

Université du Québec
INRS–Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

**Développement et caractérisation pharmacologique de sondes peptidiques
pour le photomarquage des récepteurs de l'endothéline.**

Par
Sophie Tessier
Baccalauréat en Biochimie

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Dr. Denis Girard
INRS–Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

Examineur externe

Dr. Gaétan Guillemette
Institut de Pharmacologie de Sherbrooke

Directeur de recherche

Dr. Alain Fournier
INRS–Institut Armand-Frappier
Centre de recherche en santé humaine

Résumé

L'endothéline (ET) est un peptide composé de vingt et un acides aminés dont la chaîne est repliée par deux ponts disulfures reliant les résidus cystéines des positions 1-15 et 3-11. L'ET est l'un des plus puissants agents vasoconstricteurs connus à ce jour. Chez les mammifères, ce peptide agit via deux types de récepteurs soit ET_A et ET_B . Il participe d'ailleurs aux fonctions d'une multitude d'organes par la production d'une vasoconstriction des artères et des muscles lisses, par l'induction de la sécrétion d'hormones, etc. Ces nombreuses actions physiologiques suggèrent que l'ET est impliquée dans diverses pathologies telles l'hypertension, l'infarctus du myocarde et l'asthme. Il est donc important de comprendre la nature des interactions s'établissant entre l'ET et ses récepteurs.

Afin d'identifier quelques propriétés pharmacologiques de ses récepteurs et d'en connaître davantage sur les sites de liaison de l'ET, nous avons opté pour l'utilisation d'analogues photosensibles de ce peptide dans des essais de marquage par photoaffinité. Pour ce faire, nous avons identifié deux peptides possédant une sélectivité pour l'un ou l'autre des récepteurs de l'ET. Le TTA-386 et le [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET sont sélectifs pour les récepteurs ET_A et ET_B respectivement. Ils ont été choisis comme molécule de départ pour synthétiser des sondes photosensibles. Ces peptides ont alors été modifiés légèrement afin d'y incorporer le p-benzoyl-phénylalanine (pBpa), un acide aminé photosensible à l'origine du marquage des récepteurs et une tyrosine, un résidu nécessaire pour permettre éventuellement d'ioder les sondes. Ainsi, six peptides dérivés du TTA-386 ont été synthétisés ; les acides aminés en position 1,2 et 6 ayant été tour à tour substitués soit par le D- ou le L-pBpa. Quant au récepteur ET_B , quatre sondes photosensibles ont été explorées. Pour l'une des sondes, l'espaceur aliphatique Aca a été remplacé par le dipeptide Tyr-L-pBpa. Pour les trois dernières, le résidu tyrosine a été positionné en 17 alors que le L-pBpa a été introduit à tour de rôle aux positions 9, 19 et 20.

La synthèse peptidique de ces dix sondes photosensibles s'est effectuée sur phase solide en utilisant la chimie Boc. Puisque les sondes dérivées du TTA-386 possèdent une extrémité amino-terminale couplée à un cycle hexaméthylèneiminocarbonyle, un

protocole particulier a dû être mis au point pour faire l'ajout de ce cycle. Une réaction avec du chloroformate de 4-nitrophényle suivi de l'homopipéridine au niveau de l'amine alpha du peptide s'est avérée la meilleure méthode pour obtenir les peptides désirés.

L'activité biologique de tous les peptides synthétisés a ensuite été vérifiée sur deux préparations tissulaires exprimant majoritairement soit le récepteur ET_A (aorte thoracique de rat) ou le récepteur ET_B (parenchyme pulmonaire de cobaye). Deux des sondes dérivées du TTA-386 soit le D- et le [L-pBpa⁶]-TTA-386 ont produit une activité antagoniste sur le récepteur ET_A démontrant ainsi leur capacité à se lier à ce récepteur. De plus, l'absence d'activité sur le parenchyme de poumons de cobaye montre que ces peptides sont spécifiques à ET_A . Néanmoins, aucune des sondes synthétisées pour la caractérisation du récepteur ET_B n'a démontré d'activité agoniste ou antagoniste que ce soit pour l'un ou l'autre des récepteurs de l'ET. Ces derniers résultats suggèrent que les changements apportés au peptide original ont été trop importants pour que les peptides puissent conserver leur activité et même être reconnus par les récepteurs.

Les résultats positifs obtenus avec le [D-pBpa⁶]-TTA-386 et le [L-pBpa⁶]-TTA-386 font en sorte que ces peptides pourront être utilisés comme sondes photosensibles spécifiques pour des essais de liaison avec le récepteur ET_A . Au moyen de la technique de marquage par photoaffinité, nous pourrions, par conséquent, obtenir de plus amples informations sur le domaine de liaison du récepteur ET_A . Toutefois, l'étude des récepteurs ET_B nécessitera des travaux additionnels afin de développer des sondes photosensibles puisque nos dérivés développés en ce sens ne semblent pas se lier au récepteur.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Alain Fournier, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de travailler avec une équipe fort dynamique. Je tiens également à lui exprimer toute ma reconnaissance pour le soutien et l'encadrement qu'il a su me donner tout au long de mes travaux de recherche.

Je remercie tous les membres du laboratoire, anciens et présents, pour leur aide précieuse, plus particulièrement Alexandre Brkovic, Martin Coupal, Martine Lafontaine, Chantal Langlois, Myriam Létourneau, Philippe Roby et Luc Tessier.

Je désire également remercier toute ma famille, spécialement mes parents Denise et Jean-Denis, pour leurs nombreux encouragements et leur appui inconditionnel.

Je souhaite aussi remercier mon copain Sébastien ainsi que ma meilleure amie Caroline pour leur support moral ainsi que leur grande compréhension.

Finalement, je tiens à remercier l'INRS pour son support financier.

Table des matières

| | |
|--|------|
| Résumé..... | ii |
| Remerciements..... | iv |
| Liste des figures | viii |
| Liste des tableaux..... | x |
| Liste des abréviations..... | xi |
| Introduction..... | 1 |
| Matériel et Méthodes | 15 |
| 1. Synthèse des sondes peptidiques..... | 15 |
| 1.1 Réactifs et solvants utilisés | 15 |
| 1.2 Choix de la méthode chimique de synthèse | 16 |
| 1.3 Choix des groupements protégeant les chaînes latérales des acides aminés | 17 |
| 1.4 Choix du support solide | 18 |
| 1.5 Fixation du premier acide aminé sur la résine | 19 |
| 1.6 Test à l'acide picrique | 20 |
| 1.7 Protocole de couplage des autres acides aminés..... | 21 |
| 1.8 Addition du cycle urée sur les dérivés du TTA-386 | 22 |
| 1.8.1 Préparation du premier réactif utilisant le chloroformate de p-nitrophénoxyde..... | 22 |
| 1.8.2 Préparation du deuxième réactif utilisant le carbonate de dissuccinimidyle | 23 |
| 1.8.3 Préparation du troisième réactif utilisant le carbonyldiimidazole..... | 26 |
| 1.8.4 Préparation du quatrième réactif utilisant le phosgène | 26 |
| 1.8.5 Second protocole pour faire l'addition du cycle avec le chloroformate de 4-nitrophényle | 30 |
| 1.9 Clivage à l'acide fluorhydrique (HF)..... | 30 |
| 1.10 Vérification de l'ajout du cycle urée sur les dérivés du TTA-386..... | 32 |

| | |
|--|----|
| 2. Purification des sondes peptidiques | 32 |
| 2.1 Purification des sondes dérivées du TTA-386 | 32 |
| 2.2 Purification des sondes pour le photomarquage du récepteur ET _B | 33 |
| 3. Caractérisation des dérivés peptidiques | 34 |
| 3.1 CLHP analytique | 34 |
| 3.2 Spectrométrie de masse | 34 |
| 4. Évaluation pharmacologique des analogues à structure réduite de l'ET-1 et des analogues de l'antagoniste TTA-386 | 34 |
| 4.1 Animaux et réactifs | 34 |
| 4.2 Essais biologiques <i>in vitro</i> sur l'aorte de rat | 35 |
| 4.2.1 Démonstration de l'activité agoniste | 35 |
| 4.2.2 Démonstration de l'activité antagoniste | 36 |
| 4.3 Essais biologiques <i>in vitro</i> sur le parenchyme pulmonaire de cobaye | 36 |
| Résultats | 40 |
| 5. Synthèse et purification des sondes photosensibles dérivées du TTA-386 | 40 |
| 5.1 Synthèse des dérivés peptidiques | 40 |
| 5.2 Addition du cycle urée sur les dérivés peptidiques | 40 |
| 5.2.1 Utilisation du chloroformate de p-nitrophénoxyde | 40 |
| 5.2.2 Utilisation du carbonate de dissuccinimidyle | 42 |
| 5.2.3 Utilisation du carbonyldiimidazole | 42 |
| 5.2.4 Utilisation du phosgène | 43 |
| 5.2.5 Utilisation du chloroformate de 4-nitrophényle (second protocole) | 44 |
| 5.3 Purification des sondes peptidiques | 46 |
| 6. Synthèse et purification des sondes développées pour le photomarquage des récepteurs ET _B | 47 |
| 6.1 Synthèse des dérivés peptidiques | 47 |
| 6.2 Traitement des peptides après clivage au HF | 47 |
| 6.3 Purification des sondes peptidiques | 48 |

| | |
|--|----|
| 7. Caractérisation des sondes peptidiques développées pour le photomarquage des récepteurs ET _A et ET _B | 48 |
| 8. Études pharmacologiques | 53 |
| 8.1 Études pharmacologiques sur l'aorte de rat | 53 |
| 8.2 Études pharmacologiques sur le parenchyme pulmonaire de cobaye | 57 |
| Discussion | 58 |
| 9. Formation des sondes photosensibles par la méthode de synthèse peptidique sur phase solide | 58 |
| 9.1 Choix des peptides pour le développement de sondes photosensibles..... | 58 |
| 9.2 Évaluation de la synthèse des sondes dérivées du TTA-386 | 60 |
| 9.2.1 Synthèse sur phase solide des dérivés du TTA-386..... | 60 |
| 9.2.2 Addition du cycle hexaméthylèneiminocarbonyle sur les dérivés du TTA-386 | 61 |
| 9.3 Évaluation de la synthèse des sondes développées pour le récepteur ET _B | 62 |
| 9.4 Étude de l'identité et de la pureté de toutes les sondes synthétisées..... | 64 |
| 10. Évaluation pharmacologique des sondes synthétisées | 64 |
| 10.1 Étude des dérivés du TTA-386..... | 64 |
| 10.2 Étude des dérivés du [Cys(Acm) ^{3,11} , Trp(For ²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET..... | 66 |
| Conclusion | 69 |
| Appendices..... | 71 |
| Appendice A..... | 71 |
| Appendice B..... | 72 |
| Appendice C..... | 73 |
| Appendice D..... | 75 |
| Liste des références..... | 77 |

Liste des Figures

| | | |
|-------------|--|----|
| Figure 1 : | Les trois isoformes de l'ET chez l'être humain..... | 3 |
| Figure 2 : | Biosynthèse et mécanisme d'action de l'ET-1..... | 4 |
| Figure 3 : | La structure prédite du récepteur ET _A humain avec ses sept domaines transmembranaires..... | 7 |
| Figure 4 : | Représentation schématique du récepteur ET _B de l'endothéline | 8 |
| Figure 5 : | Cascade d'évènements intracellulaires de ET-1 sur les cellules musculaires lisses induisant leur contraction..... | 10 |
| Figure 6 : | Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le chloroformate de 4-nitrophénoxyde..... | 25 |
| Figure 7 : | Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le carbonate de disuccinimidyle..... | 27 |
| Figure 8 : | Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le carbonyldiimidazole..... | 28 |
| Figure 9 : | Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le phosgène..... | 29 |
| Figure 10 : | Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le chloroformate de 4-nitrophényle (second protocole)..... | 31 |
| Figure 11 : | Protocole des bioessais sur l'aorte de rat pour un peptide agoniste (A) et pour un peptide antagoniste (B) | 38 |
| Figure 12 : | Protocole des bioessais sur le parenchyme pulmonaire de cobaye pour un peptide agoniste (A) et pour un peptide antagoniste (B) | 39 |
| Figure 13 : | Profils CLHP analytiques post HF du A) dérivé [des- hexaméthylèneiminocarbonyle-L-pBpa ²]-TTA-386 déprotégé et B) suite à la réaction avec le p-nitrophénoxyde d'hexaméthylèneiminocarbonyle..... | 41 |

- Figure 14 : Profils CLHP analytiques post HF du A) dérivé [des-hexaméthylèneiminocarbonyle-L-pBpa²]-TTA-386 déprotégé et B) suite à la réaction avec l'hexaméthylèneiminocarbonylsuccinimidyl.....43
- Figure 15 : Profils CLHP analytiques post HF du A) dérivé [des-hexaméthylèneiminocarbonyle-L-pBpa²]-TTA-386 déprotégé et B) suite à la réaction avec le chlorure d'hexaméthylèneiminocarbonyle.....44
- Figure 16 : Profils CLHP analytiques post HF du A) dérivé [des-hexaméthylèneiminocarbonyle-L-pBpa²]-TTA-386 déprotégé et B) suite à la réaction avec le chloroformate de 4-nitrophényle et l'homopipéridine45
- Figure 17 : Profil CLHP analytique du dérivé [L-pBpa²]-TTA-386 suite à une première purification.....46
- Figure 18 : Profils CLHP analytiques de A) l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹]-(-3-11)-Tyr-L-pBpa-(17-21) ET brut, B) suite au traitement au TFA/H₂O (0,06%), C) suite au traitement au NH₄OH et D) suite au traitement au NH₄I.....49
- Figure 19 : Profils CLHP analytiques de A) l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Tyr¹⁷, L-pBpa¹⁹, Trp(For)²¹]-(-3-11)-Aca-(17-21)ET brut et B) après purification par CLHP préparative50
- Figure 20 : Effet de l'antagoniste [D-pBpa⁶]-TTA-386 sur la courbe concentration-réponse de l'endothéline-1 stimulant la contraction de l'aorte de rat dénudée de son endothélium....54
- Figure 21 : Effet de l'antagoniste [L-pBpa⁶]-TTA-386 sur la courbe concentration-réponse de l'endothéline-1 stimulant la contraction de l'aorte de rat dénudée de son endothélium....55
- Figure 22 : Effet de l'antagoniste TTA-386 sur la courbe concentration-réponse de l'endothéline-1 stimulant la contraction de l'aorte de rat dénudée de son endothélium56

Liste des Tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau I : Actions biologiques de l'ET | 6 |
| Tableau II : Protocole employé pour le couplage d'un acide aminé en chimie Boc | 24 |
| Tableau III : Pureté des sondes photosensibles spécifiques pour le récepteur ET _A et ET _B selon les données de caractérisation par CLHP analytique..... | 51 |
| Tableau IV : Résultats des analyses de spectrométrie de masse des sondes photosensibles spécifiques pour le récepteur ET _A et ET _B | 52 |
| Tableau V : Valeurs de pA ₂ des sondes peptidiques produisant une réponse antagoniste sur l'aorte de rat..... | 53 |

Abréviations utilisées

| | |
|-----------------|--|
| Aca | Acide aminocaproïque |
| Acm | Acétamidométhyle |
| ACN | Acétonitrile |
| ACS | American Chemical Standard |
| Boc | T-butyloxy-carbonyle |
| BOP | Hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium |
| 2-Br-Z | 2-bromobenzoyloxy-carbonyle |
| Bzl | Benzyle |
| CCAC | Comité canadien sur les soins aux animaux |
| CLHP | Chromatographie en phase liquide à haute performance |
| 2-Cl-Z | 2-chlorobenzoyloxy-carbonyle |
| Da | Dalton |
| DAG | Diacylglycérol |
| DC | Dichroïsme circulaire |
| DCM | Dichlorométhane |
| DIEA | Diisopropyléthylamine |
| DMF | N,N-diméthylformamide |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| DSC | Carbonate de dissucinimidyle |
| EDCF | <i>Endothelium derived constricting factors</i> |
| EDRF | <i>Endothelium derived relaxing factors</i> |
| ECE | Enzyme de conversion de l'endothéline |
| ET | Endothéline |
| Fmoc | 9-fluorénylméthoxy-carbonyle |
| For | Formyle |
| HF | Acide fluorhydrique |
| HMPA | Hexaméthylphosphoramide |
| IP ₃ | Inositolphosphate |

MALDI-TOF *Matrix assisted laser desorption ionization time of flight*

NEP Endopeptidase neutre

NO Oxyde nitrique

OcHex Ester de cyclohexyle

pBpa P-benzoylphénylalanine

PIP₂ Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

PLC Phospholipase C

RMN Résonance magnétique nucléaire

TFA Acide trifluoroacétique

THF Tétrahydrofurane

Introduction

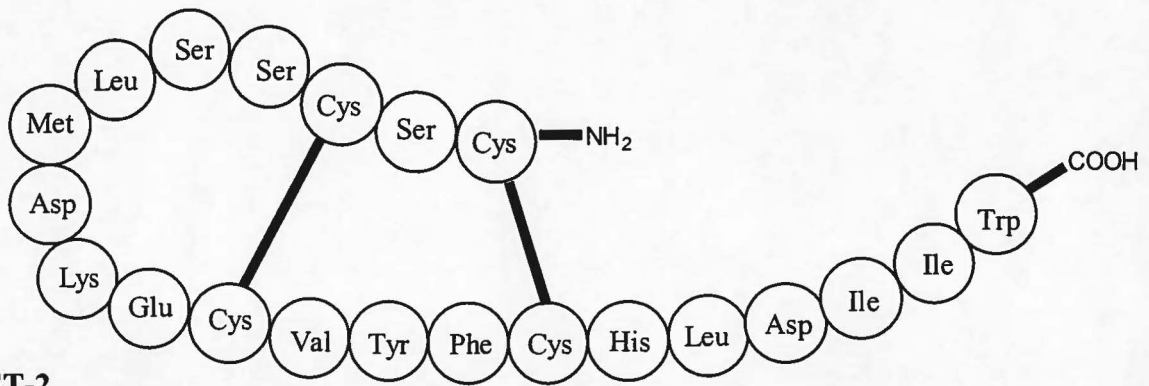
L'endothélium vasculaire a longtemps été considéré comme une simple barrière empêchant tout contact entre les cellules sanguines et la paroi des tissus vasculaires. Or, depuis une vingtaine d'années, plusieurs découvertes ont permis de révéler son importance au niveau physiologique. De nos jours, l'endothélium est considéré comme un tissu multifonctionnel jouant un rôle majeur dans l'homéostasie du système cardiovasculaire. En effet, il a été reconnu que l'endothélium vasculaire produit et libère des substances vasodilatatrices connues sous le nom de EDRF (Endothelium Derived Relaxing Factors) (Furchghott et Zawadski, 1980). Il a aussi été observé qu'un endothélium vasculaire intact est essentiel pour obtenir une vasoconstriction (Holden et McCall, 1984). De plus, au cours de la même année, O'Brien et McMurtry (1984) ont démontré que les cellules endothéliales en culture provoquaient une contraction des artères coronaires suggérant ainsi la libération par les cellules endothéliales d'une substance vasoconstrictrice nommée EDCF (Endothelium Derived Constricting Factor). Deux ans plus tard, il a été démontré que l'EDCF perd complètement son effet vasoconstricteur lors d'un traitement préalable à la trypsine, une protéase, suggérant ainsi que l'EDCF est de nature protéique (Gillespie et al., 1986).

La caractérisation complète d'un peptide vasoconstricteur dérivé de l'endothélium a été réalisée en 1988 par Yanagisawa et ses collègues (Yanagisawa et al., 1988). Ils ont démontré que le surnageant des cellules endothéliales d'aortes porcines en culture permettait une contraction des artères coronaires isolées de porc. Un peptide dérivé des cellules endothéliales a ensuite été purifié et séquencé. Ce peptide, originellement nommé endothéline porcine, est maintenant connu sous le nom de endothéline-1 (ET-1). ET-1 est un peptide de 21 acides aminés dont le poids moléculaire est de 2492 Da. Sa chaîne d'acides aminés est repliée et maintenue par deux ponts disulfures entre les Cys¹-Cys¹⁵ et Cys³-Cys¹¹. De plus, ses extrémités amino- et carboxy-terminales demeurent libres. Le pouvoir constricteur de ET-1 est d'une magnitude bien supérieure à celle de l'angiotensine II ou de la norépinéphrine, faisant ainsi de l'ET-1 un des plus puissants vasoconstricteurs connus jusqu'à ce jour, chez les mammifères (Yanagisawa et al., 1988).

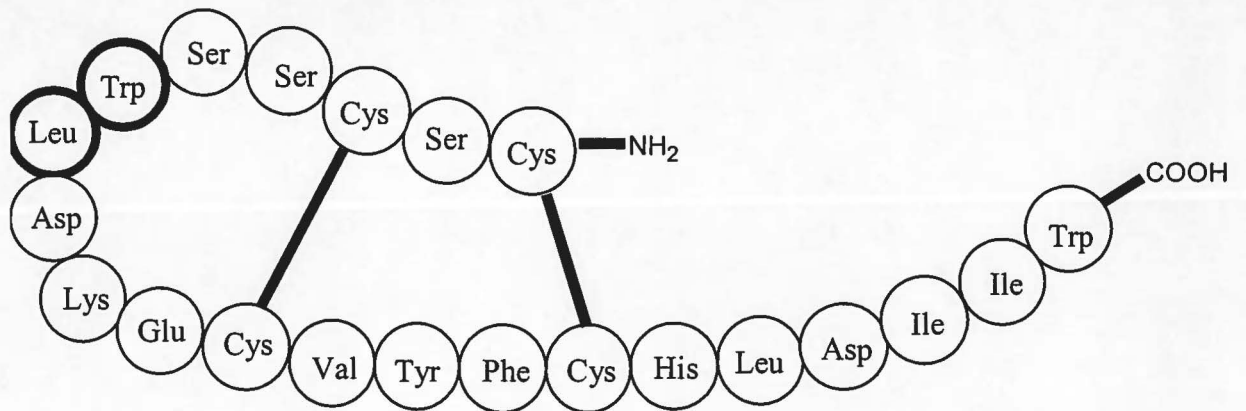
Depuis son isolation, il a été démontré que ET-1 est encodée dans le génome de plusieurs espèces de mammifères (Saida et al., 1989 ; Kimura et al., 1989 ; Yanagisawa et al., 1989). En effet, l'analyse du génome humain a révélé l'existence de trois gènes distincts encodant pour l'ET. Inoue et son équipe (1989) ont ainsi identifié une région encodant pour la même chaîne d'acides aminés que le peptide originellement isolé du surnageant de cellules endothéliales d'aorte de porc, soit l'ET-1. Les deux autres ont alors été nommés endothéline-2 (ET-2) et endothéline-3 (ET-3). Ces isoformes ne varient que très légèrement du peptide original. En effet, ET-2 n'a que deux acides aminés différents de ET-1 : [Trp⁶,Leu⁷]ET-1 ; et ET-3 en a six : [Thr²,Phe⁴,Thr⁵,Tyr⁶,Lys⁷,Tyr¹⁴]ET-1 (Figure 1).

L'étude de la biosynthèse des ETs a révélé une voie métabolique très similaire pour ces trois isopeptides (Figure 2). Leur synthèse est stimulée via différents facteurs tels que l'angiotensine II, l'insuline, la bradykinine, les cytokines et certains facteurs de croissance (Ferro et Webb, 1996). Les ETs sont synthétisées à partir de précurseurs connus sous le nom de préproendothélines formés de 160 à 238 acides aminés (Mateo et De Artinano, 1997). Ces protéines sont ensuite scindées entre les positions 51-52 et 92-93 par une convertase, la furine, en proendothélines de 37 à 41 acides aminés aussi appelées Big-endothélines (Denault et al., 1995). Finalement, les Big-ET sont scindées entre les résidus tryptophane et valine pour donner les peptides actifs ET-1 et ET-2, et entre les résidus tryptophane et isoleucine pour donner ET-3. Ce dernier clivage enzymatique implique une métalloendopeptidase spécifique appelée enzyme de conversion de l'endothéline (ECE). L'ECE est une métalloprotéase membranaire ayant la possibilité de se lier au zinc (Ahn et al., 1992 ; Shimada et al., 1994). Elle est inhibée par le phosphoramidon, un inhibiteur de métalloprotéase, mais non par le thiorphan, un inhibiteur des endopeptidases neutres (NEP) (D'Orléans-Juste et al., 1996). Trois isoformes de cette enzyme sont connues soit ECE-1 α , ECE-1 β et ECE-2. Des différences peuvent être observées au niveau de leur localisation cellulaire, leur structure moléculaire et leur affinité pour chacune des Big-ET (Mateo et De Artinano, 1997). Le pouvoir

ET-1



ET-2



ET-3

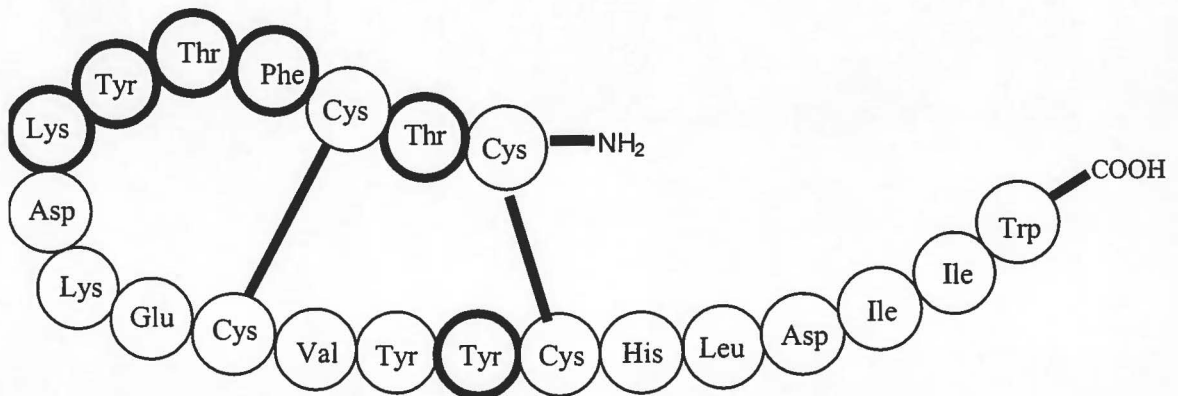


Figure 1 : Les trois isoformes de l'ET chez l'humain.

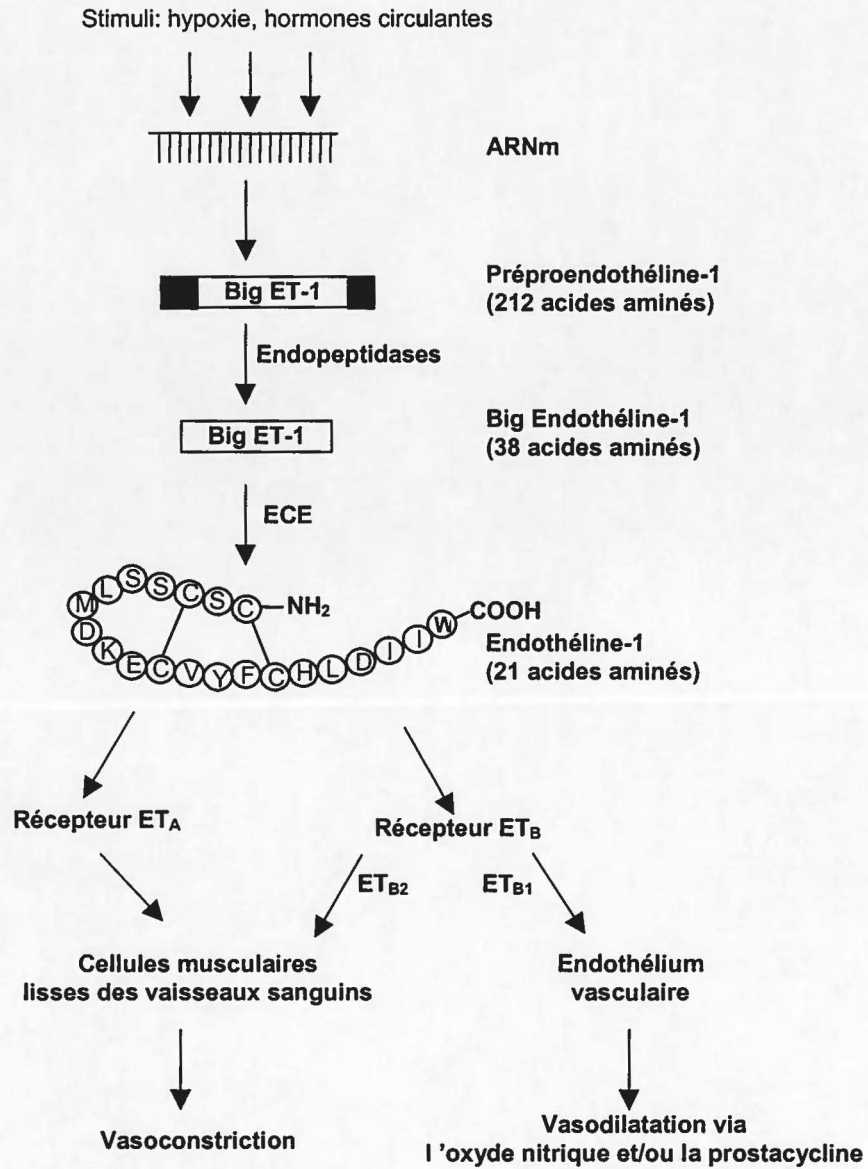


Figure 2: Biosynthèse et mécanisme d'action de l'ET-1 (Tiré de Ferro et Webb, 1996).

vasoconstricteur des Big-ET étant négligeable, leur conversion en ET s'avère alors essentielle pour l'obtention d'un effet constricteur *in vivo* (Kashiwabara et al., 1989).

L'ARNm de l'ET-1 est largement exprimé dans une variété de tissus de mammifères dont le cœur, les reins, le foie, le cerveau et le système nerveux. La grande distribution de l'ET et de ses récepteurs démontre que ce peptide participe aux fonctions d'une multitude d'organes (Tableau 1). Les propriétés physiologiques des ETs sont multiples suggérant une implication de celles-ci dans diverses pathologies dont l'hypertension, l'ischémie, l'infarctus du myocarde, l'asthme, l'arythmie et l'insuffisance rénale aiguë. C'est au niveau du système vasculaire que se retrouvent cependant les effets les plus dominants. Ainsi, lorsque l'ET est liée à son récepteur, un léger effet dilatateur est observé dû à une libération, au niveau de l'endothélium, d'oxyde nitrique (NO) (Palmer et al., 1987) et de prostacycline (PGI₂) (Moncada et al., 1976). Cette vasodilatation est suivie par une contraction longue et soutenue résultant d'une liaison ligand-récepteur quasi irréversible. En effet, l'élimination de l'ET de son récepteur est un phénomène très lent aux conditions physiologiques expliquant ainsi pourquoi ses effets constricteurs possèdent une très longue durée d'action, soit plus de soixante minutes.

Les actions causées par les ETs sont médiées via deux types de récepteurs. En effet, deux ans après la découverte de ces agents vasoconstricteurs, les gènes encodant pour leurs récepteurs ont été clonés et caractérisés. Ils sont connus sous les noms de récepteur ET_A et ET_B (Arai et al., 1990 ; Sakurai et al., 1990). Ces récepteurs sont localisés surtout dans les vaisseaux sanguins. Toutefois, leur présence a été signalée dans plusieurs tissus non-vasculaires tels que le cœur, la rate, les reins, les voies respiratoires, le foie, le pancréas, l'utérus, les glandes surrénales et le système nerveux central (Stjernquist, 1998). Dans le système vasculaire, le récepteur ET_A, composé de 427 acides aminés chez l'homme, se retrouve majoritairement à la surface des cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins pouvant ainsi provoquer leur contraction. ET-1 possède une affinité beaucoup plus forte pour le récepteur ET_A que ET-2 et ET-3 (ET-1 > ET-2 >> ET-3) (Figure 3).

Tableau I : Actions biologiques de l'ET (Doherty, 1992).

| Tissus ou organes cibles | Effets biologiques |
|--------------------------------|---|
| Muscles vasculaires lisses | <p>Constriction de longue durée des muscles vasculaires isolés.</p> <p>Actions mitogènes sur les cellules musculaires lisses en culture.</p> <p>Vasoconstriction des artères coronaires.</p> <p>Augmentation de la pression sanguine.</p> |
| Endothélium vasculaire | Libération d'oxyde nitrique. |
| Muscles lisses non-vasculaires | Constriction des muscles lisses de l'intestin, de la trachée et de l'utérus. |
| Cœur | <p>Augmentation de la contractilité.</p> <p>Augmentation du débit cardiaque.</p> <p>Stimulation de la libération d'ANP.</p> |
| Tissu nerveux | Augmentation de la libération de neurotransmetteurs. |
| Reins | <p>Inhibition de la libération de la rénine.</p> <p>Diminution du flux sanguin rénal.</p> <p>Diminution de la vitesse de filtration glomérulaire.</p> <p>Diminution de l'excrétion urinaire de Na⁺ et de K⁺.</p> |
| Glandes surrénales | <p>Stimulation de la biosynthèse de l'aldostérone.</p> <p>Libération de catécholamines.</p> |

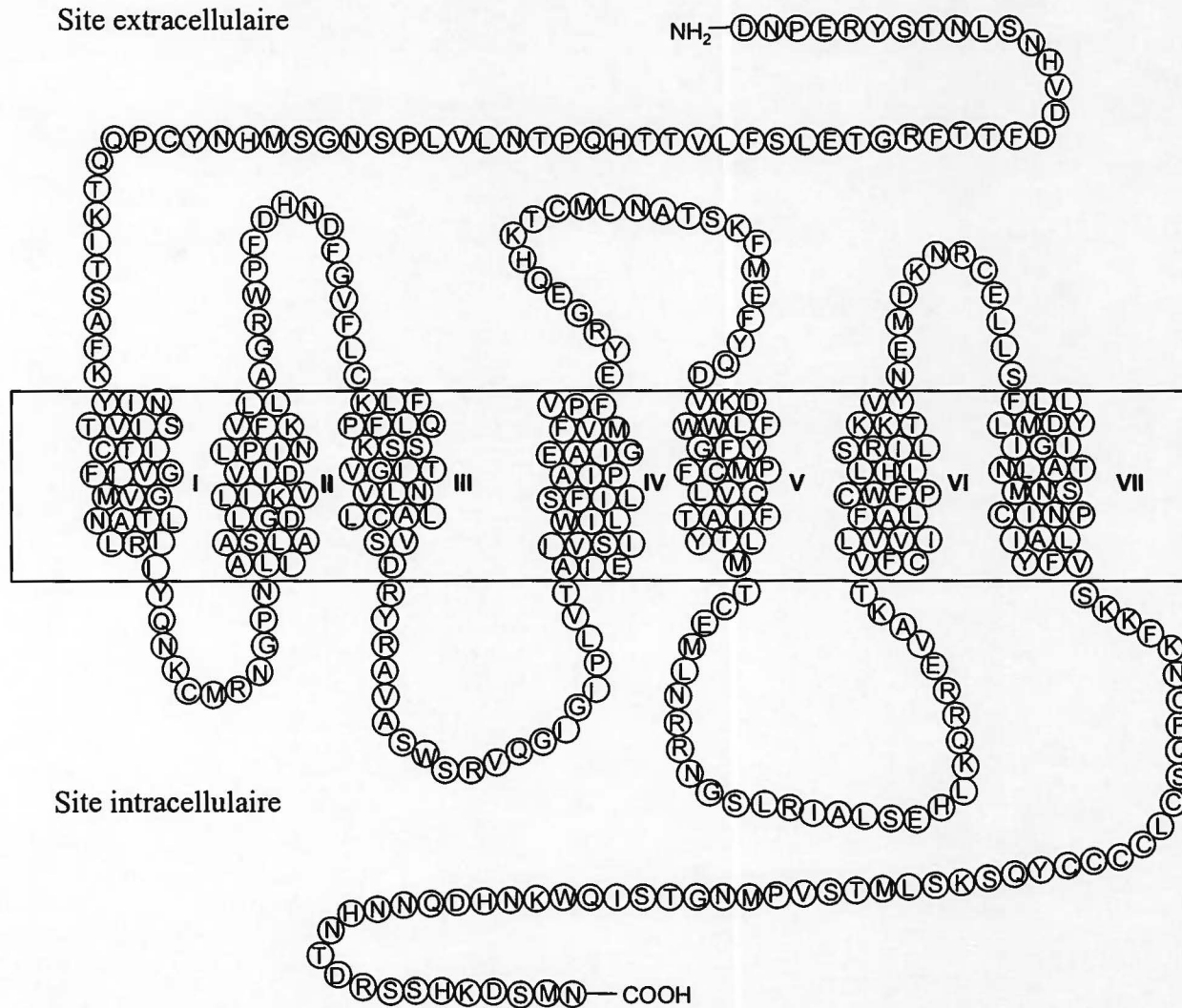


Figure 3 : La structure prédite du récepteur ET_A humain avec ses sept domaines transmembranaires (Tiré de Gray et Webb, 1996) (Voir Appendice A pour les abréviations des acides aminés).

En ce qui concerne le récepteur ET_B formé de 442 acides aminés chez l'humain, sa localisation se limite principalement à l'endothélium vasculaire où il peut induire la libération de EDRFs tels que l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline provoquant ainsi une vasodilatation (figure 4). Le récepteur ET_B , n'est aucunement sélectif liant ainsi ET-1, ET-2 et ET-3 avec une affinité similaire. Or, ce récepteur est aussi retrouvé dans le muscle vasculaire lisse où il peut induire une vasoconstriction. Pour différencier ces deux sous-types de récepteurs ET_B , on nomma ET_{B1} le récepteur retrouvé au niveau de l'endothélium et ET_{B2} , le récepteur localisé dans le muscle lisse vasculaire (Masaki et al., 1992). Un troisième récepteur de l'ET, nommé ET_C , a été retrouvé et cloné chez *Xenopus laevis*, une grenouille africaine. Ce récepteur, qui semble plutôt sélectif pour l'ET-3, n'a par contre pas encore été cloné dans le génome des mammifères (Karne et al., 1993). Les récepteurs de l'ET, couplés aux protéines G, sont formés d'une seule chaîne d'acides aminés comprenant sept domaines transmembranaires de 20 à 27 acides aminés hydrophobes chacun (Mateo et De Artinano, 1997).

Les nombreux effets produits par les récepteurs de l'ET sont causés par une cascade d'événements (Figure 5). Premièrement, le complexe récepteur-ET se lie à certaines protéines G activant ainsi la phospholipase C (PLC). Celle-ci à son tour hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP_2) en deux produits : l'inositolphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG). Ce phénomène entraînera la mobilisation du calcium cytoplasmique par l' IP_3 et l'activation de la protéine kinase C par le DAG. C'est par cette voie de signalisation cellulaire que l'ET produit les mécanismes contractiles (muscles) et sécrétoires (cellules endothéliales) (D'Orléans-Juste et al., 1996).

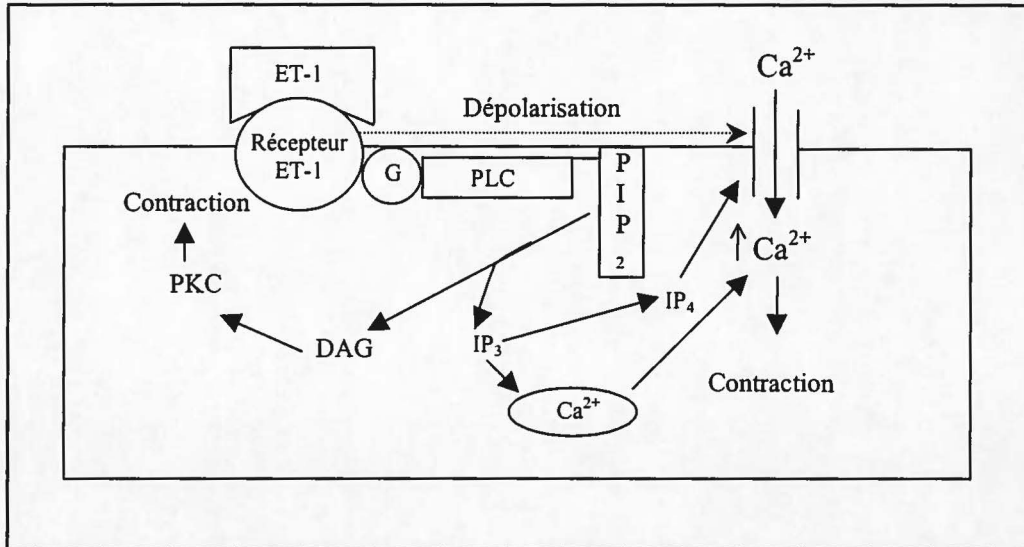


Figure 5 : Cascade d'événements intracellulaires de l'ET-1 sur les cellules musculaires lisses induisant leur contraction (Tiré de Mateo et De Artinano, 1997).

Cette cascade d'événements conduit à de nombreux effets biologiques (tableau I) qui en cas d'anomalies peuvent être à l'origine de certaines pathologies. Il est alors important de comprendre le mode d'action à l'échelle moléculaire de l'ET et de ses récepteurs. Plusieurs chercheurs se sont alors attardés à déterminer les domaines sur les récepteurs de l'ET qui sont essentiels à la liaison du peptide. Les régions extracellulaires en N-terminal des récepteurs couplés aux protéines G sont reconnues comme étant des domaines importants pour la liaison des ligands (Nagayama et al., 1991). Plus précisément, des études ont démontré que seuls les acides aminés de la partie N-terminal des récepteurs de l'ET qui sont à proximité du premier domaine transmembranaire sont essentiels à la liaison de l'ET (Hashido et al., 1991 ; Kozuka et al., 1991). Des études de modélisation moléculaire en association avec des études de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les acides aminés non conservés dans les récepteurs ET_A et ET_B qui peuvent être importants dans la sélectivité des ligands. Ces études ont démontré que la Tyr¹²⁹ (Krystek et al., 1994 ; Lee et al., 1994) et la Lys¹⁴⁰ (Adachi et al., 1994) dans le deuxième domaine transmembranaire du récepteur ET_A et la Lys¹⁸¹ dans le troisième domaine transmembranaire du récepteur ET_B (Zhu et al., 1992) sont des acides aminés importants pour la liaison de ET. Il a été proposé que les récepteurs de l'ET peuvent être divisés en

deux régions distinctes, une incluant les domaines transmembranaires I, II, III et VII qui serait impliquée dans la liaison du ligand à son récepteur et une autre région composée des domaines transmembranaires IV-VI qui serait responsable de la sélectivité du ligand (Sakamoto, 1993).

D'autre part, la structure tridimensionnelle que l'ET adopte dans l'espace joue évidemment un rôle majeur pour sa liaison avec le récepteur. Des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de dichroïsme circulaire (DC) ont montré que l'ET-1 forme une structure en hélice alpha impliquant les résidus 9 à 16 (Perkins, Hider et Barlow, 1990 ; Aumelas et al., 1991 ; Tam et al., 1994). Toutefois, des études de cristallographie décrivent différemment la structure de ce peptide. En effet, selon cette méthode, l'extrémité N-terminale formerait un feuillet plissé β suivi par un renflement entre les résidus 5 et 7, d'une boucle liée par un lien hydrogène entre les résidus 7 et 11, et d'une longue hélice irrégulière jusqu'en C-terminale (Wallace et Janes, 1995). Une structure définitive de l'ET-1 s'avère donc difficile à obtenir puisque sa conformation varie selon les études réalisées et les solvants utilisés (Wallace et Janes, 1995).

Par contre, il a été démontré par des études de structure-activité que les extrémités N- et C-terminales de l'ET doivent être libres pour induire une activité biologique (Nakajima et al., 1989). De plus, sa structure bicyclique serait essentielle pour sa liaison et son activité biologique sur le récepteur ET_A (Doherty, 1992). Plus précisément, le pont disulfure entre les cystéines 1 et 15 serait beaucoup plus important que celui entre les cystéines 3 et 11 puisque son ouverture donne un analogue dix fois moins puissant sur l'aorte de rat (tissu ET_A majoritaire) que lors du bris du pont disulfure 3-11 (Topouzis, Pelton et Miller, 1989). Cependant, la liaison et l'activité biologique via les récepteurs ET_B n'exigent aucunement la présence de ponts disulfures, tel qu'illustré par une activité biologique équipotente de l'analogue substitué tétra-alanyl [Ala^{1,3,11,15}]ET-1 versus le peptide original ET-1 (Randell, Douglas et Hiley, 1989). La liaison aux récepteurs ET_B requiert toutefois la chaîne d'acides aminés hydrophobes en C-terminal et notamment la présence du tryptophane en position 21 (Panek et al., 1992). De plus, des recherches menées dans notre laboratoire ont permis d'observer que le résidu tryptophane en position 21 de l'ET

n'altérerait aucunement l'activité biologique sur le récepteur ET_B même s'il était modifié par un groupe formyle sur le noyau indole de sa chaîne latérale (Germain et al., 1993, Forget et al., 1996).

Parmi les isoformes de l'ET, la région chargée Asp⁸-Lys⁹-Glu¹⁰, est hautement conservée. La substitution de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique par une alanine a montré que ces sites étaient sensibles aux modifications. En effet, il a été observé que [Ala⁸]ET-1 était 125 fois moins actif que l'ET-1, et que [Ala¹⁰]ET-1 n'était qu'un agoniste partiel. La charge négative de la fonction carboxylique aux positions 8 et 10 semble donc être critique pour l'activité de l'ET-1. La position 9 occupée par la lysine n'est toutefois pas aussi importante puisque la substitution de cet acide aminé par une alanine, une leucine ou un acide glutamique ne modifie en rien l'activité biologique de l'ET-1 (Pelton, 1997).

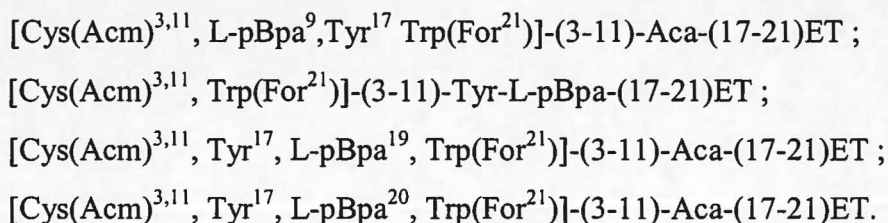
Le but principal des études de structure-activité de l'ET est de définir le rôle joué par chaque acide aminé dans la stabilité de la molécule entière et dans ses fonctions biologiques. Ces études permettent alors une meilleure compréhension des interactions de l'ET avec ses récepteurs pouvant même conduire à la création de nouveaux analogues de ce peptide. Mis à part les recherches sur l'importance des ponts disulfures, le tryptophane²¹ et les acides aminés chargés, des analyses par balayage au moyen de l'acide aminé alanine ont été effectuées par Tam et ses collègues. Ils ont alors découvert que les résidus Asp⁸, Tyr¹³, Phe¹⁴, Leu¹⁷ et Trp²¹ sont d'une importance majeure pour l'activité biologique de l'ET sur les récepteurs de type ET_A. La substitution des acides aminés aux positions 13, 14 et 21 par une alanine réduit considérablement la liaison des peptides, démontrant ainsi que ces résidus sont importants pour le contact avec le récepteur. Trois autres résidus Val¹², Asp¹⁸ et Ile²⁰, sont partiellement tolérants à la substitution par une alanine. Ces résultats démontrent ainsi l'importance des acides aminés hydrophobes, plus particulièrement des aromatiques, au niveau de la liaison et de l'activité de l'ET (Tam et al., 1994). Des résultats similaires présentés par l'équipe de Hunt suggèrent que les résidus 8, 13, 20 et 21 sont des sites importants pour la liaison au récepteur et que les résidus 10, 14, 17 et 18 sont responsables de son activation (1991).

Ainsi, par de nombreuses approches telles que les études de structure-activité, l'analyse mutationnelle ou la génération de récepteurs mutants comprenant des délétions, de nombreux chercheurs se sont intéressés à l'interaction entre l'ET et ses récepteurs. Par complémentarité aux études déjà entamées, la technique de photomarquage pourrait être utilisée. Cette méthode fournit une information directe de la surface de liaison en identifiant les points de contact précis entre les ligands et leurs récepteurs respectifs. Le principe de cette technique consiste à incorporer un radio-ligand photosensible spécifique à un récepteur de façon covalente. Les complexes ligand-récepteur ainsi formés peuvent être analysés par différentes méthodes biochimiques et soumis à différents traitements enzymatiques ou chimiques permettant d'identifier les composantes structurales de la protéine. Cette technique de marquage par photaffinité a déjà été utilisée par notre groupe afin de caractériser biochimiquement le récepteur NPR-A des peptides natriurétiques. Lors de ces études, un analogue photosensible du super-agoniste pBNP1 (Mimeault et al., 1993), le [N-alpha-p-benzoylbenzoyl, Tyr18]pBNP1, a permis d'obtenir un rendement élevé d'incorporation covalente (41%). Le photomarquage du récepteur NPR-A avec cette sonde a permis de lier spécifiquement et de façon covalente le récepteur monomérique NPR-A de 130 kDa (Coupal et al., 1999).

Dans le but de synthétiser des sondes photosensibles pour le photomarquage des récepteurs de l'ET, nous devons identifier des analogues de haute affinité pour le récepteur ET_A ou ET_B. Le TTA-386 (hexaméthylèneiminocarbonyle-Leu-trp-ala-βAla-Tyr-phe), un antagoniste compétitif de ET-1 et spécifique au récepteur ET_A, a été choisi comme gabarit de synthèse pour le développement de sondes photoactivables pour ce récepteur (Kitada, et al., 1993). En effet, ce peptide possède deux caractéristiques le rendant très intéressant pour notre recherche. Tout d'abord, c'est un peptide relativement court (six acides aminés) qui ne nécessite aucune cyclisation, rendant sa synthèse plus facile. De plus, c'est un antagoniste de haute affinité (K_d : 1nM) ayant déjà une tyrosine dans sa séquence pour l'iodation que nécessite le radiomarquage (Pullen, Brown et Nambi, 1997). Nous avons donc entrepris la synthèse peptidique sur phase solide de six analogues du TTA-386 dans lequel les résidus hydrophobes en position 1, 2 et 6 ont été

substitués à tour de rôle par le D- ou le L-p-benzoylphénylalanine (pBpa), un dérivé d'acide aminé photosensible (Kauer et al., 1986)(voir Appendice B).

En ce qui concerne le récepteur ET_B, nous avons utilisé comme molécule de départ un analogue à structure réduite de l'ET-1 qui avait préalablement été synthétisé dans notre laboratoire soit [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET (Forget et al., 1996). Ce peptide avait alors montré une activité agoniste sélective pour les récepteurs ET_B. Dans le cadre de nos travaux actuels, sa séquence a légèrement été modifiée pour incorporer le pBpa et la tyrosine, les deux résidus essentiels pour le photomarquage. Quatre analogues linéaires ont donc été synthétisés à partir de ce peptide (voir Appendice C):



Suite à la synthèse des sondes photosensibles spécifiques pour le récepteur ET_A ou le récepteur ET_B, une caractérisation pharmacologique de celles-ci a été effectuée. Des études biologiques sur des anneaux d'aorte de rat exprimant majoritairement le récepteur ET_A (Roux et al., 1997), ont permis de vérifier l'effet de la substitution sur l'activité antagoniste des sondes dérivées du TTA-386. De plus, des tests sur le parenchyme de poumon de cobaye produisant une réponse ET_{B-like} (Cardell et al., 1992 ; Takai et al., 1992) ont été effectués pour confirmer la sélectivité de ces peptides pour le récepteur ET_A. Les mêmes analyses pharmacologiques ont aussi été réalisées avec les sondes synthétisés pour le photomarquage du récepteur ET_B afin de déterminer leur sélectivité et leur activité biologique.

Matériel et Méthodes

1. Synthèse des sondes peptidiques

1.1 Réactifs et solvants utilisés

Des billes de résine de polystyrène ponté avec 1% de divinylbenzène et fonctionnalisé, au niveau des noyaux phényles, par des groupements chlorométhyles (1,2még/g de résine) ont été utilisées pour effectuer les synthèses peptidiques. Cette résine dite de Merrifield (Merrifield,1963) a été obtenue de Bio-Rad (Richmond,CA,USA). La fonction amine alpha de tous les acides aminés utilisés était protégée par le groupe tert-butylloxycarbonyle (Boc). L-Tyr(2-Br-Z), L-Leu, D-Trp, L-Leu, L-Glu(OBzl), L-Lys(2-Cl-Z) et l'acide ϵ -aminocaproïque (Aca) provenaient de Richelieu Biotechnologies (Montréal,QC,CDN). D-Ala, L- β Ala, L-Cys(Acm) et D-Phe ont été obtenus de Chem-Impex International (Wood Dale,IL,USA). L-pBpa et D-pBpa ont été achetés chez Advanced Chem Tech (Louisville,KY,USA). L-Trp(For) et L-Ser(Bzl) provenaient de Bachem California (Torrance,CA,USA). Asp(OcHex), L-Met et L-Ile ont été obtenus de Propeptide (Vert-le-Petit,FR). Le réactif de couplage utilisé était l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium (BOP). Il provenait de chez Quantum Biotechnologies (Montréal,QC,CDN). Le dichlorométhane (DCM) et le diméthylformamide (DMF), chacun de qualité ACS, le méthanol, le toluène, l'iodure de potassium, le chlorure de sodium, l'éther éthylique et l'acétonitrile (ACN) provenaient de chez Fisher Scientific (Ottawa,ON,CDN). L'éthanol absolu, l'acétate d'ammonium, le carbonate de sodium, l'acétate d'éthyle, le sulfate de magnésium et le chloroforme ont été achetés chez Anachemia Canada Inc. (Montréal,QC,CDN). Le carbonate de césium, la diisopropyléthylamine (DIEA), le diméthylsulfure, le m-crésol, le tétrahydrofurane, l'homopipéridine, la triéthylamine, le carbonyldiimidazole, le chloroformate de 4-nitrophényle et le carbonate de disuccinimidyle ont été achetés chez Aldrich Chemical Company Inc. (Milwaukee,WI,USA). Le phosgène a été obtenu de Fluka Chemica (Georgetown,ON,CDN). L'acide trifluoroacétique (TFA) Biograde provenait de Halocarbon Products Corporation (River Edge,NJ,USA). L'azote liquide a été obtenu de

Air Liquide (Montréal, QC, CDN). Finalement, l'acide fluorhydrique (HF) a été acheté de Matheson Gas Products Inc. (Ottawa, ON, CDN).

1.2 Choix de la méthode chimique de synthèse

La technique de synthèse peptidique sur phase solide a été développée au Rockefeller Institute de New York par Bruce Merrifield (Merrifield, 1963). Le principe de cette technique consiste à assembler, un à la suite de l'autre, les acides aminés d'un peptide après le retrait du groupement protégeant leur fonction amine en alpha, et ce, pendant que l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique est attachée par un lien covalent à un support insoluble. À la fin de la synthèse, la fonction N-terminale du dernier acide aminé de la chaîne est débarrassée de son groupement protecteur et le peptide est clivé du support solide. Cette méthode permet alors de synthétiser des peptides avec les extrémités N- et C-terminales libres. La synthèse peptidique sur phase solide possède d'ailleurs plusieurs avantages au niveau technique par rapport à la synthèse en phase liquide. En effet, elle permet d'obtenir plus rapidement des peptides dont les chaînes d'acides aminés sont relativement longues tel que l'ET-1. De plus, elle permet l'utilisation d'excès de réactifs dont on peut se débarrasser facilement par filtration et ainsi obtenir des couplages avec, généralement, un rendement quasi parfait à chaque addition d'un acide aminé. Cette méthode facilite d'ailleurs le changement des solvants et simplifie l'isolation des peptides de leur support solide. Par conséquent, pour toutes ces raisons, la technique de synthèse peptidique sur phase solide a été utilisée pour synthétiser les analogues de l'ET-1.

L'amine alpha des acides aminés utilisés lors de la synthèse peptidique peut être protégé soit par le groupement Boc (t-butyloxycarbonyle) ou Fmoc (fluorènylméthyl-oxycarbonyle). Ces deux groupements protecteurs nécessitent alors un traitement différent du peptide-résine lors de la synthèse. En effet, le groupement protecteur Boc qui est labile en milieu acide, peut être enlevé par le TFA et le clivage du peptide de son support solide se fait alors en présence d'un acide beaucoup plus fort soit l'acide fluorhydrique (HF). Or, la déprotection d'un acide aminé protégé par un groupe Fmoc nécessite plutôt un traitement basique avec de la pipéridine alors que le clivage du peptide

de son support solide s'effectue en milieu acide au moyen du TFA. Étant donné que le pBpa (acide aminé photosensible) dont nous disposions était protégé en N-alpha par le groupement Boc, nous avons alors privilégié la chimie Boc pour synthétiser nos sondes photosensibles (voir Appendice D).

1.3 Choix des groupements protégeant les chaînes latérales des acides aminés

Lors de la synthèse peptidique, certains acides aminés possédaient en plus du Boc sur leur fonction alpha aminée, un groupement protecteur sur leur chaîne latérale afin de minimiser les risques de réactions secondaires et d'empêcher que les acides aminés activés n'aillent s'y lier. Un plan de protection orthogonale a alors été utilisé. La labilité des groupements protecteurs étant variable, leur retrait est, par conséquent, effectué dans des conditions différentes assurant ainsi une spécificité réactionnelle.

Les acides aminés ayant une chaîne latérale aliphatique ne nécessitent aucun groupement protecteur autre que le groupe Boc sur l'amine alpha. Par conséquent, pour la synthèse des sondes photosensibles, l'alanine, la leucine et l'isoleucine ont été incorporées sans protection sur leur chaîne latérale tout comme les acides aminés aromatiques phénylalanine et pBpa. La méthionine a aussi été utilisée sans protection de sa chaîne latérale. Il est toutefois possible que cette dernière subisse une oxydation amenant la formation d'un sulfoxyde, mais cette réaction secondaire est réversible à l'aide d'un réducteur tel que le NaBH_4 .

En ce qui concerne la lysine, celle-ci possède un groupe aminé sur sa chaîne latérale. Ce groupe est protégé par le 2-chlorobenzyleoxycarbonyle afin de s'assurer que l'élongation de la chaîne peptidique n'ait lieu que sur l'amine alpha de la lysine et non sur l'amine epsilon de sa chaîne latérale.

Quant à l'acide aspartique et l'acide glutamique qui possèdent une deuxième fonction acide sur leur chaîne latérale, ceux-ci sont protégés respectivement par l'ester de

cyclohexyle et l'ester de benzyle. Ces groupements évitent ainsi la lactamisation de ces résidus qui mettrait fin prématurément à la croissance de la chaîne peptidique.

Afin d'éviter une acylation des dérivés sérine et tyrosine pouvant se produire en présence d'un excès de réactif de couplage, les groupes benzyle et bromobenzoyloxycarbonyl ont été utilisés pour protéger le groupement hydroxyle retrouvé sur la chaîne latérale de ces deux résidus.

Comme mentionné précédemment, le groupement Boc protégeant la fonction amine en alpha des acides aminés peut être éliminé au moyen d'un traitement acide avec le TFA. Les groupements protecteurs des chaînes latérales sont pour leur part retirés en présence d'un acide plus fort soit le HF, lors du clivage du peptide de la résine. Il existe toutefois des groupements protecteurs qui sont résistants aux acides. Par exemple, l'acide aminé tryptophane doit porter un groupement formyle afin de protéger son noyau indole contre l'oxydation pouvant survenir suite à une attaque par un carbocation lors du clivage par exemple (voir Appendice D). Ce groupement protecteur est résistant au HF et il ne peut être retiré que par un traitement basique avec un nucléophile comme la pipéridine. De plus, les résidus cystéines sont protégés afin d'éviter la formation de ponts disulfures qui pourraient se combiner aléatoirement lors de la synthèse peptidique. Ils sont alors protégés par le groupement acétamidométhyle (Acm) qui est stable aux conditions de clivage du peptide de la résine. Une étape supplémentaire suite au clivage du peptide permet alors, à l'aide d'une oxydation à l'iode, de déprotéger les groupes thiols des cystéines et de former les ponts disulfures. Cette différence de stabilité des groupements protecteurs nous a ainsi permis de garder les groupes Acm sur les cystéines et de produire des peptides linéaires (voir Appendice D).

1.4 Choix du support solide

L'extrémité carboxy-terminale des sondes photosensibles désirées étant libre, nous devons utiliser une résine qui permet d'obtenir un peptide acide. Le principal type de résine utilisé en chimie Boc pour la synthèse de ce genre de peptide est la résine de

Merrifield (Barany et Merrifield, 1980) (voir Appendice D). Cette résine permet alors d'obtenir, suite à son clivage, un peptide avec un groupement carboxy-terminal libre. Elle consiste en un polymère de styrène ponté avec des groupements divinylbenzènes, auxquels sont attachés des groupes chlorométhylés. Cette résine est utilisée depuis plus de vingt ans pour la synthèse peptidique utilisant la chimie Boc.

1.5 Fixation du premier acide aminé sur la résine

Dans le but de fixer le premier acide aminé sur la résine chlorométhylée, un sel de césium avec notre résidu en C-terminal du peptide doit être préparé (Gisin, 1973; Wang et al., 1977). L'utilisation du césium plutôt qu'un autre dérivé alcalin tel que le sodium, le potassium ou le lithium donne de meilleurs rendements de substitutions sur la résine. En effet, même s'il présente la même charge positive que les ions Na^+ , K^+ et Li^+ , le Cs^+ possède un rayon atomique plus important diminuant ainsi sa densité de charge, donc sa polarité. Cette caractéristique lui permet ainsi de pénétrer plus facilement le réseau hydrophobe des billes de résine formé par la co-polymérisation de styrène et de divinylbenzène. Par conséquent, le sel de césium permet un rendement plus important du taux de substitution du premier acide aminé sur les groupes chlorométhylés de la résine polymérique. Le sel de césium a été formé en dissolvant le Boc-acide aminé (3 équivalents pour 1 équivalent de sites chlorométhylés sur la résine) dans un mélange éthanol : eau (4:1). Il a ensuite été titré avec une solution de $\text{Cs}^+\text{HCO}_3^-$ 2M jusqu'à pH7. La solution a été évaporée à sec et le sel obtenu a été dissous dans du DMF en présence de 100mg de KI par gramme de résine utilisée. La résine a ensuite été ajoutée et le mélange agité à 50°C pendant 24 heures. La résine couplée à l'acide aminé a ensuite été filtrée et lavée plusieurs fois avec du DMF, du méthanol et du DCM. Elle a ensuite été séchée au dessiccateur sous vide au moyen d'une pompe mécanique.

1.6 Test à l'acide picrique

Afin d'évaluer le degré de substitution de l'acide aminé sur la résine, nous avons par la suite procédé au test picrique (Gisin, 1972). Pour ce faire, 20mg de résine sèche ont été pesés précisément et introduits dans une colonne avec robinet munie d'un filtre en laine de verre. La première étape a été de déprotéger l'amine en alpha de l'acide aminé i.e. enlever le groupe Boc. La résine a tout d'abord été lavée trois fois avec 4mL de DCM et une fois avec 4mL de TFA 40% dans le DCM. Ensuite un autre 4mL de TFA 40%/DCM a été ajouté dans l'ampoule pour vingt minutes. La deuxième étape du protocole consiste à retirer la solution de TFA et à laver puis neutraliser l'acide aminé-résine. Pour ce faire, le protocole suivant a été appliqué : lavage avec 1x 4mL de TFA 40%/DCM, 5x 3mL de DCM, 2x 4mL DCM :dioxane (1 :1), 4x 3mL de DCM et 2x 4mL DIEA 5% dans le DCM. Par la suite, 4mL de DIEA 5%/DCM ont été ajoutés à la colonne pour 5 minutes. La troisième étape a été celle de la formation du complexe entre l'acide picrique et l'amine libre de l'acide aminé. La résine a alors été lavée avec 5 x 3mL de DCM et 1 x 4mL d'acide picrique 0,05M/DCM. Un autre 4mL d'acide picrique 0,05M/DCM a ensuite été ajouté pour 10 minutes. Il a fallu par la suite enlever l'excès d'acide picrique par une série de lavages : 4x 3mL de DCM, 4x 3mL d'éthanol absolu et 4x 3mL de DCM. Finalement, un volume de 10mL de DIEA 5%/DCM a été ajouté dans l'ampoule afin de déplacer l'acide picrique lié à l'amine alpha de l'acide aminé et de former un complexe stable entre l'acide et le DIEA. Ce complexe soluble est recueilli dans une fiole jaugée de 100mL. La résine a alors été lavée à l'aide d'éthanol absolu jusqu'à disparition de la couleur jaune et ce filtrat a été recueilli. Le volume de filtrat recueilli dans la fiole jaugée a été complété à 100mL avec de l'éthanol absolu. L'absorbance de la solution a ensuite été mesurée à 358nm, au moyen d'un spectrophotomètre de marque LKB Biochrom Novaspec. À l'aide de la formule suivante, dérivée de la formule de Beer-Lambert ($A = \epsilon cd$), le taux de substitution de la résine peut être facilement calculé:

$$\text{Substitution (mmol/g)} = \frac{\text{Absorbance} \times 1000 \times 10 \times 10}{16250 \times \text{poids pesé de la résine (mg)}}$$

1.7 Protocole de couplage des autres acides aminés

L'addition des acides aminés subséquents a été effectuée à l'aide d'un synthétiseur manuel à multiréacteurs permettant la synthèse simultanée de six peptides. La méthode d'élongation des peptides avec le réactif BOP a été décrite précédemment par les membres de notre équipe (Forest et al., 1990) (voir Appendice D). Le cycle de couplage des acides aminés se compose de plusieurs étapes soit la déprotection, la neutralisation, le couplage, les lavages et le *monitoring* (Tableau II). La première étape consiste à enlever le groupement protecteur Boc sur l'amine alpha de l'acide aminé. Pour ce faire, un mélange 40%TFA, 0,5%CH₃CH₂SH/DCM est ajouté dans les réacteurs pour une période de 5 minutes, suivi d'un autre traitement avec la même solution pendant 20 minutes à raison de 10mL/g de résine. La résine est alors agitée sous azote et, à la fin de la réaction, la solution est drainée à l'aide d'une pression d'azote. L'éthanethiol retrouvé dans la solution de TFA permet de protéger les résidus sensibles à l'oxydation et l'alkylation comme le tryptophane et la méthionine. Suite à la déprotection de l'acide aminé, l'amine libre obtenue est chargée positivement puisqu'elle est en condition acide. Une série de lavages au DCM, EtOH, DIEA 1%/DMF et DMF sont ensuite effectués pour éliminer le TFA résiduel. L'extrémité N-terminale du peptide est du même coup neutralisée par le DIEA, une base dont le pKa est largement supérieur à celui de l'amine alpha de l'acide aminé. L'amine libre est alors prête pour le couplage du prochain acide aminé. Les réactifs de couplage sont toujours utilisés en excès pour s'assurer de l'efficacité de la réaction. C'est ainsi que 3 équivalents de Boc-acide aminé et 3 équivalents de BOP sont dissous dans un volume minimal de DMF avant d'être ajoutés dans les réacteurs. De plus, 5 équivalents de DIEA sont aussi ajoutés dans les réacteurs. Cet amine tertiaire permet alors d'arracher le proton de la fonction carboxylique de l'acide aminé à coupler en plus de neutraliser tous groupes ammonium résiduels encore possiblement présents en position N-terminale de la chaîne peptidique croissante. Après le couplage, une série de lavages au DMF et au DCM permettent d'éliminer les sous-produits de la réaction ainsi que les excès de réactifs. Pour vérifier si le couplage a bel et bien eu lieu, un test Kaiser est effectué sur un aliquot de peptide-résine. Ce test qualitatif, qui est à base de ninhydrine, permet

d'évaluer la présence d'amines libres (Kaiser et al., 1970). Lorsqu'aucune amine libre n'est détectée, le cycle de synthèse est répété jusqu'à l'assemblage complet du peptide.

Lorsque la synthèse du peptide est terminée, une déprotection finale à l'aide de TFA permet d'enlever le groupement protecteur Boc de l'acide aminé N-terminal. Les peptides-résines sont ensuite retirés des réacteurs et lavés abondamment au DMF, au DCM et finalement au méthanol avant d'être séchés sous vide. La synthèse des dérivés du TTA-386 nécessite toutefois une étape supplémentaire afin de faire l'ajout du cycle urée. Dans ce cas, les peptides sont déprotégés au TFA, lavés au DCM, au DMF et gardés dans le DCM jusqu'à la prochaine étape.

1.8 Addition du cycle urée sur les dérivés du TTA-386

Lors de l'ajout du cycle urée en position N-terminal des analogues du TTA-386, nous avons rencontré quelques difficultés. L'essai de nombreuses réactions chimiques ont été nécessaires avant de trouver celle qui permettait l'addition du cycle urée.

1.8.1 Préparation du premier réactif utilisant le chloroformate de p-nitrophénoxyde

Pour synthétiser le premier réactif, de l'hexaméthylèneimine et de la triéthylamine (1:2) ont été ajoutées à du tétrahydrofurane sec. Le mélange, agité mécaniquement, a ensuite été placé sous argon et refroidi à 0°C. Par la suite, 1,02 équivalent de chloroformate de p-nitrophénoxyde a été ajouté lentement au mélange. Une fois l'addition du chloroformate complétée, le bain de glace a été retiré et la réaction s'est déroulée à température ambiante jusqu'à la disparition de l'amine de départ vérifiée par chromatographie sur couche mince (CCM). Au mélange réactionnel, nous avons ensuite ajouté trois fois son volume d'une solution saturée de NaHCO₃ aqueux. Le produit a été extrait trois fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques ont ensuite été combinées et lavées une fois avec la solution saturée de NaHCO₃ et une autre fois avec de la saumure. Suite au lavage, la phase organique a été séchée avec du sulfate de magnésium anhydre, filtrée, évaporée

et séchée sous vide. Afin d'ajouter le cycle urée en position N-terminale des peptides, ceux-ci furent déprotégés à l'aide du TFA, comme décrit dans la section 1.7. Le réactif dissous dans du DMF a ensuite été ajouté dans les réacteurs en présence de DIEA à raison de 3 et 4,5 équivalents respectivement. La résine a alors été agitée sous azote pendant 24 heures en présence du réactif. Finalement, la résine a été lavée au DMF et au DCM (Figure 6).

1.8.2 Préparation du deuxième réactif utilisant le carbonate de dissuccinimidyle (DSC)

Le DSC a été dissous (1,2 équivalent) dans un volume restreint d'ACN. Un équivalent d'hexaméthylèneimine ainsi que 2,3 équivalents de triéthylamine ont été additionnés à la solution. Le mélange a été agité à température ambiante et la réaction a été poursuivie jusqu'à la disparition de l'amine de départ comme vérifiée par CCM, soit approximativement 24 heures dans nos conditions. Le mélange réactionnel a ensuite été évaporé. Le résidu a été dilué dans une solution de NaHCO_3 et extrait deux fois à l'aide d'acétate d'éthyle. Les phases organiques ont été combinées et lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl . Suite aux lavages, la phase organique a été séchée avec du sulfate de magnésium anhydre, filtrée, évaporée et séchée sous vide. Le réactif dissous dans du DCM a ensuite été mis en présence des peptides-résines déjà déprotégés à raison de 3 équivalents par réacteur. De plus, un équivalent de triéthylamine a été ajouté dans les réacteurs avant de laisser réagir pendant 24 heures. Finalement, la résine a été lavée au DMF et au DCM (Figure 7).

Tableau II : Protocole employé pour le couplage d'un acide aminé en chimie Boc.

| ÉTAPE | RÉACTIFS ^a | TEMPS DE RÉACTION (minutes) |
|-----------------------------|--|--------------------------------|
| Déprotection | 40%TFA, 0,5%CH ₃ CH ₂ SH/DCM | 1 x 5 |
| Déprotection | 40%TFA, 0,5%CH ₃ CH ₂ SH/DCM | 1 x 20 |
| Lavage | DCM | 2 x 2 |
| Lavage | CH ₃ CH ₂ OH | 1 x 2 |
| Lavage | DCM | 1 x 2 |
| Lavage ^b | DMF 1%/DIEA | 1 x 2 |
| Lavage | DMF | 1 x 2 |
| Couplage | 3éq de Boc-AA-COOH 3éq de BOP 5éq de DIEA | 1 x 45 ^c |
| Lavage | DMF | 2 x 2 |
| Lavage ^d | DCM | 2 x 2 |
| Vérification du couplage | Ninhydrine (Test Kaiser) | 1 x 5 |

^a Les volumes de solvant utilisés à chaque étape d'un couplage sont d'environ 10mL/g de résine.

^b L'étape de lavage avec le DIEA est omise lorsque le dernier acide aminé couplé est l'acide glutamique.

^c Le temps de couplage d'un acide aminé peut dépasser 45 minutes si le test Kaiser confirme la présence d'amines libres.

^d Entre les couplages, les peptides-résines sont conservés dans le DCM.

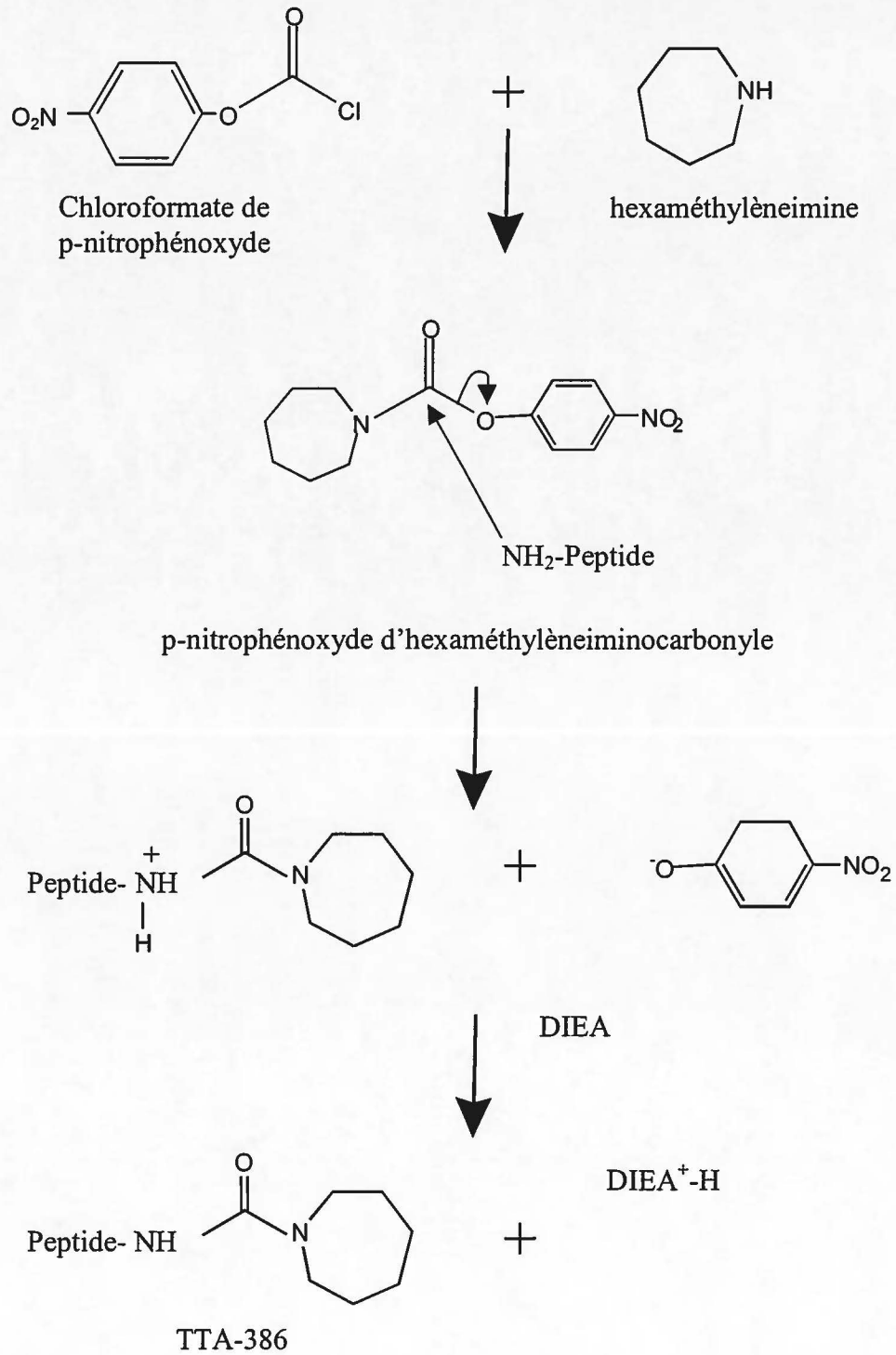


Figure 6 : Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le chloroformate de p-nitrophénoxyde.

1.8.3 Préparation du troisième réactif utilisant le carbonyldiimidazole

Dans des conditions anhydres, l'hexaméthylèneimine et le carbonyldiimidazole (1:1,2) ont été ajoutés à une solution de THF contenant 2 équivalents de triéthylamine. Le mélange a ensuite été agité à température ambiante jusqu'à la disparition de l'amine de départ vérifiée par CCM, soit 2 heures. Le mélange réactionnel a ensuite été évaporé. Le résidu a été dilué dans une solution de NaHCO₃ et extrait deux fois à l'aide d'acétate d'éthyle. Les phases organiques ont été combinées et lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl. Suite au lavage, la phase organique a été séchée avec du sulfate de magnésium anhydre, filtrée, évaporée et séchée sous vide. Le réactif dissous dans du DCM (6 éq) a ensuite été mis en présence des peptides-résines déprotégés, transférés préalablement dans des erlenmeyers. Aussi, 1,1 équivalent de triéthylamine a été ajouté avant de laisser réagir sous argon pendant 24 heures à 50°C avec agitation continue. Finalement, la résine a été lavée au DMF et au DCM (Figure 8).

1.8.4 Préparation du quatrième réactif utilisant le phosgène

La solution de phosgène a été diluée dans du toluène sec afin d'obtenir quatre équivalents de réactif par rapport au taux de substitution de la résine. Une fois ce mélange bien refroidi à 0°C, l'homopipéridine dissous dans du toluène y a été ajoutée goutte à goutte (4 équivalents). Lorsque l'homopipéridine a complètement été ajoutée, la solution a été agitée pendant 3 heures à reflux. À la fin de la réaction, du DCM a été rajouté au mélange pour qu'il redevienne relativement clair. La solution contenant le réactif ainsi qu'une solution 20% triéthylamine/DCM a ensuite été ajoutée aux peptides-résines déprotégés. La réaction de couplage s'est effectuée à 50°C sous agitation continue pendant 24 heures. Finalement, les résines ont été lavées au DMF et au DCM (Figure 9).

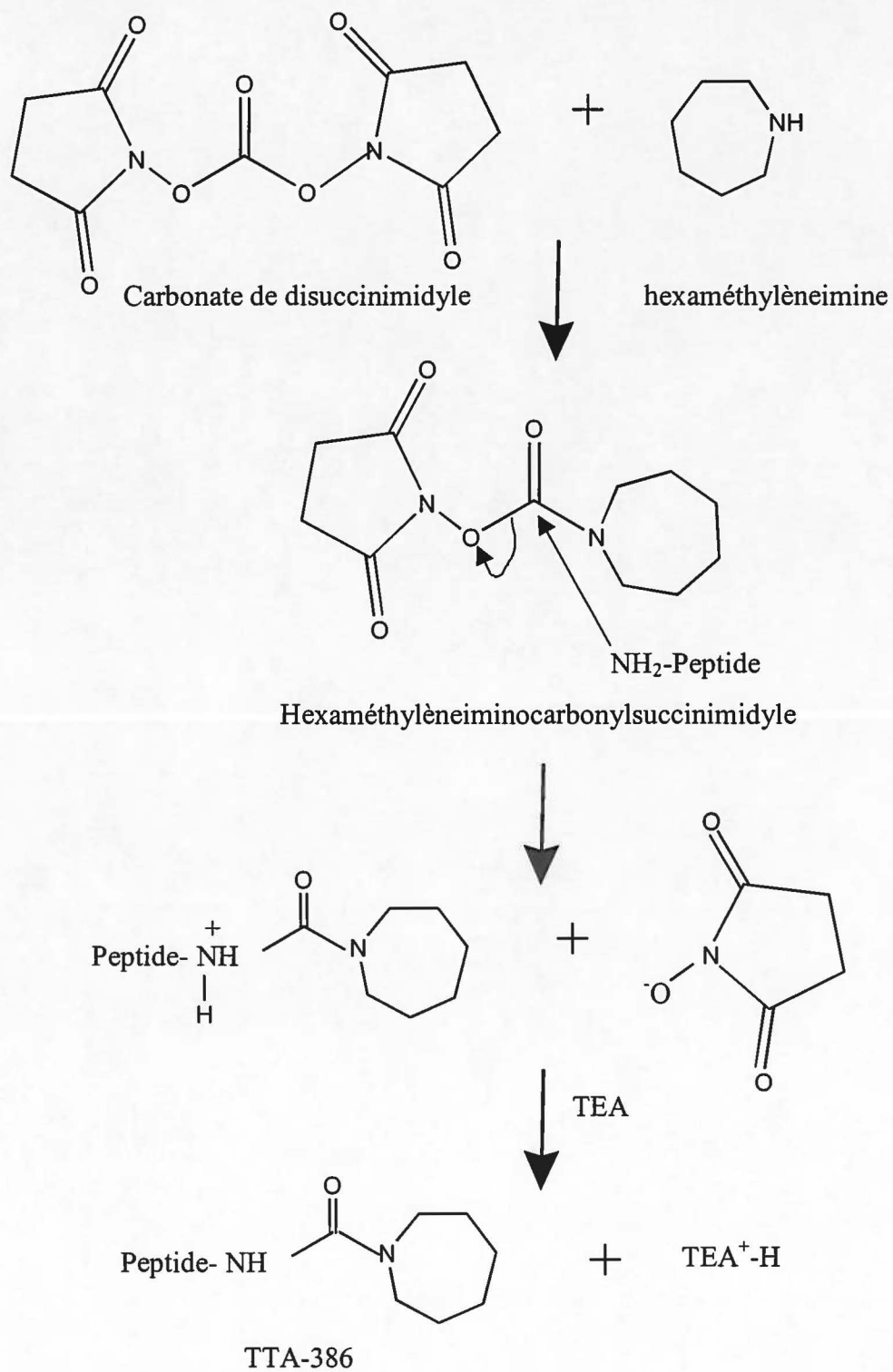


Figure 7 : Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le carbonate de disuccinimidyle.

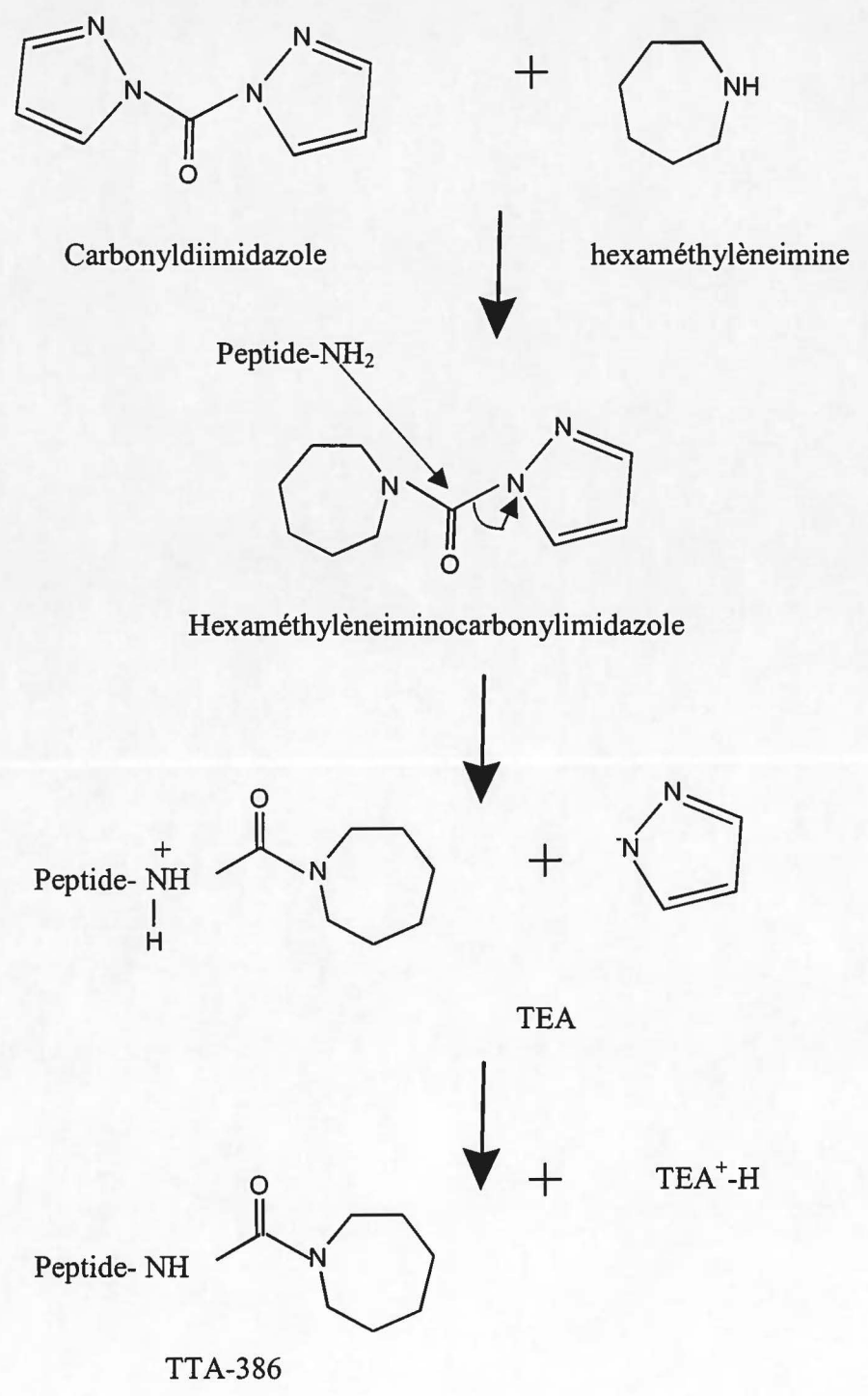


Figure 8 : Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le carbonyldiimidazole.

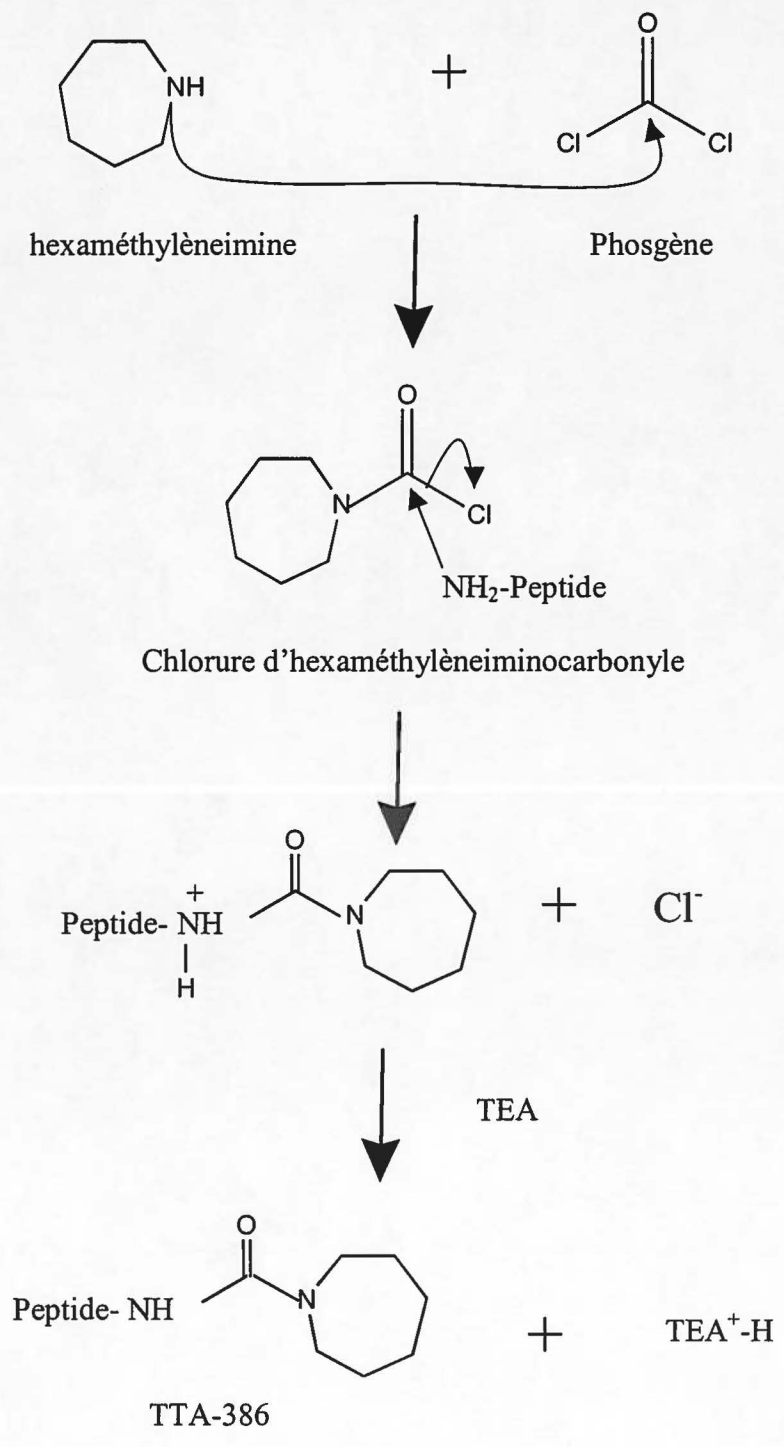


Figure 9 : Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le phosgène.

1.8.5 Second protocole pour l'addition du cycle avec le chloroformate de 4-nitrophényle

Suite à la déprotection et à la neutralisation des peptides comme décrit à la section 1.7, les résines ont été lavées trois fois avec du THF : DCM (1 :1). Le chloroformate de 4-nitrophényle dilué dans du THF :DCM (1 :1) a ensuite été rajouté dans chaque réacteur afin d'avoir un excès de 10 de ce réactif par rapport au taux de substitution de la résine. De plus, un équivalent de DIEA a aussi été ajouté. La résine a alors été agitée sous azote en présence du réactif. Vingt-quatre heures plus tard, la résine a été lavée trois fois au DCM et trois fois au DMF. Une solution de 20% homopipéridine/DMF a ensuite été ajoutée dans chaque réacteur pour deux heures. Les résines ont été lavées trois fois au DMF et une solution fraîche de 20% homopipéridine/DMF a ensuite été introduite dans chaque réacteur pour 24 heures. Le lendemain, les résines ont été lavées abondamment au DMF, à l'éthanol, au DCM, et à l'éther avant d'être mises au dessiccateur pour sécher (Bunin B, 1998) (Figure 10).

1.9 Clivage à l'acide fluorhydrique (HF)

Une fois les peptides synthétisés en entier, l'étape subséquente a consisté à les séparer de leur support solide. Pour ce faire, l'acide fluorhydrique, qui est un acide plus fort que le TFA a été utilisé. Le HF ne permet pas seulement de cliver les peptides du support solide mais permet aussi de retirer plusieurs groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés tels que OcHex, OBzl, 2-Cl-Z, Bzl et 2-Br-Z. Toutefois, les groupements Acm sur les résidus cystéines ne sont pas retirés lors du clivage au HF permettant ainsi d'éviter la formation de ponts disulfures aléatoires. De plus, le groupement formyle sur le noyau indole du tryptophane est aussi résistant au HF le protégeant ainsi contre une oxydation ou une alkylation possible.

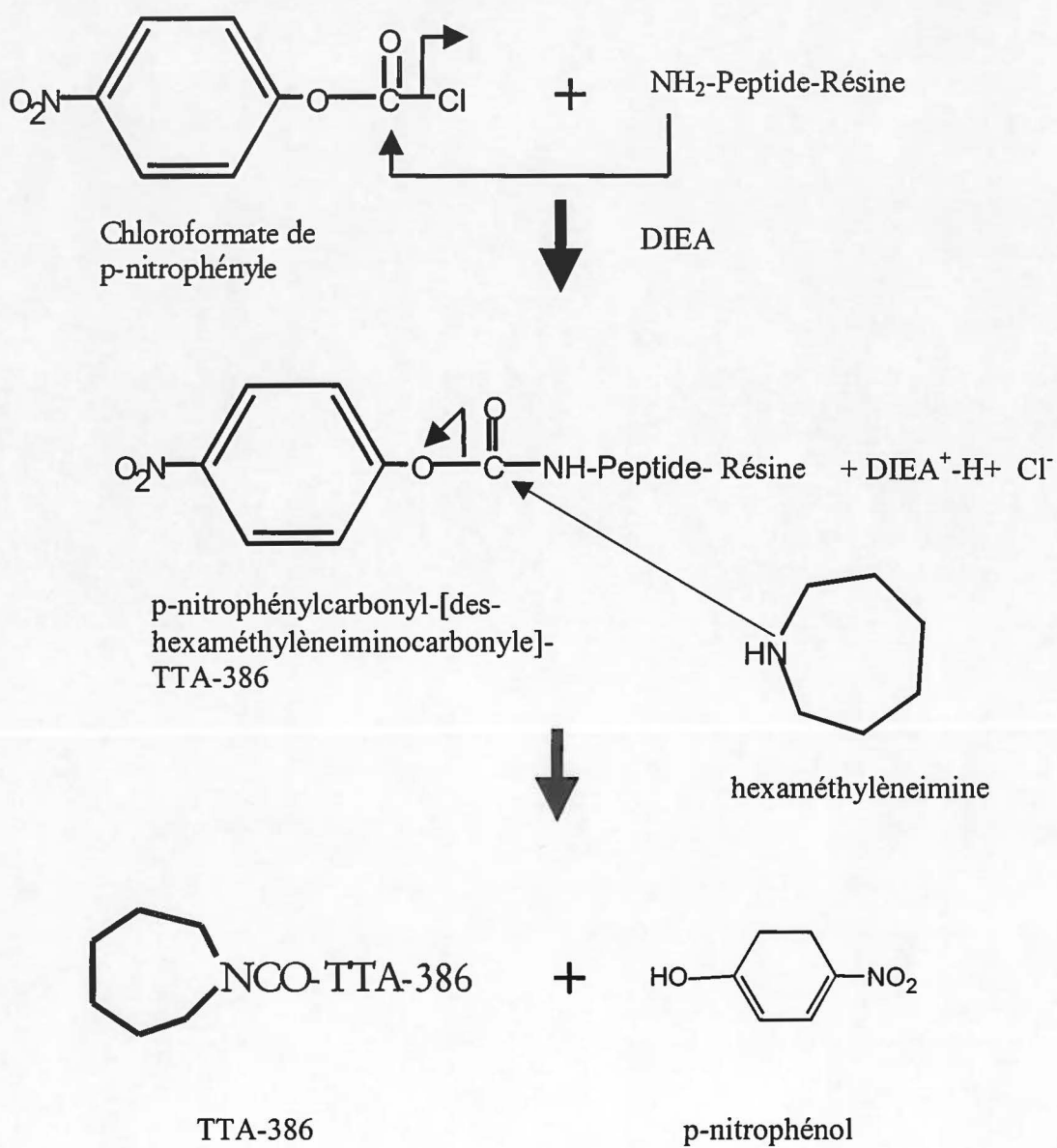


Figure 10 : Addition du cycle urée sur les dérivés TTA-386 en utilisant le chloroformate de 4-nitrophényle (second protocole).

Le peptide-résine, une fois bien sec, est introduit dans un réservoir de polymère fluoré de type Kel F en présence de deux capteurs de carbocations : le m-crésol (1mL/g) et l'éthanethiol (1mL/g). Après avoir fait le vide, le réacteur est alors refroidi à -196°C à l'aide d'azote liquide. Le HF est ensuite condensé à raison de 10mL/g de résine. La réaction de clivage se fait sous agitation continue à 0°C pendant une heure. Le HF est par la suite complètement évaporé du réacteur. Le peptide est précipité à l'éther, trituré et filtré sur un verre fritté. Une extraction à l'aide du TFA pur permet de séparer le peptide de la résine. Le TFA est ensuite évaporé et le peptide brut obtenu est précipité à l'éther. Il est lavé avec ce même solvant, filtré et séché sous vide. Finalement, le matériel brut est conservé à -20°C jusqu'à l'étape de purification.

1.10 Vérification de l'ajout du cycle urée sur les dérivés du TTA-386

Par le biais des protocoles décrits à la section 1.8, nous avons tenté par cinq méthodes distinctes de faire l'ajout du cycle urée en position N-terminale des analogues du TTA-386. Avant de procéder à la purification des peptides, des analyses par CLHP analytique ont été réalisées afin de vérifier la présence du cycle urée sur les peptides. Ces analyses ont été produites au moyen d'un système automatisé Beckman System Gold 507E couplé à un contrôleur de gradient modèle 128 et à un détecteur d'absorbance de modèle 168. Les peptides ont été injectés sur une colonne Vydac C_{18} ($10\mu\text{m}$; 300 \AA) de $250 \times 4,6\text{mm}$. Ils ont été élués en 20 minutes avec un débit de $1,5\text{mL}/\text{min}$ au moyen d'un gradient 0-60% de (B), (A) étant de l'eau contenant 0,06%TFA et (B) de l'acétonitrile. La détection s'est effectuée à 230nm.

2. Purification des sondes peptidiques

2.1 Purification des sondes dérivées du TTA-386

Les sondes peptidiques dérivées du TTA-386 dont la présence du cycle urée dans leur structure a été confirmée, ont été purifiées par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) préparative sur phase inverse. Un système Waters Prep LC500A

comprenant un module Waters 1000 PrepPak couplé à un détecteur d'absorbance de modèle 441 a été utilisé. Une portion du matériel brut (250mg) a été dissous dans un litre d'H₂O dégazée contenant de l'acétate d'ammonium (0,005%, pH9). Le peptide en solution a été injecté sur une colonne Jupiter C₁₈ (15µm; 300 Å) de 25 x 2,1cm. Le matériel a ensuite été élué au moyen d'un gradient linéaire de 0-100% de (B) en trois heures, (A) étant une solution d'acétate d'ammonium 0,005% dans l'eau et (B) étant une solution 80% ACN/(A). Le débit a été maintenu à 20mL/min et la densité optique de l'éluat a été mesurée à 230 nm. Les fractions recueillies (5mL) ont été analysées par CLHP analytique selon le même protocole décrit dans la section 1.10. Les fractions correspondant au produit majoritaire ont été regroupées, évaporées et lyophilisées. Le matériel a finalement été conservé à -20°C.

2.2 Purification des sondes pour le photomarquage du récepteur ET_B

La purification des sondes synthétisées pour le photomarquage des récepteurs ET_B, s'est effectuée sur le même système CLHP préparatif que pour les dérivés du TTA-386. Toutefois, le matériel à purifier (400mg) a été dissous dans 1mL de TFA Biograde et incorporé goutte-à-goutte à un volume de deux litres d'eau distillée préalablement déoxygénée. La solution peptidique a été injectée sur une colonne DeltaPak C₁₈ (15µm; 300 Å). Le matériel a ensuite été élué au moyen d'un gradient linéaire de 20-60% de (B) en 90 minutes, (A) étant de l'eau contenant 0,06% de TFA et (B) étant une solution 60% ACN/(A). Le débit a été maintenu à 40mL/min et la densité optique de l'éluat a été mesuré à 230 nm. Les fractions recueillies (5mL) ont été analysées par CLHP analytique selon le même protocole décrit à la section 1.10 mais avec un gradient différent soit de 20-60% au lieu de 0-60%. Les fractions correspondant au peptide désiré ont été regroupées, évaporées et lyophilisées. Le matériel a finalement été conservé à -20°C.

3. Caractérisation des dérivés peptidiques

3.1 CLHP analytique

La caractérisation par CLHP analytique a été effectuée au moyen du système de marque Beckman décrit à la section 1.10. Les peptides ont alors été injectés sur une colonne Vydac C₁₈, de phase inverse (5µm; 300 Å) de 25 x 0,45cm. L'élution avec un débit de 1mL/min, a été effectuée au moyen d'un gradient linéaire de 20 minutes allant de 20-60% ACN dans de l'eau contenant 0,06%. L'analyse par CLHP a fourni une évaluation de la pureté des peptides obtenus.

3.2 Spectrométrie de masse

Les peptides ont été caractérisés par spectrométrie de masse utilisant la technologie MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) avec un spectromètre Voyager-DE de PE Biosystem. Le voltage a été ajusté à 20kV ; le laser à 337nm et le balayage a été effectué à une vitesse de 20 pulses/sec. La matrice utilisée pour les analyses a été l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique. L'appareil a été calibré avec l'angiotensine I, l'ACTH et l'insuline bovine.

4. Évaluation pharmacologique des analogues à structure réduite de l'ET-1 et des analogues de l'antagoniste TTA-386

4.1 Animaux et réactifs

Les rats mâles Sprague-Dawley et les cobayes mâles Hartley provenaient de chez Charles River Canada (St-Constant, QC, CDN). Pesant entre 250 et 300g, les rats et les cobayes étaient gardés sous un cycle lumière-obscurité de 12h avec nourriture et eau *ad libitum* selon les standards établis par le Comité canadien sur les soins aux animaux (CCAC). Les produits entrant dans la composition du tampon Krebbs soit le NaCl, le glucose, le KCl, le KH₂PO₄ et le CaCl₂ ont été achetés chez Fisher Scientific (Ottawa, ON, CDN) tandis que le NaHCO₃ et le MgSO₄ ont été obtenus chez Anachemia Canada Inc. (Montréal, QC,

CDN). L'histamine et l'acétylcholine provenaient de Sigma (St-Louis, MO, USA) et l'anesthésiant utilisé, le Somnotol, a été obtenu chez CDMV (St-Hyacinthe, QC, CDN).

4.2 Essais biologiques *in vitro* sur l'aorte de rat

4.2.1 Démonstration de l'activité agoniste

Les rats mâles Sprague-Dawley ont été anesthésiés à l'aide d'une injection intrapéritonéale de Somnotol (65mg/kg). Une fois endormis, les rats ont été saignés et leur aorte thoracique a été rapidement prélevée et placée dans un tampon de Krebs-Henseleit oxygéné qui assure la conservation des tissus. Ce tampon est constitué de (mmol/L) NaCl 120; NaHCO₃ 25; KCl 4,7; MgSO₄ 1,6 ; KH₂PO₄ 1,17; CaCl₂ 2,5; glucose 10 à pH 7,4. L'aorte a ensuite été débarrassée du tissu adipeux et conjonctif qui l'entourait. Par la suite, l'endothélium a été enlevé en frottant délicatement la surface interne de l'aorte. Celle-ci a été finalement coupée pour former des anneaux de 5mm de longueur. Chaque anneau a été installé dans un bain à organe isolé à 37°C rempli de tampon physiologique de Krebs-Henseleit oxygéné (95%O₂; 5%CO₂). Les tissus ont alors été attachés à deux crochets, un étant fixe dans le fond du bain et l'autre étant rattaché à un transducteur de force Grass modèle FT03 relié à un polygraphe Grass 7E qui permet l'enregistrement isométrique des réponses mécaniques. Les anneaux ont alors été installés de façon à subir une tension initiale de 1g. Suite à une période d'équilibration de soixante minutes, une injection de 80mmol/L de KCl a permis de vérifier la viabilité et la contractilité de chacun des anneaux. Lorsque la contraction maximale a été atteinte, l'absence de relaxation par une injection d'acétylcholine (10⁻⁵M) a permis de vérifier que l'aorte était complètement dénudée de son endothélium. Si une relaxation de plus de 10% était enregistrée, le tissu n'était alors pas utilisé pour les tests biologiques. Les anneaux montrant une contractilité par le KCl et une absence de relaxation à l'acétylcholine ont alors été lavés jusqu'à ce qu'une ligne de base stable soit obtenue. Des injections de doses cumulatives d'ET-1 ou de chacun des analogues allant de 1x10⁻¹⁰M à 1x10⁻⁶M ont finalement été effectuées afin d'obtenir une courbe concentration-réponse pour chacun des peptides. La dissolution des dérivés dans le DMSO et ensuite dans l'eau, juste avant la première injection, et la conservation des solutions à 4°C ont assuré l'intégrité des

peptides pour la durée de l'expérimentation. Des mesures de la contraction pour l'ensemble de la courbe ont été effectuées chez 4 rats différents pour chacun des peptides (8 dans le cas de ET-1) pour un total de 4-8 expérimentations par analogue (figure 11). L'analyse par régression non-linéaire pondérée des courbes concentration-réponse a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel All-fit basé sur la formule générale de la loi d'action de masse (DeLéan et al., 1982).

4.2.2 Démonstration de l'activité antagoniste

Lorsqu'il y avait absence de contraction lors de la courbe concentration-réponse d'un peptide, de nouveaux tests pharmacologiques étaient effectués pour vérifier s'il démontrait une activité antagoniste. Les anneaux d'aorte ont alors été accrochés dans les bains comme décrit précédemment. Suite à une injection de KCl et à un lavage des anneaux pour retrouver une ligne de base stable, les tissus ont été incubés avec une concentration fixe de peptide ($3 \times 10^{-8} \text{M}$, $1 \times 10^{-7} \text{M}$, $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ou $1 \times 10^{-6} \text{M}$) pour une vingtaine de minutes. Par la suite, des doses cumulatives d'ET-1 allant de $1 \times 10^{-10} \text{M}$ à $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ont été injectées afin d'obtenir une courbe concentration-réponse de l'ET-1 en présence du peptide à tester. La dissolution des dérivés dans le DMSO et ensuite dans l'eau, juste avant la première injection, et la conservation des solutions à 4°C, ont assuré l'intégrité des peptides pour la durée de l'expérimentation. Des mesures de la contraction pour l'ensemble de la courbe d'ET-1 incubée avec différents peptides ont été effectuées chez 4 rats différents pour chacun des peptides (8 pour ceux présentant une activité antagoniste) pour un total de 4-8 expérimentations par analogue.

4.3 Essais biologiques *in vitro* sur le parenchyme pulmonaire de cobaye

Les cobayes mâles Hartley ont été anesthésiés à l'aide d'une injection intrapéritonéale de Somnotol (65mg/kg). Une fois endormis, les cobayes ont été saignés et les poumons ont été rapidement prélevés et placés dans du tampon de Krebs-Henseleit. Les poumons ont ensuite été coupés en bandelettes longitudinales de taille similaire soit de 3mm de largeur, 15mm de longueur et de 3-5mm d'épaisseur. Chaque bandelette a été installée dans un

bain à organe isolé à 37°C rempli de tampon physiologique de Krebs-Henseleit oxygéné (95%O₂; 5%CO₂). L'une des extrémités du tissu pulmonaire a été reliée à l'aide d'un fil à un crochet fixe dans le fond du bain et l'autre a été rattachée à un transducteur de force Grass modèle FT03 relié à un polygraphe Grass 7E permettant l'enregistrement isométrique des réponses mécaniques. Les bandelettes ont alors été installées de façon à subir une tension initiale de 1g. Suite à une période d'équilibration de soixante minutes, une injection de 1x10⁻⁶M d'histamine a permis de vérifier la viabilité et la contractilité de chaque bande de poumons. Lorsque la contraction maximale a été atteinte, les tissus ont alors été lavés jusqu'à ce qu'une ligne de base stable soit obtenue. Des injections de doses cumulatives de sarafotoxine 6c ou de chacun des analogues allant de 1x10⁻¹⁰M à 1x10⁻⁶M ont finalement été effectuées afin d'obtenir une courbe concentration-réponse pour chacun des peptides. Lorsqu'un peptide ne démontrait aucune activité agoniste sur le parenchyme pulmonaire, une dose de 10⁻⁷M de sarafotoxine 6c était alors injectée dans le bain à la fin de la courbe concentration-réponse du peptide afin de vérifier son effet antagoniste sur ce tissu. Des mesures de la contraction pour l'ensemble de la courbe ont été effectuées chez 4 cobayes différents pour chacun des peptides pour un total de 4-6 expérimentations par analogue (figure 12).

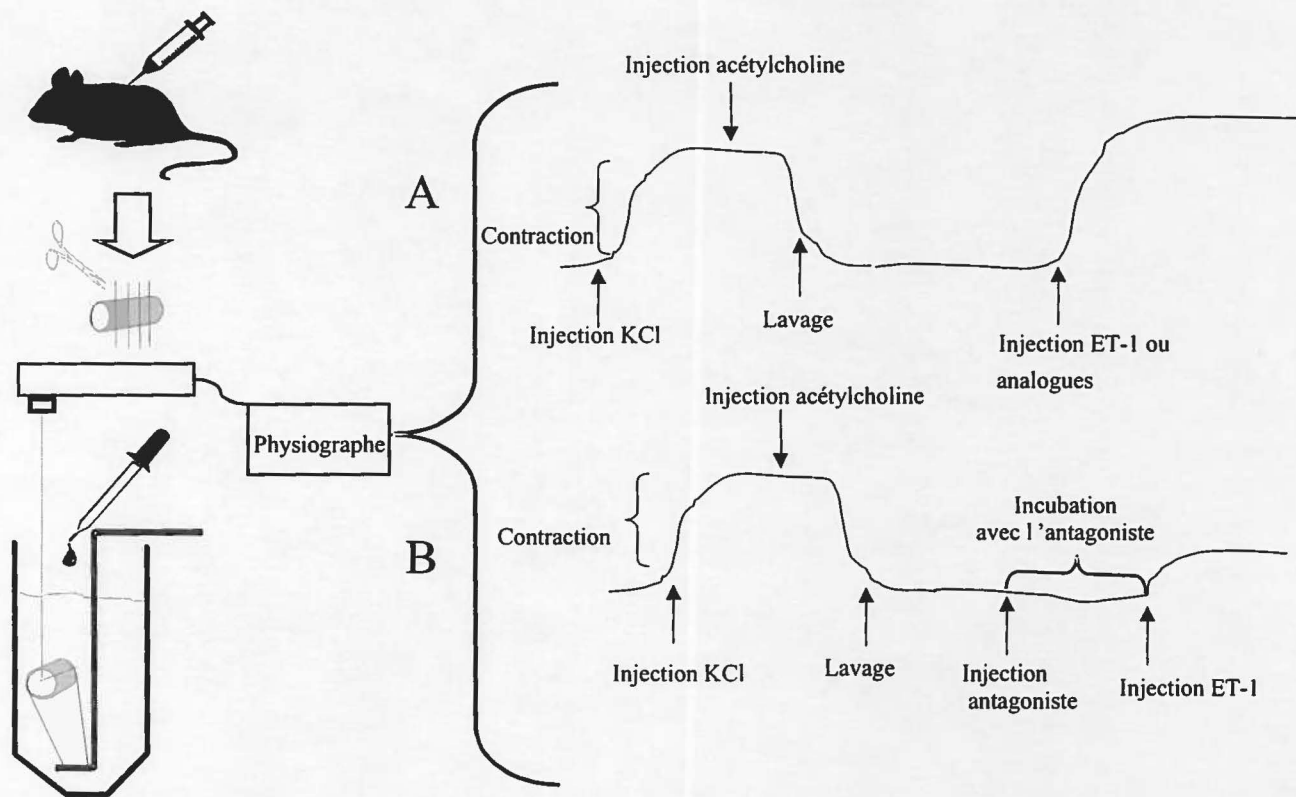


Figure 11: Protocole des bioessais sur l'aorte de rat pour un peptide agoniste (A) et pour un peptide antagoniste (B).

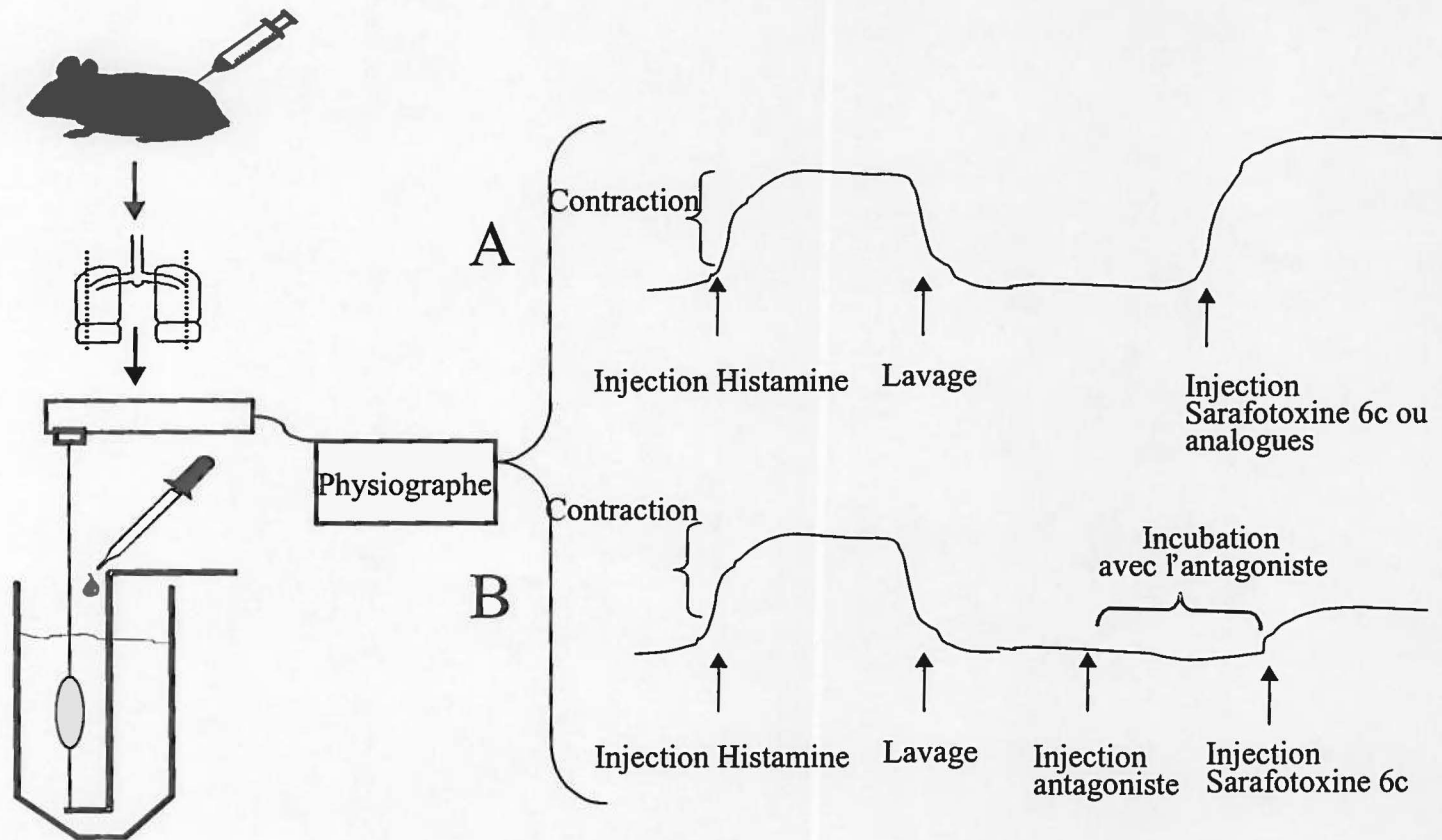


Figure 12: Protocole des bioessais sur le parenchyme pulmonaire de cobaye pour un peptide agoniste (A) et pour un peptide antagoniste (B).

Résultats

5. Synthèse et purification des sondes photosensibles dérivées du TTA-386

5.1 Synthèse des dérivés peptidiques

Afin de synthétiser les six sondes photosensibles dérivées du TTA-386 ainsi que le peptide original, trois sels de césium ont été préparés pour effectuer l'incorporation du premier acide aminé de la synthèse (le résidu C-terminal). Selon le test à l'acide picrique, les taux de substitution sur la résine de Merrifield ont été évalués à 0,32mmol/g pour le Boc-D-Phe, 0,45mmol/g pour l'acide aminé Boc-D-pBpa et 0,49mmol/g pour le Boc-L-pBpa. Pour chacun des peptides à synthétiser, 2,5 grammes de résine ont été utilisés pour une échelle de synthèse de 0,8mmole pour le Boc-D-Phe, 1,13mmole pour l'acide aminé Boc-D-pBpa et 1,23mmole pour le Boc-L-pBpa. Les conditions utilisées ont fait en sorte que la synthèse de ces peptides n'a présenté aucun problème particulier, le couplage des acides aminés se faisant d'ailleurs dès le premier essai.

5.2 Addition du cycle urée sur les dérivés peptidiques

5.2.1 Utilisation du chloroformate de p-nitrophénoxyde

Afin d'ajouter le groupe hexaméthylèneiminocarbonyle à l'extrémité N-terminale des analogues du TTA-386, plusieurs réactifs ont été préparés. Le premier, soit le p-nitrophénoxyde d'hexaméthylèneiminocarbonyle, a été formé à l'aide du chloroformate de p-nitrophénoxyde qui a été mis en présence d'hexaméthylèneimine. Ce nouveau réactif était alors constitué du groupement hexaméthylèneiminocarbonyle et du groupe partant p-nitrophénol. L'amine libre du peptide déprotégé pouvait alors attaquer le groupement carbonyle du réactif et par substitution nucléophile, provoquer l'ajout du cycle urée en position N-terminale du peptide. Afin de vérifier si la réaction avait réussi, un test Kaiser sur chacun des peptides a été effectué. Ce test a montré la présence d'amines libres. Un échantillon de peptide-résine a tout de même été prélevé et clivé au HF afin de vérifier si,

suite à cette réaction, le profil CLHP des peptides démontrait de nouveaux pics pouvant correspondre aux peptides avec le cycle urée. Or, l'analyse par CLHP n'a montré aucune différence entre les peptides déprotégés et les peptides ayant été mis en contact avec le p-nitrophénoxyde d'hexaméthylèneiminocarbonyle. Comme l'indique la figure 13, les deux chromatogrammes d'un peptide témoin sont parfaitement identiques. En effet, un seul pic majoritaire correspondant au peptide [des-hexaméthylèneiminocarbonyle, L-Bpa²]-TTA-386 déprotégé est présent sur les deux chromatogrammes, démontrant ainsi que l'ajout du cycle urée via le réactif p-nitrophénoxyde d'hexaméthylèneiminocarbonyle avait échoué.

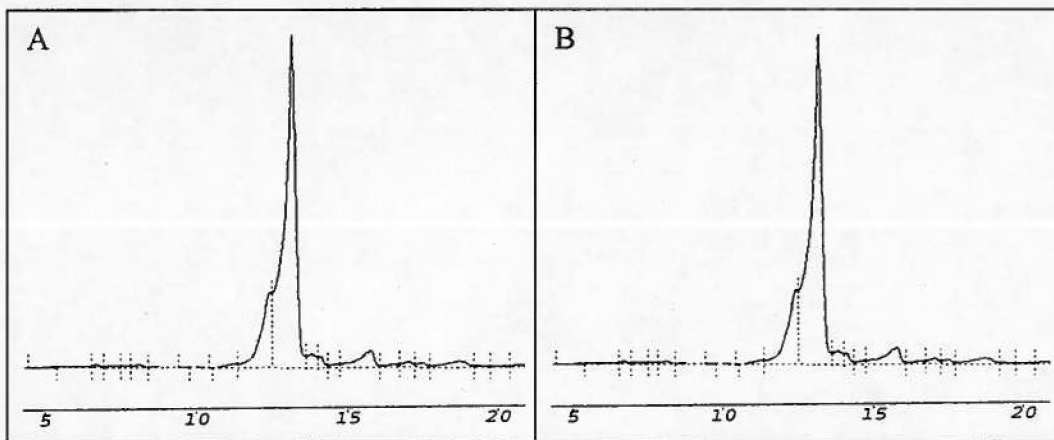


Figure 13: Profils CLHP analytiques post HF du A) dérivé [des-hexaméthylèneiminocarbonyle, L-Bpa²]-TTA-386 déprotégé et B) suite à la réaction avec le p-nitrophénoxyde d'hexaméthylèneiminocarbonyle.

Colonne : Vydac C₁₈, sur phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm

Gradient : linéaire, 20-60% (B) en 20 min

Débit : 1,5mL/min.

Détection : 230nm

5.2.2 Utilisation du carbonate de dissuccinimidyle

Puisque l'utilisation du chloroformate de p-nitrophénoxyde n'a pas permis de faire l'ajout du cycle urée sur les dérivés du TTA-386, nous avons alors prévu l'usage d'un réactif possédant un meilleur groupe partant que le p-nitrophénol, soit le succinimidyle. Nous avons alors formé le réactif hexaméthylèneiminocarbonylsuccinimidyle en faisant réagir l'homopipéridine et du carbonate de dissuccinimidyle. L'amine libre du peptide déprotégé devrait alors attaquer le groupement carbonyle du réactif provoquant ainsi l'ajout du cycle urée en position N-terminale des peptides. Or suite à cette réaction, les tests Kaiser effectués sur chacun des peptides ont toujours été positifs. L'analyse par CLHP analytique du peptide témoin [des-hexaméthylèneiminocarbonyle, L-Bpa²]-TTA-386 a alors montré l'apparition de deux nouveaux pics suite à cette réaction (figure 14). Toutefois, leur très faible proportion comparée au pic du peptide déprotégé nous a menés à la conclusion que cette autre méthode n'était pas non plus efficace pour l'introduction du cycle urée N-terminal. Il est même possible que ces nouveaux pics n'aient pas été produits par une addition du réactif, mais plutôt par un contaminant ou un produit de dégradation suite à la réaction.

5.2.3 Utilisation du carbonyldiimidazole

L'ajout du cycle urée en utilisant l'hexaméthylèneiminocarbonylimidazole formé à l'aide de carbonyldiimidazole et d'homopipéridine a donné des résultats comparables à ceux observés avec les deux autres méthodes. Des tests à l'aide de la ninhydrine ont montré la présence d'amines libres en abondance sur les peptides. Dans ce cas, aucune analyse par chromatographie n'a été effectuée. Nous avons ciblé une nouvelle stratégie en utilisant cette fois-ci le phosgène.

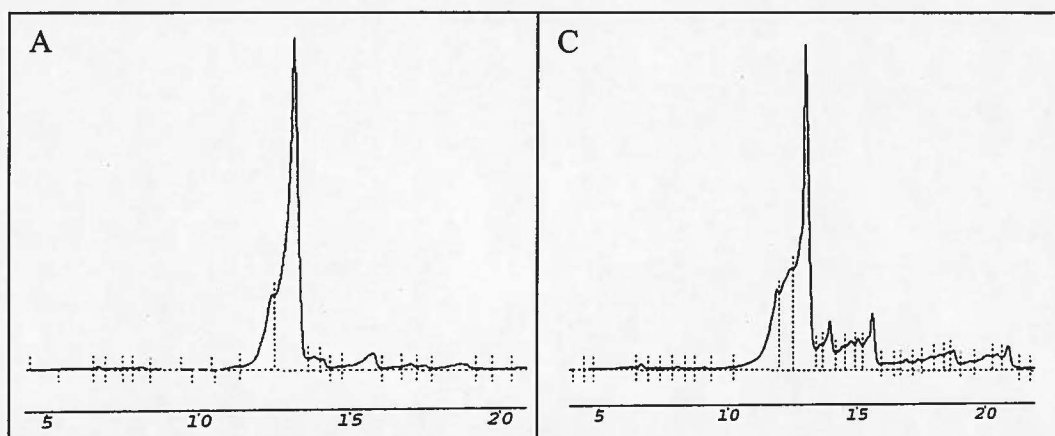


Figure 14: Profils CLHP analytiques post HF du A) dérivé [des-hexaméthylèneiminocarbonyle, L-Bpa²]-TTA-386 déprotégé et B) suite à la réaction avec l'hexaméthylèneiminocarbonylsuccinimidyl.

Colonne : Vydac C₁₈, sur phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm

Gradient : linéaire, 20-60% (B) en 20 min

Débit : 1,5mL/min.

Détection : 230nm

5.2.4 Utilisation du phosgène

Suite aux échecs obtenus avec les réactifs précédents, nous avons alors fait réagir l'hexaméthylèneimine avec du phosgène afin de former le chlorure d'hexaméthylèneiminocarbonyle. Ce nouveau réactif mis en présence des peptides-résine a aussi donné des résines-peptide porteuses d'amines libres comme vérifié au moyen du test Kaiser. Le profil d'élution de l'analogue témoin [des-hexaméthylèneiminocarbonyle, L-Bpa²]-TTA-386 a montré l'apparition de quelques pics minoritaires dont la nature n'a pas été identifiée (figure 15).

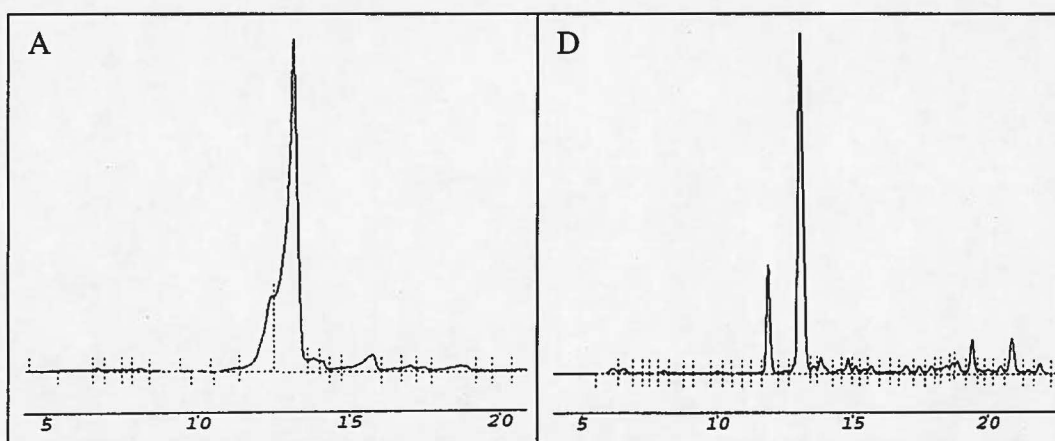


Figure 15: Profils CLHP analytiques post HF du A) dérivé [des-hexaméthylèneiminocarbonyle, L-Bpa²]-TTA-386 déprotégé et B) suite à la réaction avec le chlorure d'hexaméthylèneiminocarbonyle.

Colonne : Vydac C₁₈, sur phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm

Gradient : linéaire, 20-60% (B) en 20 min

Débit : 1,5mL/min.

Détection : 230nm

5.2.5 Utilisation du chloroformate de 4-nitrophényle (second protocole)

Puisque l'ajout du cycle urée sur les peptides n'a pas été réussi via l'utilisation d'un réactif composé de l'homopipéridine et d'un groupement partant, nous avons alors décidé d'utiliser une nouvelle méthode d'addition. Pour ce faire, nous avons incubé le chloroformate de 4-nitrophényle avec le peptide déprotégé. L'amine libre de celui-ci pouvait alors attaquer le carbonyle du réactif et former ainsi le p-nitrophényl carbonyle-TTA-386. Cette première substitution nucléophile a été vérifiée par un test à la ninhydrine qui a montré que tous les peptides avaient une fonction N-terminale occupée. La première étape ayant réussi, l'homopipéridine a été ajoutée afin que son amine puisse aller attaquer le groupement carbonyle réactif maintenant incorporé sur l'amine terminale des peptides et ainsi permettre l'ajout du cycle urée. Puisque cette deuxième substitution

nucléophile ne pouvait pas être vérifiée par un test Kaiser (l'amine du peptide étant déjà occupée par le formate de 4-nitrophényle), un aliquot de peptide-résine a été clivé et le peptide brut obtenu a été analysé par CLHP. Le profil de tous les peptides présentait alors deux pics majoritaires. La comparaison du chromatogramme du peptide témoin [des-hexaméthylèneiminocarbonyle, L-Bpa²]-TTA-386, avant et après la réaction, suggère que le premier pic correspondrait au peptide déprotégé tandis que le second pic, avec un temps de rétention de 20 minutes, correspondrait alors au peptide avec le cycle urée. L'identification de ces pics est d'autant plus plausible que l'ajout du cycle urée sur les peptides devraient augmenter leur caractère hydrophobe, donc augmenter leur temps de rétention sur CLHP analytique (Figure 16).

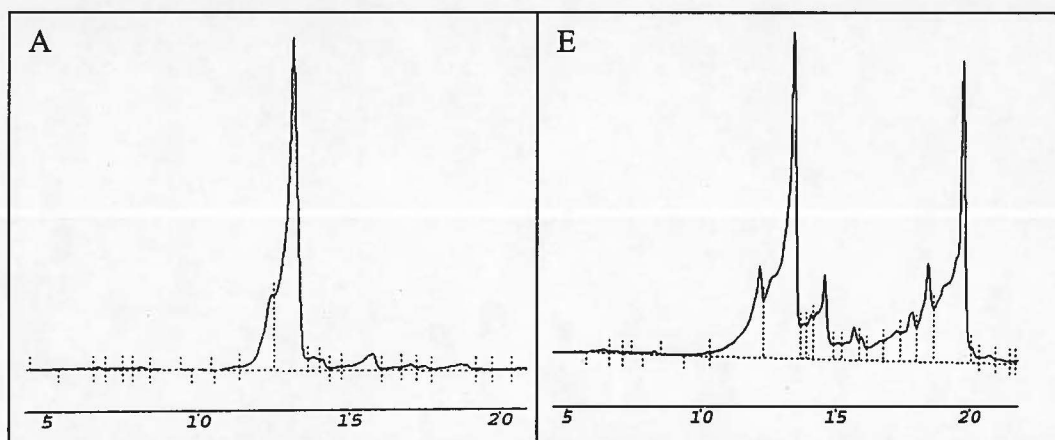


Figure 16: Profils CLHP analytiques post HF du A) dérivé [des-hexaméthylèneiminocarbonyle, L-Bpa²]-TTA-386 déprotégé et B) suite à la réaction avec le chloroformate de 4-nitrophényle et l'homopipéridine.

Colonne : Vydac C₁₈, sur phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm

Gradient : linéaire, 20-60% (B) en 20 min

Débit : 1,5mL/min.

Détection : 230nm

5.3 Purification des sondes peptidiques

L'ajout de l'hexaméthylèneiminocarbonyle à l'extrémité N-terminale des peptides semblant avoir réussi, nous avons alors clivé en totalité les peptides de la résine. Ces clivages ont alors permis d'obtenir des peptides bruts ayant l'apparence d'une poudre amorphe jaune. La purification par CLHP préparative a permis d'isoler les deux pics majoritaires présents sur les chromatogrammes permettant ainsi de séparer le peptide déprotégé du peptide portant le cycle urée. Pour chaque peptide, les fractions ayant un temps de rétention aux alentours de 21 minutes sur CLHP analytique ont été jumelées et conservées. La figure 17 montre le chromatogramme de [L-Bpa²]-TTA-386 suite à une première purification.

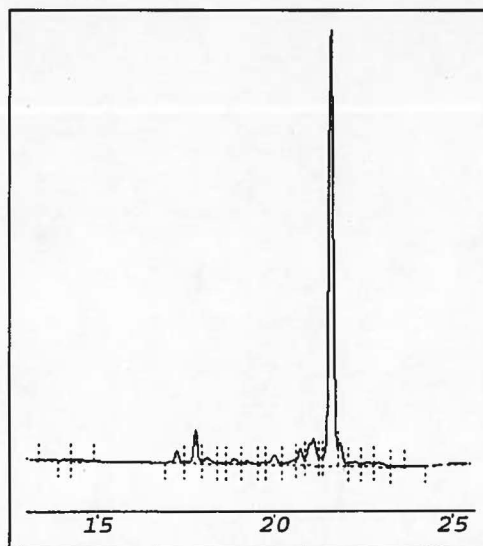


Figure 17: Profil CLHP analytique du dérivé [L-pBpa²]-TTA-386 suite à une première purification.

Colonne : Vydac C₁₈, sur phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm

Gradient : linéaire, 20-60% (B) en 20 min

Débit : 1,5mL/min.

Détection : 230nm

6.Synthèse et purification des sondes développées pour le photomarquage des récepteurs ET_B

6.1 Synthèse des dérivés peptidiques

Selon le test à l'acide picrique, le taux de substitution de Boc-Trp(For) sur la résine de Merrifield a été évalué à 0,67mmol/g. Pour chacune des quatre sondes peptidiques, 2,5 grammes de résine ont été déposées dans un système comptant six réacteurs manuels pour une échelle de synthèse de 1,68mmole. Le couplage de certains acides aminés lors de la synthèse a nécessité une période de réaction deux fois plus longue que celle décrite dans le protocole. Le clivage au HF a donné des peptides bruts ayant l'apparence d'une poudre amorphe mauve. Leur analyse par CLHP analytique a montré la présence de deux ou trois pics majoritaires séparés par quelques secondes seulement et ce pour les quatre produits synthétisés.

6.2 Traitement des peptides après clivage au HF

La présence de pics multiples dans les chromatogrammes post HF nous a obligés à effectuer quelques tests afin de vérifier si une réaction secondaire avait eu lieu lors de la synthèse peptidique. Premièrement, pour s'assurer qu'il n'y ait pas eu de formation d'aspartimide, un aliquot du peptide [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹]- (3-11)-Tyr-L-pBpa-(17-21)ET a été dissous dans une solution de TFA 0,06% dans l'eau. Après deux heures dans cette solution, le peptide a été injecté sur CLHP analytique (Figure 18). Le profil CLHP n'ayant pas changé, nous avons procédé à un traitement basique afin de vérifier s'il n'y avait pas eu un shift N-O. Pour ce faire, un aliquot du même peptide a été dissous dans du NH₄OH à pH10. Après une heure d'attente, le peptide a été injecté sur CLHP analytique. De nouveaux pics sont alors apparus sur le chromatogramme. L'allure du chromatogramme et l'apparence du spectre du peptide dans l'UV suggèrent que ces résultats proviennent de la déformylation du tryptophane du peptide qui se produit dans des conditions basiques plutôt que de la réversibilité d'un shift N-O. Un dernier test a alors été effectué afin de vérifier si la méthionine n'avait pas subi une oxydation. Le peptide dissous dans du méthanol a ainsi été mis en présence de 20 équivalents de NH₄I et

de 20 équivalents de DMS pendant une heure avant d'être injecté sur le CLHP analytique. Le chromatogramme du peptide ne s'étant pas amélioré, la présence des pics multiples ne serait donc pas causée par l'oxydation de la méthionine. Ces trois traitements n'ayant donné aucun résultat positif, nous avons alors décidé de procéder à la purification des peptides.

6.3 Purification des sondes peptidiques

La purification par CLHP préparative a permis d'isoler chacun des pics majoritaires observés sur CLHP analytique. La figure 19 montre le chromatogramme de [Cys(Acm)^{3,11}, Tyr¹⁷, L-pBpa¹⁹, Trp(For)²¹]- (3-11)-Aca-(17-21)ET après le clivage au HF et suite à une première purification. Sur le profil post HF, on distingue clairement les deux pics majoritaires aux temps de rétention (Tr) 12,67 et 13,23 minutes. Les fractions ayant un temps de rétention de 13 minutes ont été jumelées et conservées pour des fins d'analyses détaillées.

7.0 Caractérisation des sondes peptidiques développées pour le photomarquage des récepteurs ET_A et ET_B.

L'analyse par CLHP analytique a démontré la pureté des sondes peptidiques obtenue après leur purification. Puisque la surface de contact entre les particules et le produit injecté augmente avec des billes de taille réduite, la pureté des peptides a été évaluée en utilisant une colonne de particules de 5µm. Ce type de colonne permet d'évaluer rigoureusement la pureté des peptides en séparant de façon précise le matériel à étudier. Tous les peptides synthétisés ont montré une pureté supérieure à 62%. Les résultats détaillés de cette analyse sont énumérés au tableau III. Des analyses par spectrométrie de masse utilisant la technologie MALDI-TOF a permis d'évaluer le poids moléculaire de chacune des sondes photosensibles synthétisées afin de vérifier si les peptides obtenus correspondaient vraisemblablement aux produits désirés. Comme décrit dans le tableau IV, tous les peptides synthétisés possèdent une masse moléculaire correspondant à la masse théorique recherchée à l'intérieur des marges d'erreur possible.

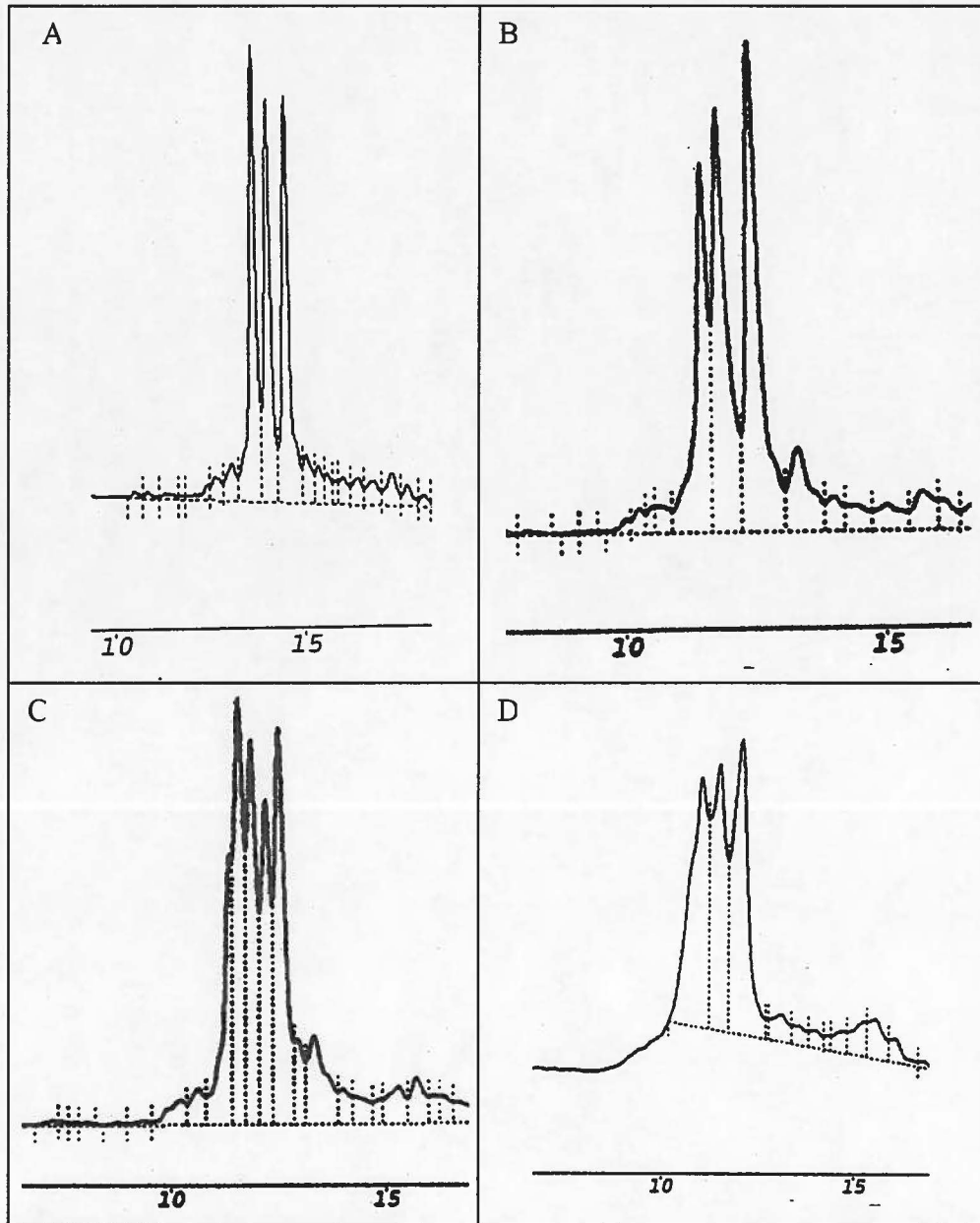


Figure 18 : Profils CLHP analytiques de A) l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹]- (3-11)-Tyr-L-pBpa-(17-21)ET brut, B) suite au traitement au TFA/H₂O (0,06%), C) suite au traitement au NH₄OH et D) suite au traitement au NH₄I.
 Colonne : Vydac C₁₈, sur phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm
 Gradient : linéaire, 20-60% (B) en 20 min pour le profil A et 30-60% pour B,C et D
 Débit : 1,5mL/min.
 Détection : 230nm

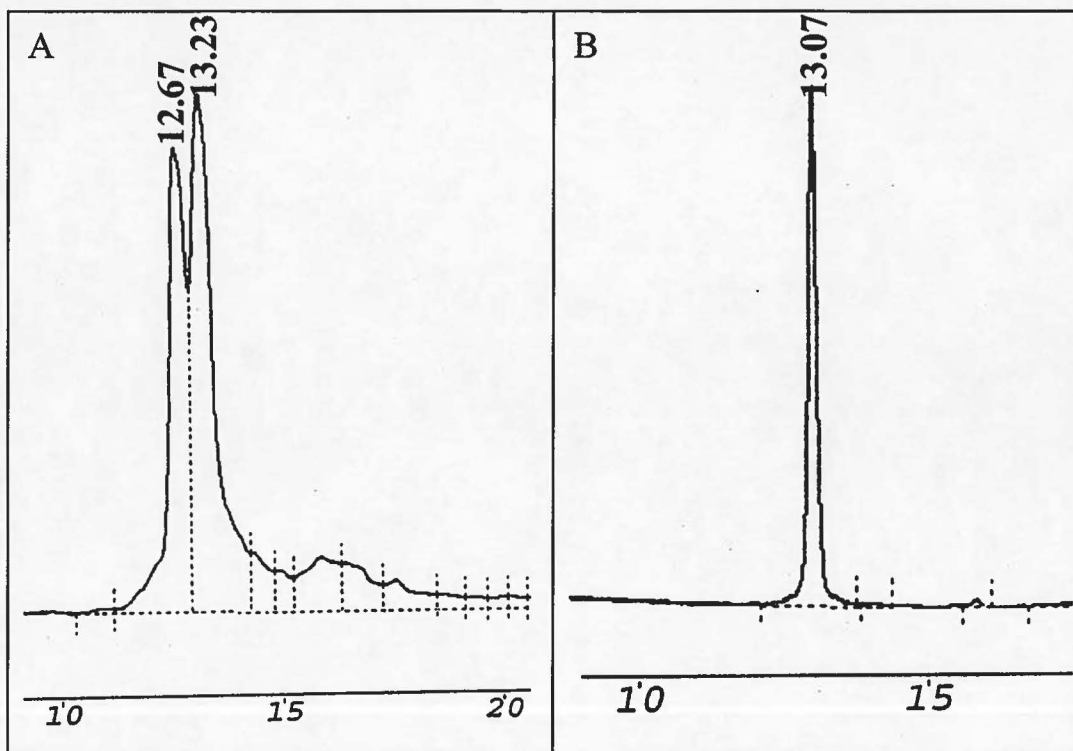


Figure 19 : Profils CLHP analytiques de A) l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Tyr¹⁷, L-pBpa¹⁹, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET brut et B) après purification par CLHP préparative.

Colonne : Vydac C₁₈, sur phase inverse (10µm ; 300Å) 25 x 0,45cm

Gradient : linéaire, 20-60% (B) en 20 min

Débit : 1,5mL/min.

Détection : 230nm

Tableau III : Pureté des sondes photosensibles spécifiques pour le récepteur ET_A et ET_B selon les données de caractérisation par CLHP analytique.

| Peptide | Pureté en % déterminée par CLHP analytique |
|---|--|
| [Cys(Acm) ^{3,11} ,L-pBpa ⁹ ,Tyr ¹⁷ ,Trp(For) ²¹]- (3-11)-Aca-(17-21)ET | 72,1 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} ,Trp(For) ²¹]- (3-11)-Tyr-L-pBpa-(17-21)ET | 82,3 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} ,Tyr ¹⁷ ,L-pBpa ¹⁹ ,Trp(For) ²¹]- (3-11)-Aca-(17-21)ET | 87,0 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} ,Tyr ¹⁷ ,L-pBpa ²⁰ ,Trp(For) ²¹]- (3-11)-Aca-(17-21)ET | 92,4 |
| [D-pBpa ¹]-TTA-386 | 79,9 |
| [L-pBpa ¹]-TTA-386 | 81,3 |
| [D-pBpa ²]-TTA-386 | 76,0 |
| [L-pBpa ²]-TTA-386 | 92,7 |
| [D-pBpa ⁶]-TTA-386 | 62,7 |
| [L-pBpa ⁶]-TTA-386 | 90,3 |
| TTA-386 | 97,1 |

Tableau IV : Résultats des analyses en spectrométrie de masse des sondes photosensibles spécifiques pour le récepteur ET_A et ET_B.

| Peptide | Poids moléculaire attendu (Da) | Poids moléculaire obtenu (Da) |
|--|--------------------------------|-------------------------------|
| [Cys(Acm) ^{3,11} ,L-pBpa ⁹ ,Tyr ¹⁷ , Trp(For) ²¹]- (3-11)-Aca-(17-21)ET | 2115,83 | 2113,51 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} ,Trp(For) ²¹]- (3-11)-Tyr- L-pBpa-(17-21)ET | 2243,93 | 2241,23 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} ,Tyr ¹⁷ , L-pBpa ¹⁹ ,Trp(For) ²¹]- (3-11)-Aca-(17- 21)ET | 2130,83 | 2127,22 |
| [Cys(Acm) ^{3,11} ,Tyr ¹⁷ , L-pBpa ²⁰ ,Trp(For) ²¹]- (3-11)-Aca-(17- 21)ET | 2130,83 | 2128,16 |
| [D-pBpa ¹]-TTA-386 | 1033,2 | 1033,18 |
| [L-pBpa ¹]-TTA-386 | 1033,2 | 1033,96 |
| [D-pBpa ²]-TTA-386 | 960,2 | 959,99 |
| [L-pBpa ²]-TTA-386 | 960,2 | 961,72 |
| [D-pBpa ⁶]-TTA-386 | 999,2 | 999,95 |
| [L-pBpa ⁶]-TTA-386 | 999,2 | 999,45 |
| TTA-386 | 896 | 893,74 |

8. Études pharmacologiques

8.1 Études pharmacologiques sur l'aorte de rat

La réponse pharmacologique sur les récepteurs ET_A de l'ET a été testée sur l'aorte de rat qui exprime majoritairement ce type de récepteur. Toutefois, l'endothélium de l'aorte, qui contient des récepteurs ET_B, pourrait fausser les résultats. Par conséquent, l'aorte est rapidement débarrassée de son endothélium suite à son prélèvement. Elle est ensuite coupée en anneaux de même longueur permettant ainsi d'obtenir une réponse reproductible entre des rats de taille similaire. L'évaluation de l'activité biologique des peptides photosensibles a alors montré que les sondes [D-pBpa⁶]-TTA-386 et [L-pBpa⁶]-TTA-386 se comportaient comme des antagonistes de l'ET-1. Tout comme le peptide original TTA-386, ces deux sondes ont produit un déplacement vers la droite de la courbe concentration-réponse de l'ET-1 d'une manière dose-dépendante (figures 20-22). Toutefois, aucun changement significatif dans les réponses maximales n'a été observé, identifiant ainsi nos peptides comme des antagonistes compétitifs. Une régression non-linéaire des courbes obtenues a finalement permis de calculer la valeur des pA₂ de ces antagonistes (tableau V). Les quatre autres analogues dérivés du TTA-386 soit [D- ou L-pBpa¹]-TTA-386 et [D- ou L-pBpa²]-TTA-386 n'ont montré aucune activité agoniste ou antagoniste sur l'aorte de rat.

Des tests de contractibilité sur l'aorte de rat ont aussi été effectués avec les quatre autres sondes photosensibles développées pour le photomarquage du récepteur ET_B. Ces dérivés de l'agoniste [Cys(Acm)^{3,11},Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET qui est spécifique pour les récepteurs ET_B n'ont, tout comme le peptide original, démontré aucune activité agoniste ou antagoniste sur l'aorte de rat.

Tableau V : Valeurs de pA₂ des sondes peptidiques produisant une réponse antagoniste sur l'aorte de rat.

| Peptide | pA ₂ |
|-------------------------------|-----------------|
| [D-Bpa ⁶]-TTA-386 | 7,8 |
| [L-Bpa ⁶]-TTA-386 | 7,5 |
| TTA-386 | 7,8 |

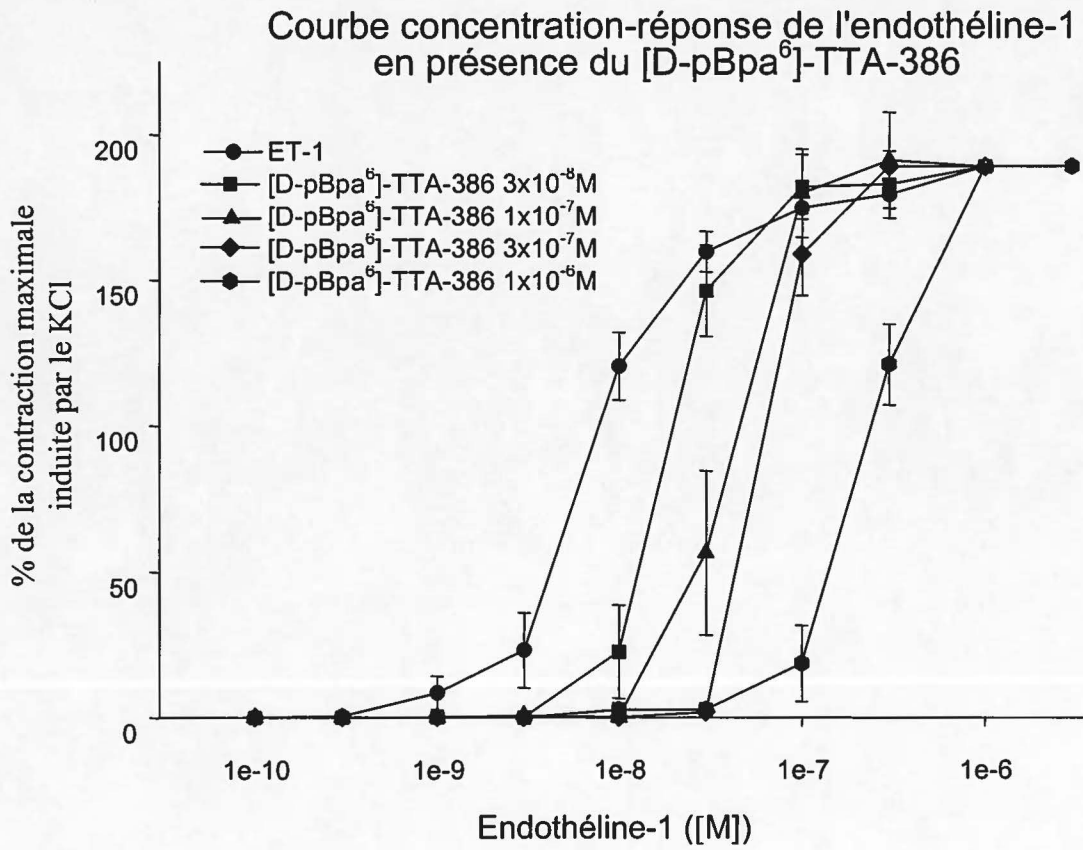


Figure 20 :Effet de l'antagoniste [D-pBpa⁶]-TTA-386 sur la courbe concentration-réponse de l'ET-1 stimulant la contraction de l'aorte de rat dénudée de son endothélium.

Courbe concentration-réponse de l'endothéline-1
en présence du [L-pBpa⁶]-TTA-386

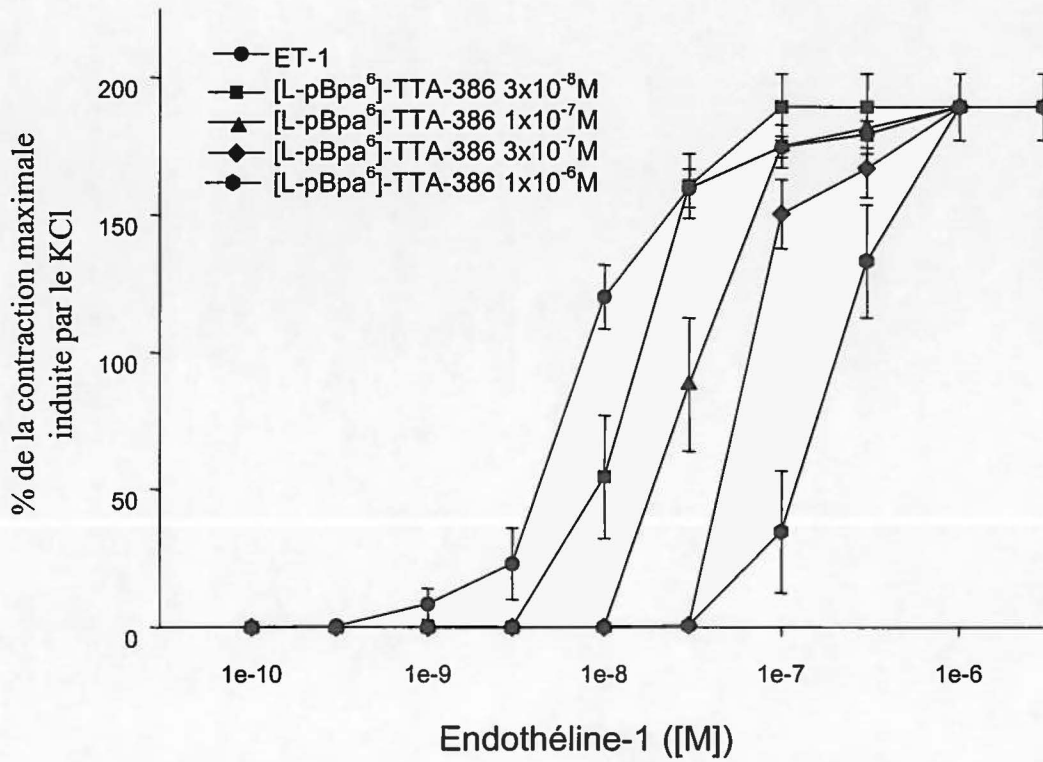


Figure 21 : Effet de l'antagoniste [L-pBpa⁶]-TTA-386 sur la courbe concentration-réponse de l'ET-1 stimulant la contraction de l'aorte de rat dénudée de son endothélium.

Courbe concentration-réponse de l'endothéline-1
en présence du TTA-386

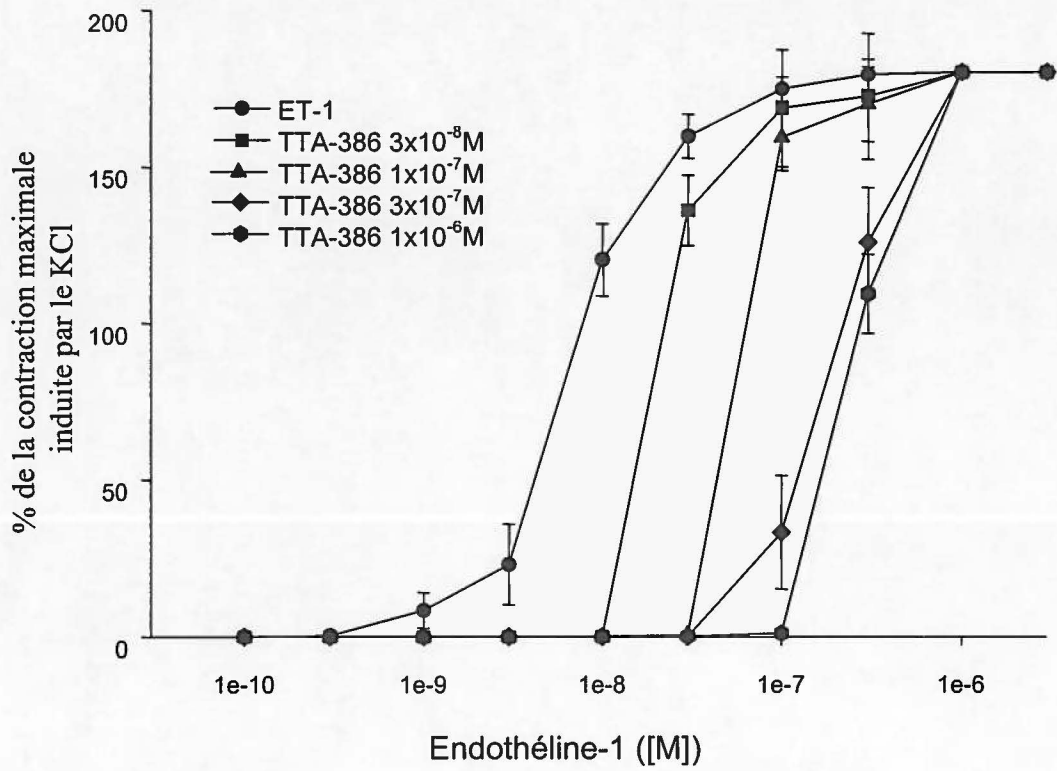


Figure 22 : Effet de l'antagoniste TTA-386 sur la courbe concentration-réponse de l'ET-1 stimulant la contraction de l'aorte de rat dénudée de son endothélium.

8.2 Études pharmacologiques sur le parenchyme pulmonaire de cobaye

Des études biologiques ont aussi été effectuées sur le parenchyme pulmonaire de cobaye, un tissu riche en récepteur ET_B. Les analyses ont alors démontré que les sondes dérivées du TTA-386 ainsi que le peptide original n'avaient aucune activité agoniste ou antagoniste sur ce type de récepteur.

D'autre part, même si l'analogue [Cys(Acm)^{3,11},Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET synthétisé dans notre laboratoire avait été caractérisé comme un agoniste possiblement partiel sur le parenchyme pulmonaire (Forget et al., 1996), les sondes dérivées de ce peptide n'ont présenté aucune activité. La substitution de certains acides aminés par l'agent photosensible p-Bpa et le résidu tyrosine ont entraîné une perte totale d'activité.

Discussion

9. Formation des sondes photosensibles par la méthode de synthèse peptidique sur phase solide

9.1 Choix des peptides pour le développement de sondes photosensibles

L'endothéline, un des plus puissants agents vasoconstricteurs, agit chez les mammifères via deux types de récepteurs, ET_A et ET_B (Arai et al., 1990 ; Sakurai et al., 1990). Afin d'approfondir les propriétés biochimiques de ces récepteurs et d'en connaître davantage sur les sites de liaison de l'ET, nous avons opté pour l'utilisation d'analogues photosensibles de ce peptide dans des essais de marquage par photoaffinité. Cette technique, qui a d'ailleurs grandement été utilisée, a permis la caractérisation biochimique d'une multitude de récepteurs et protéines (Sokolovsky, 1987; Escher, 1988; Eberle et al., 1989; Dorman et Prestwich, 1994; Nakanishi et al., 1995). Or, avant d'étudier la dynamique des interactions existant entre l'ET et ses récepteurs, la technique de photomarquage requiert la synthèse de sondes portant un groupement photosensible. Plusieurs agents photosensibles tels que les diazo esters, les aryl azido, les diazirines ou les dérivés benzophénones ont été développés au cours des années. Ces derniers, présentant plusieurs avantages comparés aux autres agents photosensibles, ont été choisis pour l'étude des récepteurs de l'ET. En effet, les dérivés benzophénones sont chimiquement plus stables et peuvent donc être manipulés à la lumière ambiante. De plus, ils peuvent être activés à 350-360nm évitant ainsi l'utilisation des longueurs d'ondes dommageables pour les protéines. Finalement, les dérivés benzophénones réagissent préférentiellement avec les liaisons C-H et ce, même en présence d'eau ou de volumineux nucléophiles (Dorman et Prestwich, 1994).

L'agent photosensible étant choisi, nous avons ensuite identifié deux analogues de l'ET susceptibles de devenir les sondes photosensibles nécessaires pour le photomarquage des récepteurs ET_A et ET_B. En ce qui concerne le récepteur ET_A, nous avons opté pour le TTA-386, un antagoniste compétitif de haute affinité (K_d : 1nm) et sélectif pour ce

récepteur (Kitada et al., 1993). Notre choix s'est arrêté sur cet hexapeptide puisqu'il est relativement court et qu'il ne nécessite aucune cyclisation, rendant ainsi sa synthèse plus facile. De plus, sa séquence contient déjà une tyrosine, le résidu favorable pour l'iodation de la sonde photosensible (Pullen, Brown et Nambi, 1997). Par ailleurs, l'utilisation d'un antagoniste comme sonde photosensible permet d'éviter l'internalisation des récepteurs lors des essais de liaison. Nous avons alors décidé d'entreprendre la synthèse de six analogues du TTA-386 dans lequel les résidus hydrophobes 1,2 et 6 ont été substitués tour à tour par le D- ou le L-pBpa, le dérivé benzophénone.

Pour le développement de sondes photosensibles sélectives au récepteur ET_B, nous avons utilisé le [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET. Cet analogue à structure réduite de l'ET-1 que nous avons déjà synthétisé dans notre laboratoire, est un peptide relativement court et linéaire qui n'avait présenté aucun problème de synthèse. De plus, il avait démontré une activité agoniste sélective pour les récepteurs ET_B. Nous avons donc modifié légèrement ce peptide pour incorporer le pBpa et la tyrosine, les deux résidus essentiels pour le radio-photomarquage. Quatre analogues linéaires ont alors été synthétisés à partir de ce peptide. Dans les trois premières sondes synthétisées, la leucine en position 17 a été remplacée par une tyrosine afin de permettre l'iodation subséquente des peptides. Ensuite, à tour de rôle, l'isoleucine 19 et l'isoleucine 20 ont été remplacées par le L-pBpa sachant que la portion C-terminale de l'ET-1 et plus spécifiquement son caractère hydrophobe est importante pour la liaison au récepteur. De plus, la lysine en position 9 a aussi été substituée par un L-pBpa puisqu'il a déjà été démontré que la substitution de ce résidu ne change pas l'activité du peptide. Finalement, pour la synthèse de la dernière sonde, nous avons remplacé l'espaceur aliphatique Aca, qui remplace les résidus 12 à 16 de la molécule ET-1, par Tyr-L-pBpa, un dipeptide très hydrophobe dont la longueur du squelette s'apparente à celle de l'Aca. Le segment 12 à 16 dans la molécule native est d'ailleurs hydrophobe.

9.2 Évaluation de la synthèse des sondes dérivées du TTA-386

9.2.1 Synthèse sur phase solide des dérivés du TTA-386

La synthèse sur phase solide des analogues du TTA-386 a été effectuée sans difficulté à l'aide d'un protocole de chimie Boc. La substitution des acides aminés hydrophobes leucine, alanine et phénylalanine par l'agent photosensible p-Bpa ne semble donc pas avoir provoqué de changement majeur dans l'organisation structurale de la molécule permettant ainsi l'élongation de la chaîne peptidique sans problème. Or, l'inconvénient associé à l'utilisation des acides aminés dont leur fonction N-terminale est protégée par le groupement Boc, réside dans la situation que les peptides en élongation sont soumis à de nombreux traitements au TFA. Des réactions secondaires catalysées en milieu acide auraient pu donc survenir. Nous étions ainsi confrontés par exemple à des risques d'oxydation du résidu tryptophane dont la chaîne latérale n'était pas protégée. De même, l'acide aminé tyrosine aurait pu lui aussi être modifié lors de la synthèse. Il aurait pu subir une substitution sur son noyau aromatique si le groupe protecteur n'avait pas été adéquat. Toutefois, les profils obtenus par CLHP analytique des analogues du TTA-386, avant l'ajout du groupement hexaméthylèneiminocarbonyle, n'ont montré qu'un seul pic majoritaire pour chacun des peptides. Les synthèses effectuées ont par conséquent conduit à la formation d'un seul produit majoritaire pour chacune des sondes. Les réactions secondaires ont donc été maintenues à un niveau très minimal.

L'obtention du peptide brut suite à sa synthèse nécessite finalement l'usage d'un acide fort tel que le HF pour rompre le lien entre le support solide et la chaîne d'acides aminés. Pendant la réaction de clivage, des capteurs de carbocations ont été ajoutés afin de réduire les risques de réactions secondaires. L'usage du m-crésol et de l'éthanthiol permet alors de protéger les résidus tryptophane et tyrosine contre une alkylation possible et/ou une oxydation. Toutefois, la présence d'un seul pic majoritaire sur le chromatogramme de chacune des sondes synthétisées avant l'ajout du cycle urée, laisse supposer qu'aucune de ces réactions ne s'est produite au niveau de la chaîne peptidique.

9.2.2 Addition du cycle hexaméthylèneiminocarbonyle sur les dérivés du TTA-386

L'antagoniste TTA-386 ne possède pas de fonction N-terminale libre. En effet, celle-ci se termine par le cycle hexaméthylèneiminocarbonyle relié au peptide par un lien urée. Or, l'ajout de ce groupement aux chaînes peptidiques s'est avéré une opération ardue. Deux protocoles différents ont été mis sur pied. Le premier était constitué de deux étapes, soit la formation d'un dérivé de l'hexaméthylèneiminocarbonyle, qui était ensuite mis en présence de l'amine alpha du peptide pour former le cycle recherché. Pour ce faire, nous avons fait réagir le chloroformate de p-nitrophénoxyde avec de l'homopipéridine. Une fois la réaction terminée, l'hexaméthylèneiminocarbonyle de p-nitrophénoxyde a été mis en présence du peptide dont l'amine alpha libre pouvait attaquer le carbonyle du dérivé par substitution nucléophile et ainsi libérer le groupe partant p-nitrophénolate. Des tests Kaiser effectués à différents temps durant la réaction ont alors montré la présence d'amines libres. Puisqu'il ne faut qu'une proportion d'amines libres relativement faible pour provoquer un test positif de forte intensité (moins de 5%), nous avons alors décidé d'arrêter la réaction et de vérifier le produit de clivage par chromatographie CLHP. Si la réaction avait fonctionné, la formation du lien urée et l'ajout du cycle auraient provoqué une augmentation du caractère hydrophobe des peptides. Leur temps de rétention sur CLHP analytique aurait donc augmenté de façon très significative. Toutefois, les chromatogrammes obtenus pour notre série de peptides, suite à cette réaction, n'ont démontré aucune différence de profil avec ceux des peptides de départ. L'ajout du cycle n'ayant pas réussi, le protocole a été repris en modifiant les réactifs utilisés pour la formation du dérivé de l'hexaméthylèneiminocarbonyle. La réaction a alors été successivement tentée avec du carbonate de disuccinimidyle, du carbonyldiimidazole et du phosgène, toujours en présence d'homopipéridine comme nucléophile. Les dérivés d'hexaméthylèneiminocarbonyle formés différaient alors d'une réaction à l'autre par leur groupe partant présent sur le carbonyle. La synthèse de tous ces dérivés visait à évaluer la réactivité de divers groupes partant et leur compatibilité avec l'attaque de l'amine alpha du peptide TTA-386, lors de la deuxième étape du protocole. Malheureusement, aucun des produits synthétisés n'a permis l'ajout du cycle sur la fonction N-terminale des peptides. L'objectif étant d'abord et avant tout de produire le TTA-386 et ses analogues,

nous n'avons pas exploré les causes de ces succès. A cette étape, nous avons plutôt pensé à inverser la stratégie de réaction soupçonnant que l'amine N-terminale n'était que peu ou pas disponible pour une attaque nucléophile sur une forme ou une autre de l'hexaméthylèneiminocarbonyle activé.

C'est dans cet ordre d'idée qu'un deuxième protocole fut mis au point en utilisant les mêmes réactifs que dans le premier essai effectué: le chloroformate de 4-nitrophényle et de l'homopipéridine. Dans ce cas-ci, les peptides n'ont donc pas réagi avec un dérivé de l'hexaméthylèneiminocarbonyle mais plutôt avec un réactif de couplage. L'amine alpha des peptides a donc été activée au moyen du chloroformate de 4-nitrophényle pour former les p-nitrophénylcarbonyl-peptides correspondants. Cette première étape du protocole a pu être vérifiée par un test Kaiser et celui-ci démontra la disparition d'amines libres. Ensuite, nous avons procédé à l'addition d'homopipéridine. L'amine de cette dernière pouvait alors attaquer le carbonyle lié à l'amine alpha du peptide et ainsi produire, après le départ du p-nitrophénolate, le dérivé urée désiré. L'amine alpha du peptide étant déjà occupé, la dernière partie de ce protocole ne pouvait pas être vérifiée par un test Kaiser. Suite à cette réaction, une analyse par CLHP des produits bruts obtenus après clivage au HF a démontré pour tous les peptides la présence d'un nouveau pic majoritaire possédant un temps de rétention plus élevé que celui des peptides de départ. Ce changement de profils suggérait que cette nouvelle approche produisait l'analogue attendu. Néanmoins, il est clair que la réaction n'est pas des plus favorables puisque dans tous les profils observés, le pic correspondant aux peptides de départ demeure présent et constitue un pourcentage important du produit brut. Nous n'avons pas tenté de maximiser le rendement de cette réaction. Néanmoins, une augmentation du temps de réaction pourrait améliorer les résultats.

9.3 Évaluation de la synthèse des sondes développées pour le récepteur ET_B

La synthèse sur phase solide des analogues du [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET a été effectuée sans difficulté à l'aide d'un protocole de chimie Boc. La substitution des acides aminés leucine, isoleucine, lysine et l'espaceur aliphatique Aca par

l'agent photosensible p-Bpa ne semble donc pas avoir provoqué de changement majeur dans l'organisation structurale de la molécule couverte de groupements protecteurs permettant ainsi l'élongation de la chaîne peptidique sans trop de difficulté. Par contre, l'analyse par CLHP des peptides bruts a montré sur chacun des profils la présence de deux ou trois pics majoritaires. Quelques réactions secondaires peuvent en être la cause. Un traitement basique a alors été effectué sur l'une des sondes afin de vérifier si nous pouvions renverser un possible shift N-O subi par une sérine lors du clivage au HF. Pendant la synthèse, la chaîne latérale de cet acide aminé est protégée, lui conférant ainsi une résistance aux réactions secondaires. Toutefois, lors du clivage, la protection est retirée et rien ne peut empêcher le réarrangement nommé déplacement N-O, catalysé en milieu acide (Bodanszky et Martinez, 1981). Un traitement acide a aussi été effectué sur un aliquot afin de vérifier s'il n'y avait pas eu de formation d'aspartimide, réaction secondaire catalysée en milieu basique lors de la neutralisation des peptides durant la synthèse. Les chromatogrammes obtenus suite à ces deux traitements n'ont présenté aucune amélioration de profil. Finalement, un test au NH_4I nous a convaincus que la méthionine n'avait subi aucune oxydation au cours de la synthèse. Les résultats de ces tests nous suggèrent donc qu'aucune des réactions secondaires énumérées ci-haut n'a eu lieu au cours de la synthèse. Par contre, une réaction secondaire catalysée en milieu acide telle que l'oxydation du résidu tryptophane aurait pu survenir dans le processus. Une alkylation suite à une déformylation prématurée de ce résidu a pu également se produire. D'ailleurs, le clivage des sondes photosensibles a donné des poudres d'un violet foncé suggérant la présence de noyaux indoles libres. Un test de Ehrlich dans lequel, l'indole du tryptophane réagit avec du p-diméthylaminobenzaldéhyde pour former un complexe violet, a montré que certains groupements formyles de ce résidu avaient été perdus puisque le test est insensible lorsque l'indole est protégé (Stewart et Young, 1984). Il est donc probable qu'une partie plus ou moins importante de la protection formyle ait été perdue en cours de synthèse. Nous sommes toutefois convaincus que cet événement est tout de même demeuré mineur puisque les pics majoritaires du produit brut obtenu possédaient des masses de peptides formylés.

9.4 Étude de l'identité et de la pureté de toutes les sondes synthétisées

Tous les pics majoritaires observés sur les chromatogrammes des peptides bruts ont été séparés par CLHP préparative sur phase inverse. Les analyses par spectrométrie de masse de chacun de ces pics ont ensuite permis d'identifier ceux correspondant aux peptides recherchés. Pour chacune des sondes dérivées du TTA-386 et du [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET, seul un des pics isolés possédait, dans chacun des cas, la masse du peptide recherché. Une différence de masse non significative a parfois été observée pour certaines des sondes synthétisées.

Selon l'analyse par CLHP sur une colonne de 5 μ m, la pureté des peptides synthétisés variait entre 62% et 97%. Cette pureté s'avérait à ce stade-ci suffisante pour notre premier criblage pharmacologique.

10. Évaluation pharmacologique des sondes synthétisées

10.1 Étude des dérivés du TTA-386

Le TTA-386 est un antagoniste peptidique capable d'inhiber la contraction de l'aorte de rat induite par l'ET-1 via les récepteurs ET_A. En 1993, l'activité antagoniste de cette molécule avait déjà été décrite par sa capacité d'inhiber la libération de calcium induite par la liaison de ET-1 sur les récepteurs ET_A (Kitada et al., 1993). La valeur du pA₂ calculée suite à l'inhibition concentration-dépendante de la contraction de l'aorte de rat par le TTA-386 est de 7,8. En d'autres mots, une concentration approximative de 10⁻⁸M de cet antagoniste permet de diminuer de moitié l'effet constricteur de l'ET-1. Par comparaison, un composé tel que le bosentan exprime une valeur de pA₂ de 7,2 sur le même tissu (Roux et al., 1999). Par conséquent, l'activité antagoniste du TTA-386 est comparable à celle d'antagonistes déjà connus pour leur effet inhibiteur sur l'activité vasoconstrictrice de l'ET-1. De plus, l'absence d'activité agoniste ou antagoniste sur une préparation ET_B (parenchyme pulmonaire de cobaye) suggère fortement que le TTA-386 est un antagoniste spécifique pour les récepteurs ET_A tel qu'il avait été décrit précédemment (Pullen et al., 1997).

Selon les travaux effectués dans notre laboratoire, la séquence du TTA-386 serait importante pour l'activité du peptide sur le récepteur ET_A . En effet, la substitution du premier et du second résidu du peptide TTA-386 par l'agent photosensible pBpa inhibe complètement l'activité antagoniste sur les anneaux d'aorte de rat tout en demeurant inactif sur le parenchyme pulmonaire de cobaye. La perte d'activité des peptides [D-L-pBpa¹]-TTA-386 est probablement causée par le remplacement de la chaîne alkyle de la leucine par le noyau benzophénone de l'agent photosensible pBpa. L'insertion de cette structure aromatique relativement volumineuse à côté du cycle hexaméthylène-imonocarbonyle affecte la liaison du peptide au récepteur. Toutefois, ce n'est pas clair si l'absence de liaison est causée par un effet sur la conformation du TTA-386 ou est le résultat d'un encombrement stérique entre le ligand et son récepteur.

D'autre part, les mêmes explications peuvent être évoquées en ce qui concerne les peptides [D-pBpa²]-TTA-386 et [L-pBpa²]-TTA-386. De plus, même si la chaîne latérale du tryptophane est formée de deux cycles conjugués (noyau indole), ses propriétés biologiques et physiques sont très différentes de celles du pBpa. L'inactivité de ces sondes peut par conséquent aussi s'expliquer par la perte de l'indole.

En ce qui concerne les peptides [D-pBpa⁶]-TTA-386 et [L-pBpa⁶]-TTA-386, le résidu phénylalanine a été substitué par l'agent photosensible pBpa. Ce changement d'acide aminé n'a pas modifié l'activité du peptide suggérant que le remplacement de ce résidu aromatique par un autre de nature similaire mais tout de même de taille supérieure est parfaitement tolérée. Le benzophénone du pBpa étant localisé dans la partie C-terminale du peptide, il est probablement libre de tourner et ainsi d'accomoder la topographie du récepteur.

Étonnamment, la configuration absolue du pBpa ne semble en aucun temps affecter l'activité antagoniste des peptides. Que soit inséré dans la chaîne d'acides aminés le D- ou le L-pBpa en position un, deux ou six, aucune différence significative dans le comportement des peptides n'a été observée. L'arrangement spatial de la chaîne latérale du pBpa ne modifie donc pas l'activité du peptide. Des valeurs similaires de pA_2 de 7,8 et

7,5 ont d'ailleurs été calculées pour le [D-pBpa⁶]-TTA-386 et le [L-pBpa⁶]-TTA-386 respectivement.

10.2 Étude des dérivés du [Cys(Acm)^{3,11},Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET

Selon des études de structure-activité effectuées par notre équipe, l'analogue linéaire [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET se comporte en agoniste probablement partiel sur le parenchyme pulmonaire de cobayes (Forget et al., 1996). En effet, une valeur de $1,4 \times 10^{-9} \text{M}$ a été calculée pour la concentration du peptide qui produit 50% de la réponse maximale de ET-1 dans le parenchyme pulmonaire de cobaye (EC₅₀). De plus, cette activité agoniste semble spécifique pour le récepteur ET_B puisque ce peptide n'a démontré aucune activité lors des essais pharmacologiques sur l'aorte de rat.

En ce qui concerne les sondes synthétisées pour le photomarquage du récepteur ET_B, nous avons remplacé deux acides aminés du peptide décrit ci-haut pour y incorporer la tyrosine et le L-pBpa. Ces substitutions se sont avérées fatales pour l'activité des peptides. Or la perte d'activité peut être le reflet de la substitution de l'un ou l'autre des acides aminés ciblés. Dans le cas de la sonde [Cys(Acm)^{3,11}, L-Bpa⁹, Tyr¹⁷, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET, nous avons remplacé la lysine en position 9 par le pBpa. Or, il avait déjà été démontré que cet acide aminé peut être substitué par l'alanine, la leucine ou l'acide glutamique sans modifier l'activité biologique de l'ET-1 (Pelton, 1997). Néanmoins, le remplacement d'une chaîne latérale basique et polaire par un groupement hydrophobe comportant deux noyaux aromatiques peut vraisemblablement créer un encombrement stérique et venir modifier l'interaction du peptide avec le récepteur. Toutefois, la perte d'activité peut aussi être causée par la substitution de la leucine¹⁷ par la tyrosine. Nous avons déjà observé lors de l'étude de l'analogue [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(18-21)ET que le retrait de la Leu¹⁷ provoquait un effet important sur l'activité contractile enregistrée. Ce résidu est d'ailleurs considéré comme un élément clé de l'activation des récepteurs ET_B (Erhardt, 1991). Toutefois, même si ce résidu est important, il n'est pas essentiel puisque [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(18-21)ET possède, dans le parenchyme pulmonaire de cobayes, une activité intrinsèque semblable à celle de ET-1.

Donc, la perte de ce résidu ne devrait pas être la cause majeure de l'inactivité de la sonde photosensible. Toutefois, la substitution d'un résidu hydrophobe par un résidu possédant une fonction phénolique comme chaîne latérale, peut modifier les caractéristiques structurales du peptide et empêcher que celui-ci prenne la forme désirée pour accommoder le récepteur et assurer son activation.

Les sondes [Cys(Acm)^{3,11}, Tyr¹⁷, L-pBpa¹⁹, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET et [Cys(Acm)^{3,11}, Tyr¹⁷, L-pBpa²⁰, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET ont elles aussi perdu leur résidu Leu¹⁷ à la faveur d'une tyrosine. La même hypothèse peut donc être émise pour leur perte d'activité, soit un encombrement stérique créé par la chaîne latérale de la tyrosine. Dans le même ordre d'idée, la deuxième substitution de ces deux peptides a consisté à remplacer les résidus Ile en position 19 et 20 par le pBpa. Notre postulat consistait à remplacer un résidu hydrophobe par un autre résidu hydrophobe, ce qui aurait dû minimiser l'impact de la substitution. Des études sur les éléments nécessaires à la liaison aux récepteurs ET_B ont montré que le segment C-terminal est essentiel pour l'activation (Doherty, 1992 ; Saeki et al., 1992). La substitution n'a pas modifié la dimension du squelette amide (backbone). Par conséquent, c'est la nature de la substitution qui a conduit à l'abolition complète de l'activité des peptides. De plus, les deux substitutions ont été faites très près l'une de l'autre, soit en position 17 et 19 ou en position 17 et 20. L'ajout de deux structures aromatiques de bonne taille, séparées par seulement un ou deux acides aminés a pu occasionner un changement majeur dans la structure tridimensionnelle du peptide ne lui permettant plus de se lier au récepteur.

Pour ce qui est du peptide [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For²¹)]-(3-11)-Tyr-L-pBpa-(17-21)ET, aucun acide aminé n'a été substitué. Seul l'espaceur aliphatique Aca a été remplacé par la tyrosine et le dérivé benzophénone. Or, l'espaceur permettait à la molécule d'être très flexible. Malheureusement, le changement de celui-ci a dû créer une certaine rigidité ne permettant plus au peptide de se replier et de s'ajuster à la topographie du récepteur, d'où l'inhibition de la liaison.

Les hypothèses avancées pour expliquer la cause de la perte d'activité des peptides synthétisés pourraient être vérifiées. Il faudrait dans ce cas synthétiser de nouveaux peptides en ne faisant cette fois qu'une seule substitution. Les résultats de ces travaux nous permettraient alors de déterminer si la perte d'activité des peptides est causée par la tyrosine, le benzophénone ou par l'interaction des deux résidus.

Conclusion

L'ET qui est l'un des plus puissants agents vasoconstricteurs connus jusqu'à ce jour chez les mammifères agit via deux types de récepteurs, soit ET_A et ET_B. Les interactions de l'ET avec ses récepteurs étant peu connues, nous avons proposé de synthétiser des sondes peptidiques photosensibles. Celles-ci permettraient alors, par la technique de marquage par photoaffinité, d'approfondir les propriétés biochimiques de ces récepteurs et d'en connaître davantage sur les sites de liaison de l'ET.

Les résultats des tests pharmacologiques obtenus suite à la synthèse de peptides photosensibles ont confirmé que deux des sondes dérivées du TTA-386, soit le [D-pBpa⁶]-TTA-386 et le [L-pBpa⁶]-TTA-386 ont produit une activité antagoniste sur le récepteur ET_A. Leur aptitude à inhiber la contraction de l'aorte causée par l'ET démontre ainsi leur capacité à se lier à ce récepteur. De plus, l'absence d'activité sur le parenchyme de poumons de cobaye suggère que ces peptides sont spécifiques à ET_A. Par conséquent, ces deux sondes pourront être utilisées sans aucun doute pour la caractérisation du récepteur ET_A.

Lors de la prochaine étape du projet de marquage par photoaffinité des récepteurs de l'ET, ces deux peptides seront utilisés comme sondes photosensibles spécifiques pour des essais de liaison avec le récepteur ET_A. Il faudra alors marquer à l'¹²⁵I les peptides contenant tous d'ailleurs un résidu tyrosine. Ce radio-marquage nous permettra de tracer des courbes de saturation de ces photosondes comme cela a déjà été réalisé avec la molécule originale TTA-386 (Pullen, 1997). Finalement, la technique de marquage par photoaffinité nous permettra de mieux caractériser le site de liaison de ces peptides sur le récepteur ET_A.

En ce qui concerne le récepteur ET_B, l'utilisation de l'analogue linéaire [Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For²¹)]-(3-11)-Aca-(17-21)ET, comme gabarit de synthèse pour le développement de sondes photosensibles, n'a pas permis d'obtenir des peptides se liant au récepteur, comme il a été confirmé par les tests pharmacologiques. Par conséquent, l'étude des

récepteurs ET_B nécessitera la synthèse de nouvelles sondes photosensibles. Un nouvel analogue de l'ET devra alors être sélectionné comme molécule de départ. Celui-ci devra alors être choisi en considérant qu'un de ces résidus devra être remplacé par l'agent photosensible pBpa et un autre par la tyrosine. L'utilisation d'un peptide contenant déjà dans sa structure initiale une tyrosine, comme le TTA-386 pour le récepteur ET_A, éviterait toutefois de procéder à une deuxième substitution d'acide aminé. L'analogue IRL 1620 (Suc-[Glu⁹,Ala^{11,15}]ET-1 (8-21)) qui démontre une activité agoniste spécifique pour le récepteur ET_B possède déjà dans sa structure initiale une tyrosine (Karakci et al., 1993). Il pourrait donc être intéressant d'utiliser ce peptide pour le développement de nouvelles sondes photosensibles spécifiques pour le récepteur ET_B de l'ET.

Appendices

Appendice A

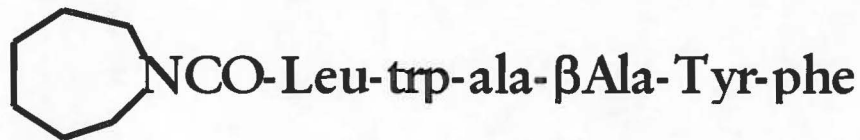
Abréviations des acides aminés

| Acide Aminé | Abréviation à trois lettres | Abréviation à une lettre |
|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Acide aspartique | Asp | D |
| Acide glutamique | Glu | E |
| Alanine | Ala | A |
| Arginine | Arg | R |
| Asparagine | Asn | N |
| Cystéine | Cys | C |
| Glutamine | Gln | Q |
| Glycine | Gly | G |
| Histidine | His | H |
| Isoleucine | Ile | I |
| Leucine | Leu | L |
| Lysine | Lys | K |
| Méthionine | Met | M |
| Phénylalanine | Phe | F |
| Proline | Pro | P |
| Sérine | Ser | S |
| Thréonine | Thr | T |
| Tryptophane | Trp | W |
| Tyrosine | Tyr | Y |
| Valine | Val | V |
| p-benzoyl- phénylalanine | p-Bpa | |

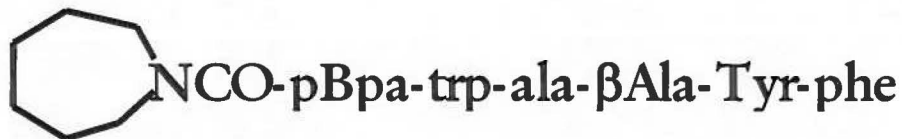
Appendice B

Sondes photosensibles synthétisées pour le photomarquage du récepteur ET_A.

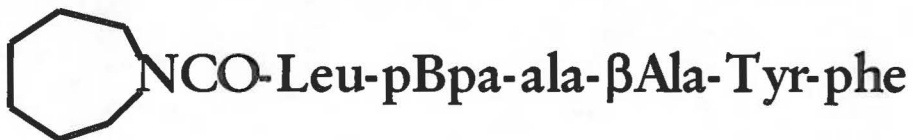
TTA-386



[D ou L-pBpa¹]-TTA-386



[D ou L-pBpa²]-TTA-386



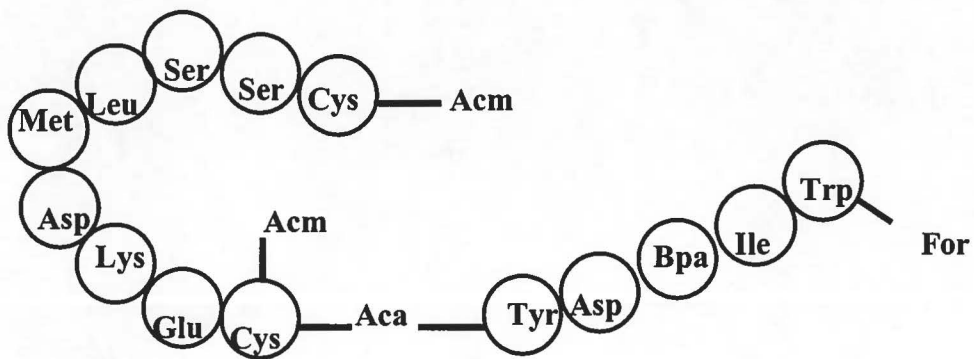
[D ou L-pBpa⁶]-TTA-386



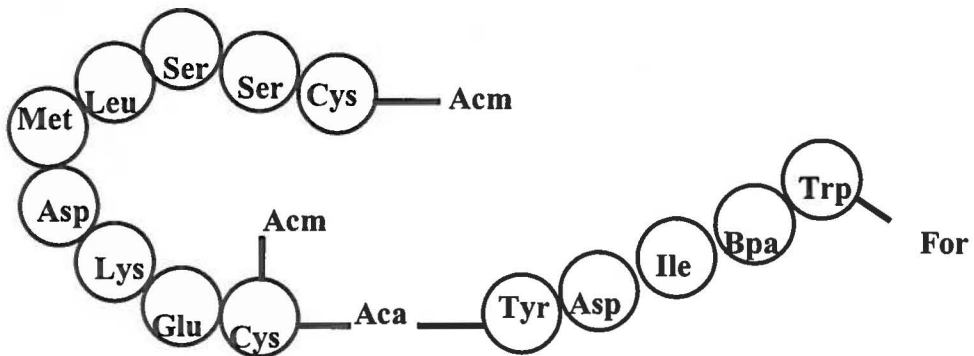
Appendice C

Sondes photosensibles synthétisées pour le photomarquage du récepteur ET_B.

[Cys(Acm)^{3,11}, Tyr¹⁷, L-pBpa¹⁹, Trp(For)²¹]- (3-11)Aca- (17-21)ET

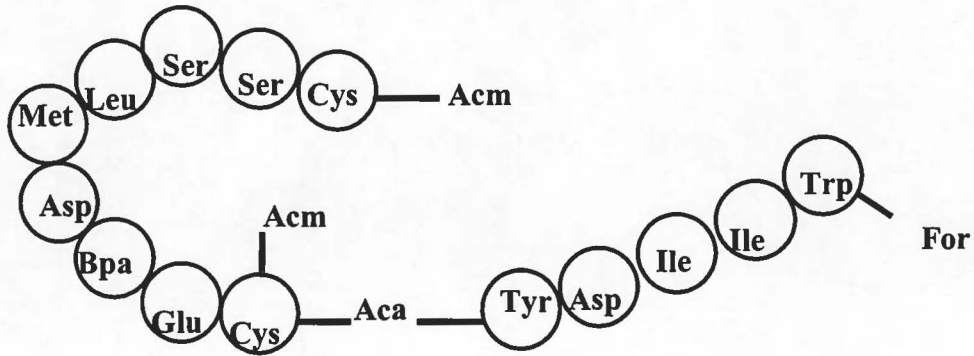


[Cys(Acm)^{3,11}, Tyr¹⁷, L-pBpa²⁰, Trp(For)²¹]- (3-11)Aca- (17-21)ET

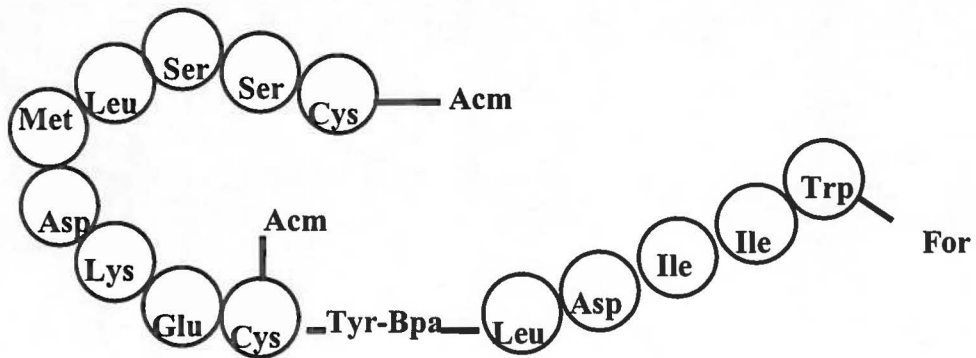


Appendice C (suite)

[Cys(Acm)^{3,11}, L-pBpa⁹, Tyr¹⁷, Trp(For)²¹]- (3-11)Aca- (17-21)ET

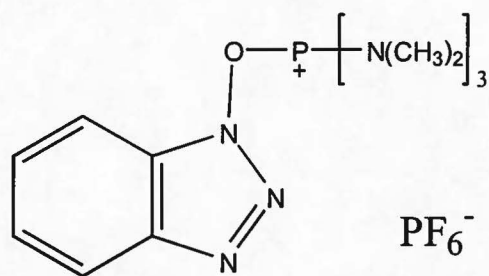


Cys(Acm)^{3,11}, Trp(For)²¹]- (3-11)- Tyr-L-pBpa- (17-21)ET



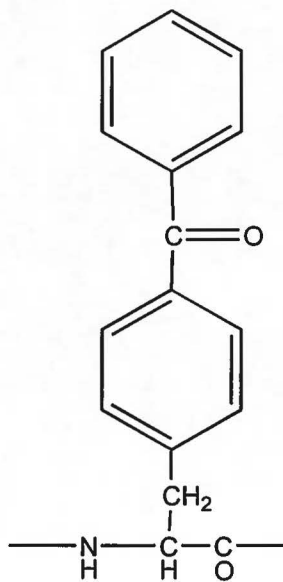
Appendice D

Structure des réactifs et des groupes protecteurs utilisés

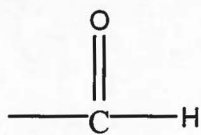


PF_6^-

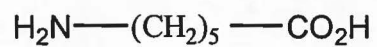
BOP



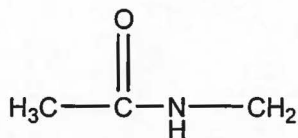
pBpa

Appendice D (suite)

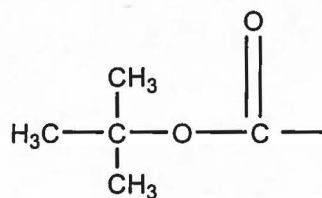
Formyle
(For)



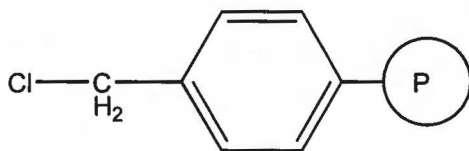
Acide 6-aminocaproïque
(Aca)



Acétamidométhyle
(Acm)



t-butyloxy-carbonyle
(Boc)



Résine de Merrifield

Références

- ADACHI, M., Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1994. « 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.
- AHN, K., K. Beningo, G. Olds et D. Hupe. 1992. « The Endothelin-Converting Enzyme from Human Umbilical Vein is a Membrane-Bound Metalloprotease Similar to that from Bovine Aortic Endothelial Cells ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol.89, p. 8606-8610.
- ARAI, H., S. Nori, I. Aramori, H. Ohkubu et S. Nakanishi. 1990. « Cloning and Expression of a cDNA Encoding an Endothelin Receptor ». Nature, vol. 348, p. 730-732.
- 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 ¹H-NMR ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 37, p.315-324.
- BARANY, G. et R.B. Merrifield. 1980. Peptides, E. Gross et J. Meienhofer Eds. New York : Academic Press.
- BODANSZKY, M. et J. Martinez. 1981. « Side Reactions in Peptide Synthesis ». Synthesis, p.333-356.
- BUNIN, B. 1998. The Combinatorial Index. San Francisco : Academic Press, 322p.
- 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.
- COUPAL, M., A. De Léan, N. McNicoll et A. Fournier. 1999. « Development of p-Benzoylbenzoylated [N,C,rANP(1-28)]pBNP32 (pBNP1) Derivatives and Affinity Photolabeling of the Bovine NPR-A Receptor ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol.258, p.181-186.
- DELÉAN, A., A.A. Hancock, et R.J. Lefkowitz. 1982. « Validation and Statistical Analysis of a Computer Modeling for Quantitative Analysis of Radio-Ligand Binding Data for Mixtures of Pharmacological Receptor Subtypes ». Molecular Pharmacology, vol. 21, p.5-16.
- DENAULT, J.-B., A. Claing, P. D'Orléans-Juste, T. Sawamura, T. Kido, T. Masaki et R. Leduc. 1995. « Processing of Proendothelin-1 by Human Furin Convertase ». FEBS Letters, vol. 362, p.276-280.

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

D'ORLÉANS-JUSTE, P., J.-P. Gratton, R. Leduc, G. Bkaily et A. Claing. 1996. «L'Endothéline : Pharmacologie Cardio-vasculaire et Considérations Physiopathologiques ». Médecine/Sciences, vol.12, p. 563-574.

DORMAN, G. et G.D. Prestwich. 1994. «Benzophenone Photophores in Biochemistry». Biochemistry, vol.33, p.5661-5673.

EBERLE, A.N., P.N. De Graan, T. Scimonelli et F. Solca. 1989. «Photoaffinity Labeling of Melanocyte-Stimulating Hormone Receptors». Pharmacology and Therapeutics, vol.44, p.63-83.

ERHARDT, P.W. 1991. «Endothelin Structure and Structure-Activity Relationships ». Clinical Physiology Series, p.41-57.

ESCHER, E. 1988. «Photoaffinity Labeling of Angiotensin II and Bradikinin Receptors ». Pharmacology and Therapeutics, vol.32, p. 37-55.

FERRO, C.J. et D.J. Webb. 1996. «The Clinical Potential of Endothelin Receptor Antagonists in Cardiovascular Medicine». Drugs, vol. 51, p. 12-27.

FLEET, G.W.J., R.R. Porter et J.R. Knowles. 1969. «Affinity labeling of Antibodies with Aryl Nitrene as Reactive Group». Nature, vol.224, p.511-512.

FLEMING, S.A. 1995. «Chemical Reagents in Photoaffinity Labeling». Tetrahedron, vol.57, p. 12479-12520.

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, p89-94.

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.

FURCHGOTT, R.F. et J.V. Zawadski. 1980. « The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine ». Nature vol.288 p. 373-376.

GALARDY, R.E., L.C. Craig et M.P. Printz. 1973. «Benzophenone Triplet : A New Photochemical Probe of Biological Ligand-Receptor Interactions». Nature, vol. 242, p. 127-128.

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

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

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.

HASHIDO, K., T. Gamou, M. Adachi, H. Tabuchi, T. Watanabe, Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1991. « 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.

HIGHSMITH, R.F., 1998. Endothelin Molecular Biology, Physiology and Pathology, New Jersey : Humana press, 274p.

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

HUNT, J.T., V.G. Lee, P.D. Steir, A. Hedberg, E. C.-K. Liu, D. McMuller et S. Moreland. 1991. «Structure-Activity Relationships of Monocyclic Endothelin Analogs» » Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, vol. 1, p.33-38.

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

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.

KARAKI, H., S.A. Sudjarwo, M. Hori, M. Takai, Y. Urade et T. Okada. 1993. « Induction of Endothelium-Dependent Relaxation in the Rat Aorta by IRL 1620, a Novel

and Selective Agonist at the Endothelin ET_B Receptor». British Journal of Pharmacology, vol. 109, p.486-490.

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

KASHIWABARA, T., Y. Inagaki, H. Ohata, A. Iwamatsu, M. Nomizu, A. Morita et K. Nishikori. 1989. « Putative Precursors of Endothelin Have Less Vasoconstrictor Activity *In Vitro* But a Potent Pressor Effect *In Vivo* ». FEBS Letters, vol. 247, p.73-76.

KAUER, J.C., S. Erickson-Viitanen, H.R. Wolfe et W.F. DeGrado. 1986. «p-Benzoyl-L-phenylalanine, a New Photoreactive Amino Acid». Journal of Biological Chemistry, vol.261, p. 10695-10700.

KIMURA, C., Y. Itoh, S. Ohklubo et M. Fujino. 1989. « Cloning and Sequencing of a Canine Gene Segment Encoding Mature Endothelin ». Nucleic Acids Research, vol. 17, p 3290.

KITADA, C., T. Ohtaki, Y. Masuda, Y. Masuo, H. Nomura, T. Asami, Y. Matsumoto, M. Satou et M. Fujino. 1993 «Design and Synthesis of ET_A Receptor Antagonists and Study of ET_A Receptor Distribution». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol.22, p.S128-131.

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. 16892-16896.

KRYSTEK, S.R., P.S. Patel, P.M. Rose, S.M. Fisher, B.K. Kienzle, D.A. Lach, E.C.K. 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.

LEE, J.A., J.D. Elliot, J.A. Sutiphong, W.J. Freisen, E.H. Ohlstein, J.M. Stadel, J.G. Gleason et C.E. Peishoff. 1994. « 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 USA. vol. 91, p. 7164-7168.

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

MASAKI, T., M. Yanagisawa et K Goto. 1992. « Physiology and Pharmacology of Endothelins ». Medicinal Research Reviews, vol.12, p.391-421.

MATEO A.O. et A.A. De Artinano. 1997. « Highlights on Endothelins : a Review ». Pharmacological Research, vol.36, p.339-351.

MERRIFIELD, R.B.1963. «Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide». Journal of the American Chemical Society, vol.85, p2149-2154.

MIMEAULT, M., A. Fournier, J. Féthière et A. De Léan. 1993. «Development of Natriuretic Peptide Analogs Selective for the Atrial Natriuretic Factor-R1A Receptor Subtype». Molecular Pharmacology, vol.43, p. 775-782.

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. 288, p. 663-665.

NAGAYAMA, Y., H.L. Wadsworth, G.D. Chazenbalk, D. Russo, P. Seto et B. Rapoport. 1991. «Thyrotropin-luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor Extracellular Domain Chimeras as Probes for Thyrotropin Receptor Function ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol. 88, p. 902-905.

NAKAJIMA, K., S.-I. Kumagaye, H. Nishio, H. Kuroda, T. Watanabe, Y. Kobayashi, H. Tamaoki, T. Kimura et S. Sakakibara. 1989. «Synthesis of Endothelin-1 Analogues, Endothelin-3, and Sarafotoxin S6b : Structure-Activity Relationships». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol.13, p. S8-S12.

NAKANISHI, K., H. Khang, K.A. Lerro, S. Takekuma, T. Yamamoto, T.H. Lien, L. Sastry, D.J. Baek, C. Moquin-Pathey et M.F. Boehm. 1995. «Photoaffinity Labeling of Rhodopsin and Bacteriorhodopsin». Biophysical Chemistry, vol. 56, p. 13-22.

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.

PALMER, R.M.J., 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.

PELTON, J.T. et J.P. Huggins. Éd., 1997. Endothelins in Biology and Medicine. New York : CRC Press, p.307-325.

PERKINS, T.D.J., 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.

PULLEN, M., G. Brown et P. Nambi. 1997. «Binding Characteristics of [¹²⁵I]TTA-386, ET_A-Selective Antagonist». Neuropeptides, vol.31, p.345-349.

RANDALL, M.D., S.A. Douglas et C.R. Hiley. 1989. «Vascular Activities of Endothelin-1 and Some Alanyl Substituted Analogues in Resistance Beds of the Rat». British Journal of Pharmacology, vol. 98, p. 685-699.

ROUX, S., V. Breu, T. Giller, W. Neidhart, H. Ramuz, P. Coassolo, J.-P., Clozel et M. Clozel. 1997. «Ro 61-1790, a New Hydrosoluble Endothelin Antagonist: General Pharmacology and Effects on Experimental Cerebral Vasospasm». Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, vol. 283, p.1110-1118.

SAEKI, T., M. Ihara, T. Fukuroda et M. Yano. 1992. « Structure-Activity Relationships 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.

SAKAMOTO, A., M. Yanagisawa, T. Sawamura, T. Enoki, T. Ohtani, T. Sakurai, K. Nakao, T. Toyooka et T. Masaki. 1993. «Distinct Subdomains of Human Endothelin Receptors Determine their Selectivity to Endothelin A-Selective Antagonist and Endothelin B-selective agonists ». Journal of Biological Chemistry, vol. 268, p. 8547-8553.

SAKURAI, T., M. Yanagisawa, Y. Takawa, 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.

SHIMADA, K., M. Takahashi et K. Tanzawa. 1994. « Cloning and Functional Expression of Endothelin-Converting Enzyme from Rat Endothelial Cells ». The Journal of Biological Chemistry, vol.269, p. 18275-18278.

SINGH, A., E.R. Thorton et F.H. Westheimer. 1962. «The Photolysis of Diazoacetylchymotrypsin». Journal of Biological Chemistry, vol.237, p.3007-3008.

SMITH, R.A. et J.R. Knowles. 1973. «Aryldiazirines. Potential Reagents for Photolabeling of Biological Receptor Sites». Journal of the American Chemical Society, vol. 95, p. 5072-5073.

SOKOLOVSKY, M. 1987. «Photoaffinity Labeling of Muscarinic Receptors». Pharmacology and Therapeutics, vol.32, p.287-302.

STEWART, J.M. et J.D. Young. 1984. Solid Phase Peptide Synthesis. Rockford, Illinois : Pierce, Chemical Company, 176p.

STJERNQUIST, M. 1998. « Endothelins-Vasoactive Peptides and Growth Factors ». Cell and Tissue Research, vol.292, p.1-9.

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,Ala^{11,15}]-Endothelin-1(8-21), IRL 1620, for the ET_B Receptor ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 184, p.953-959.

TAM, J.P., W. Liu, J.-W. Zhang, M. Galantiro, F. Bertolero, C. Cristiani, F. Vaghi et R. Castiglione. 1994. «Alanine Scan of Endothelin : Importance of Aromatic Residues». Peptides, vol.15, p. 703-708.

TOPOUZIS, S., J.T. Pelton et R.C. Miller. 1989. «Effects of Calcium Entry Blockers on Contractions Evoked by Endothelin-1, [Ala^{3,11}]Endothelin-1 and [Ala^{1,15}]Endothelin-1 in Rat Isolated Aorta». British Journal of Pharmacology, vol.98, p.669-677.

WALLACE, B.A. et R.W. Janes. 1995. «The Crystal Structure of Human Endothelin-1 ». vol. 26, p. S250-253.

WANG, S.-S., B.F. Gisin, D.P. Winter, R. Makofske, I.D. Kulesha, C. Tzougraki et J. Meienhofer. 1977. « Facile Synthesis of Amino Acid and Peptide Esters under Mild Conditions via Cesium Salts ». Journal of Organic Chemistry, vol. 42, p.1286-1290.

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

YANAGISAWA, M. et T. Masaki. 1989. « Endothelin, a Novel Endothelium-Derived Peptide : Pharmacological Activities, Regulation and Possible Roles in Cardiovascular Disease ». Biochemical Pharmacology, vol. 38, p. 1877-1883.

ZHU, G., L.H. Wu, C. Mauzy, A.M. Egloff, T. Mirzadegan et F.Z. Chung. 1992. « Replacement of Lysine-181 by Aspartic Acid in the Third Transmembrane Region of Endothelin Type B Receptor Reduces its Affinity to Endothelin Peptides and Sarafotoxin 6c Without Affecting G Protein Coupling ». Journal of Cellular Biochemistry, vol. 50, p. 159-164.