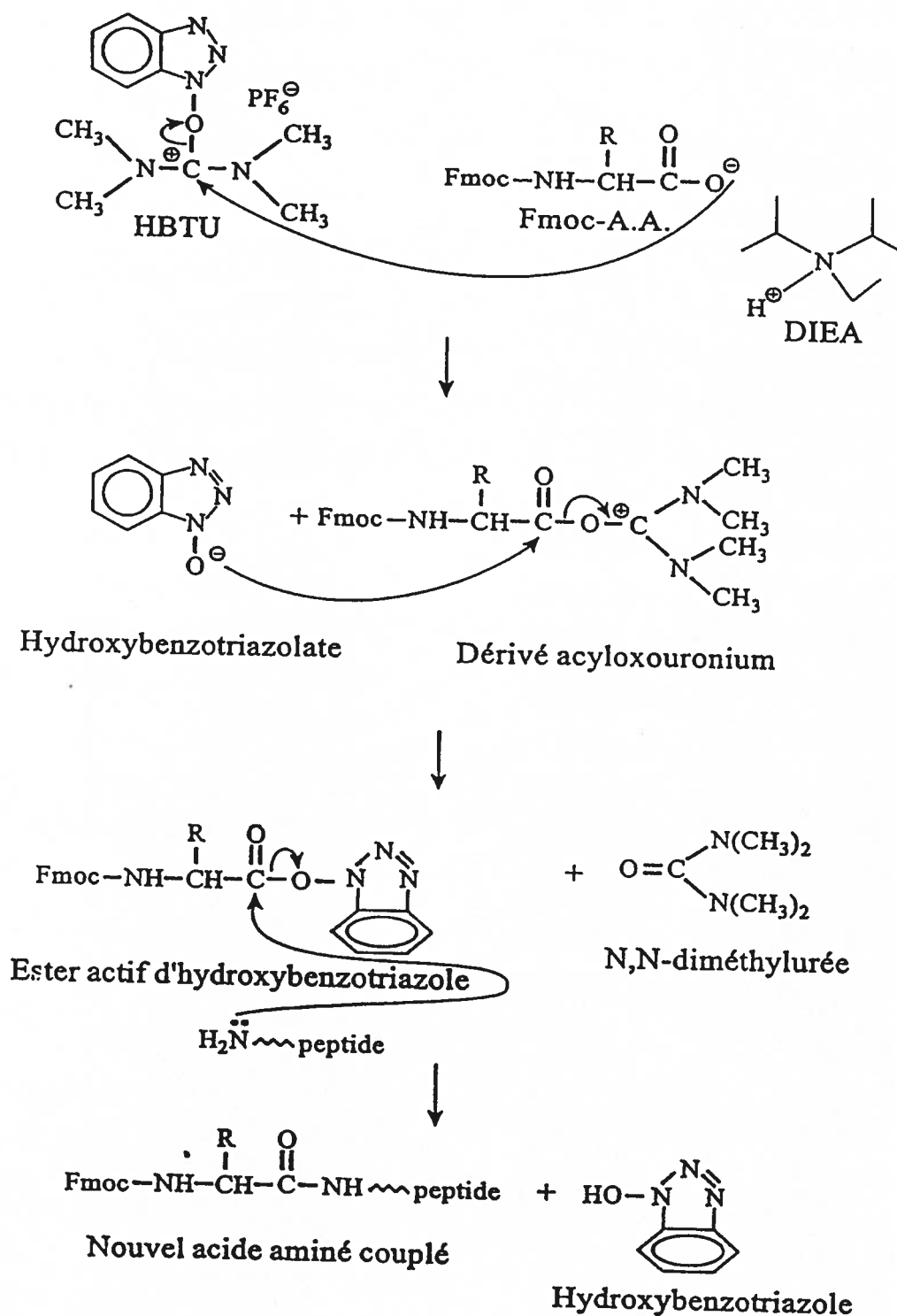
Appendice D

Déprotection de l'amine α en chimie Fmoc



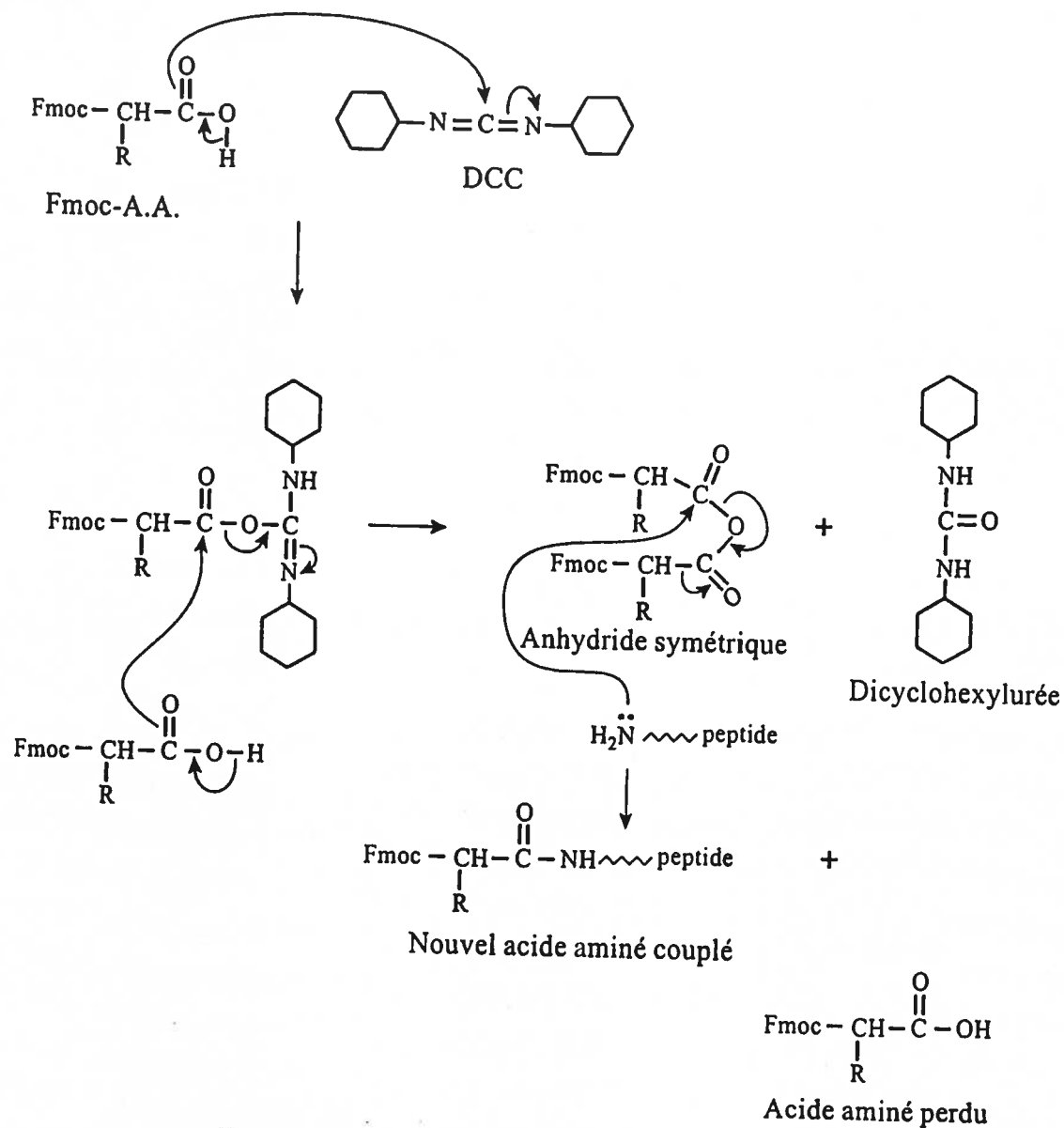
Appendice E

Couplage d'un acide aminé en chimie Fmoc



Appendice F

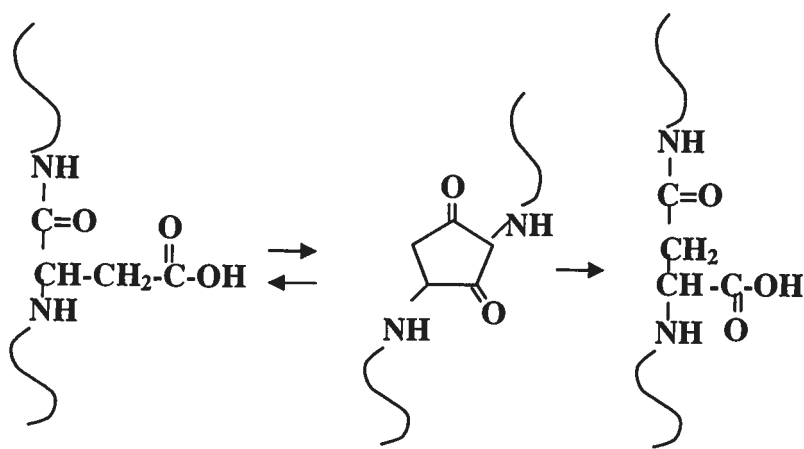
Formation de l'anhydride symétrique et couplage de Fmoc-Cys(Trt)-OH



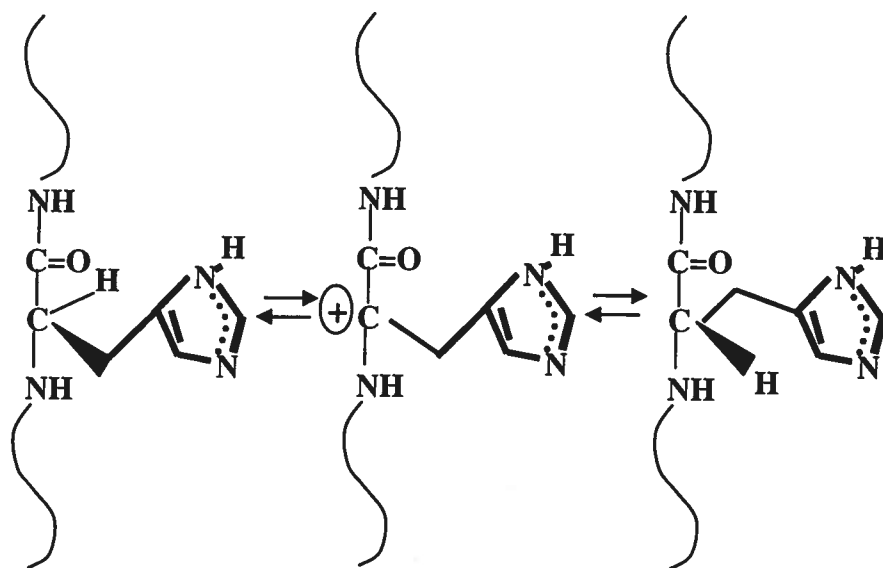
Appendice G

Mécanismes de formation d'un acide β -aspartique (a) et de la racémisation de l'histidine (b)

a)

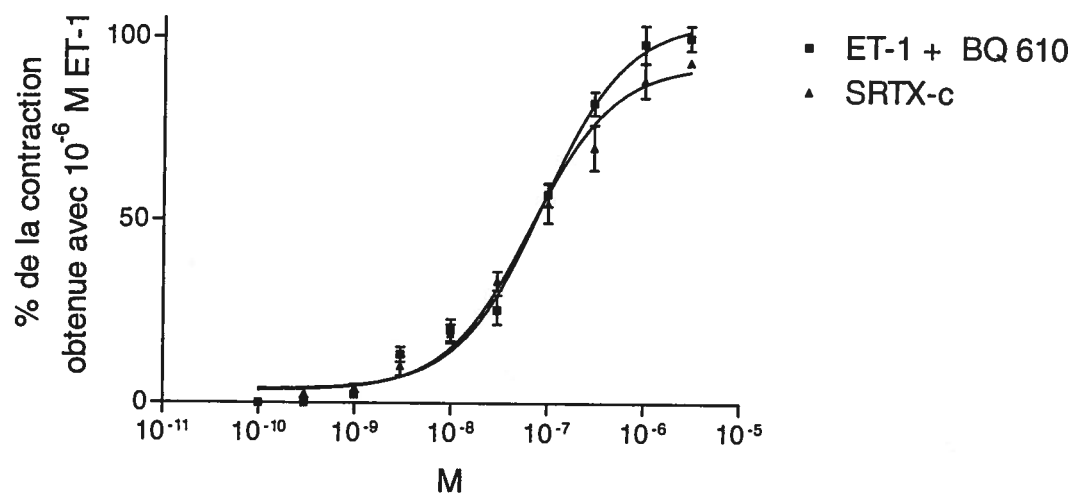


b)



Appendice H

Courbe concentration-réponse de l'ET-1, en présence de BQ610 (0,1 μ M) et de la SRTX-c



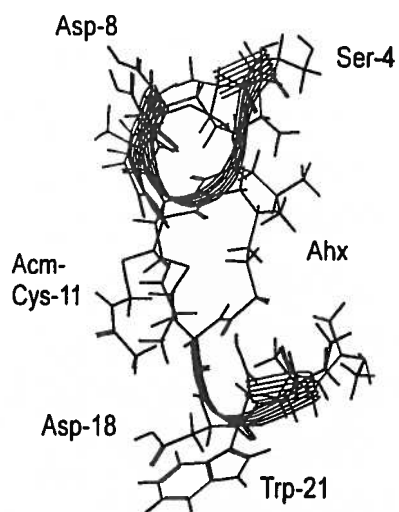
Appendice I

Étude de modélisation moléculaire des analogues

[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1 et

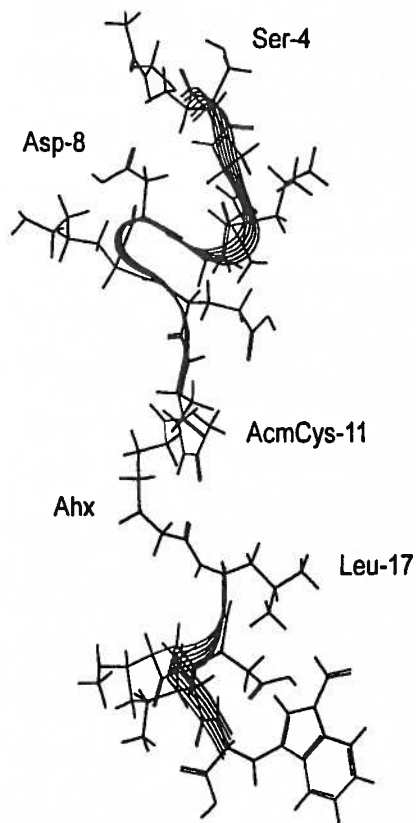
[Cys(Acm)^{3,11}](3-11)-Aca-(17-21)ET-1

A



[Cys(Acm)^{3,11}](3-11)-Aca-(17-21)ET-1

B

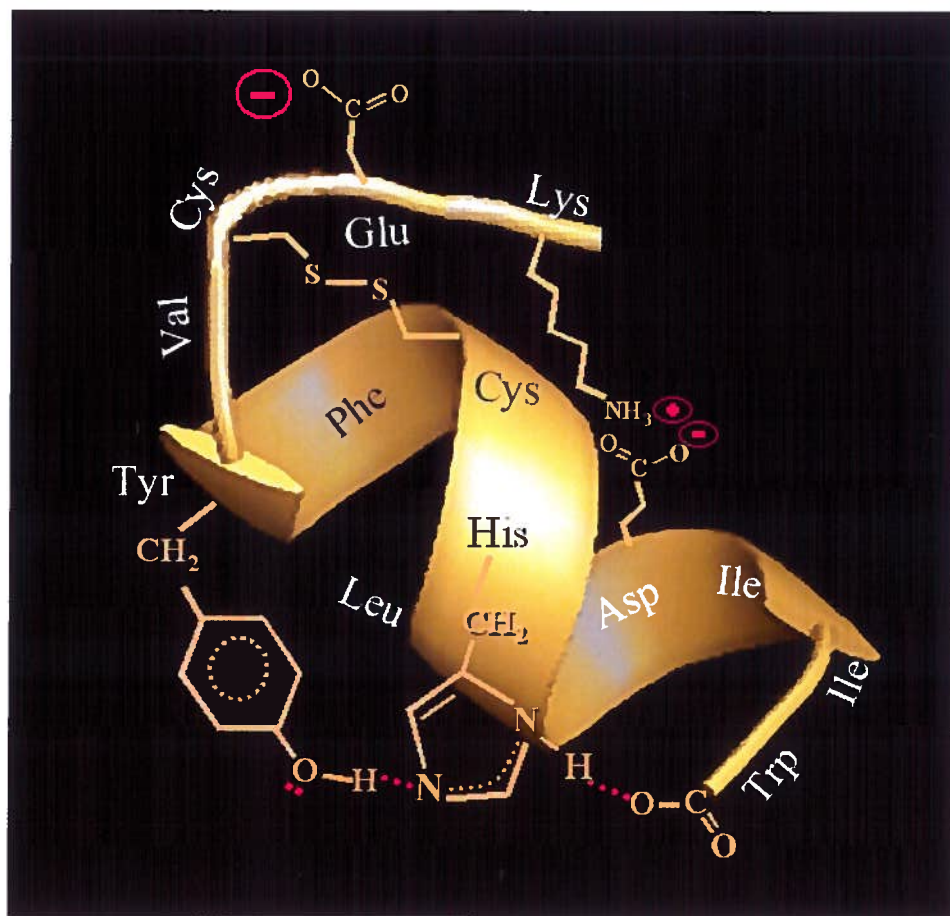


[Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹](3-11)-Aca-(17-21)ET-1

(Boulanger *et al.*, 1999)

Appendice J

Modèle montrant les éléments importants de l'analogue [lys⁹]ET-1 (9-21) pour la liaison et l'activation du récepteur ET_A élaboré à partir des résultats obtenus.



Références

ABASSI, Z.A., J.E. Tate, E. Golomb et H.R. Keiser. 1992. "Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin". Hypertension, vol. 20, p. 89-95.

ABE, Y., Y. Kasuya, M. Kudo, K. Yamashita, K. Goto, T. Masaki et Y. Takuwa. 1991. "Endothelin-1-induced phosphorylation of the 20-kDa myosin light chain and caldesmon in porcine coronary artery smooth muscle". Japanese Journal of Pharmacology, vol. 57, p. 431-435.

ACHBAROU, A., S. Kaiser, G. Tremblay, L. G. Ste-Marie, P. Brodt, D. Goltzman et S. A. Rabbani. 1994. "Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo". Cancer Research, vol. 54, p. 2372-2377.

ADACHI, M., Y. Y. Yang, A. Trzeciak, Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1992. "Identification of a domain of ET-A receptor required for ligand binding". FEBS Letters, vol. 311, p. 179-183.

ADACHI, M., Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1994a. "Identification of a ligand-binding site of the human endothelin-A receptor and specific regions required for ligand selectivity". European Journal of Biochemistry, vol. 220, p. 37-43.

ADACHI, M., Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1994b. "Identification of a region of the human endothelin ET-A receptor required for interaction with bosentan". European Journal of Pharmacology, vol. 269, p. 225-234.

ADAM, L. P., L. Milio, B. Brengle et D. R. Hathaway. 1990. "Myosin light chain and caldesmon phosphorylation in arterial muscle stimulated with endothelin-1". Journal of Molecular and Cellular Cardiology, vol. 22, p. 1017-1023.

AKIYAMA, N., O. Hiraoka, Y. Fujii, H. Terashima, M. Satoh, K. Wada et Y. Furuichi. 1992. "Biotin derivatives of endothelin: utilization for affinity purification of endothelin receptor". Protein Expression and Purification, vol. 3, p. 427-433.

ANDERSEN, N. H., C. P. Chen, T. M. Marschner, S. R. Krystek Jr et D. A. Bassolino. 1992. "Conformational isomerism of endothelin in acidic aqueous media: a quantitative NOESY analysis". Biochemistry, vol. 31, p. 1280-1295.

ARAI, H., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo et S. Nakanishi. 1990. "Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor". Nature, vol. 348, p. 730-732.

ARAI, H., K. Nakao, K. Takaya, K. Hosoda, Y. Ogawa, S. Nakanishi et H. Imura. 1993. "The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment". Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 3463-3470.

ARAKI, S., Y. Kawahara, K. Kariya, M. Sunako, H. Fukuzaki et Y. Takai. 1989. "Stimulation of phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphoinositides by endothelin in cultured rabbit aortic smooth muscle cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 159, p. 1072-1079.

ASTLES, P. C., C. Brealey, T. J. Brown, V. Facchini, C. Handscombe, N. V. Harris, C. McCarthy, I. M. McLay, B. Porter, A. G. Roach, C. Sargent, C. Smith et R. J. Walsh. 1998a. "Selective endothelin A receptor antagonists. 3. Discovery and structure-activity relationships of a series of 4-phenoxybutanoic acid derivatives". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 41, p. 2732-2744.

ASTLES, P. C., T. J. Brown, F. Halley, C. M. Handscombe, N. V. Harris, C. McCarthy, I. M. McLay, P. Lockey, T. Majid, B. Porter, A. G. Roach, C. Smith et R. Walsh. 1998b. "Selective endothelin A receptor antagonists. 4. Discovery and structure-activity relationships of stilbene acid and alcohol derivatives". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 41, p. 2745-2753.

ASTLES, P. C., T. J. Brown, F. Halley, C. M. Handscombe, N. V. Harris, T. N. Majid, C. McCarthy, I. M. McLay, A. Morley, B. Porter, A. G. Roach, C. Sargent, C. Smith et R. J. Walsh. 2000. "Selective ET-A antagonists. 5. Discovery and structure-activity relationships of phenoxyphenylacetic acid derivatives". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 43, p. 900-910.

- AUMELAS, A., L. Chiche, E. Mahe, D. Le-Nguyen, P. Sizun, P. Berthault et B. Perly. 1991. "Determination of the structure of [Nle7]-endothelin by H1 NMR". International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 37, p. 315-324.
- AUMELAS, A., L. Chiche, S. Kubo, N. Chino, H. Tamaoki et Y. Kobayashi. 1995. "[Lys(-2)-Arg(-1)]endothelin-1 solution structure by two-dimensional 1H-NMR: possible involvement of electrostatic interactions in native disulfide bridge formation and in biological activity decrease". Biochemistry, vol. 34, p. 4546-4561.
- AUMELAS, A., S. Kubo, N. Chino, L. Chiche, E. Forest, C. Roumestand et Y. Kobayashi. 1998. "Formation of native disulfide bonds in endothelin-1. Structural evidence for the involvement of a highly specific salt bridge between the prosequence and the endothelin-1 sequence". Biochemistry, vol. 37, p. 5220-5230.
- AUMELAS, A., L. Chiche, S. Kubo, N. Chino, T. X. Watanabe et Y. Kobayashi. 1999. "The chimeric peptide". European Journal of Biochemistry, vol. 266, p. 977-985.
- BADR, K. F., K. A. Munger, M. Sugiura, R. M. Snajdar, M. Schwartzberg et T. Inagami. 1989. "High and low affinity binding sites for endothelin on cultured rat glomerular mesangial cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 161, p. 776-781.
- BARBER, D. A., S. R. Michener, S. C. Ziesmer et V. M. Miller. 1996. "Chronic increases in blood flow upregulate endothelin-B receptors in arterial smooth muscle". American Journal of Physiology, vol. 270, p. H65-71.
- BATTISTINI, B., P. D'Orleans-Juste et P. Sirois. 1993. "Endothelins: circulating plasma levels and presence in other biologic fluids". Laboratory Investigation, vol. 68, p. 600-628.
- BDOLAH, A., Z. Wollberg, G. Fleminger et E. Kochva. 1989. "SRTX-d, a new native peptide of the endothelin/sarafotoxin family". FEBS Letters, vol. 256, p. 1-3.
- BECKER, A., E. B. Dowdle, U. Hechler, K. Kauser, P. Donner et W. D. Schleuning. 1993. "Bibrotoxin, a novel member of the endothelin/sarafotoxin peptide family, from the

venom of the burrowing asp *Atractaspis bibroni*". FEBS Letters, vol. 315, p. 100-103.

BIALECKI, R. A., N. J. Izzo Jr et W. S. Colucci. 1989. "Endothelin-1 increases intracellular calcium mobilization but not calcium uptake in rabbit vascular smooth muscle cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 164, p. 474-479.

BIRNBAUMER, L., J. Abramowitz et A. M. Brown. 1990. "Receptor-effector coupling by G proteins". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1031, p. 163-224.

BLACKBURN, K. et R. F. Highsmith. 1990. "Nickel inhibits endothelin-induced contractions of vascular smooth muscle". American Journal of Physiology, vol. 258, p. C1025-1030.

BOIVIN, S., S. Tessier, J. Aubin, P. Lampron, M. Detheux et A. Fournier. 2004. "Identification of a binding domain of the endothelin-B receptor using a selective IRL-1620-derived photoprobe". Biochemistry, vol. 43, p. 11516-11525.

BOSS, C., M. Bolli et T. Weller. 2002. "Endothelin receptor antagonists: structures, synthesis, selectivity and therapeutic applications". Current Medicinal Chemistry, vol. 9, p. 349-383.

BOULANGER, Y., E. Biron, A. Khiat et A. Fournier. 1999. "Conformational analysis of biologically active truncated linear analogs of endothelin-1 using NMR and molecular modeling". Journal of Peptide Research, vol. 53, p. 214-222.

BOUSSO-MITTLER, D., R. Galron et M. Sokolovsky. 1991. "Endothelin/sarafotoxin receptor heterogeneity: evidence for different glycosylation in receptors from different tissues". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 178, p. 921-926.

BRAUN-MENENDEZ, E., J.C. Fasciolo, L.F. Leloir et J.M. Munoz. 1940. "The substance causing renal hypertension". Journal of physiology, vol. 98, p. 283-298.

CADE, C., W. C. Lumma Jr, R. Mohan, G. M. Rubanyi et L. H. Parker-Botelho. 1990. "Lack of biological activity of preproendothelin". Life Sciences, vol. 47, p. 2097-2103.

- CANNAN, C. R., J. C. Burnett Jr et A. Lerman. 1996. "Enhanced coronary vasoconstriction to endothelin-B-receptor activation in experimental congestive heart failure". Circulation, vol. 93, p. 646-651.
- CARDELL, L. O., R. Uddman et L. Edvinsson. 1992. "Evidence for multiple endothelin receptors in the guinea-pig pulmonary artery and trachea". British Journal of Pharmacology, vol. 105, p. 376-380.
- CARDILLO, C., C. M. Kilcoyne, R. O. Cannon 3rd et J. A. Panza. 2000. "Increased activity of endogenous endothelin in patients with hypercholesterolemia". Journal of the American College of Cardiology, vol. 36, p. 1483-1488.
- CHABRIER, P. E., M. Auguet, P. Roubert, M. O. Lonchamp, V. Gillard, J. M. Guillon, S. Delaflotte et P. Braquet. 1989. "Vascular mechanism of action of endothelin-1: effect of Ca²⁺ antagonists". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13 Suppl 5, p. S32-35; discussion S45.
- CHIRGWIN, J.M., K.S. Mohammad et T.A. Guise. 2003. "Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) fragments are potent agonists of the endothelin A receptor". In: Abstracts Book of the Eighth International Conference on Endothelin, (Tsukuba, Japon; novembre 2003). Charlottesville VA, University of Virginia, p. 29.
- CLOUTHIER, D. E., S. C. Williams, H. Yanagisawa, M. Wieduwilt, J. A. Richardson et M. Yanagisawa. 2000. "Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice". Developmental Biology, vol. 217, p. 10-24.
- CLOZEL, M. 1989. "Endothelin sensitivity and receptor binding in the aorta of spontaneously hypertensive rats". Journal of Hypertension, vol. 7, p. 913-917.
- CODY, W. L., A. M. Doherty, X. Q. He, S. T. Rapundalo, G. P. Hingorani, R. L. Panek et T. C. Major. 1991. "Monocyclic endothelins: examination of the importance of the individual disulfide rings". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 17 Suppl 7, p. S62-64.
- CODY, W. L. et A. M. Doherty. 1995a. "The development of potent peptide agonists and

antagonists for the endothelin receptors". Biopolymers, vol. 37, p. 89-104.

CODY, W. L., J. X. He, P. L. DePue, L. A. Waite, D. M. Leonard, A. M. Sefler, J. S. Kaltenbronn, S. J. Haleen, D. M. Walker, M. A. Flynn, K. M. Welch, E. E. Reynolds et A. M. Doherty. 1995b. "Structure-activity relationships of the potent combined endothelin-A/endothelin-B receptor antagonist Ac-DDip16-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp21: development of endothelin-B receptor selective antagonists". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 38, p. 2809-2819.

CODY, W. L., J. X. He, M. D. Reily, S. J. Haleen, D. M. Walker, E. L. Reyner, B. H. Stewart et A. M. Doherty. 1997. "Design of a potent combined pseudopeptide endothelin-A/endothelin-B receptor antagonist, Ac-DBhg16-Leu-Asp-Ile-[NMe]Ile-Trp21 (PD 156252): examination of its pharmacokinetic and spectral properties". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 40, p. 2228-2240.

DAGASSAN, P. H., M. Clozel, V. Breu et J. P. Clozel. 1995. "Role of endothelin in spontaneous phasic contraction of human coronary arteries". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 26 Suppl 3, p. S200-203.

DALGARNO, D. C., L. Slater, S. Chackalamannil et M. M. Senior. 1992. "Solution conformation of endothelin and point mutants by nuclear magnetic resonance spectroscopy". International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 40, p. 515-523.

DANTHULURI, N. R. et T. A. Brock. 1990. "Endothelin receptor-coupling mechanisms in vascular smooth muscle: a role for protein kinase C". Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 254, p. 393-399.

DASGUPTA, F., A. K. Mukherjee et N. Gangadhar. 2002. "Endothelin receptor antagonists--an overview". Current Medicinal Chemistry, vol. 9, p. 549-575.

DASHWOOD, M. R., M. Timm et J. C. Kaski. 1995. "Regional variations in ET-A/ET-B binding sites in human coronary vasculature". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 26 Suppl 3, p. S351-354.

DE MEY, J. G. et P. M. Vanhoutte. 1981. "Role of the intima in cholinergic and

purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries". J Physiol, vol. 316, p. 347-355.

DE MEY, J. G. et P. M. Vanhoutte. 1982. "Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium". Circulation Research, vol. 51, p. 439-447.

DE MEY, J. G. et P. M. Vanhoutte. 1983. "Anoxia and endothelium-dependent reactivity of the canine femoral artery". J Physiol, vol. 335, p. 65-74.

DEVESLY, P., C. Cade, M. A. Polokoff et L. H. Botelho. 1991. "Evidence of glycosylated sites on the endothelin-1 receptor in Swiss 3T3 cells". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 17 Suppl 7, p. S134-136.

DOHERTY, A. M., W. L. Cody, N. L. Leitz, P. L. DePue, M. D. Taylor, S. T. Rapundalo, G. P. Hingorani, T. C. Major, R. L. Panek et D. G. Taylor. 1991. "Structure-activity studies of the C-terminal region of the endothelins and the sarafotoxins". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 17 Suppl 7, p. S59-61.

DOHERTY, A. M. 1992. "Endothelin: a new challenge". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 35, p. 1493-1508.

DOHERTY, A. M., W. L. Cody, P. L. DePue, J. X. He, L. A. Waite, D. M. Leonard, N. L. Leitz, D. T. Dudley, S. T. Rapundalo, G. P. Hingorani, S. J. Haleen, D. M. LaDouceur, K.E. Hill, M. A. Flynn et E. E. Renolds. 1993a. "Structure-activity relationships of C-terminal endothelin hexapeptide antagonists". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 36, p. 2585-2594.

DOHERTY, A. M., W. L. Cody, J. X. He, P. L. DePue, X. M. Cheng, K. M. Welch, M. A. Flynn, E. E. Reynolds, D. M. LaDouceur et L. S. Davis. 1993b. "In vitro and in vivo studies with a series of hexapeptide endothelin antagonists". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 22 Suppl 8, p. S98-102.

DÖLLING, R. M. Beyermann, J. Haenel, F. Kernchen, E. Krause, P. Franke, M. Brudel et M. Bienert. 1994. "Piperidine-mediated side product formation for Asp(Obut)-containing peptides". Journal of the chemical society, Chemical communications, vol. 7,

p. 853-854

EGASHIRA, K., F. S. Pipers, J. E. Rush et J. P. Morgan. 1990. "Effects of calcium channel blockers on coronary vasoconstriction induced by endothelin-1 in closed chest pigs". Journal of the American College of Cardiology, vol. 16, p. 1296-1303.

EMORI, T., Y. Hirata, K. Ohta, M. Shichiri et F. Marumo. 1989. "Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 160, p. 93-100.

EMOTO, N. et M. Yanagisawa. 1995. "Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum". Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 15262-15268.

ENCABO, A., M. Ferrer, J. Marin, J. Villamor et G. Balfagon. 1992. "Vasoconstrictive responses elicited by endothelin in bovine cerebral arteries". General Pharmacology, vol. 23, p. 263-267.

ERDOS, E. G. et R. A. Skidgel. 1989. "Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones". FASEB Journal, vol. 3, p. 145-151.

FAGAN, K. A., I. F. McMurtry et D. M. Rodman. 2001. "Role of endothelin-1 in lung disease". Respir Res, vol. 2, p. 90-101.

FAGNY, C., A. Michel, I. Leonard, G. Berkenboom, J. Fontaine et M. Deschodt-Lanckman. 1991. "In vitro degradation of endothelin-1 by endopeptidase 24.11 (enkephalinase)". Peptides, vol. 12, p. 773-778.

FARACI, F. M. 1989. "Effects of endothelin and vasopressin on cerebral blood vessels". American Journal of Physiology, vol. 257, p. H799-803.

FILEP, J. G., A. Rousseau, A. Fournier et P. Sirois. 1992. "Structure-activity relationship of analogues of endothelin-1: dissociation of hypotensive and pressor actions". European Journal of Pharmacology, vol. 220, p. 263-266.

FOREST, M. et A. Fournier. 1990. "BOP reagent for the coupling of pGlu and Boc-His(Tos) in solid phase peptide synthesis". International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 35, p. 89-94.

FORGET, M. A., N. Lebel, P. Sirois, Y. Boulanger et A. Fournier. 1996. "Biological and molecular analyses of structurally reduced analogues of endothelin-1". Molecular Pharmacology, vol. 49, p. 1071-1079.

FOURNIER, A., R. Couture, D. Regoli, M. Gendreau et S. St-Pierre. 1982. "Synthesis of peptides by the solid-phase method. 7. Substance P and analogues". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 25, p. 64-68.

FOURNIER, A., J. K. Saunders et S. St-Pierre. 1984. "Synthesis, conformational studies and biological activities of VIP and related fragments". Peptides, vol. 5, p. 169-177.

FOURNIER, A., C. T. Wang et A. M. Felix. 1988. "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". International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 31, p. 86-97.

FU, T., W. Chang, N. Ishida, K. Saida, Y. Mitsui, Y. Okano et Y. Nozawa. 1989. "Effects of vasoactive intestinal contractor (VIC) and endothelin on intracellular calcium level in neuroblastoma NG108-15 cells". FEBS Letters, vol. 257, p. 351-353.

FUKAMI, T., T. Nagase, K. Fujita, T. Hayama, K. Niiyama, T. Mase, S. Nakajima, T. Fukuroda, T. Saeki, M. Nishikibe, M. Ihara, M. Yano et K. Ishikawa. 1995. "Structure-activity relationships of cyclic pentapeptide endothelin A receptor antagonists". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 38, p. 4309-4324.

FUKURODA, T., K. Noguchi, S. Tsuchida, M. Nishikibe, F. Ikemoto, K. Okada et M. Yano. 1990. "Inhibition of biological actions of big endothelin-1 by phosphoramidon". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 172, p. 390-395.

FURCHGOTT, R. F. et J. V. Zawadzki. 1980. "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine". Nature, vol. 288, p. 373-376.

GAILIT, J. 1993. "Restoring free sulfhydryl groups in synthetic peptides". Analytical Biochemistry, vol. 214, p. 334-335.

GALANTINO, M., R. de Castiglione, C. Cristiani, F. Vaghi, W. Liu, J. W. Zhang et J. P. Tam. 1995. "D-amino acid scan of endothelin: importance of amino acids adjacent to cysteinyl residues in isomeric selectivity". Peptide Research, vol. 8, p. 154-159.

GALOPPINI, C., L. Giusti, M. Macchia, M. Hamdan, M. R. Mazzoni, F. Calvani et P. Rovero. 1999. "Synthesis and structure-activity relationship studies of new endothelin pseudopeptide analogues containing alkyl spacers". Farmaco, vol. 54, p. 213-217.

GARDNER, J. P., G. Tokudome, H. Tomonari, E. Maher, D. Hollander et A. Aviv. 1992. "Endothelin-induced calcium responses in human vascular smooth muscle cells". American Journal of Physiology, vol. 262, p. C148-155.

GERMAIN, M., B. Battistini, J. G. Filep, P. Sirois et A. Fournier. 1993. "Endothelin derivatives showing potent effects in the guinea pig trachea". Peptides, vol. 14, p. 613-619.

GILLESPIE, M. N., J. O. Owasoyo, I. F. McMurtry et R. F. O'Brien. 1986. "Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture". Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 236, p. 339-343.

GISIN, B. F. 1972. "The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric acid". Analytica Chimica Acta, vol. 58, p. 248-249.

GISIN, B. F. 1973. "The Preparation of Merrifield-Resins through Total Esterification with Cesium Salts". Helvetica Chimica Acta, vol. 56 p. 1476-1482.

GRAY, G. A. et D. J. Webb. 1996. "The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease". Pharmacology and Therapeutics, vol. 72, p. 109-148.

GRIENDLING, K. K., T. Tsuda et R. W. Alexander. 1989. "Endothelin stimulates

diacylglycerol accumulation and activates protein kinase C in cultured vascular smooth muscle cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 8237-8240.

GU, X. H., J. J. Liu, J. S. Dillon et W. G. Nayler. 1989. "The failure of endothelin to displace bound, radioactively-labelled, calcium antagonists (PN 200/110, D888 and diltiazem)". British Journal of Pharmacology, vol. 96, p. 262-264.

GUISE, T. A., T. Yoneda, A. J. Yates et G. R. Mundy. 1993. "The combined effect of tumor-produced parathyroid hormone-related protein and transforming growth factor-alpha enhance hypercalcemia in vivo and bone resorption in vitro". Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 77, p. 40-45.

GUISE, T. A. et G. R. Mundy. 1996. "Physiological and pathological roles of parathyroid hormone-related peptide". Current Opinion in Nephrology and Hypertension, vol. 5, p. 307-315.

GUISE, T. A. 2000. "Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases". Cancer, vol. 88, p. 2892-2898.

GUISE, T. A., J. J. Yin et K. S. Mohammad. 2003. "Role of endothelin-1 in osteoblastic bone metastases". Cancer, vol. 97, p. 779-784.

GUISE, T. A. et K. S. Mohammad. 2004. "Endothelins in bone cancer metastases". Cancer Treatment and Research, vol. 118, p. 197-212.

HAENDLER, B., U. Hechler et W. D. Schleuning. 1992. "Molecular cloning of human endothelin (ET) receptors ET-A and ET-B". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 20 Suppl 12, p. S1-4.

HAENDLER, B., U. Hechler, A. Becker et W. D. Schleuning. 1993. "Expression of human endothelin receptor ET-B by Escherichia coli transformants". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 191, p. 633-638.

HAMILTON, M. G., R. Frew et P. M. Lundy. 1989. "Effect of endothelin on Ca^{2+} influx, intracellular free Ca^{2+} levels and ligand binding to N and L type Ca^{2+} channels in rat brain". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 162, p. 1332-1338.

HAN, Y., F. Albericio et G. Barany. 1997. "Occurrence and minimization of cysteine racemization during stepwise solid-phase peptide synthesis". Journal of Organic Chemistry, vol. 62, p. 4307-4312.

HARRIS, S. E., L. F. Bonewald, M. A. Harris, M. Sabatini, S. Dallas, J. Q. Feng, N. Ghosh-Choudhury, J. Wozney et G. R. Mundy. 1994. "Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts". Journal of Bone and Mineral Research, vol. 9, p. 855-863.

HASHIDO, K., T. Gamou, M. Adachi, H. Tabuchi, T. Watanabe, Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1992. "Truncation of N-terminal extracellular or C-terminal intracellular domains of human ET-A receptor abrogated the binding activity to ET-1". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 187, p. 1241-1248.

HASHIDO, K., M. Adachi, T. Gamou, T. Watanabe, Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1993. "Identification of specific intracellular domains of the human ET-A receptor required for ligand binding and signal transduction". Cellular and Molecular Biology Research, vol. 39, p. 3-12.

HENSEN, J., B. Levenson, K. Schroder, M. Jereczek, C. Spielberg, K. Schwenn et P. Gross. 1991. "Plasma endothelin is increased in heart failure--no effect of a short infusion of atrial natriuretic factor". Zeitschrift fur Kardiologie, vol. 80 Suppl 8, p. 101-102.

HEWAGE, C. M., L. Jiang, J. A. Parkinson, R. Ramage et I. H. Sadler. 1997. "Solution structure determination of endothelin-1 in methanol/water by NMR and molecular modelling methods". J Pept Sci, vol. 3, p. 415-428.

HEWAGE, C. M., L. Jiang, J. A. Parkinson, R. Ramage et I. H. Sadler. 1998. "Development of ET-B selective agonists: solution structure of a linear endothelin-1 analogue, ET-1". Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, vol. 16, p. 425-435.

HEWAGE, C. M., L. Jiang, J. A. Parkinson, R. Ramage et I. H. Sadler. 1999. "A linear endothelin-1 analogue: solution structure of ET-1[Aib1,3,11,15, Nle7] by nuclear magnetic resonance spectroscopy and molecular modelling". Neurochemistry International, vol. 35, p. 35-45.

HEYL, D. L., W. L. Cody, J. X. He, M. A. Flynn, K. M. Welch, E. E. Reynolds et A. M. Doherty. 1993. "Truncated analogues of endothelin and sarafotoxin are selective for the ET-B receptor subtype". Peptide Research, vol. 6, p. 238-241.

HIRATA, Y., H. Yoshimi, S. Takaichi, M. Yanagisawa et T. Masaki. 1988. "Binding and receptor down-regulation of a novel vasoconstrictor endothelin in cultured rat vascular smooth muscle cells". FEBS Letters, vol. 239, p. 13-17.

HIRATA, Y., Y. Fukuda, H. Yoshimi, T. Emori, M. Shichiri et F. Marumo. 1989a. "Specific receptor for endothelin in cultured rat cardiocytes". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 160, p. 1438-1444.

HIRATA, Y., H. Yoshimi, T. Emori, M. Shichiri, F. Marumo, T. X. Watanabe, S. Kumagaye, K. Nakajima, T. Kimura et S. Sakakibara. 1989b. "Receptor binding activity and cytosolic free calcium response by synthetic endothelin analogs in cultured rat vascular smooth muscle cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 160, p. 228-234.

HIRATA, Y., H. Yoshimi, F. Marumo, T. X. Watanabe, S. Kumagaye, K. Nakajima, T. Kimura et S. Sakakibara. 1989c. "Interaction of synthetic sarafotoxin with rat vascular endothelin receptors". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 162, p. 441-447.

HOSODA, K., K. Nakao, Hiroshi-Arai, S. Suga, Y. Ogawa, M. Mukoyama, G. Shirakami, Y. Saito, S. Nakanishi et H. Imura. 1991. "Cloning and expression of human

endothelin-1 receptor cDNA". FEBS Letters, vol. 287, p. 23-26.

HOSODA, K., K. Nakao, N. Tamura, H. Arai, Y. Ogawa, S. Suga, S. Nakanishi et H. Imura. 1992. "Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor". Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 18797-18804.

HOWARD, P. G., C. Plumpton et A. P. Davenport. 1992. "Anatomical localization and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue". Journal of Hypertension, vol. 10, p. 1379-1386.

HUGGINS, J. P., J. T. Pelton et R. C. Miller. 1993. "The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in physiology and medicine". Pharmacology and Therapeutics, vol. 59, p. 55-123.

HUNT J. T., V. G. Lee, D. McMullen, E. C. Liu, M. Bolgar, C. L. Delaney, S. M. Festin, D. M. Floyd, A. Hedberg, S. Natarajan, R. Serafino, P. D. Stein, M. L. Webb, R. Zhang and S. Moreland. 1993. "Structure-activity studies of endothelin leading to novel peptide ET-A antagonists". Bioorganic Medicinal Chemistry, vol 1, p. 59-65.

IHARA, M., T. Fukuroda, T. Saeki, M. Nishikibe, K. Kojiri, H. Suda et M. Yano. 1991. "An endothelin receptor ET-A antagonist isolated from *Streptomyces misakiensis*". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 178, p. 132-137.

IJIMA, K., L. Lin, A. Nasjletti et M. S. Goligorsky. 1991. "Intracellular signaling pathway of endothelin-1". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 17 Suppl 7, p. S146-149.

INOUE, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto et T. Masaki. 1989a. "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 86, p. 2863-2867.

INOUE, A., M. Yanagisawa, Y. Takuwa, Y. Mitsui, M. Kobayashi et T. Masaki. 1989b. "The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of

expression". Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 14954-14959.

ISHIKAWA, T., M. Yanagisawa, S. Kimura, K. Goto et T. Masaki. 1988. "Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria". American Journal of Physiology, vol. 255, p. H970-973.

ISHIKAWA, K., T. Fukami, T. Nagase, K. Fujita, T. Hayama, K. Niiyama, T. Mase, M. Ihara et M. Yano. 1992. "Cyclic pentapeptide endothelin antagonists with high ET-A selectivity. Potency- and solubility-enhancing modifications". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 35, p. 2139-2142.

ISHIKAWA, K., M. Ihara, K. Noguchi, T. Mase, N. Mino, T. Saeki, T. Fukuroda, T. Fukami, S. Ozaki, T. Nagase, M. Nishikibe et M. Yano. 1994. "Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, p. 4892-4896.

ISHIZUKA, N., K. Matsumura, J. Kikuchi et H. Nakai. 2002a. "A novel class of endothelin-A receptor antagonists, (R)-2-(benzo[1,3]dioxol-5-yl)-6-isopropoxy-2H-chromene-3-carboxylic acids (S-1255). Conformational analysis of basic structure, crucial for ET-A antagonism, in solution and solid states". Bioorganic and Medicinal Chemistry, vol. 10, p. 3965-3972.

ISHIZUKA, N., K. Matsumura, K. Sakai, M. Fujimoto, S. Mihara et T. Yamamori. 2002b. "Structure-activity relationships of a novel class of endothelin-A receptor antagonists and discovery of potent and selective receptor antagonist, 2-(benzo[1,3]dioxol-5-yl)-6-isopropoxy-4-(4-methoxyphenyl)-2H-chromene-3-carboxylic acid (S-1255). 1. Study on structure-activity relationships and basic structure crucial for ET-A antagonism". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 45, p. 2041-2055.

JAE, H. S., M. Winn, D. B. Dixon, K. C. Marsh, B. Nguyen, T. J. Opgenorth et T. W. von Geldern. 1997. "Pyrrolidine-3-carboxylic acids as endothelin antagonists. 2. Sulfonamide-based ET-A/ET-B mixed antagonists". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 40, p. 3217-3227.

JANES, R. W., D. H. Peapus et B. A. Wallace. 1994. "The crystal structure of human endothelin". Nature Structural Biology, vol. 1, p. 311-319.

JONES, H. et W.I. Ramage. 1978. "An approach to the prevention of racemisation in the synthesis of histidine-containing peptides". Journal of the chemical society, Chemical communications, vol. 11, p. 472-473.

JONES, H., W.I. Ramage et M.J. Wity. 1980. "Mechanism of racemisation of histidine derivatives in peptide synthesis". International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 15, p. 301-303

JONES, C. R., C. R. Hiley, J. T. Pelton et M. Mohr. 1989. "Autoradiographic visualization of the binding sites for [125I]endothelin in rat and human brain". Neuroscience Letters, vol. 97, p. 276-279.

JONES, C. R., C. R. Hiley, J. T. Pelton et R. C. Miller. 1991. "Endothelin receptor heterogeneity; structure activity, autoradiographic and functional studies". Journal of Receptor Research, vol. 11, p. 299-310.

KAI, H., H. Kanaide et M. Nakamura. 1989. "Endothelin-sensitive intracellular Ca²⁺ store overlaps with caffeine-sensitive one in rat aortic smooth muscle cells in primary cultures". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 158, p. 235-243.

KAISER, E., R. L. Colescott, C. D. Bossinger et P. I. Cook. 1970. "Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides". Analytical Biochemistry, vol. 34, p. 595-598.

KAISER, T., G. J. Nicholson, H. J. Hohlbau et W. Voelter. 1996. "Racemization studies of Fmoc-Cys(Trt)-OH during stepwise Fmoc-solid phase peptide sythesis". Tetrahedron Letters, vol. 37, p. 1187-1190.

KARAKI, H., S. A. Sudjarwo, M. Hori, K. Sakata, Y. Urade, M. Takai et T. Okada. 1993. "ET-B receptor antagonist, IRL 1038, selectively inhibits the endothelin-induced endothelium-dependent vascular relaxation". European Journal of Pharmacology, vol. 231, p. 371-374.

KARLSTRÖM, A et A. Undén. 1996. "A new protecting group for aspartic acid that minimizes piperidine-catalysed aspartimide formation in Fmoc solid phase peptide synthesis". Tetrahedron Letters, vol. 37, p. 4243-4246.

KARNE, S., C. K. Jayawickreme et M. R. Lerner. 1993. "Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores". Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 19126-19133.

KASUYA, Y., T. Ishikawa, M. Yanagisawa, S. Kimura, K. Goto et T. Masaki. 1989a. "Mechanism of contraction to endothelin in isolated porcine coronary artery". American Journal of Physiology, vol. 257, p. H1828-1835.

KASUYA, Y., Y. Takuwa, M. Yanagisawa, S. Kimura, K. Goto et T. Masaki. 1989b. "Endothelin-1 induces vasoconstriction through two functionally distinct pathways in porcine coronary artery: contribution of phosphoinositide turnover". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 161, p. 1049-1055.

KATAHIRA, R., I. Umemura, M. Takai, K. Oda, T. Okada et A. Y. Nosaka. 1998. "Structural studies on endothelin receptor subtype B specific agonist IRL 1620". Journal of Peptide Research, vol. 51, p. 155-164.

KIMURA, S., Y. Kasuya, T. Sawamura, O. Shinmi, Y. Sugita, M. Yanagisawa, K. Goto et T. Masaki. 1988. "Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 156, p. 1182-1186.

KIMURA, S., Y. Kasuya, T. Sawamura, O. Shinimi, Y. Sugita, M. Yanagisawa, K. Goto et T. Masaki. 1989. "Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13 Suppl 5, p. S5-7; discussion S18.

KING, D. S., C. G. Fields et G. B. Fields. 1990. "A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis". International Journal of

Peptide and Protein Research, vol. 36, p. 255-266.

KINNEY, W. A., H. R. Almond Jr, J. Qi, C. E. Smith, R. J. Santulli, L. de Garavilla, P. Andrade-Gordon, D. S. Cho, A. M. Everson, M. A. Feinstein, P. A. Leung et B. E. Maryanoff. 2002. "Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model". Angewandte Chemie. International Ed. In English, vol. 41, p. 2940-2944.

KITANO, Y., H. Kurihara, Y. Kurihara, K. Maemura, Y. Ryo, Y. Yazaki et K. Harii. 1998. "Gene expression of bone matrix proteins and endothelin receptors in endothelin-1-deficient mice revealed by in situ hybridization". Journal of Bone and Mineral Research, vol. 13, p. 237-244.

KITAZUMI, K., T. Shiba, K. Nishiki, Y. Furukawa, C. Takasaki et K. Tasaka. 1990. "Structure-activity relationship in vasoconstrictor effects of sarafotoxins and endothelin-1". FEBS Letters, vol. 260, p. 269-72.

KLOCKNER, U. et G. Isenberg. 1991. "Endothelin depolarizes myocytes from porcine coronary and human mesenteric arteries through a Ca-activated chloride current". Pflügers Archiv. European Journal of Physiology, vol. 418, p. 168-175.

KLOOG, Y., I. Ambar, M. Sokolovsky, E. Kochva, Z. Wollberg et A. Bdolah. 1988. "Sarafotoxin, a novel vasoconstrictor peptide: phosphoinositide hydrolysis in rat heart and brain". Science, vol. 242, p. 268-270.

KLOOG, Y., D. Bousso-Mittler, A. Bdolah et M. Sokolovsky. 1989. "Three apparent receptor subtypes for the endothelin/sarafotoxin family". FEBS Letters, vol. 253, p. 199-202.

KOH, E., S. Morimoto, S. Kim, T. Nabata, Y. Miyashita et T. Ogihara. 1990. "Endothelin stimulates Na⁺/H⁺ exchange in vascular smooth muscle cells". Biochemistry International, vol. 20, p. 375-380.

KOMURO, I., H. Kurihara, T. Sugiyama, M. Yoshizumi, F. Takaku et Y. Yazaki. 1988. "Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth

muscle cells". FEBS Letters, vol. 238, p. 249-252.

KOSHI, T., C. Suzuki, K. Arai, T. Mizoguchi, T. Torii, M. Hirata, M. Ohkuchi et T. Okabe. 1991. "Syntheses and biological activities of endothelin-1 analogs". Chemical and Pharmaceutical Bulletin, vol. 39, p. 3061-3063.

KOSHIMIZU, T., G. Tsujimoto, K. Ono, T. Masaki et A. Sakamoto. 1995. "Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs membrane signaling but not ligand binding of human ET-B endothelin receptor". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 217, p. 354-362.

KOUREMBANAS, S., P. A. Marsden, L. P. McQuillan et D. V. Faller. 1991. "Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium". Journal of Clinical Investigation, vol. 88, p. 1054-1057.

KOUTSILIERIS, M., G. Frenette, C. Lazure, J. G. Lehoux, M. V. Govindan et C. Polychronakos. 1993. "Urokinase-type plasminogen activator: a paracrine factor regulating the bioavailability of IGFs in PA-III cell-induced osteoblastic metastases". Anticancer Research, vol. 13, p. 481-486.

KOZUKA, M., T. Ito, S. Hirose, K. M. Lodhi et H. Hagiwara. 1991. "Purification and characterization of bovine lung endothelin receptor". Journal of Biological Chemistry, vol. 266, p. 16892-168926.

KRYSTEK, S. R. Jr, D. A. Bassolino, J. Novotny, C. Chen, T. M. Marschner et N. H. Andersen. 1991. "Conformation of endothelin in aqueous ethylene glycol determined by ¹H-NMR and molecular dynamics simulations". FEBS Letters, vol. 281, p. 212-218.

KRYSTEK, S. R. Jr, P. S. Patel, P. M. Rose, S. M. Fisher, B. K. Kienzle, D. A. Lach, E. C. Liu, J. S. Lynch, J. Novotny et M. L. Webb. 1994. "Mutation of peptide binding site in transmembrane region of a G protein-coupled receptor accounts for endothelin receptor subtype selectivity". Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p. 12383-12386.

KUMAGAYE, S., H. Kuroda, K. Nakajima, T. X. Watanabe, T. Kimura, T. Masaki et S. Sakakibara. 1988. "Synthesis and disulfide structure determination of porcine endothelin:

an endothelium-derived vasoconstricting peptide". International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 32, p. 519-526.

KUNDU, G. C. et K. S. Misono. 1991. "Affinity labeling of endothelin receptors in bovine and rat lung membranes by N epsilon 9-azidobenzoyl-125I-endothelin-1". Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 79, p. 85-92.

KURIHARA, H., M. Yoshizumi, T. Sugiyama, F. Takaku, M. Yanagisawa, T. Masaki, M. Hamaoki, H. Kato et Y. Yazaki. 1989. "Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 159, p. 1435-1440.

KURODA, M., K. Yamazaki et T. Taga. 1994. "Conformation of the C-terminus of endothelin-1 in aqueous solution studied by Monte-Carlo simulation". FEBS Letters, vol. 355, p. 263-266.

LAMTHANH, H., A. Bdolah, C. Creminon, J. Grassi, A. Menez, Z. Wollberg et E. Kochva. 1994. "Biological activities of [Thr2]sarafotoxin-b a synthetic analogue of sarafotoxin-b". Toxicon, vol. 32, p. 1105-1114.

LANGLOIS, C., S. Tessier, A. Brkovic et A. Fournier. 2000. "An improved procedure for the preparation of the endothelin-B-receptor ligand sarafotoxin 6c". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 36, p. S290-291.

LANGLOIS, C., M. Létourneau, P. Lampron, V. St-Hilaire et A. Fournier. 2003. "Developement of agonist of endothelin-1 exhibiting selectivity towards ET-A receptors". British Journal of Pharmacology, vol. 139, p. 616-622.

LANGLOIS, C., M. Létourneau, K. Turcotte, M. Detheux et A. Fournier. 2005. "PTHrP fragments 1-16 and 1-23 do not bind to either the ET-A or ET-B endothelin receptors". Peptides, vol. 26, p. 1436-1440.

LAUER J.L., C. Fields et G.B. Fields. 1995. "Sequence dependence of aspartimide formation during 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis". Letters in peptide science, vol. 1, p. 197-205.

- LEE, H. K., G. D. Leikauf et N. Sperelakis. 1990. "Electromechanical effects of endothelin on ferret bronchial and tracheal smooth muscle". Journal of Applied Physiology, vol. 68, p. 417-420.
- LEE, J. A., J. A. Brinkmann, E. D. Longton, C. E. Peishoff, M. A. Lago, J. D. Leber, R. D. Cousins, A. Gao, J. M. Stadel, C. S. Kumar, E. H. Ohlstein, J. G. Gleason et J. D. Elliott. 1994a. "Lysine-182 of endothelin B receptor modulates agonist selectivity and antagonist affinity: evidence for the overlap of peptide and non-peptide ligand binding sites". Biochemistry, vol. 33, p. 14543-14549.
- LEE, J. A., J. D. Elliott, J. A. Sutiphong, W. J. Friesen, E. H. Ohlstein, J. M. Stadel, J. G. Gleason et C. E. Peishoff. 1994b. "Tyr-129 is important to the peptide ligand affinity and selectivity of human endothelin type A receptor". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 91, p. 7164-7168.
- LIN, W. W. et C. Y. Lee. 1990. "Biphasic effects of endothelin in the guinea-pig ileum". European Journal of Pharmacology, vol. 176, p. 57-62.
- LIN, H. Y., E. H. Kaji, G. K. Winkel, H. E. Ives et H. F. Lodish. 1991. "Cloning and functional expression of a vascular smooth muscle endothelin-1 receptor". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, p. 3185-3189.
- LOFFLER, B. M. et W. Lohrer. 1991. "Different endothelin receptor affinities in dog tissues". Journal of Receptor Research, vol. 11, p. 293-298.
- LONCHAMPT, M. O., S. Pinelis, J. Goulin, P. E. Chabrier et P. Braquet. 1991. "Proliferation and Na⁺/H⁺ exchange activation by endothelin in vascular smooth muscle cells". American Journal of Hypertension, vol. 4, p. 776-779.
- MAGGI, C. A., S. Giuliani, R. Patacchini, P. Santicioli, P. Rovero, A. Giachetti et A. Meli. 1989. "The C-terminal hexapeptide, endothelin-(16-21), discriminates between different endothelin receptors". European Journal of Pharmacology, vol. 166, p. 121-122.
- MAGUIRE, J. J. et A. P. Davenport. 2002. "Is urotensin-II the new endothelin?". British

Journal of Pharmacology, vol. 137, p. 579-588.

MASAKI, T. et M. Yanagisawa. 1992. "Endothelins". Essays in Biochemistry, vol. 27, p. 79-89.

MATSUEDA, G. R., E. Haber et M. N. Margolies. 1981. "Quantitative solid-phase Edman degradation for evaluation of extended solid-phase peptide synthesis". Biochemistry, vol. 20, p. 2571-2580.

MATSUEDA, G. R. et J. M. Stewart. 1981. "A p-methylbenzhydrylamine resin for improved solid-phase synthesis of peptide amides". Peptides, vol. 2, p. 45-50.

MAYAHARA, H., T. Ito, H. Nagai, H. Miyajima, R. Tsukuda, S. Taketomi, J. Mizoguchi et K. Kato. 1993. "In vivo stimulation of endosteal bone formation by basic fibroblast growth factor in rats". Growth Factors, vol. 9, p. 73-80.

MCDONALD, D. M., J. R. Bailie, D. B. Archer et U. Chakravarthy. 1996. "Receptor binding and biologic activity of synthetic ET-1 peptides in the retinal pericyte". Investigative Ophthalmology and Visual Science, vol. 37, p. 1067-1073.

MERRIFIELD, B. 1986. "Solid phase synthesis". Science, vol. 232, p. 341-347.

MEYER-LEHNERT, H., C. Wanning, H. G. Predel, A. Backer, H. Stelkens et H. J. Kramer. 1989. "Effects of endothelin on sodium transport mechanisms: potential role in cellular Ca²⁺ mobilization". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 163, p. 458-465.

MIASIRO, N., R. De Castiglione et A. C. Paiva. 1995. "Structure-activity relationships of endothelin-1 analogues". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 26 Suppl 3, p. S320-321.

MILLS, R. G., S. I. O'Donoghue, R. Smith et G. F. King. 1992. "Solution structure of endothelin-3 determined using NMR spectroscopy". Biochemistry, vol. 31, p. 5640-5645.

MIMEAULT, M., R. Quirion, Y. Dumont, S. St-Pierre et A. Fournier. 1992. "Structure-

activity study of hCGRP8-37, a calcitonin gene-related peptide receptor antagonist". Journal of Medicinal Chemistry, vol. 35, p. 2163-2168.

MOE, G. W., J. L. Rouleau, Q. T. Nguyen, P. Cernacek et D. J. Stewart. 2003. "Role of endothelins in congestive heart failure". Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 81, p. 588-597.

MONCADA, S., R. Gryglewski, S. Bunting et J. R. Vane. 1976. "An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation". Nature, vol. 263, p. 663-665.

MOORE, G. J., R. C. Ganter, J. M. Matsoukas, J. Hondrelis, G. Agelis, K. Barlos, S. Wilkinson, J. Sandall et P. Fowler. 1994. "Receptor interactions of the position 4 side chains of angiotensin II analogues: importance of aromatic ring quadrupole". Journal of Molecular Recognition, vol. 7, p. 251-256.

MORELAND, S., D. M. McMullen, C. L. Delaney, V. G. Lee et J. T. Hunt. 1992. "Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ET-B-like receptors". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 184, p. 100-106.

MULDOON, L. L., K. D. Rodland, M. L. Forsythe et B. E. Magun. 1989. "Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, diacylglycerol release, and gene expression in response to endothelin, a potent new agonist for fibroblasts and smooth muscle cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 8529-8536.

MUNDY, G. R. 1997. "Mechanisms of bone metastasis". Cancer, vol. 80, p. 1546-1556.

MUNRO, S., D. Craik, C. McConville, J. Hall, M. Searle, W. Bicknell, D. Scanlon et C. Chandler. 1991. "Solution conformation of endothelin, a potent vaso-constricting bicyclic peptide. A combined use of ¹H NMR spectroscopy and distance geometry calculations". FEBS Letters, vol. 278, p. 9-13.

NAITOH, T., T. Toyo-Oka et T. Sugimoto. 1990. "An endogenous Ca²⁺ channel agonist, endothelin-1, does not directly activate partially purified dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel from cardiac muscle in a reconstituted system". Biochemical and

Biophysical Research Communications, vol. 171, p. 1205-1210.

NAKAJIMA, K., S. Kubo, S. Kumagaye, H. Nishio, M. Tsunemi, T. Inui, H. Kuroda, N. Chino, T. X. Watanabe, T. Kimura et S. Sakakibara. 1989a. "Structure-activity relationship of endothelin: importance of charged groups". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 163, p. 424-429.

NAKAJIMA, K., S. Kumagaye, H. Nishio, H. Kuroda, T. X. Watanabe, Y. Kobayashi, H. Tamaoki, T. Kimura et S. Sakakibara. 1989b. "Synthesis of endothelin-1 analogues, endothelin-3, and sarafotoxin S6b: structure-activity relationships". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13 Suppl 5, p. S8-12; discussion S18.

NAKAMUTA, M., R. Takayanagi, Y. Sakai, S. Sakamoto, H. Hagiwara, T. Mizuno, Y. Saito, S. Hirose, M. Yamamoto et H. Nawata. 1991. "Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding human non-selective type of endothelin receptor". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 177, p. 34-39.

NAKAO, K., Y. Inoue, M. Oike, K. Kitamura et H. Kuriyama. 1990. "Mechanisms of endothelin-induced augmentation of the electrical and mechanical activity in rat portal vein". Pflugers Archiv. European Journal of Physiology, vol. 415, p. 526-532.

NELSON, J. B., S. P. Hedican, D. J. George, A. H. Reddi, S. Piantadosi, M. A. Eisenberger et J. W. Simons. 1995. "Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate". Nature Medicine, vol. 1, p. 944-949.

NELSON, J. B., K. Chan-Tack, S. P. Hedican, S. R. Magnuson, T. J. Opgenorth, G. S. Bova et J. W. Simons. 1996. "Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer". Cancer Research, vol. 56, p. 663-668.

NISHIZUKA, Y. 1989. "Studies and prospectives of the protein kinase C family for cellular regulation". Cancer, vol. 63, p. 1892-1903.

O'BRIEN, R.F. et I.F. McMurtry. 1984. "Endothelial cell (EC) supernates contract bovine pulmonary artery (PA) rings". American Review of Respiratory Disease, vol. 129,

p. A337.

OGAWA, Y., K. Nakao, H. Arai, O. Nakagawa, K. Hosoda, S. Suga, S. Nakanishi et H. Imura. 1991. "Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 178, p. 248-55.

OHNAKA, K., R. Takayanagi, T. Yamauchi, H. Okazaki, M. Ohashi, F. Umeda et H. Nawata. 1990. "Identification and characterization of endothelin converting activity in cultured bovine endothelial cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 168, p. 1128-1136.

OHTA, K., Y. Hirata, T. Imai, K. Kanno, T. Emori, M. Shichiri et F. Marumo. 1990. "Cytokine-induced release of endothelin-1 from porcine renal epithelial cell line". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 169, p. 578-584.

OKADA, K., Y. Miyazaki, J. Takada, K. Matsuyama, T. Yamaki et M. Yano. 1990. "Conversion of big endothelin-1 by membrane-bound metalloendopeptidase in cultured bovine endothelial cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 171, p. 1192-1198.

OKADA, K., S. Ishikawa et T. Saito. 1991. "Interaction between endothelin-induced Na^+ and Ca^{2+} kinetics in cultured rat vascular smooth muscle cells". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 17 Suppl 7, p. S124-126.

OPGENORTH, T. J., J. R. Wu-Wong et K. Shiosaki. 1992. "Endothelin-converting enzymes". FASEB Journal, vol. 6, p. 2653-2659.

OPGENORTH, T. J. 1995. "Endothelin receptor antagonism". Advances in Pharmacology, vol. 33, p. 1-65.

ORRY, A. J. et B. A. Wallace. 2000. "Modeling and docking the endothelin G-protein-coupled receptor". Biophysical Journal, vol. 79, p. 3083-3094.

ORTEGA MATEO, A. et A. A. de Artinano. 1997. "Highlights on endothelins: a review". Pharmacological Research, vol. 36, p. 339-351.

PAGE, I.H. et O.M. Helmer. 1940. "A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction renin and renin activator. " Journal of Experimental Medecine, vol. 71, p. 29-42.

PALMER, R. M., A. G. Ferrige et S. Moncada. 1987. "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor". Nature, vol. 327, p. 524-526.

PANEK, R. L., T. C. Major, G. P. Hingorani, A. M. Doherty, D. G. Taylor et S. T. Rapundalo. 1992. "Endothelin and structurally related analogs distinguish between endothelin receptor subtypes". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 183, p. 566-571.

PARKER, J. M., D. Guo et R. S. Hodges. 1986. "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, vol. 25, p. 5425-5432.

PEISHOFF, C. E., R. W. Janes et B. A. Wallace. 1995. "Comparison of the structures of the endothelin A receptor antagonists BQ123 and N-methyl leucine BQ123 with the crystal structure of the C-terminal tail of endothelin-1". FEBS Letters, vol. 374, p. 379-383.

PELTON, J. T. et R. C. Miller. 1991. "The role of the disulphide bonds in endothelin-1". Journal of Pharmacy and Pharmacology, vol. 43, p. 43-45.

PERICH, J. W., M. Ruzzene, L. A. Pinna et E. C. Reynolds. 1994. "Efficient Fmoc/solid-phase peptide synthesis of O-phosphotyrosyl-containing peptides and their use as phosphatase substrates". International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 43, p. 39-46.

PERKINS, T. D., R. C. Hider et D. J. Barlow. 1990. "Proposed solution structure of endothelin". International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 36, p. 128-133.

POLLOCK, D. M., B. J. Divish, I. Milicic, E. I. Novosad, N. S. Burres et T. J.

Oppenorth. 1993. "In vivo characterization of a phosphoramidon-sensitive endothelin-converting enzyme in the rat". European Journal of Pharmacology, vol. 231, p. 459-464.

POWELL, G. J., J. Southby, J. A. Danks, R. G. Stillwell, J. A. Hayman, M. A. Henderson, R. C. Bennett et T. J. Martin. 1991. "Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites". Cancer Research, vol. 51, p. 3059-3061.

RAPOPORT, R. M., K. A. Stauderman et R. F. Highsmith. 1990. "Effects of EDCF and endothelin on phosphatidylinositol hydrolysis and contraction in rat aorta". American Journal of Physiology, vol. 258, p. C122-131.

RESINK, T. J., T. Scott-Burden et F. R. Buhler. 1988. "Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 157, p. 1360-1368.

ROSATI, C., E. Jeanclos, S. Cavalier, P. E. Chabrier, P. Hannaert, P. Braquet et R. Garay. 1990. "Stimulatory action of endothelin-1 on membrane Na⁺ transport in vascular smooth muscle cells in culture". American Journal of Hypertension, vol. 3, p. 711-713.

ROVERO, P., R. Patacchini et C. A. Maggi. 1990. "Structure-activity studies on endothelin (16-21), the C-terminal hexapeptide of the endothelins, in the guinea-pig bronchus". British Journal of Pharmacology, vol. 101, p. 232-234.

SAEKI, T., M. Ihara, T. Fukuroda, M. Yamagiwa et M. Yano. 1991. "[Ala^{1,3,11,15}]endothelin-1 analogs with ET-B agonistic activity". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 179, p. 286-292.

SAEKI, T., M. Ihara, T. Fukuroda et M. Yano. 1992. "Structure-activity relationship for ET-B agonism in truncated endothelin-1 analogs". Biochemistry International, vol. 28, p. 305-312.

SAIDA, K., Y. Mitsui et N. Ishida. 1989. "A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (endothelin) peptide family. Molecular cloning, expression, and biological activity". Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 14613-14616.

- SAKAMOTO, A., M. Yanagisawa, T. Sakurai, Y. Takuwa, H. Yanagisawa et T. Masaki. 1991. "Cloning and functional expression of human cDNA for the ET-B endothelin receptor". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 178, p. 656-663.
- SAKAMOTO, A., M. Yanagisawa, T. Sakurai, K. Nakao, T. Toyo-oka, M. Yano et T. Masaki. 1993a. "The ligand-receptor interactions of the endothelin systems are mediated by distinct "message" and "address" domains". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 22 Suppl 8, p. S113-116.
- SAKAMOTO, A., M. Yanagisawa, T. Sawamura, T. Enoki, T. Ohtani, T. Sakurai, K. Nakao, T. Toyo-oka et T. Masaki. 1993b. "Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin-A selective antagonist and endothelinB-selective agonists". Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 8547-8553.
- SAKATA, K., H. Ozaki, S. C. Kwon et H. Karaki. 1989. "Effects of endothelin on the mechanical activity and cytosolic calcium level of various types of smooth muscle". British Journal of Pharmacology, vol. 98, p. 483-492.
- SAKURAI, T., M. Yanagisawa, Y. Takuwa, H. Miyazaki, S. Kimura, K. Goto et T. Masaki. 1990. "Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor". Nature, vol. 348, p. 732-735.
- SASAKI, T. et M. H. Hong. 1993. "Endothelin-1 localization in bone cells and vascular endothelial cells in rat bone marrow". Anatomical Record, vol. 237, p. 332-337.
- SAUDEK, V., J. Hoflack et J. T. Pelton. 1989. "¹H-NMR study of endothelin, sequence-specific assignment of the spectrum and a solution structure". FEBS Letters, vol. 257, p. 145-148.
- SAUDEK, V., J. Hoflack et J. T. Pelton. 1991. "Solution conformation of endothelin-1 by ¹H NMR, CD, and molecular modeling". International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 37, p. 174-179.
- SIMONSON, M. S. et M. J. Dunn. 1990. "Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family". FASEB Journal, vol. 4, p. 2989-3000.

SIEBER, P. 1987 "An Improved Method for Anchoring of 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Amino Acids to 4-Alkoxybenzyl Alcohol Resins ". Tetrahedron Letters, vol.49, p. 6147-6150.

SIEBER, P. et B. Riniker. 1987. "Protection of histidine in peptide synthesis: A reassessment of the trityl group". Tetrahedron letters, vol. 28, p. 6031-6034.

SIMPSON, A. W. et C. C. Ashley. 1989. "Endothelin evoked Ca^{2+} transients and oscillations in A10 vascular smooth muscle cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 163, p. 1223-1229.

SOKOLOVSKY, M. 1991. "Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling". Trends in Biochemical Sciences, vol. 16, p. 261-264.

SOKOLOVSKY, M. 1992. "Structure-function relationships of endothelins, sarafotoxins, and their receptor subtypes". Journal of Neurochemistry, vol. 59, p. 809-821.

SPINELLA, M. J., A. B. Malik, J. Everitt et T. T. Andersen. 1991. "Design and synthesis of a specific endothelin 1 antagonist: effects on pulmonary vasoconstriction". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 88, p. 7443-7446.

SPOKES, R. A., M. A. Ghattei et S. R. Bloom. 1989. "Studies with endothelin-3 and endothelin-1 on rat blood pressure and isolated tissues: evidence for multiple endothelin receptor subtypes". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13 Suppl 5, p. S191-192.

STERN, P. H., A. Tatrai, D. E. Semler, S. K. Lee, P. Lakatos, P. J. Strielemann, G. Tarjan et J. L. Sanders. 1995. "Endothelin receptors, second messengers, and actions in bone". Journal of Nutrition, vol. 125, p. 2028S-2032S.

SUDJARWO, S. A., M. Hori, M. Takai, Y. Urade, T. Okada et H. Karaki. 1993. "A novel subtype of endothelin B receptor mediating contraction in swine pulmonary vein". Life Sciences, vol. 53, p. 431-437.

SUMNER, M. J., T. R. Cannon, J. W. Munding, D. G. White et I. S. Watts. 1992. "Endothelin ET-A and ET-B receptors mediate vascular smooth muscle contraction". British Journal of Pharmacology, vol. 107, p. 858-860.

SUNAKO, M., Y. Kawahara, K. Kariya, S. Araki, H. Fukuzaki et Y. Takai. 1989. "Endothelin-induced biphasic formation of 1,2-diacylglycerol in cultured rabbit vascular smooth muscle cells--mass analysis with a radioenzymatic assay". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 160, p. 744-750.

TADDEI, S., A. Virdis, L. Ghiadoni, I. Sudano et A. Salvetti. 2001. "Endothelial dysfunction in hypertension". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 38 Suppl 2, p. S11-14.

TAKAGI, Y., H. Ninomiya, A. Sakamoto, S. Miwa et T. Masaki. 1995. "Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. A study with endothelin-A/B chimeras". Journal of Biological Chemistry, vol. 270, p. 10072-10078.

TAKAI, M., I. Umemura, K. Yamasaki, T. Watakabe, Y. Fujitani, K. Oda, Y. Urade, T. Inui, T. Yamamura et T. Okada. 1992. "A potent and specific agonist, Suc-[Glu9,Ala11,15]-endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET-B receptor". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 184, p. 953-959.

TAKASAKI, C., S. Aimoto, R. Takayanagi, M. Ohashi et H. Nawata. 1990. "Structure-receptor binding relationships of sarafotoxin and endothelin in porcine cardiovascular tissues". Biochemistry International, vol. 21, p. 1059-1064.

TAKASAKI, C., S. Aimoto, K. Kitazumi, K. Tasaka, T. Shiba, K. Nishiki, Y. Furukawa, R. Takayanagi, K. Ohnaka et H. Nawata. 1991. "Structure-activity relationships of sarafotoxins: chemical syntheses of chimera peptides of sarafotoxins S6b and S6c". European Journal of Pharmacology, vol. 198, p. 165-169.

TAKASUKA, T., T. Sakurai, K. Goto, Y. Furuichi et T. Watanabe. 1994. "Human endothelin receptor ET-B. Amino acid sequence requirements for super stable complex formation with its ligand". Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p. 7509-7513.

TAKUWA, N., Y. Takuwa, M. Yanagisawa, K. Yamashita et T. Masaki. 1989. "A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts". Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 7856-7861.

TAM, J. P., M. W. Riemen et R. B. Merrifield. 1988. "Mechanisms of aspartimide formation: the effects of protecting groups, acid, base, temperature and time". Peptide Research, vol. 1, p. 6-18.

TAM, J. P., W. Liu, J. W. Zhang, M. Galantino, F. Bertolero, C. Cristiani, F. Vaghi et R. de Castiglione. 1994. "Alanine scan of endothelin: importance of aromatic residues". Peptides, vol. 15, p. 703-708.

TAMAOKI, H., Y. Kobayashi, S. Nishimura, T. Ohkubo, Y. Kyogoku, K. Nakajima, S. Kumagaye, T. Kimura et S. Sakakibara. 1991. "Solution conformation of endothelin determined by means of ¹H-NMR spectroscopy and distance geometry calculations". Protein Engineering, vol. 4, p. 509-518.

TESSIER, S., S. Boivin, J. Aubin, P. Lampron, M. Detheux et A. Fournier. 2005. "Transmembrane domain V of the endothelin-A receptor is a binding domain of ET-A-selective TTA-386-derived photoprobes". Biochemistry, vol. 44, p. 7844-7854.

THALMANN, G. N., P. E. Anezinis, S. M. Chang, H. E. Zhau, E. E. Kim, V. L. Hopwood, S. Pathak, A. C. von Eschenbach et L. W. Chung. 1994. "Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer". Cancer Research, vol. 54, p. 2577-2581.

TIGERSTEDT, R. et P.G. Bergman. 1898. "Niere und kreislauf." Scandinavian archives of physiology, vol. 8, p. 223-271.

TOMITA, U., K. Takahashi, K. Ikenaka, T. Kondo, I. Fujimoto, S. Aimoto, K. Mikoshiba, M. Ui et T. Katada. 1991. "Direct activation of GTP-binding proteins by venom peptides that contain cationic clusters within their alpha-helical structures". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 178, p. 400-406.

TURNER, R. J., J. M. Matsoukas et G. J. Moore. 1991. "Fluorescence properties of

angiotensin II analogues in receptor-simulating environments: relationship between tyrosinate fluorescence lifetime and biological activity". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1065, p. 21-28.

UCHIDA, Y., T. Jun, H. Ninomiya, H. Ohse, S. Hasegawa, A. Nomura, T. Sakamoto, M. S. Sardesai et F. Hirata. 1996. "Involvement of endothelins in immediate and late asthmatic responses of guinea pigs". Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 277, p. 1622-1629.

VAN RENTERGHEM, C., P. Vigne, J. Barhanin, A. Schmid-Alliana, C. Frelin et M. Lazdunski. 1988. "Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 157, p. 977-985.

VIJAYARAGHAVAN, J., A. G. Scicli, O. A. Carretero, C. Slaughter, C. Moomaw et L. B. Hersh. 1990. "The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase)". Journal of Biological Chemistry, vol. 265, p. 14150-14155.

WAGGONER, W. G., S. L. Genova et V. A. Rash. 1992. "Kinetic analyses demonstrate that the equilibrium assumption does not apply to [125I]endothelin-1 binding data". Life Sciences, vol. 51, p. 1869-1876.

WAGNER-MANN, C. et M. Sturek. 1991. "Endothelin mediates Ca influx and release in porcine coronary smooth muscle cells". American Journal of Physiology, vol. 260, p. C771-7.

WAGNER, O. F., G. Christ, J. Wojta, H. Vierhapper, S. Parzer, P. J. Nowotny, B. Schneider, W. Waldhausl et B. R. Binder. 1992. "Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells". Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 16066-16068.

WALLACE, B. A. et R. W. Janes. 1995. "The crystal structure of human endothelin-1 and how it relates to receptor binding". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 26 Suppl 3, p. S250-253.

WALLACE, B. A., R. W. Janes, D. A. Bassolino et S. R. Krystek Jr. 1995. "A

comparison of X-ray and NMR structures for human endothelin-1". Protein Science, vol. 4, p. 75-83.

WALLNOFER, A., S. Weir, U. Ruegg et C. Cauvin. 1989. "The mechanism of action of endothelin-1 as compared with other agonists in vascular smooth muscle". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13 Suppl 5, p. S23-31; discussion S45.

WARNER, T. D., G. de Nucci et J. R. Vane. 1989. "Rat endothelin is a vasodilator in the isolated perfused mesentery of the rat". European Journal of Pharmacology, vol. 159, p. 325-326.

WARNER, T. D., G. H. Allcock, R. Corder et J. R. Vane. 1993. "Use of the endothelin antagonists BQ-123 and PD 142893 to reveal three endothelin receptors mediating smooth muscle contraction and the release of EDRF". British Journal of Pharmacology, vol. 110, p. 777-782.

WATANABE, T., K. Kusumoto, T. Kitayoshi et N. Shimamoto. 1989a. "Positive inotropic and vasoconstrictive effects of endothelin-1 in in vivo and in vitro experiments: characteristics and the role of L-type calcium channels". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13 Suppl 5, p. S108-11 discussion s123.

WATANABE, T. X., S. Kumagaye, H. Nishio, K. Nakajima, T. Kimura et S. Sakakibara. 1989b. "Effects of endothelin-1 and endothelin-3 on blood pressure in conscious hypertensive rats". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 13 Suppl 5, p. S207-208.

WATANABE, T. X., Y. Itahara, K. Nakajima, S. Kumagaye, T. Kimura et S. Sakakibara. 1991. "The biological activity of endothelin-1 analogues in three different assay systems". Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 17 Suppl 7, p. S5-9.

WATANABE, H. et N. Himori. 1992. "Responses of isolated rabbit thoracic aortae to endothelin-1 and several vasoactive substances. A new blood perfusion circuit under the controlled conditions of resistance and flow". Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, vol. 28, p. 35-43.

WEBB, M. L., P. S. Patel, P. M. Rose, E. C. Liu, P. D. Stein, J. Barrish, D. A. Lach, T. Stouch, S. M. Fisher, O. Hadjilambris, H. Lee, S. Skwish, K. E. Dickinson et S. R. Krystek Jr. 1996. "Mutational analysis of the endothelin type A receptor ET-A: interactions and model of selective ET-A antagonist BMS-182874 with putative ET-A receptor binding cavity". Biochemistry, vol. 35, p. 2548-2556.

WONG, W. S., S. L. Bloomquist, A. M. Bendele et J. H. Fleisch. 1992. "Pharmacological and histological examinations of regional differences of guinea-pig lung: a role of pleural surface smooth muscle in lung strip contraction". British Journal of Pharmacology, vol. 105, p. 620-626.

XU, D., N. Emoto, A. Giaid, C. Slaughter, S. Kaw, D. deWit et M. Yanagisawa. 1994. "ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1". Cell, vol. 78, p. 473-485.

YAGAMI, T., K. Kitagawa, C. Aida, H. Fujiwara et S. Futaki. 2000. "Stabilization of a tyrosine O-sulfate residue by a cationic functional group: formation of a conjugate acid-base pair". Journal of Peptide Research, vol. 56, p. 239-249.

YANAGISAWA, M., A. Inoue, T. Ishikawa, Y. Kasuya, S. Kimura, S. Kumagaye, K. Nakajima, T. X. Watanabe, S. Sakakibara, K. Goto et T. Masaki. 1988a. "Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 85, p. 6964-6967.

YANAGISAWA, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto et T. Masaki. 1988b. "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells". Nature, vol. 332, p. 411-415.

YANAGISAWA, M. et T. Masaki. 1989. "Endothelin, a novel endothelium-derived peptide. Pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control". Biochemical Pharmacology, vol. 38, p. 1877-1883.

YANG, Y., W.V. Sweeney, K. Schneider, S. Thörnqvist, B.T. Chait et J.P. Tam. 1994.

"Aspartimide formation in base-driven 9-fluorenylmethoxycarbonyl chemistry". Tetrahedron letters, vol35, p.9689-9692.

YELLEN, G., M. E. Jurman, T. Abramson et R. MacKinnon. 1991. "Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel". Science, vol. 251, p. 939-942.

YI, B., P. J. Williams, M. Niewolna, Y. Wang et T. Yoneda. 2002. "Tumor-derived platelet-derived growth factor-BB plays a critical role in osteosclerotic bone metastasis in an animal model of human breast cancer". Cancer Research, vol. 62, p. 917-923.

YIN, J. J., K. S. Mohammad, S. M. Kakonen, S. Harris, J. R. Wu-Wong, J. L. Wessale, R. J. Padley, I. R. Garrett, J. M. Chirgwin et T. A. Guise. 2003. "A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 100, p. 10954-10959.

YOSHIZUMI, M., H. Kurihara, T. Sugiyama, F. Takaku, M. Yanagisawa, T. Masaki et Y. Yazaki. 1989. "Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells". Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 161, p. 859-864.

YOSHIMOTO, S., Y. Ishizaki, T. Sasaki et S. Murota. 1991. "Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells". Stroke, vol. 22, p. 378-383.