

Université du Québec
INRS-Santé

Développement d'une méthode de lactamisation pour la synthèse d'analogues pontés de l'endothéline-1

Par
Céline Charbonneau
Bachelière ès sciences (B.Sc.)

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

Jury d'évaluation

Examineur externe

Bruno Battistini
Chercheur
Hôpital Laval

Examineur interne

Christiane Ayotte
Professeure
INRS-Santé

Directeur de recherche

Alain Fournier
Professeur
INRS-Santé

Juillet 1998

© droits réservés de Céline Charbonneau, 1998

RÉSUMÉ

Les endothélines (ET-1,-2,-3) sont des peptides de 21 acides aminés qui suscite beaucoup d'intérêts puisqu'il sont les plus puissants vasoconstricteurs connus chez l'humain. Ces médiateurs possèdent dans leur structure deux ponts disulfures unissant respectivement les cystéines 1-15 et 3-11. Les nombreuses études pharmacologiques sur les endothélines, principalement ET-1, ont permis d'établir que ce peptide est à l'origine de deux réponses distinctes au niveau vasculaire; l'une de vasoconstriction et l'autre de vasodilatation. Ces deux types d'effets en réponse à l'ET-1 suggèrent l'existence d'une hétérogénéité de récepteurs. Effectivement, des études pharmacologiques ainsi que le clonage moléculaire démontrent l'existence de divers sous-types de récepteurs pour les ETs. Chez les mammifères, les mieux connus sont ET_A-R, ET_B-R et ET_C-R. D'autres études suggèrent même l'existence d'autres récepteurs pour l'ET-1 soient ET_{B1}, ET_{B2}, ET_{AX}, etc... La liaison de l'ET-1 à ses récepteurs produit divers effets physiologiques, tel que la modulation du tonus vasculaire, la production d'hormones et une action mitogène. Aussi, il est suggéré que l'ET-1 soit impliquée dans plusieurs pathophysiologies humaines. On lui attribue notamment un rôle important dans les cas d'infarctus du myocarde, de l'insuffisance rénale et de maladies inflammatoires pulmonaires.

Jusqu'à maintenant, plusieurs études de structure-activité ont été entreprises dans le but de connaître le rôle exact et distinct des 21 acides aminés constituant l'ET-1 lors de l'interaction avec son récepteur. Plusieurs observations rapportées jusqu'à présent laissent entrevoir l'implication des 4 Cys de la molécule et des 19 Cys du récepteur. Des analogues de l'ET-1 ayant un des deux ponts disulfures remplacé par un pont lactame ont été conçus par synthèse en phase solide. Ce projet de recherche a pour but de vérifier le rôle des cystéines lors de l'interaction au niveau moléculaire. Les acides aminés sélectionnés pour substituer les Cys 1, 3, 11 et 15 sont Asp, Glu, Lys et Orn. Les diverses combinaisons de résidus formant les ponts ont alors été testées dans le but de vérifier de quelle façon la longueur de ce lien intramoléculaire vient influencer l'activité biologique de ce peptide analogue de l'ET-1. Une méthode de synthèse spécifique a de plus été évaluée, puisque deux stratégies de cyclisation sont nécessaires pour former de façon distincte le pont lactame

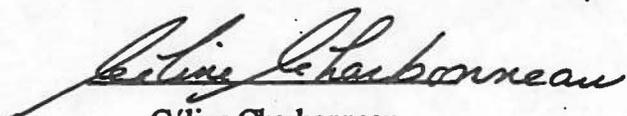
et le pont disulfure. Une approche avec protection orthogonale est donc utilisée. Cette procédure permet de retirer sélectivement les différents groupes protecteurs.

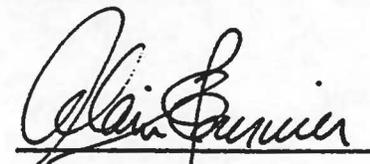
La méthode de synthèse habituellement utilisée dans notre laboratoire ne convient pas au type d'analogues désirés. Effectivement, nos observations suggèrent une déprotection inattendue du noyau indole du Trp en cours de synthèse. Ce noyau étant instable, il peut donner naissance à plusieurs réactions secondaires. De plus, au cours de la synthèse, plusieurs étapes de couplage ont dû être reprises 2 ou 3 fois, ce qui signifie que le peptide a été mis en contact avec une quantité importante de réactifs. Cette situation a entraîné la production d'espèces nucléophiles, contribuant à diverses réactions secondaires.

Aussi, nous avons constaté que le temps nécessaire à la lactamisation, établi avec d'autres peptides, ne convient pas aux présents analogues. La taille particulière de l'ET-1 avec ses ponts disulfure et lactame rend l'arrangement difficile. Ainsi, le temps de cyclisation a dû être prolongé. De plus, étant donné qu'il y a un certain pourcentage de déprotection du noyau indole, une oxydation plus douce, au ferricyanure de potassium, a été préférée pour la formation du pont disulfure. Par conséquent, l'oxydation du Trp devient moins probable.

Une analyse des produits pré- et post-oxydation révèle des temps de rétention similaires. Des tests ont alors été effectués pour vérifier si la réaction avait bien eu lieu et si oui, à quel moment. Les résultats obtenus ont permis de conclure que l'oxydation est réalisée avant même que la réaction au ferricyanure de potassium ne soit exécutée. L'oxydation à l'air étant très propice et, les deux groupements sulfhydriles déjà face à face, la réaction ne se trouve que facilitée.

En résumé, les caractéristiques propres à chacun des peptides, et même à chacun des analogues, doivent être considérées rigoureusement, car une même stratégie donnera des résultats différents pour divers analogues


Céline Charbonneau
Étudiante


Alain Fournier
Directeur

REMERCIEMENTS

Premièrement, je tiens à offrir mes plus sincères remerciements au directeur de mes recherches, le Dr Alain Fournier, pour toute l'aide et les précieux conseils qu'il m'a apportés.

Je tiens à remercier également:

Dr Aziza Benalil pour l'assistance apportée par son expertise en chimie organique lors de la préparation de certains réactifs utilisés pour la synthèse de mes analogues,

Mme Marie-Annick Forget pour avoir partagé avec moi les connaissances relatives à son expertise pharmacologique,

M. Patrick Sabourin pour les précieux conseils qu'il m'a apportés sur le plan technique,

L'INRS-Santé pour son support financier,

M. et Mme Gaétan Charbonneau pour leur support constant et attentif tout au long de mes études.

Enfin, je tiens à dédier ce travail à mon fiancé Benoit qui tout au long de ces deux dernières années m'a constamment encouragée et appuyée.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Remerciements.....	iii
Liste des figures et des tableaux.....	vii
Liste des abréviations couramment utilisées dans ce document.....	x
Liste des abréviations à 3 lettres des acides aminés.....	xi
Introduction.....	1
Matériel et Méthodes.....	15
1. De la synthèse à la purification des analogues de l'ET-1.....	15
1.1 Réactifs et solvants.....	15
1.2 Préparation de Glu (OFm) et Asp (OFm).....	17
1.3 Procédure de synthèse des peptides.....	18
1.3.1 Protocole de couplage des acides aminés.....	18
1.3.2 Protocole de lactamisation.....	19
1.4 Clivages des analogues à l'acide fluorhydrique	21
1.5 Purification des analogues linéaires et monocycliques.....	21
1.5.1 Purification des peptides linéaires.....	23
1.5.2 Purification des peptides monocycliques.....	23
1.6 Protocole de cyclisation par le pont disulfure.....	24
2. Méthodes de caractérisation physico-biochimiques des analogues de l'ET-1...25	
2.1 Chromatographie liquide à haute performance analytique.....	25
2.2 Test de réduction au 2-mercaptoéthanol.....	25
2.3 Test de réduction au NaBH ₄	25
2.4 Spectrométrie de masse.....	26
2.5 Électrophorèse capillaire.....	26
Résultats.....	27
3. Production des analogues de l'ET-1.....	27
3.1 Synthèse et clivage des analogues de l'ET-1.....	27

3.2	Purification des analogues linéaires et monocycliques de l'ET-1.....	30
3.3	Formation du pont disulfure.....	33
4.	Caractérisation des analogues.....	35
4.1	Test de co-injection.....	35
4.2	Spectre de masse.....	35
4.3	Test de réduction au NaBH ₄	35
4.4	Test au 2-mercaptoéthanol.....	36
4.5	Évaluation de la pureté des analogues par HPLC.....	36
Discussion.....		43
5.	Élaboration de la méthode de synthèse.....	43
5.1	Justification de la sélection des analogues.....	43
5.2	Choix du matériel et des réactifs de synthèse.....	44
5.2.1	Choix de la résine.....	44
5.2.2	Choix des groupements protecteurs de la fonction α -aminée.....	45
5.2.3	Choix du réactif de couplage.....	50
5.2.4	Sélection des groupements protecteurs des chaînes latérales.....	50
5.2.5	Schéma de protection orthogonale.....	54
5.2.6	Préparation des résidus Asp et Glu protégés par OFm.....	54
5.2.7	Procédure de synthèse des peptides.....	57
5.3	Justification du clivage à l'acide fluorhydrique.....	58
6.	Évaluation de la synthèse.....	59
6.1	Regard sur la 1 ^{ère} série d'analogues synthétisés.....	59
6.1.1	Évaluation des analogues linéaires.....	59
6.1.2	Évaluation des analogues monocycliques.....	59
6.1.3	Analyse de la synthèse de cette 1 ^{ère} série d'analogues.....	60
6.2	Regard sur la 2 ^{ème} série d'analogues synthétisés.....	61
6.2.1	Évaluation des analogues monocycliques de 2 ^{ème} série.....	62
7.	Évaluation de la formation du pont disulfure.....	64
7.1	Analyse du test de co-injection.....	64

7.2 Test de réduction au 2-mercaptoéthanol.....	65
7.3 Test de réduction au NaBH ₄	65
8. Évaluation de la pureté des analogues d'ET-1.....	67
Conclusions.....	68
Appendice A.....	70
Références.....	71

LISTES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Liste des figures

Figure 1 :	Grande famille des Endothélines. Structure primaire des ETs, du VIC, des sarafotoxines et de la bibrotoxine.....	2
Figure 2 :	Maturation post-traductionnelle de l'endothéline.....	4
Figure 3 :	Principaux mécanismes intracellulaires résultant de l'interaction de l'endothéline avec son récepteur.....	6
Figure 4 :	Modèle proposé par Spinella pour expliquer l'interaction de l'endothéline avec son récepteur.....	13
Figure 5 :	Procédure de synthèse appliquée au présent projet.....	14
Figure 6 :	Chromatogrammes de l'analyse par HPLC de la purification de (Asp ¹ -Lys ¹⁵) hET-1 linéaire.....	28
Figure 7 :	Chromatogrammes de l'analyse HPLC de la purification de (Asp ¹ -Orn ¹⁵) hET-1 monocyclique obtenu suite à la synthèse d'une première série d'analogues.....	29
Figure 8 :	Chromatogrammes de l'analyse par HPLC de (Asp ³ -Lys ¹¹) hET-1 monocyclique et comparaison des produits après traitement au HF obtenus à la suite de la synthèse de 2 séries différentes d'analogues.....	31
Figure 9 :	Chromatogrammes de l'analyse par HPLC de la purification de (Asp ¹ -Orn ¹⁵) h ET-1 monocyclique obtenu lors de la synthèse d'une 2 ^{ème} série d'analogues.....	32
Figure 10 :	Chromatogrammes de l'analyse par HPLC de la formation du pont disulfure de (Asp ³ -Orn ¹¹) hET-1.....	34
Figure 11 :	Chromatogrammes de l'analyse par HPLC de la co-injection des produits monocyclique et bicyclique de (Asp ³ -Orn ¹¹) hET-1.....	37
Figure 12 :	Chromatogrammes de l'analyse par HPLC du test de réduction au NaBH ₄ sur le produit (Asp ³ -Orn ¹¹) hET-1 bicyclique.....	38

Figure 13 :	Chromatogrammes de l'analyse par HPLC du test de réduction au NaBH_4 sur le produit ($\text{Asp}^3\text{-Orn}^{11}$) hET-1 supposément monocyclique.....	39
Figure 14 :	Chromatogrammes de l'analyse par HPLC du test de réduction au 2-mercaptoéthanol de ($\text{Asp}^3\text{-Orn}^{11}$) hET-1.....	40
Figure 15 :	Structure partielle d'un copolymère de styrène ponté avec du divinylbenzène.....	46
Figure 16 :	Structure de la résine classique de Merrifield.....	46
Figure 17 :	Représentation schématique de la résine fonctionnalisée avec le groupement PAM.....	47
Figure 18 :	Mécanisme de la réaction de déprotection de la fonction N-terminale de l'acide aminé par retrait du groupement Boc.....	48
Figure 19 :	Mécanisme de la déprotection de la fonction N-terminale de l'acide aminé par le retrait du groupement Fmoc.....	49
Figure 20 :	Mécanisme de réaction de l'étape de couplage avec utilisation du BOP..	51
Figure 21 :	Schéma illustrant la première étape de la préparation des résidus Asp et Glu, soit l'ajout du groupement Ofm sur la chaîne latérale.....	55
Figure 22 :	Schéma illustrant la seconde étape du processus de transformation, soit l'hydrogénation permettant de retirer le groupement Obzl.....	56

Liste des tableaux

Tableau I :	Résumé des principaux effets provoqués par l'endothéline-1.....	7
Tableau II :	Groupements protecteurs des fonctions des chaînes latérales des acides aminés utilisés lors de la synthèse des analogues de l'endothéline-1.....	16
Tableau III :	Protocole présentant les différentes étapes d'un cycle de couplage d'un acide aminé.....	20
Tableau IV :	Protocole de déprotection sélective des groupements Fmoc et oFm précédant la lactamisation.....	22
Tableau V :	Caractérisation des analogues de l'ET-1 par EC et par HPLC.....	41
Tableau VI :	Pureté des analogues de l'ET-1 tel que déterminé par HPLC.....	42

Liste des abréviations couramment utilisées dans ce documents

Acm: acétamidométhyle

ACN: acétonitrile

Boc: tert-butyloxycarbonyle

BOP: hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium

2-BrZ: bromobenzoyloxycarbonyle

CHO: formyle

2-ClZ: chlorobenzoyloxycarbonyle

DCM: dichlorométhane

DIEA: diisopropyléthylamine

DMF: diméthylformamide

éq: équivalent

ET-1: endothéline-1

EtOAc: acétate d'éthyle

EtOH: éthanol

Fmoc: 9-fluorénylméthoxyloxycarbonyle

HF: acide fluorhydrique

HPLC: Chromatographie liquide à haute performance

Tos: imidazole 4-toluènesulfonyle (tosyle)

MeBzl: méthylbenzyle

MeOH: méthanol

OBzl: benzyle éther

OcHex: ester de cyclohexyle

OFm: ester de fluorénylméthyle

PAM: phénylacétamidométhyle

TFA: acide trifluoroacétique

Liste des abréviations à 3 lettres des acides aminés

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

INTRODUCTION

Au début des années 80, des équipes de chercheurs reconnaissent que l'endothélium joue un rôle essentiel dans l'induction de la vasodilatation et de la vasoconstriction des muscles lisses vasculaires (Furchgott et Zawadzki, 1980; Holden et McCall, 1983). Simultanément ces études entraînent le développement de nombreuses autres études pour tenter d'identifier et de caractériser les éléments responsables d'une telle activité vasomotrice (Agricola et al., 1984; O'Brien et McMurtry, 1984; Hickey et al., 1985). En 1986, Gillespie et son équipe démontre l'existence d'un facteur vasoconstricteur sensible à la trypsine. Ils concluent alors qu'il s'agit d'une protéine (Gillespie et al., 1986).

Finalement, ce n'est que 2 ans plus tard, soit en 1988, dans les labos du professeur Masaki que Yanagisawa et collègues réussissent à isoler l'élément vasoconstricteur dans le surnageant d'une culture de cellules endothéliales d'aorte de porc. Ils l'isolent, le clonent puis le caractérisent. Le peptide est identifié comme étant l'endothéline-1 qui s'avère le plus puissant vasoconstricteur naturel jusqu'à présent observé (Yanagisawa et al., 1988). Dans la même année, une autre équipe isole des toxines retrouvées dans le venin d'*Atractaspis engaddensis*. Ce sont les sarafotoxines et celles-ci présentent une forte homologie de séquence avec les endothélines (Kloog et al., 1988). Enfin, plus récemment, soit en 1993, l'équipe de Becker isole une autre toxine provenant, cette fois-ci, du venin d'*Atractaspis bibroni*. Cette substance est nommée bibrotoxine et comme les sarafotoxines, elle fait désormais partie de la grande famille des endothélines puisqu'elle présente aussi une homologie de séquence remarquable (Becker et al., 1993).

L'ET-1 fait partie d'une grande famille qui inclut 2 autres isotypes d'endothéline (ET-2 et ET-3) (Inoue et al., 1989; Yanagisawa et al., 1988), les 4 isotypes de sarafotoxines, la bibrotoxine ainsi que le VIC (*vasoactive intestinal contractor*) qui est l'équivalent murin d'ET-2 (Saida, Mitsui et Ishida, 1989). Tous ces isopeptides possèdent des caractéristiques communes. En effet, ils sont tous constitués de 21 acides aminés et possèdent tous, 2 ponts

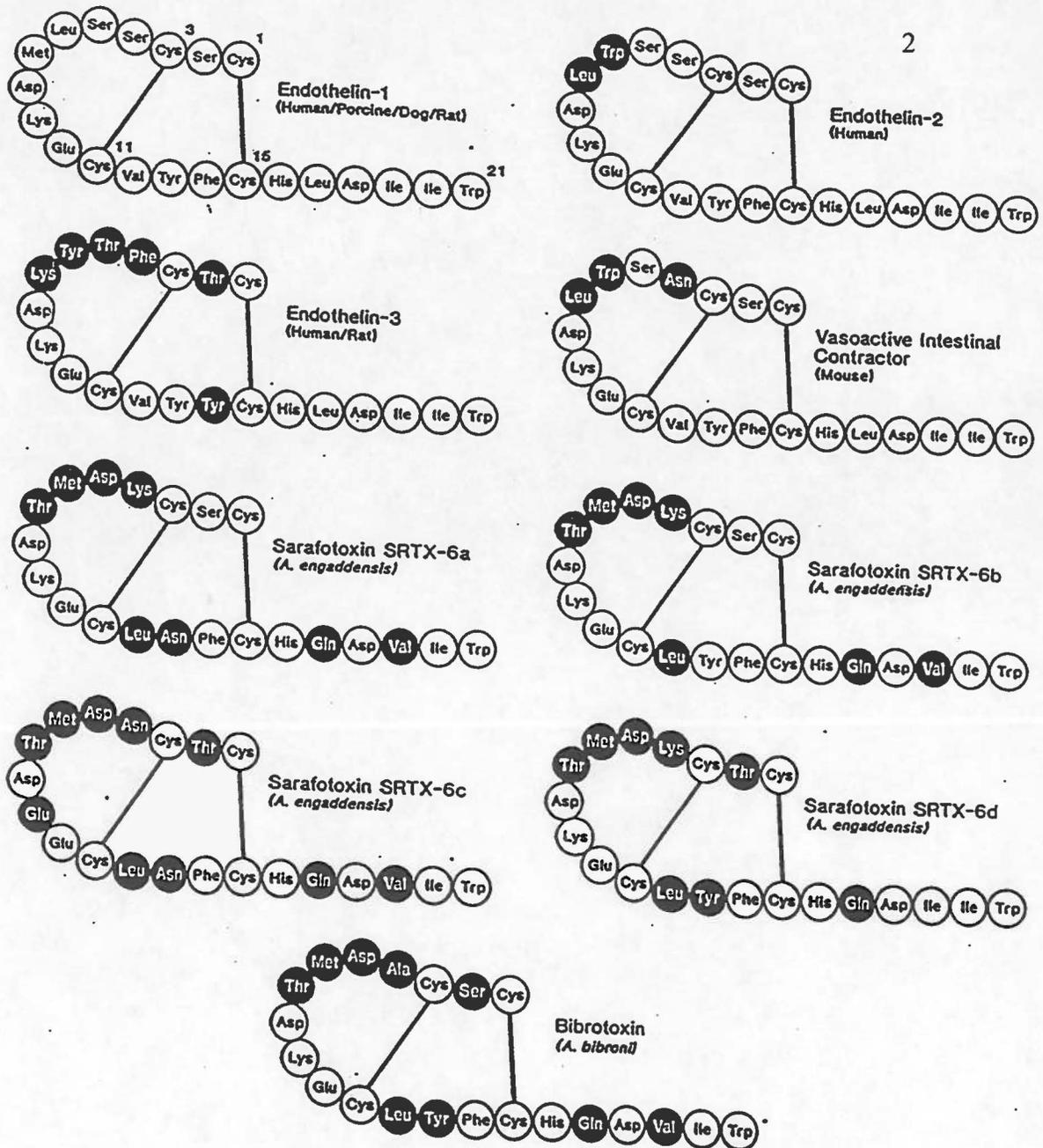


Figure 1: Grande famille des endothélines. Structure primaire des ETs (ET-1, 2, 3) du VIC (*vasoactive intestinal contractor*), des sarafotoxines (SX6a, b, c, d) et de la bibrotoxine. Les acides aminés en noir sont ceux qui diffèrent de la séquence d'ET-1. (Tiré de Cody et Doherty, 1995)

disulfures entre les résidus 1-15 et 3-11 (Figure 1). De plus, ils ont tous des extrémités N-terminale et C-terminale identiques. L'homologie de séquence entre les isopeptides de l'endothéline se situe entre 71 et 95%. Quant à celle entre les divers isopeptides des sarafotoxines, elle varie entre 81 et 95%. Enfin, entre les endothélines et les sarafotoxines, l'homologie est de 52 à 67%. Ces similarités remarquables démontrent l'importance physiologique de ces peptides qui ont été peu modifiés au cours de l'évolution. C'est donc la preuve qu'ils possèdent une origine évolutive commune (Landan *et al.*, 1991).

Les 3 isotopes de l'ET sont originaires de 3 précurseurs différents et constitués d'environ 200 acides aminés. Ce sont les préproendothélines. Ces précurseurs sont codés par 3 gènes différents (Sakurai, Yanagisawa et Masaki, 1992). La préproendothéline subit un clivage entre des résidus basiques (Lys-Arg et/ou Arg-Arg). Ces clivages sont réalisés par une endopeptidase intracellulaire furine. Les isopeptides qui en résultent sont les Big-Ets précurseurs inactifs constitués de 38-41 acides aminés selon l'espèce. Enfin, un autre clivage est réalisé entre 2 résidus inhabituels, soit Trp²¹-Val²² pour ET-1 et ET-2 et Trp²¹-Ile²² pour ET-3, pour finalement donner un peptide mature et actif de 21 acides aminés, soit l'ET (Figure 2). La participation d'une endopeptidase avec une nouvelle spécificité est donc suggérée. La responsable de ce dernier clivage est l'enzyme de conversion de l'ET (ECE) (Sawamura *et al.*, 1990).

Jusqu'à présent, ECE-1a, b, c et ECE-2 ne sont pas très bien connues (Télémaque *et al.*, 1993). Cependant, ECE-1 a été clonée et elle a été caractérisée comme étant une nouvelle forme de métalloprotéase. Celle-ci est sensible au phosphoramidon mais insensible à d'autres inhibiteurs tels que le captopril et le kélatorphan, signifiant ainsi qu'il s'agit d'une endopeptidase neutre unique (McMahon *et al.*, 1991; Sawamura *et al.*, 1991; D'Orléans-Juste, Télémaque et Claing, 1991). L'analyse de l'ADN complémentaire prédit une séquence en acides aminés qui présente une forte homologie avec l'endopeptidase neutre 24.11 mais, avec une activité différente (Oppenorth, Kimura et Wu-Wong, 1995).

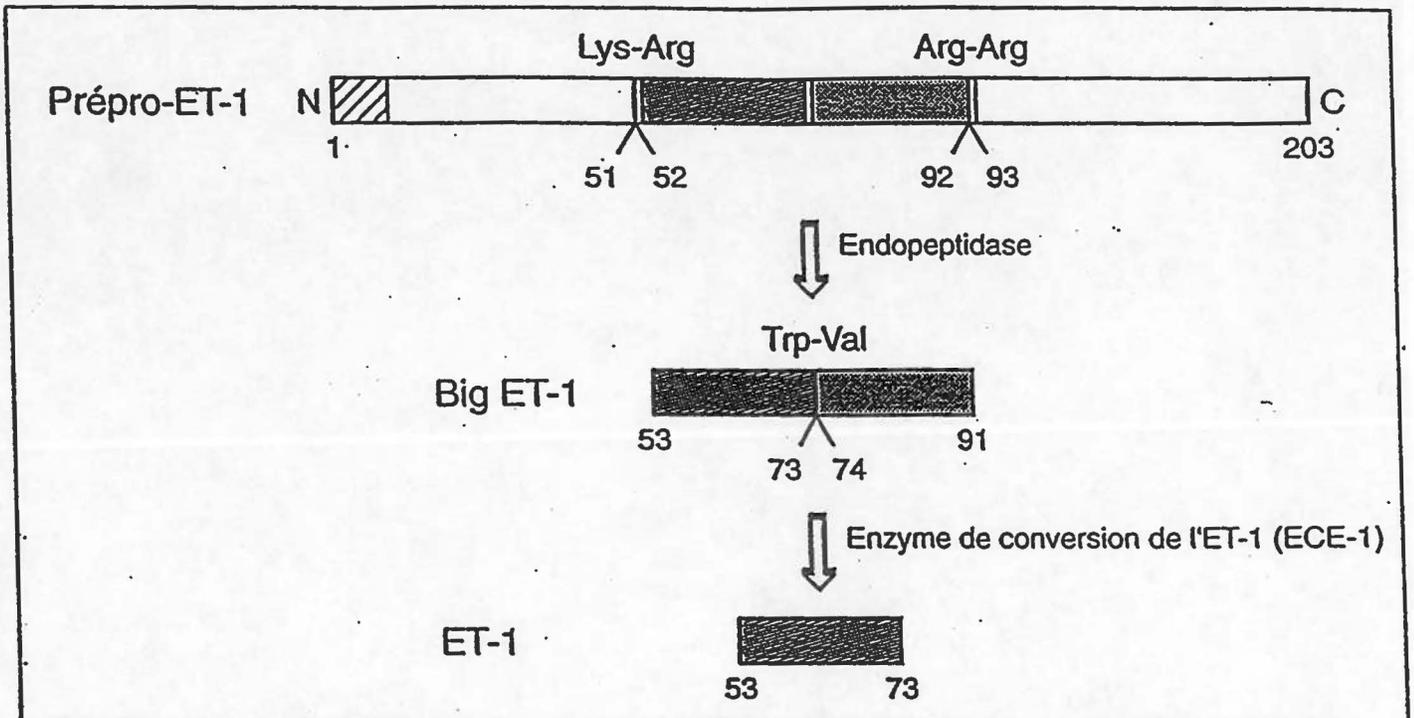


Figure 2: Maturation post-traductionnelle de l'endothéline (Tiré de Lotersztajn, 1993)

La caractérisation de ces enzymes de conversion de l'endothéline s'avère être un défi important. En effet, il a été démontré que l'ET-1 est environ 100 fois plus active que la Big-ET-1. Ainsi le développement d'outils pouvant exercer un contrôle efficace de la conversion de la Big-ET-1 en ET-1 permettrait de prévenir ou contrôler des pathophysiologies associées à l'endothéline-1.

La très grande distribution de l'endothéline-1 à travers de nombreux organes et systèmes, permet d'expliquer le large éventail d'activités biologiques dont elle est responsable. En effet, pour n'en nommer que quelques-uns, il est possible d'observer des effets de ce peptide au niveau du coeur, des poumons, des reins, du foie et du système nerveux. Toutefois, l'activité principale de l'ET-1 demeure au niveau vasculaire.

La figure 3 illustre les nombreux mécanismes déclenchés à l'intérieur de la cellule, suite à la fixation de l'endothéline à son récepteur. Cette interaction de concert avec la stimulation des protéines G, active la phospholipase C qui produit de l'inositol triphosphate (Ins(1,4,5)P₃) et du diacylglycérol (DAG). L'Ins(1,4,5)P₃ est alors responsable de la libération de calcium (Ca²⁺). Pour sa part, le DAG active la protéine kinase C qui est à l'origine de la phosphorylation des protéines. Le Ca²⁺ libéré et les protéines phosphorylées possèdent la capacité de réguler d'autres systèmes comme la phospholipase D, la phospholipase A₂, l'adénylyl cyclase et la NO synthase. Plus concrètement, le calcium libéré et les protéines phosphorylées sont à l'origine d'effets observables tels que la contraction, la prolifération cellulaire et la sécrétion de neurotransmetteurs et de substances hormonales. L'interaction ET-récepteur active aussi, directement, les systèmes de phospholipase D, de phospholipase A₂, d'adénylyl cyclase et de canaux potassiques (Huggins, Pelton et Miller, 1993).

L'ensemble des effets résultant des divers mécanismes d'action initiés par l'ET, conduit à des manifestations physiologiques observables sur les tissus et les organes. Le tableau I résume les principaux effets (Doherty, 1992). De manière plus concrète,

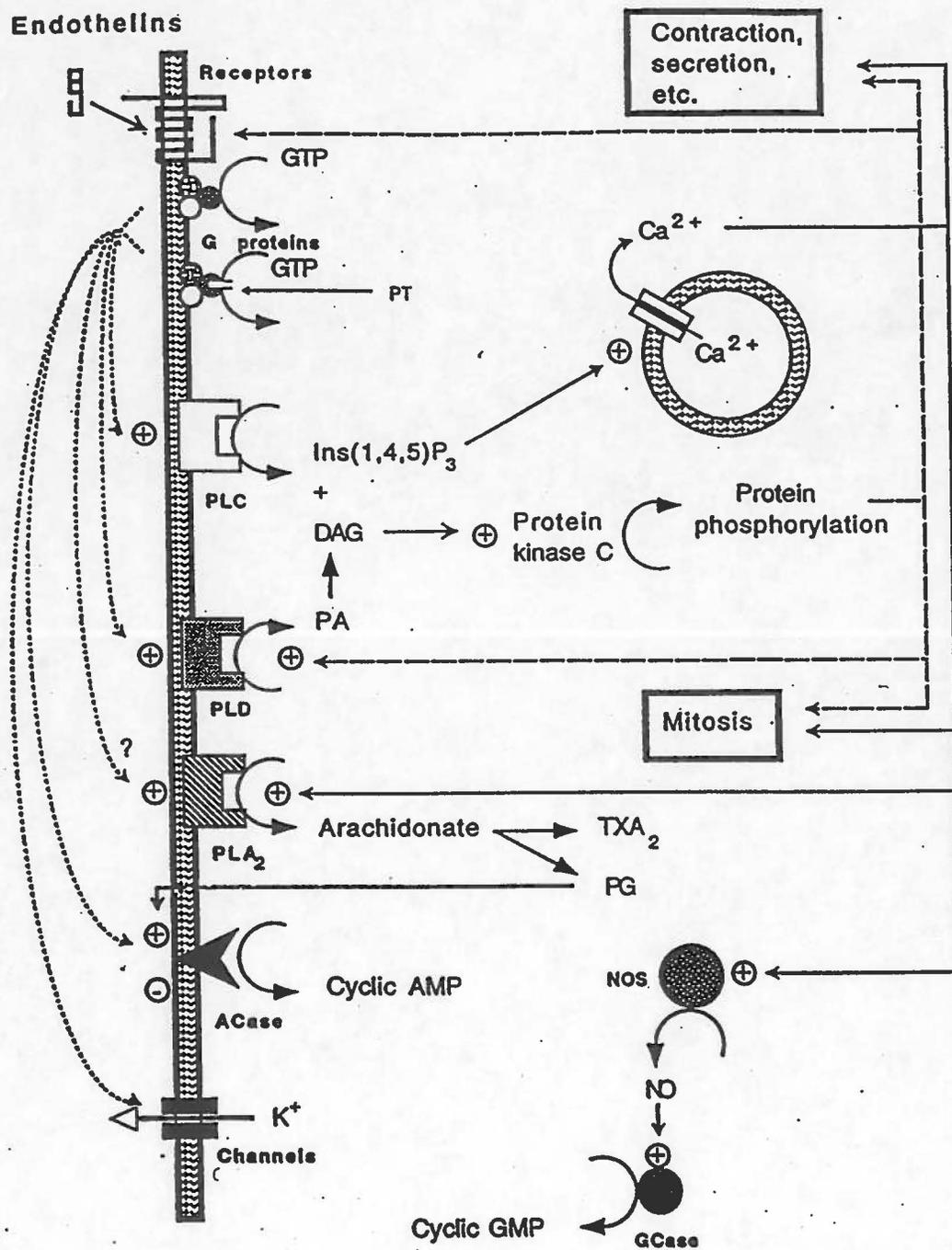


Figure 3: Principaux mécanismes intracellulaires résultant de l'interaction de l'endothéline avec son récepteur (Tiré de Huggins, Pelton et Miller, 1993)

TABLEAU I: Résumé des principaux effets provoqués par l'endothéline-1.

TISSUS	EFFETS
MUSCLE LISSE VASCULAIRE	-VASOCONSTRICTION PROLONGÉE -ACTION MITOGÉNIQUE IN VITRO
MUSCLE LISSE NON VASCULAIRE	-CONSTRICTION DE; * LA TRACHÉE * L'INTESTIN * L'UTÉRUS
COEUR	-AUGMENTATION DE LA CONTRACTILITÉ ET DU DÉBIT CARDIAQUE
POUMONS	-BRONCHOCONSTRICTION PUISSANTE
TISSUS NERVEUX	-AUGMENTATION DU RELARGAGE DE NEUROTRANSMETTEURS
REINS	-INHIBITION DE LA SÉCRÉTION DE RÉNINE -DIMINUTION DE LA RÉABSORPTION DE SODIUM
FOIE	-ACTIVATION DE LA GLYCOGÉNOLYSE
PRODUCTION D'HORMONES	-AUGMENTATION DE LA SÉCRÉTION *D'ALDOSTÉRONE *DE VASOPRESSINE *D'ANF *D'ACTH *DE FSH *DE LH ET DE TSH

l'administration de ET-1 par voie intraveineuse provoque dans un premier temps, une hypotension transitoire due à la libération de vasodilatateurs comme la prostaglandine I₂ (PGI₂) et l'oxyde nitrique (NO) (Inoue et al., 1989). Cet effet est suivi d'une constriction soutenue jumelée à une augmentation du débit cardiaque. Cette constriction est provoquée par le relargage du facteur activateur de plaquette (PAF) et de la thromboxane A₂ (Filep et al., 1991 ; Sirois et al., 1992). Ce phénomène vient confirmer l'importante implication de l'ET au niveau du système vasculaire. Par conséquent, ce peptide semble être un agent étiologique probable dans des pathologies telles l'ischémie du myocarde, l'arythmie, l'hypertension, l'asthme et l'insuffisance rénale.

La présence des ETs engendre dans certains cas de la vasoconstriction et dans d'autres cas de la vasodilatation. Cette diversité de réponses suggère l'existence d'une hétérogénéité de récepteurs. Dès 1990, le clonage de 2 récepteurs distincts vient confirmer cette hypothèse. Les gènes des récepteurs ET_A et ET_B sont situés respectivement sur les chromosomes 13 et 4 (Lotersztajn, 1993). Premièrement, le récepteur ET_A qui provoque une vasoconstriction, se montre sélectif pour ET-1 et ET-2 (Arai et al., 1990). Il est principalement localisé dans les muscles lisses vasculaires. Quant au récepteur ET_B, qui a la capacité de provoquer les 2 types de réponses, il présente une affinité égale pour les 3 isopeptides de l'ET (Sakurai et al., 1990). Une vaste gamme de tissus logent ces ET_B, notamment le cerveau, les poumons et les reins (Doherty, 1992). Enfin, ce sont des mesures d'activité biologique dans le cervelet de rat qui ont permis de supposer l'existence d'un troisième sous-type de récepteur. Celui-ci semble spécifique à ET-3 et il a été nommé ET_C (Emori, Hirata et Marumo, 1990; Hiley et al., 1990). Ce récepteur n'a toutefois pas encore été cloné chez les mammifères. Cependant, le clonage d'un récepteur spécifique à ET-3 a été réussi chez *Xenopus laevis*, une grenouille africaine (Karne, Jayawickreme et Lerner, 1993). La difficulté à cloner ce type de récepteur chez l'humain suggère une faible homologie de séquence avec les récepteurs ET_A et ET_B.

Les études poursuivies pour tenter d'expliquer la double activité du récepteur ET_B, ont permis de suggérer l'existence des sous-types de récepteurs ET_{B1} et ET_{B2} (Sokolovsky,

Ambar et Galron, 1992). Les ET_{B1} , localisés principalement dans l'endothélium sont responsables de l'effet de vasodilatation. Ils possèdent une affinité très élevée dans l'ordre du pM pour les endothélines. Quant aux récepteurs ET_{B2} , qui sont surtout présents dans les muscles lisses, vasculaires ou non, ils sont à l'origine de l'effet vasoconstricteur. Leur affinité pour les endothélines se situe dans l'ordre du nM.

L'évolution des recherches sur la spécificité des récepteurs se poursuit constamment. Les résultats de certaines de ces études tendent à suggérer l'existence de nouveaux sous-types de récepteurs. À titre d'exemple, l'équipe de Hélyuy a maintenu, à travers quelques expériences, l'hypothèse voulant que les cellules de l'utérus ne contiennent que des récepteurs ET_A , mais de nature variée (a)Hélyuy et *al.*, 1995; b)Hélyuy et *al.*, 1995).

D'un point de vue moléculaire, les récepteurs de l'endothéline sont très semblables. Les ET_A et les ET_B sont tous les deux constitués d'une chaîne peptidique disposée en 7 segments transmembranaires avec une portion N-terminale extracellulaire et une portion C-terminale cytoplasmique. Cependant, ces récepteurs sont couplés à différentes protéines G (G_i , G_o et G_s) pour leur fonctionnement. Toutes ces caractéristiques permettent de considérer les récepteurs de l'ET comme des membres de la famille des récepteurs de la rhodopsine. Ce qui les distingue, c'est premièrement le nombre d'acides aminés qui les constitue. Le récepteur ET_A est composé de 427 résidus alors que les ET_B en possèdent 442. Deuxièmement, la nature des acides aminés qui les constitue leur permet d'avoir une identité propre. Les récepteurs ET_A et ET_B présentent entre eux une homologie de séquence de 60%. La composition en acides aminés diverge principalement au niveau de la partie N-terminale de la molécule (Sakurai, Yanagisawa et Masaki, 1992; Sokolovsky, 1992; Lotersztajn, 1993). De plus, les récepteurs de l'ET possèdent des caractéristiques importantes pouvant suggérer une hypothèse pour le mécanisme d'interaction avec sa molécule. Effectivement, les récepteurs de l'ET possèdent 19 résidus cystéines (Adachi et *al.*, 1993). Cette quantité inhabituellement élevée, de pair avec les 4 cystéines présentes chez la molécule d'ET, permet de supposer que l'interaction peptide-récepteur pourrait avoir lieu par le biais d'un échange disulfure.

Le mécanisme d'interaction molécule-récepteur de l'ET n'a pas encore été élucidé. La compréhension de ce mécanisme est primordiale car ceci permettra de développer par la suite des outils thérapeutiques ou diagnostiques pour les systèmes biologiques avec anomalie de fonctionnement des endothélines, qui sont la source de certaines pathologies. Les études de structure-activité pour expliquer cette interaction sont nombreuses et très variées. Des conclusions déterminantes en sont tirées. En 1989, Nakajima et son équipe démontrent que les extrémités N- et C-terminales doivent être libres pour que la réponse pharmacologique se produise. Aussi, puisque les résidus Asp⁸-Lys⁹-Glu¹⁰ sont conservés dans toutes les endothélines et dans toutes les sarafotoxines, ils suggèrent un rôle important dans l'activité biologique. De fait, le blocage des chaînes latérales de Asp⁸ et Glu¹⁰ par des fonctions amides provoque une perte importante de la contraction (Nakajima *et al.*, 1989).

Beaucoup de recherches s'intéressent aussi, à la présence nombreuse des cystéines tant dans le ligand ET (4) que dans son récepteur (19). Une analyse Scatchard de la liaison de l'ET à son récepteur s'est révélée invalide. La liaison de l'endothéline est irréversible possiblement à cause d'un lien covalent de nature disulfure (Waggoner, Genova et Rash, 1992). Des agents alkylant les groupements sulfhydryles tels l'acide p-chloromercurisulfonique (PCMS) et le N-éthylmaléimide (NEM) nuisent à la formation du complexe ET-récepteur. Cette constatation vient une fois de plus, renforcer l'hypothèse voulant que l'interaction se fasse par le biais d'un échange disulfure (Hagiwara *et al.*, 1990; Spinella *et al.*, 1993). Une autre équipe de chercheurs a aussi démontré que la liaison de l'ET-1 est inhibée en présence de cadmium. Une fois de plus, cette observation laisse croire en l'implication de groupements sulfhydryles car de fortes liaisons de coordination peuvent alors s'établir entre l'atome de soufre et le métal lourd (Wada *et al.*, 1991).

Les travaux de Spinella et son équipe ont porté sur l'analogue [Dpr¹-Asp¹⁵]ET-1. Le pont disulfure 1-15 de cet analogue est substitué par un pont lactame entre les chaînes latérales à fonction amine de l'acide diaminopropionique et à fonction carboxylique de l'acide aspartique. Les études réalisées avec cet analogue ont permis de conclure que le [Dpr¹-Asp¹⁵]ET-1 possède une capacité antagoniste puissante et spécifique à l'activité

vasoconstrictrice induite par l'ET-1. Ce même analogue n'a aucun effet sur la vasoconstriction provoquée par ET-3. Un autre aspect retenu lors de cette même étude, c'est l'importance d'un pont en position 1-15. Effectivement, l'analogue monocyclique n'ayant pas de lien amide entre les résidus Dpr¹ et Asp¹⁵ est dépourvu de capacité antagoniste (Spinella et al., 1991). Ces conclusions, en combinaison avec des études de compétition en présence de NEM, ont permis à Spinella de suggérer 2 conformations distinctes et importantes dans le mécanisme d'interaction de l'ET-1 avec son récepteur. La conformation de liaison au récepteur est décrite comme étant la structure bicyclique. Quant à la conformation d'activation du récepteur, elle est identifiée comme étant plus ouverte donc de nature monocyclique (Spinella et al., 1993). La figure 4 illustre le modèle d'interaction de l'endothéline avec son récepteur tel que proposé par Spinella.

Pour explorer davantage l'hypothèse maintenue par Spinella qui implique un échange disulfure en guise d'interaction de l'ET-1 avec son récepteur, d'autres analogues ont été conçus. Notre objectif est de substituer à tour de rôle les ponts 1-15 et 3-11 par des ponts lactames entre les chaînes latérales des acides aminés substituants. Le choix des résidus pour ce type d'opération s'est arrêté sur la lysine et l'ornithine d'une part et l'acide aspartique et l'acide glutamique d'autre part. Ainsi, cette étude a visé dans un premier temps, à vérifier l'importance de chacun des ponts disulfures. Notre second objectif est de former des ponts lactames avec les diverses combinaisons d'acides aminés afin d'évaluer l'impact de la longueur du lien. Lors de travaux portant sur le Facteur de libération de l'hormone de croissance (GRF), Campbell et son équipe ont effectivement démontré que l'efficacité biologique des analogues reposait sur la taille des cycles intramoléculaires (Campbell, Bongers et Felix, 1995). Les analogues conçus pour vérifier la première hypothèse peuvent par la même occasion servir à vérifier si l'hypothèse de Campbell peut aussi s'appliquer à l'efficacité biologiques des analogues de l'ET-1.

La technique utilisée pour concevoir ce type d'analogues est la méthode de synthèse en phase solide telle que décrite par Merrifield et combinée à une stratégie de protection orthogonale (Merrifield, 1963). Dans ce cas, l'introduction de plusieurs types de

groupements protecteurs nécessite l'utilisation d'une plus grande variété de réactifs. Par conséquent, la méthode de synthèse doit être élaborée de manière très rigoureuse afin d'éviter au maximum les réactions secondaires. Dans le cas présent, deux niveaux de protection sont nécessaires en plus de la protection des chaînes latérales. Effectivement, au premier niveau, il est indispensable de protéger la fonction amine α du dernier acide aminé ajouté pour éviter des erreurs dans la séquence. Ce groupement protecteur doit être choisi en considérant qu'il devra être retiré à chaque cycle de couplage. Il est donc essentiel d'arrêter son choix sur un groupement labile dans un milieu qui n'affectera pas la protection des chaînes latérales. Ainsi, dans le présent projet, le groupement Boc, labile en présence de d'acide trifluoroacétique a servi à protéger la fonction amine α du dernier résidu intégré.

Pour arriver à former le pont lactame à l'intérieur de nos analogues, il a fallu choisir un second niveau de protection permettant de protéger les chaînes latérales des acides aminés substitués pendant l'assemblage de la chaîne peptidique. Toutefois, ce groupement protecteur doit être labile dans un milieu autre que celui des groupements des autres chaînes latérales. Pour assurer cette protection, notre choix s'est arrêté sur les groupements Fmoc et Ofm, lesquels sont labiles en présence de pipéridine. La réaction de lactamisation comme telle est relativement simple puisqu'il ne suffit que de procéder à une étape de couplage dans un délai suffisamment long pour assurer une réaction complète. La présente étude nous a permis de constater que le délai de lactamisation pour l'ET n'est pas le même que pour le GRF. Les conformations propres à chaque molécule peptidique jouent un rôle important dans le temps nécessaire à la formation de ponts lactames. Cette stratégie est présentée à la figure 5.

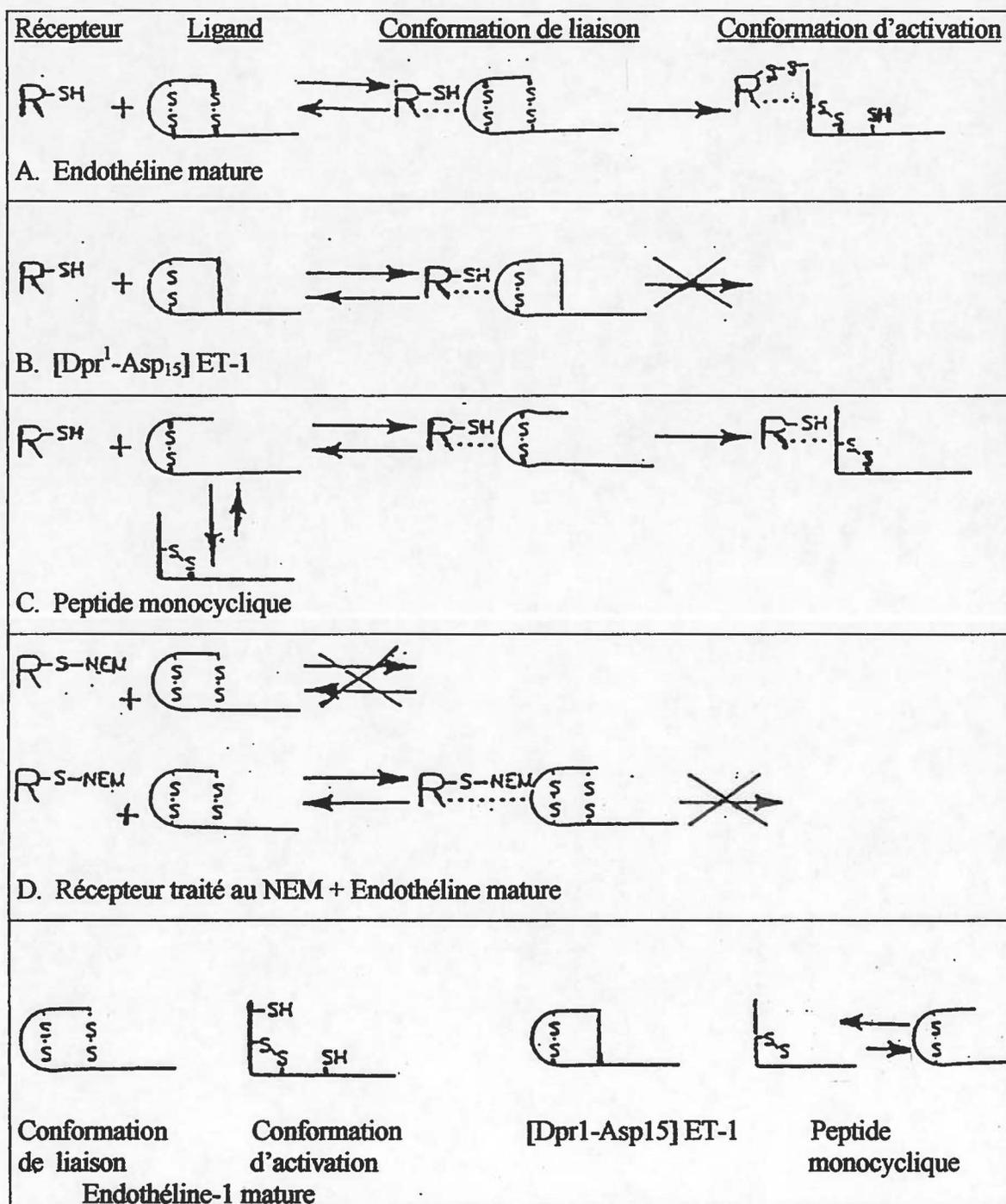


Figure 4: Modèle proposé par Spinella pour expliquer l'interaction de l'endothéline avec son récepteur (Spinella et al, 1993)

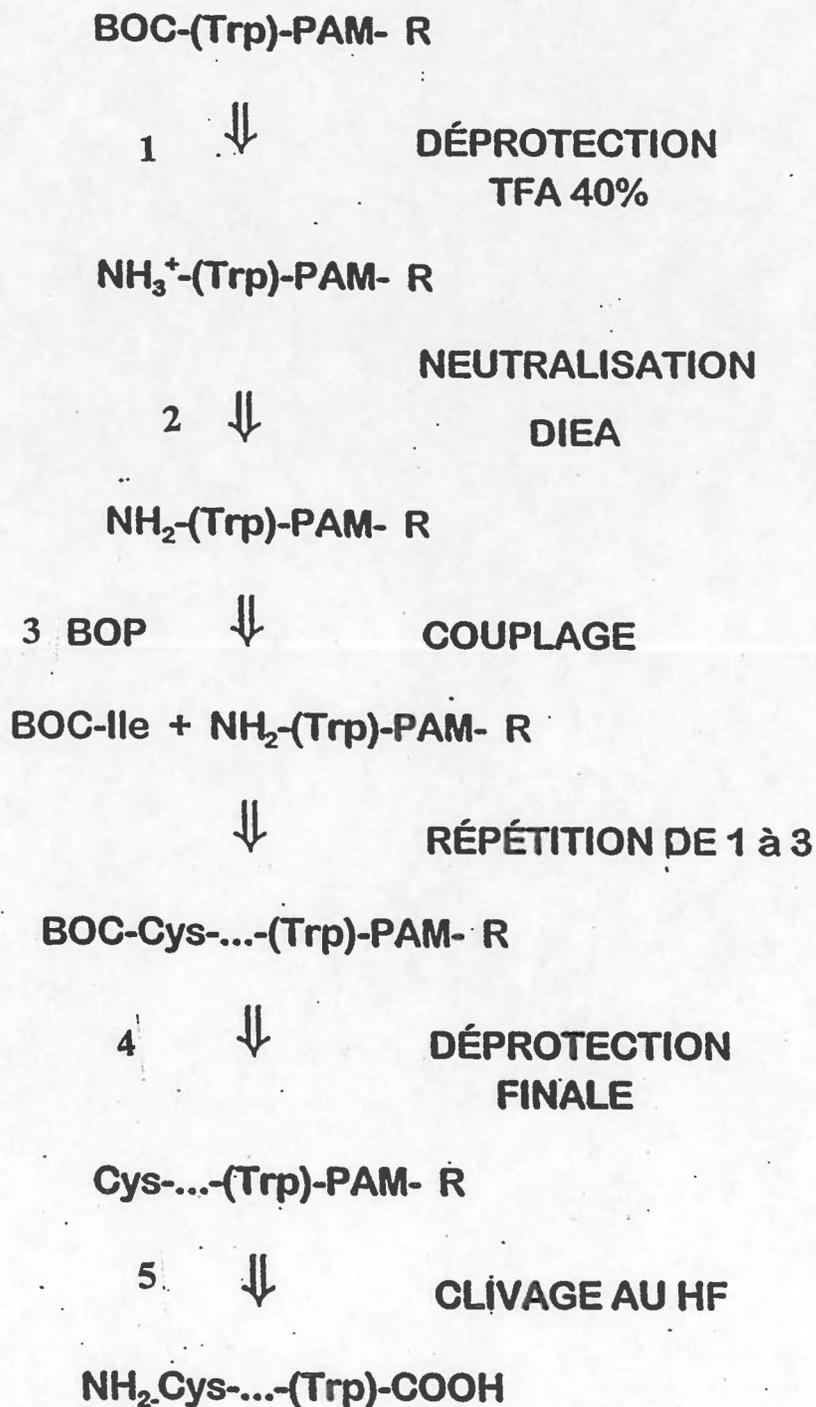


Figure 5 : Procédure de synthèse appliquée au présent projet

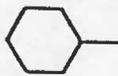
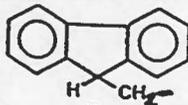
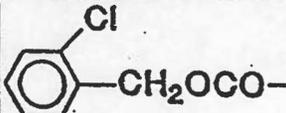
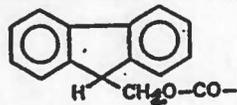
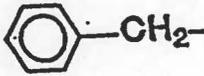
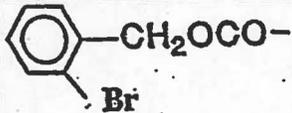
MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. De la synthèse à la purification des analogues de l'ET

1.1 Réactifs et solvants

Les peptides ont été synthétisés selon la méthode de synthèse en phase solide telle que développée par Merrifield (1953). Cette synthèse a été effectuée sur la résine PAM à laquelle était déjà fixé le premier acide aminé soit le Boc-Trp(CHO). La résine PAM est fabriquée de polystyrène ponté avec 1% de divinylbenzène et fonctionnalisée au moyen du groupement phénylacétamidométhyle (Bachem, Torrance, CA). La fonction amine α des acides aminés était protégée par le groupement *tert*-butyloxycarbonyle (Boc). Les résidus Asp(OcHex), Ile, Leu, Met, et Phe ont été fournis par Propeptides (Vert le Petit, France) alors que Cys(Acm), Glu(OcHex), His(Tos), Lys(Fmoc), Orn(Fmoc), Ser(OBzl), Tyr(BrZ) et Val provenaient de Bachem (Torrance, CA). Boc-Lys (2-ClZ) a été acheté de Richelieu Biotechnologies (Montréal, QC) alors que Cys(4-MeBzl) a été obtenu de Peninsula Laboratories Inc. (Belmont, CA). Enfin, Asp(OFm) et Glu(OFm) ont été obtenus à partir des acides aminés Boc-Asp et Boc-Glu ayant une fonction carboxylique α protégée par un groupement OBzl et fournis par Bachem (Torrance, CA). Ces résidus ont subi une transformation en deux étapes dont la première consiste en l'ajout du groupement -OFm sur la fonction carboxylique libre de la chaîne latérale. La seconde est une hydrogénation qui permet d'enlever le groupement OBzl de la position α . Tous les acides aminés mentionnés ci-haut possèdent la configuration absolue L. Le réactif de couplage utilisé est l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphonium (BOP) fourni par Richelieu Biotechnologies (Montréal, QC). Les solvants employés soit le diméthylformamide (DMF), le dichlorométhane (DCM) et l'éthanol (EtOH) ont été achetés de Anachemia Canada Inc. (Ville St-Pierre, Qc), alors que l'acide trifluoroacétique biograde (TFA) a été obtenu de Halocarbon (Hackensack, NJ). Le diisopropyléthylamine (DIEA) provient de Aldrich (Milwaukee, WI). Finalement, l'acide fluorhydrique (HF) provient de Liquid Carbonic Inc. (Scarborough, ON).

TABLEAU II: Groupements protecteurs des fonctions des chaînes latérales des acides aminés utilisés lors de la synthèse des analogues de l'endothéline-1.

Acides Aminés	Nom	Structure
Asp, Glu	Ester de cyclohexyle (OcHex)	
Asp, Glu (Substitut)	Ester de fluorénylméthyle (OFm)	
Cys	Acétamidométhyle (Acm)	$\text{CH}_3\text{CONHCH}_2^-$
Cys	4-Méthylbenzyle (MeBzl)	CH_3 -  - CH_2^-
His	p-Toluènesulfonyle (Tos)	CH_3 -  - SO_2^-
Lys	2-Chlorobenzoyloxycarbonyle (2-ClZ)	
Lys, Orn (Substitut)	9-fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc)	
Ser	Benzyle éther (OBzl)	
Trp	Formyle (For)	$\text{CHO}-$
Tyr	2-Bromobenzoyloxycarbonyle (2-BrZ)	

1.2 Préparation de Glu (-OFm) et Asp (-OFm)

Le matériel de départ utilisé était à l'origine le Boc-L-Asp- α -oBzl et le Boc-L-Glu- α -oBzl de Bachem (Torrance, CA). Ces deux résidus ont antérieurement, été traités de façon à protéger l'extrémité acide de leur chaîne latérale avec le groupement 9-fluorénylméthyle ester. Cette réaction se fait en exécutant la procédure suivante. L'acide aminé (8,31g, 25,7mmol) et le 9-fluorénylméthanol (4,80g, 24,5mmol) sont dissous dans 150 mL de chlorure de méthylène. Cette solution est agitée et refroidie dans un bain de glace. Ensuite, approximativement 30 mg (0,24mmol) de 4-(N,N-diméthylamino)-pyridine sont ajoutés. Enfin, 5,31g (25,7mmol) de DCC sont incorporés en petites quantités et le mélange est toujours agité à froid pour une période de 1 heure. Après, le précipité de N,N-dicyclohexylurée est retiré et le filtrat est dilué avec 300 mL de chlorure de méthylène. Par la suite, une extraction est exécutée avec 2 fois 40 mL d'acide citrique 10%, 1 fois 40 mL d'eau, 2 fois 40 mL de NaHCO₃ 2,5% et 2 fois 40 mL d'eau. Finalement, le produit résultant est séché avec du MgSO₄ puis filtré et concentré. Cette procédure permet d'obtenir un rendement de 74%.

Environ 8,0g d'acide aminé sont dissous dans 200mL de MeOH. Le tout est placé dans un réacteur équipé d'un bulleur-disperseur. Le contenu est purgé à l'azote puis environ 500 mg de palladium (10%) sur charbon sont ajoutés en guise de catalyseur. L'azote est remplacé par un apport continu en hydrogène et la réaction se poursuit à la température de la pièce pendant 2½ heures. Après cette période, l'hydrogène est remplacé par un courant d'azote afin de chasser l'excès d'hydrogène encore présent dans le milieu. Par la suite, le tout est filtré sous vide sur de la célite afin de retirer le catalyseur. Le filtrat obtenu est évaporé sous vide pour éliminer le MeOH. Le précipité est ressolubilisé dans de l'acétate d'éthyle puis mis au réfrigérateur pendant toute une nuit pour une recristallisation. Enfin, le produit est filtré sous vide puis séché au dessiccateur. Le rendement de cette deuxième étape est d'approximativement 83 %.

1.3 Procédure de synthèse des peptides

1.3.1 Protocole de couplage des acides aminés

La synthèse des peptides est réalisée dans un système manuel à 6 réacteurs. Toutes les étapes d'un cycle, soit la déprotection, le couplage et les lavages, y sont effectuées (Tableau III). L'utilisation d'environ 1,5g de résine PAM à laquelle est déjà fixé le Boc-Trp(CHO) permet de travailler avec une substitution d'environ 0,5 $\mu\text{mole/mg}$. La première étape est donc la déprotection qui permettra de retirer le groupement protecteur Boc. Elle est effectuée en deux temps. Premièrement, du TFA : éthanethiol (40% : 1%) dans du DCM est ajouté dans le réacteur dans des proportions d'environ 10 mL/g de résine. Le tout est agité par un jet d'azote pendant 5 minutes puis drainé sous une pression d'azote. Dans un second temps, l'ajout d'une même quantité de TFA est répété mais, cette fois-ci pour 20 minutes. Ensuite, la résine est rincée, à raison d'environ 10 mL/g, pendant 2 minutes avec deux fois du DCM, de l'éthanol, du DCM et du DMF pur ou du DMF/DIEA 1%.

Après l'ensemble des rinçages, 3 éq. de Boc-acide aminé et 3 éq. de BOP sont dissous dans un minimum de DMF. Le tout est ajouté dans le réacteur puis agité par un jet d'azote pendant quelques secondes. Par la suite, le DIEA est ajouté à raison de 5 éq. et ce jusqu'à l'introduction (en position 11 ou 15, selon le cas) d'un acide aminé substitué ayant le groupement fonctionnel de sa chaîne latérale protégé par un groupement Fmoc. Pour le couplage de ce résidu et les couplages subséquents, et ce jusqu'à la fin, seulement 3 éq. de DIEA sont utilisés, car celui-ci peut lentement retirer les groupements protecteurs -Fmoc et -OFm.

La réaction de couplage s'exécute en moyenne en 30-45 minutes et ce constamment sous agitation à l'azote. Quand la réaction de couplage est terminée, la résine est rincée pendant 2 minutes, 2 fois au DMF et 2 fois au DCM pour éliminer l'excès de réactifs. Ensuite, il y a une évaluation qualitative du degré de couplage à l'aide

d'un test à la ninhydrine tel que décrit par Kaiser et *al* (1970). Si le couplage s'avère incomplet, l'étape de couplage est reprise avec la même quantité de réactifs.

Ce cycle comprenant la déprotection, le couplage et leur lavage respectif, est repris pour chaque résidu et ce jusqu'à ce que la séquence désirée soit obtenue. Par la suite, il est possible de procéder à la cyclisation en position 3-11 ou 1-15 via le lien amide entre les chaînes latérales des résidus substitués.

1.3.2 Protocole de lactamisation

La première étape est la déprotection qui permettra de retirer les groupements -Fmoc et -OFm des deux acides aminés à être impliqués dans la cyclisation. Cependant, avant de procéder à cette étape, il faut conditionner la résine en lui ajoutant du DMF. La résine est donc traitée respectivement au DCM et au DMF pour des périodes de 2 minutes chacune. La réaction de déprotection, proprement dite, s'effectue en 2 temps. Premièrement, un mélange 20% pipéridine dans du DMF est ajoutée dans les réacteurs à raison de 10 mL/g. Le tout est agité pendant 5 minutes puis drainé. Au second temps, l'ajout de pipéridine est répété mais cette fois-ci pour une période de 15 minutes. Enfin, la résine est rincée successivement avec 2 fois du DMF, de l'éthanol, du DCM, de l'éthanol et 2 fois du DMF (Tableau IV). Après le traitement à la pipéridine, les deux acides aminés impliqués dans le lien amide se retrouvent sous forme d'acide et de base libre. La réaction de cyclisation peut alors avoir lieu. Ainsi, 3 équivalents de BOP sont dissous dans du DMF. Le tout est ajouté au réacteur puis agité par le jet d'azote pendant quelques secondes. Le DIEA est ensuite ajouté à raison de 5 équivalents. Le degré de couplage est vérifié environ aux 45 minutes, à l'aide du test de Kaiser et *al*. (1970). Dans le cas de la première série d'analogues, la cyclisation est arrêtée après 5½ heures alors que la seconde série a nécessité 22 heures de réaction. Toutefois, dans le but de conserver les meilleures conditions possibles, les réactifs sont changés approximativement aux 2 heures. Quand la réaction est terminée, la résine subit des rinçages, 2 fois au DMF et 2 fois au DCM, afin d'éliminer les excès de réactifs. Enfin, le

TABLEAU III: Protocole présentant les différentes étapes d'un cycle de couplage d'un acide aminé.

ÉTAPES	RÉACTIFS ^a	TEMPS (min)
Déprotection	40% TFA, 1% éthanethiol / DCM	1 X 5
Déprotection	40% TFA, 1% éthanethiol / DCM	1 X 20
Lavage	DCM	2 X 2
Lavage	EtOH	1 X 2
Lavage	DCM	1 X 2
Lavage	DMF	2 X 2
Couplage	3 éq de Boc-AA-COOH / DMF ^b 3 éq de BOP / DMF 5 éq de DIEA ^c	1 X 45 ^d
Lavage	DMF	2 X 2
Lavage	DCM ^e	2 X 2

^a Le volume de solvant utilisé pour les lavages est approximativement de 10 mL/g de résine

^b Pour les AA substitués, seulement 2 éq ont servis au couplage.

^c Après l'introduction d'un résidu protégé par Fmoc, soit en position 11 ou 15 selon le cas, la quantité de base utilisée est réduite à 3 éq.

^d Ceci est le temps moyen. Certains couplages sont plus courts et d'autres plus longs. Le contrôle est effectué par le test à la ninhydrine de Kaiser et *al.* 1970.

^e Entre les couplages, le peptide-résine est conservé dans le DCM.

peptide-résine est retiré du réacteur, filtré tout en étant rincé généreusement au DMF, au DCM et au MeOH, avant d'être séché sous vide.

1.4 Clivage des analogues à l'acide fluorhydrique

Le produit de la synthèse, soit le peptide-résine, est introduit dans un réservoir en Kel-F. Du *m*-crésol y est ajouté à raison de 1mL/g de peptide-résine ainsi que de l'éthanthiol (0,5mL/g). Le réacteur est alors placé sur l'appareil à clivage et un vide est créé à l'intérieur, avant de l'amener à -196°C en le plaçant dans un bain d'azote liquide. À cette température, il sera possible de procéder à l'ajout du HF (10ml/g) par condensation. La réaction se poursuit dans un bain de glace et d'eau à 0°C pour une période de 50 à 60 min. Ensuite, le HF est évaporé sous vide pendant approximativement 30 min. Après, le peptide est précipité à l'éther puis, trituré et filtré sur un verre fritté. Une extraction avec ~10 mL de TFA "biograde" permet de resolubiliser le peptide. Par la suite, l'évaporation du TFA est requise avant d'ajouter à nouveau de l'éther pour précipiter le peptide. Le tout est trituré, filtré et le précipité obtenu peut enfin être séché au dessiccateur. Le peptide est ensuite congelé à -20°C ce qui assure sa conservation jusqu'à son utilisation ultérieure.

1.5 Purification des analogues linéaires et monocycliques

Tous les analogues conçus dans le cadre du présent projet ont été purifiés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) préparative en phase inverse. Les purifications ont été exécutées sur un système Waters modèle 590, couplé à un contrôleur de gradient et combiné à un détecteur d'absorbance, modèle 441.

**TABLEAU IV: Protocole de déprotection sélective des groupements
Fmoc et OFm précédant la lactamisation.**

ÉTAPES	RÉACTIFS ^a	TEMPS (min)
Lavage	DCM	1 X 2
Lavage	DMF	1 X 2
Déprotection	20 % pipéridine / DMF	1 X 5
Déprotection	20 % pipéridine / DMF	1 X 15
Lavage	DMF	2 X 2
Lavage	EtOH	1 X 2
Lavage	DCM	1 X 2
Lavage	EtOH	1 X 2
Lavage	DMF	2 X 2
Cyclisation	3 éq de BOP / DMF 5 éq de DIEA	Total ^b 22 heures
Lavage	DMF	2 X 2
Lavage	DCM	2 X 2

^a Le volume de solvant utilisé pour les lavages est approximativement de 10 mL/g de résine.

^b Pour conserver des conditions de réaction optimales, les réactifs sont renouvelés environ aux 2 heures.

1.5.1 Purification des peptides linéaires

Les analogues sont dissous à raison d'approximativement 100 mg pour 1L de ACN : TFA (5% : 0,06%), préalablement déoxygené au moins 15 minutes sous jet d'azote. La solution est ensuite injectée sur une colonne DeltaPak C₁₈ (15 µm, 300 Å) de 30 x 5,7 cm.

L'élution du produit se fait à l'aide d'un gradient linéaire de 0% à 100% (B) en 1¼ heure. Les solvants (A) et (B) sont respectivement du TFA (0.06%) dans l'eau et un mélange ACN : TFA (35% : 0,06%). Un débit de 40 mL/min est maintenu tout au long de l'élution. La détection du produit se fait à une longueur d'onde de 229 nm. Finalement, les fractions sont récoltées. Par la suite, un système de HPLC analytique de modèle 715 Ultra wisp de Waters, couplé à un contrôleur de gradient automatique et à un détecteur de modèle 484 (Waters), permet l'analyse des fractions recueillies. Les échantillons passent sur une colonne Vydac (10 µm) de 30 x 0,39 cm en phase inverse. Ils subissent une séparation au moyen des solvants suivants: (A) TFA 0,06% et (B) ACN qui permettent l'élution selon un gradient linéaire de 20% à 60% (B) en 20 minutes. Le débit est fixé à 1,5 mL/min. Enfin, l'absorbance mesurée à 230 nm garantit la détection. Finalement, les fractions identifiées comme étant pures sont regroupées, évaporées et lyophilisées.

1.5.2 Purification des peptides monocycliques

Dans ce cas-ci, les analogues sont dissous, à raison d'environ 50 mg/L, dans un mélange ACN : TFA(5% : 0,06%). Par la suite, la solution est injectée sur une colonne DeltaPak C₁₈ (15 µm, 300Å) de 30 X 2,8cm. Un gradient linéaire de 0% à 100% (B) en 1 heure permet l'élution des produits. Les solvants (A) et (B) sont respectivement constitués de ACN : TFA (5% : 0,06%) et de ACN : TFA (40% : 0,06%). Les paramètres de débit et de détection, établis pour la purification des analogues linéaires demeurent les mêmes dans le cas présent. Enfin, la procédure d'analyse des fractions sur HPLC analytique reste sensiblement la même. La seule exception se situe au niveau du gradient d'élution. En effet, celui-ci a été modifié pour un gradient linéaire de 25% à 55% (B) en 15 minutes.

Enfin, les fractions déterminées comme étant pures subissent les mêmes traitements que dans le cas précédent.

1.6 Protocole de cyclisation du pont disulfure

Les fractions obtenues à la suite des purifications des analogues monocycliques, et ayant une pureté appréciable, sont réunies. Leur solubilisation a été réalisée dans un mélange ACN : TFA (5% : 0,06%) et ce, à raison d'environ 50 mg/L. Ce solvant avait été préalablement déoxygené, au moins 15 minutes, sous jet d'azote. A cette solution, un ajout de NH_4OH concentré permet d'ajuster le pH à 8.0. Par la suite, le tout est mis en présence de l'oxydant à raison de 20 éq d'une solution de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 0,1 M. Le temps de réaction est de 30 minutes. Après ce délai, du TFA « biograde » sert à l'abaissement du pH jusqu'à 2.5. Enfin, le peptide est maintenant prêt à être purifié. La procédure utilisée est quasi similaire à celle employée pour la purification des analogues monocycliques. Cette fois-ci, le gradient linéaire de 0% à 100% (B) s'étend sur une période de 1½ heure et, le solvant (B) est constitué de ACN : TFA (35% : 0,06%). En ce qui concerne la procédure d'analyse des fractions, elle demeure identique à celle employée pour les analogues monocycliques. Il en va aussi de même pour la finition des produits avant leur entreposage.

2. Caractérisation des analogues de l'endothéline-1

2.1 Chromatographie liquide à haute performance analytique

Les produits sont analysés sur une colonne Pep-S Super Pak (5 μ m) (25 X 0,4 cm) de Pharmacia, branchée à un système 715 Ultra Wisp de Waters. Cet appareil est couplé à un contrôleur de gradient automatique et à un détecteur d'absorbance de modèle 484 provenant aussi de Waters. Le système utilise comme éluant A, TFA 0,06% et comme éluant B, ACN. Le gradient est réglé de 25% à 65% de B en 20 minutes, pour un débit de 1,0 mL/min. Enfin, l'absorbance est mesurée à 230 nm.

2.2 Test de réduction au 2-mercaptoéthanol

Un échantillon de 1 mg est solubilisé dans 1 mL d'H₂O. Ensuite, 50 μ L de 2-mercaptoéthanol sont ajoutés. Le tout est mélangé et incubé à la température de la pièce. Après 1½ heure de réaction, un aliquot est prélevé et une analyse par HPLC est effectuée sur une colonne Pep-S Super Pak (5 μ m) (25 X 0,4 cm) de Pharmacia installée sur le système 715 Ultra Wisp de Waters. L'éluant A est le TFA 0,06% et l'éluant B consiste en de l'ACN. Le gradient fixé est de 25 % à 65 %B en 20 minutes, avec un débit de 1 mL/min.

2.3 Test de réduction au NaBH₄

Un échantillon de 1 mg de peptide est solubilisé dans 10 mL de tampon carbonate à pH 9.1. Ensuite, du NaBH₄ y est ajouté pour une concentration finale de 0.1 M. Le tout est agité soigneusement puis incubé à la température de la pièce pour au moins 30 minutes. Après ce délai, le mélange est acidifié jusqu'à pH 4 en utilisant du TFA 0.1 M. Puis, une fois de plus, la solution est incubée à la température de la pièce pour une période de 10 minutes, ce qui permet au NaBH₄ restant de bien s'hydrolyser. Finalement, l'échantillon est prêt à être passé sur HPLC. L'analyse se fait sur une colonne Vydac (10 μ m) en phase

inverse (30 X 0,39 cm). Les éluants A et B sont respectivement du TFA 0,06% et de l'ACN. L'élution est effectuée selon un gradient linéaire de 25 à 55% B en 15 minutes avec un débit de 1,5 mL/ min.

2.4 Spectrométrie de masse

Un spectromètre de masse Fisons AutoSpecQ permet de donner les mesures FAB/MS. De l'iodure de césium sert à la calibration de l'appareil. La matrice utilisée lors du premier essai est la nitrobenzylamine et lors du second essai, le thioglycérol.

2.5 Électrophorèse capillaire

Les analyses sont effectuées sur un appareil de Applied Biosystems de modèle 270 A. Les conditions en vigueur pour les analyses sont les suivantes: le peptide est solubilisé dans un tampon citrate de sodium 20 mM à pH 2.5, la séparation est effectuée sur un capillaire de 50 cm X 50 µm à un voltage de 30 kV et à une température de 30°C, le produit est injecté pendant 20 secondes par aspiration sous vide et enfin, la détection est effectuée à 230 nm.

RÉSULTATS

3. Production des analogues de l'endothéline-1

3.1 Synthèse et clivage des analogues de l'endothéline

La synthèse d'un premier groupe d'analogues a été réalisée sur une résine Pam à laquelle était déjà fixé le Boc-Trp (CHO) (substitution 0,52 mmole/g de résine). Dans le cas de chaque analogue, approximativement 1,5 g de résine est utilisé, ce qui résulte à une échelle de synthèse de 0,77 mmole. Une portion de ce produit de synthèse a été retirée après la déprotection à la pipéridine sans qu'il y ait eu cyclisation. Ce produit correspond aux analogues linéaires. Quant au reste du produit de synthèse, il a subi une réaction pour lier les deux chaînes latérales des résidus substitués. Cette cyclisation qui a duré 5½ heures, avait pour but de permettre la formation du pont lactame.

De la même façon que le test Kaiser a servi au cours des couplages des acides aminés, il a servi ici à vérifier si la cyclisation était complète. Après 5½ de réaction, le résultat du Kaiser ne permettait pas de confirmer la complétion du couplage. Cependant, étant donné que l'utilisation de ce test n'est que qualitative et, considérant le délai de formation du pont lactame nécessaire dans le cas du GRF, la réaction a été arrêtée à ce moment.

Par la suite, tous les analogues subissent un clivage au HF en présence de capteurs de carbocations. Les produits résultant de cette étape ont une coloration mauve plus ou moins prononcée, selon les analogues. Enfin, une analyse par HPLC du produit obtenu à la suite du traitement au HF démontre que les produits de synthèse des analogues linéaires sont de bonne qualité car dans 5 cas sur 6, il y a présence d'un pic majeur qui se distingue bien des autres pics (Figure 6). Cependant, l'analyse par HPLC des analogues monocycliques révèle que ces produits de synthèse sont de piètre qualité. En effet, le chromatogramme démontre une multitude de petits pics qui émergent d'un profil en forme de « cloche ». Ceci

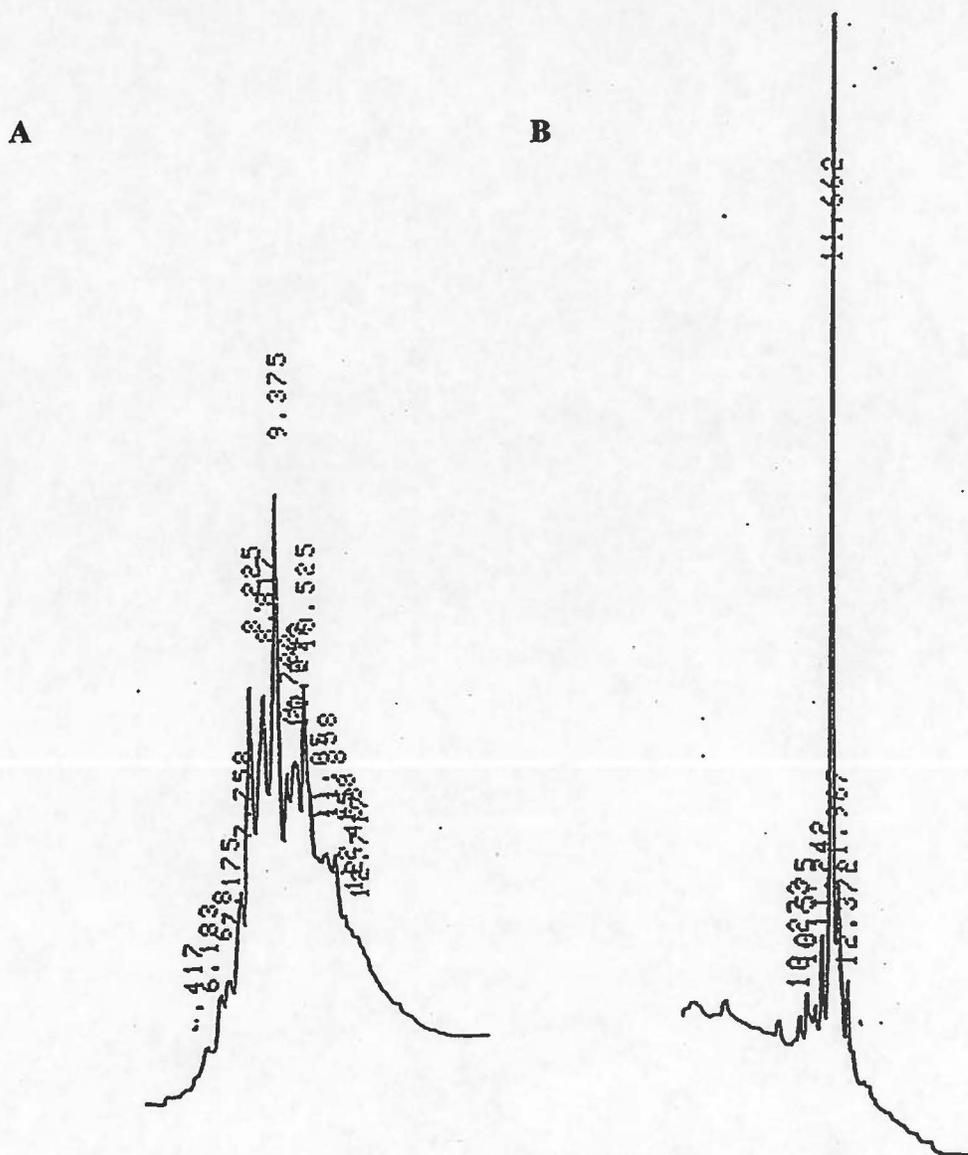


Figure 6: Chromatogrammes de l'analyse par HPLC de la purification de (Asp¹-Lys¹⁵) hET-1 linéaire

- A) après synthèse en phase solide avec le BOP et clivage au HF (gradient 25-65% de B en 33 minutes sur colonne 10 μ m);
- B) après purification par HPLC préparative (gradient 25-65% de B en 20 minutes sur colonne 5 μ m).

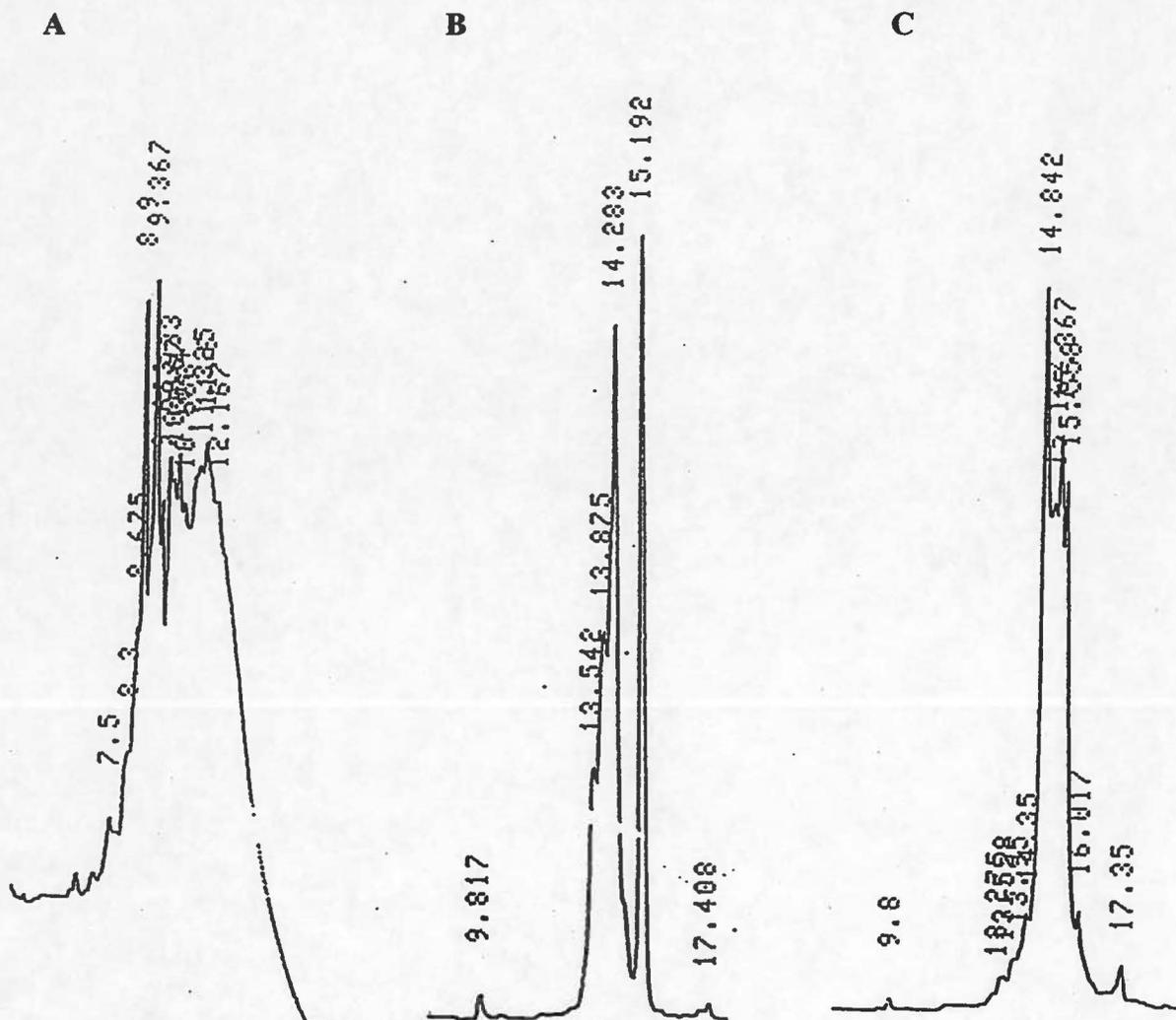


Figure 7: Chromatogrammes de l'analyse par HPLC de la purification de (Asp¹-Orn¹⁵) hET-1 monocyclique obtenu suite à la synthèse d'une première série d'analogues

- A) après la synthèse en phase solide avec le BOP et clivage au HF (gradient de 25-65% de B en 20 minutes sur colonne 10 μ m);
- B) après purification par HPLC préparative. (Pool 36-44) (gradient de 25-65% de B en 20 minutes sur colonne 5 μ m);
- C) après purification par HPLC préparative. (Pool 55-64) (mêmes conditions qu'en B)).

signifie alors, qu'une multitude de produits est obtenue incluant peut-être, la présence de polymères (Figure 7).

À cause de la qualité médiocre des produits de synthèse des analogues monocycliques, une deuxième série d'analogues a été synthétisée. Beaucoup de précautions ont été prises pour minimiser les risques de réactions secondaires. Ainsi, comparativement à la première synthèse, beaucoup de couplages doubles et triples ont pu être évités. Enfin, le produit de cette synthèse a entièrement été cyclisé. La cyclisation a donc lieu dans des conditions similaires à la première fois. Cependant, cette fois-ci, la réaction est suivie régulièrement à l'aide du test Kaiser et ce, jusqu'à ce qu'un résultat négatif soit obtenu. La cyclisation est donc réalisée en une période totale de 22 heures. Enfin, ces analogues ont subi un clivage au HF dans les mêmes conditions que la première fois. Encore une fois, les produits obtenus avaient une coloration mauve plus ou moins forte. Finalement, l'analyse par HPLC, des produits post HF démontre que ces analogues monocycliques sont de bonne qualité. En effet, dans tous les cas, un pic majeur est présent (Figure 8).

3.2 Purification des analogues linéaires et monocycliques de l'endothéline-1

Comme il est possible de le remarquer à la figure 6, la purification des analogues linéaires par HPLC préparative permet un bon isolement du pic majoritaire. Le cas illustré concerne l'analogue (Asp¹-Lys¹⁵) hET-1 linéaire mais cet exemple est représentatif de 4 des 5 autres analogues linéaires. La purification de ce 5^{ème} analogue, soit (Glu¹-Lys¹⁵)hET-1 n'est pas aussi efficace et, le profil chromatographique obtenu représente un pic qui émerge d'un groupe de pics.

En ce qui concerne la purification des analogues monocycliques issus de la 1^{ère} série de synthèse, elle s'avère impossible. Effectivement, comme l'illustre la figure 7, aucun pic unique ne peut être isolé. Les 2 fractions semblant les plus pures lors de la purification ont été analysées. Les résultats révèlent dans les deux cas, quelques pics impossible à isoler. Donc, aucun produit d'intérêt n'a pu être tiré de cette purification.

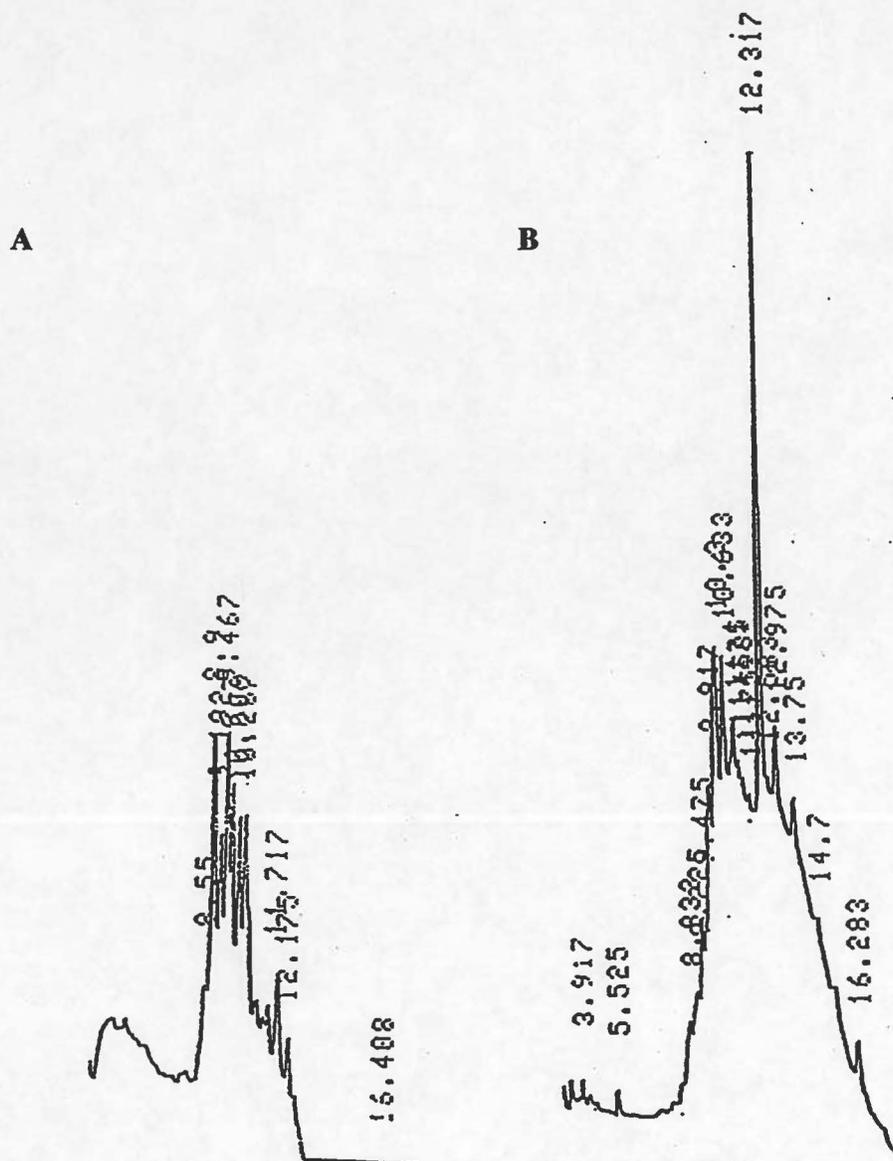


Figure 8: Chromatogrammes de l'analyse par HPLC de (Asp³-Lys¹¹) hET-1 monocyclique. Comparaison des produits obtenus après traitement au HF suite à la synthèse d'une 2^{ème} série d'analogues.

A) produit de la 1^{ère} série (gradient 25-65% de B en 33 minutes);

B) produit de la 2^{ème} série (gradient 25-65% de B en 20 minutes).

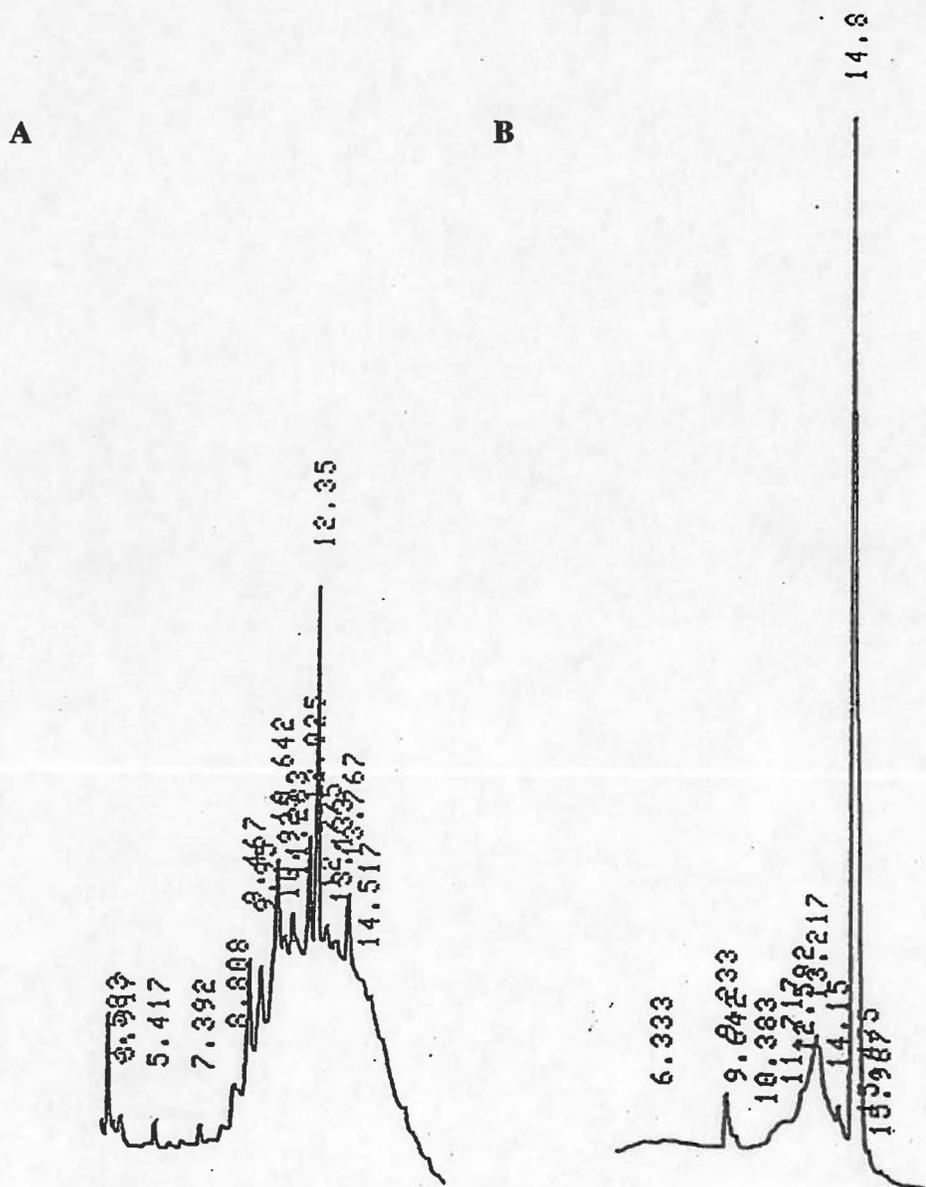


Figure 9: Chromatogrammes de l'analyse par HPLC de la purification de (Asp¹-Orn¹⁵) hET-1 monocyclique obtenu lors de la synthèse d'une 2ème série d'analogues.

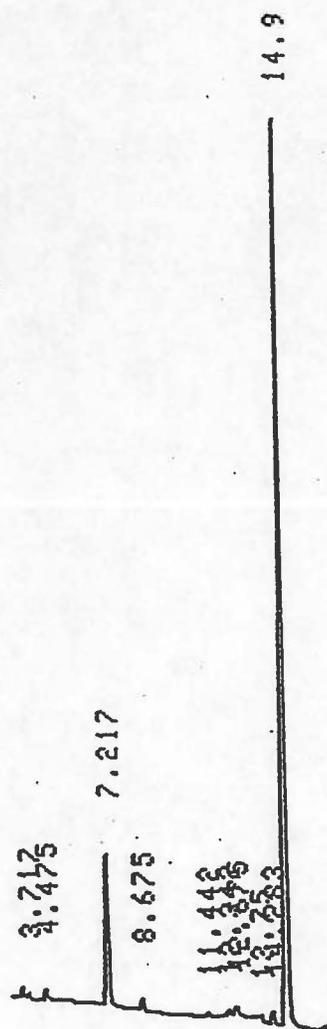
- A) après la synthèse en phase solide avec le BOP et clivage au HF (gradient de 25-65% de B en 20 minutes sur colonne 10 µm);
- B) après purification par HPLC préparative (gradient de 25-65% de B en 20 minutes sur colonne 5 µm).

La purification par HPLC préparative des analogues monocycliques issus de la seconde série s'est révélée beaucoup plus satisfaisante. Comme en témoigne la figure 9, un important pic majoritaire démontre qu'un produit a pu être convenablement isolé.

3.3 Formation du pont disulfure

Dans la deuxième série d'analogues, le groupement 4-MeBzl est utilisé pour protéger les Cys. La formation du pont disulfure peut alors se faire par une oxydation au $K_3Fe(CN)_6$, un réactif beaucoup plus doux que l'iode. Comme il est possible de l'observer à la figure 10, le produit pré-cyclisation et le produit post-cyclisation ont sensiblement le même temps de rétention. De ce résultat, trois conclusions peuvent être envisagées. La première peut correspondre au fait que la réaction de cyclisation n'ait pas eu lieu. Toutefois, cette situation est peu probable. La deuxième conclusion est que le produit monocyclique pourrait avoir le même temps de rétention que le produit bicyclique. Cette situation est aussi peu probable, compte tenu de l'importance de la conformation d'une molécule lors de son élution. Enfin, il est possible que le produit soit déjà cyclisé avant le traitement au $K_3Fe(CN)_6$. Cette hypothèse semble beaucoup plus réaliste. Différents tests ont été exécutés pour essayer de confirmer cette hypothèse.

A



B

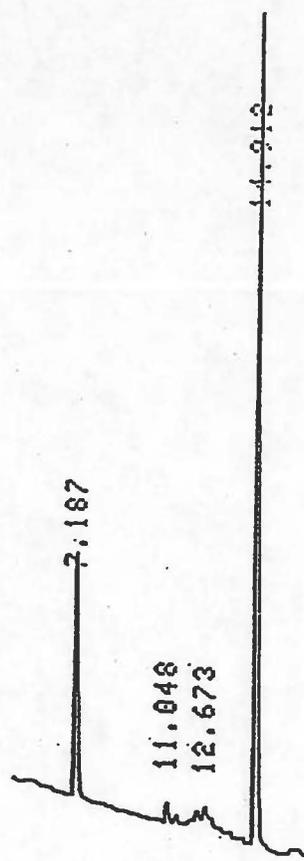


Figure 10: Chromatogrammes de l'analyse par HPLC de la formation du pont disulfure de (Asp³-Orn¹¹) hET-1.

- A) avant la réaction de cyclisation;
- B) après la réaction de cyclisation.

4. Caractérisation des analogues

4.1 Test de co-injection

Dans un premier temps, un test de co-injection a été envisagé. Ce test a été réalisé avec les analogues ($\text{Asp}^3\text{-Orn}^{11}$) monocycliques et ($\text{Asp}^3\text{-Orn}^{11}$) bicycliques provenant du pool 35-43. La figure 11 démontre que le produit monocyclique et le produit bicyclique ont un temps de rétention qui varie de l'ordre du centième de minute. Cependant, la co-injection des deux produits ne résulte qu'en un seul pic démontrant ainsi, la présence d'un seul et unique produit.

4.2 Spectre de masse

Suite aux résultats non concluants du test de co-injection, une analyse par spectre de masse a été tentée pour déterminer le poids moléculaire expérimental et définir si le produit obtenu est de nature bicyclique ou monocyclique. Toutefois, aucun résultat valable n'a été obtenu car les analogues se décomposent en petits fragments de masse variable et le pic moléculaire est absent.

4.3 Test de réduction au NaBH_4

Un test de réduction au NaBH_4 a donc été effectué sur l'analogue ($\text{Asp}^3\text{-Orn}^{11}$) hET-1 bicyclique. Comme la figure 12 le démontre, la réaction est réussie. En effet, il est possible d'observer un déplacement du temps de rétention d'environ 4 minutes. Après 30 minutes de traitement, la réaction n'est pas complète. En effet, un petit pic est encore présent à 12 minutes. Toutefois, après 2 heures de traitement, ce pic est complètement disparu. Enfin, pour confirmer ces résultats, le test de réduction a été repris sur l'analogue ($\text{Asp}^3\text{-Orn}^{11}$) hET-1 n'ayant pas subi la réaction de cyclisation au $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Comme il est possible de le remarquer sur le profil HPLC de la figure 13, après 1 heure de réaction, le pic majeur se déplace de la même manière que dans le cas de l'analogue bicyclique. En effet, il

passé de 12,2 minutes à 8,2 minutes. Toutefois, après 60 minutes, la réaction n'est pas encore complète car un petit pic est encore présent à 12,3 minutes (figure 13B).

4.4 Test au 2- mercaptoéthanol

Dans l'ordre chronologique des expérimentations, ce test a été effectué avant le test de réduction au NaBH_4 . Toutefois, après avoir pris connaissance des résultats de la réduction au NaBH_4 , il est maintenant connu que la différence de temps de rétention entre les formes monocycliques et bicycliques de nos analogues est d'environ 4 minutes. Ainsi, en observant attentivement la figure 14B, il est possible d'apercevoir, sur le profil post-traitement 1h30, l'émergence d'un petit pic à 10,2 minutes, soit à environ 4 minutes de différence du pic initial.

4.5 Évaluation de la pureté des analogues par HPLC

Comme le tableau VI le démontre la pureté des analogues synthétisés se situe entre 65% et 96%. Seul l'analogue Glu¹-Lys¹⁵ a une pureté de beaucoup inférieure aux autres analogues.

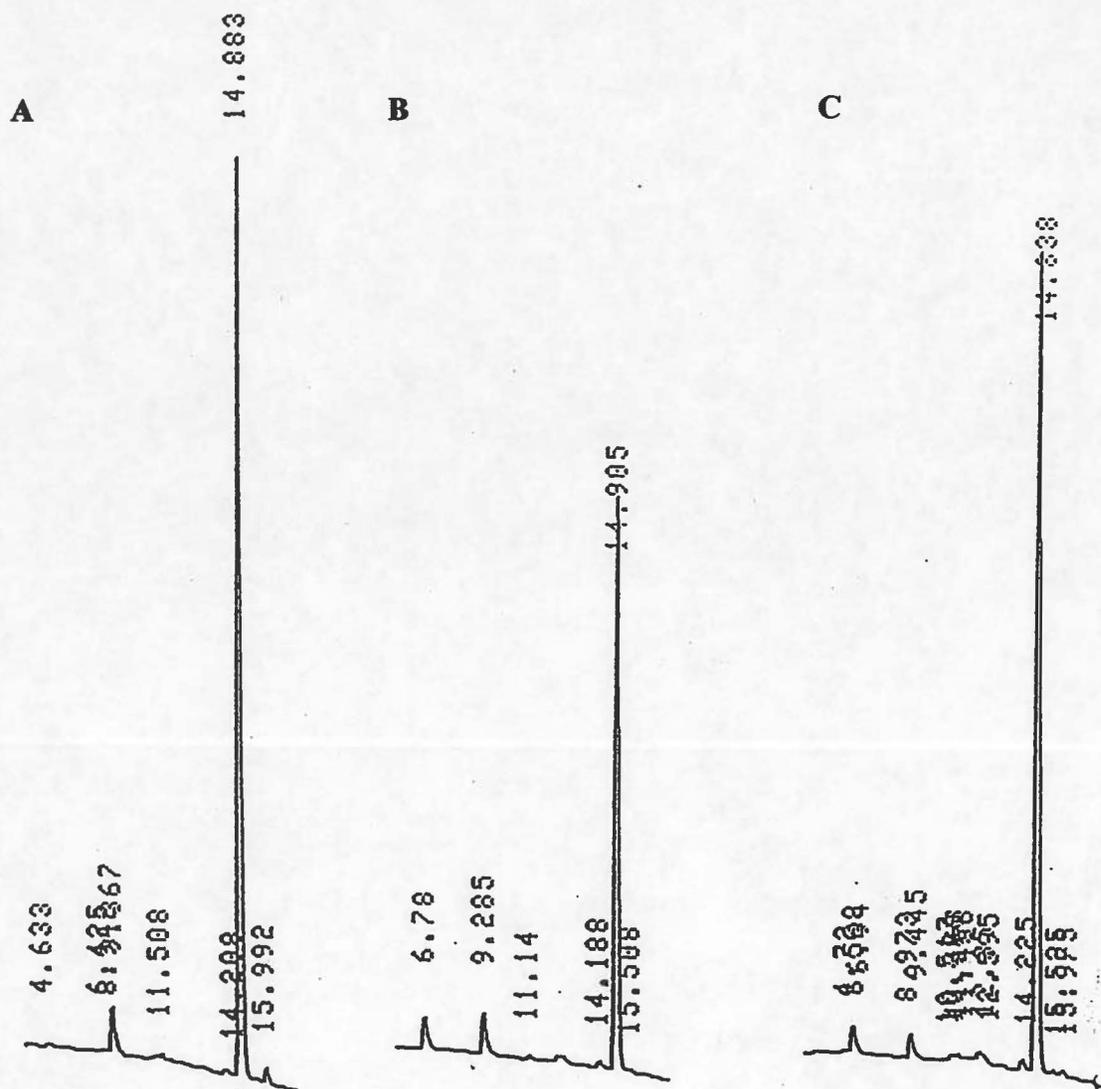


Figure 11: Chromatogrammes de l'analyse par HPLC de la co-injection des produits monocyclique et bicyclique de $(\text{Asp}^3\text{-Orn}^{11})$ hET-1.

- A) le produit monocyclique;
- B) le produit bicyclique (Pool 35-43);
- C) la co-injection des deux produits.

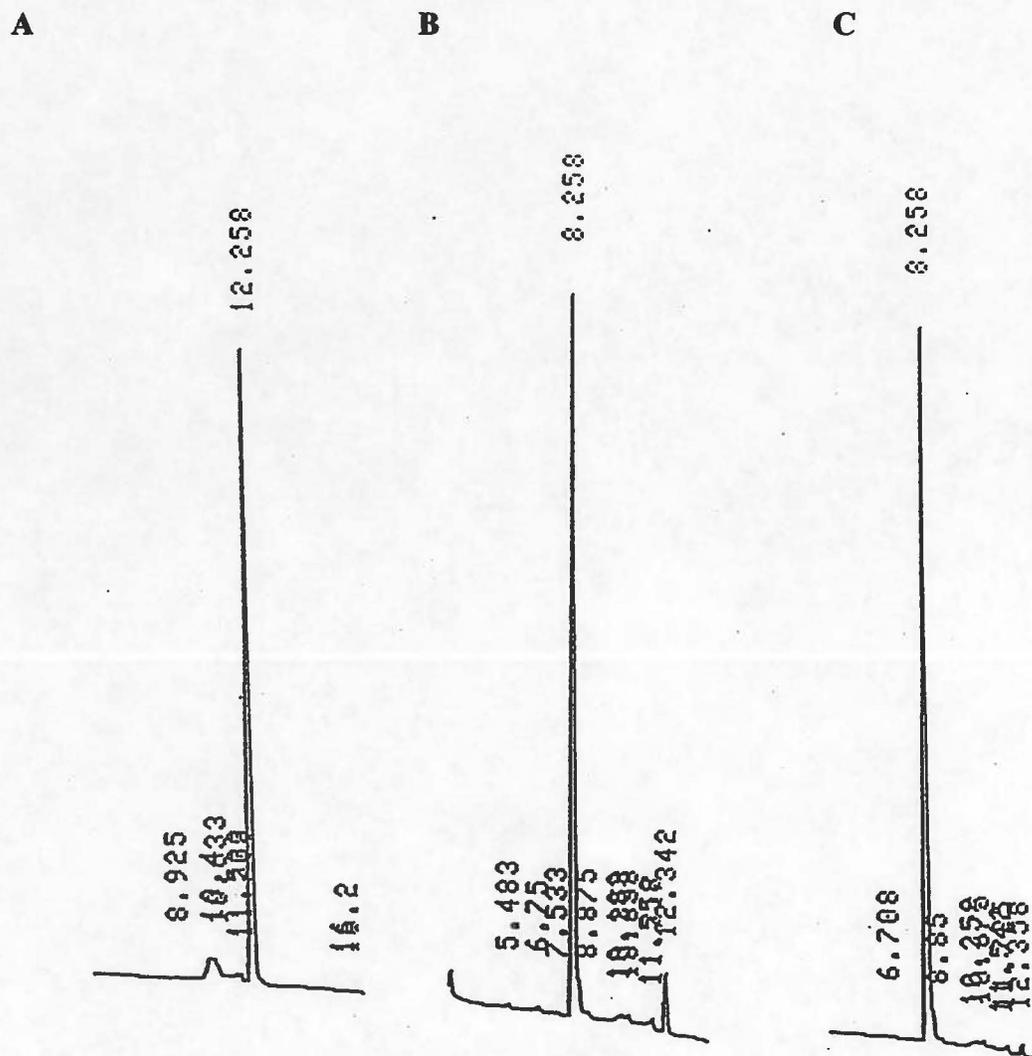


Figure 12: Chromatogrammes de l'analyse par HPLC du test de réduction au NaBH_4 sur le produit ($\text{Asp}^3\text{-Orn}^{11}$) hET-1 bicyclique.

- A) avant le traitement au NaBH_4 ;
- B) après 30 minutes de traitement;
- C) après 2 heures de traitement.

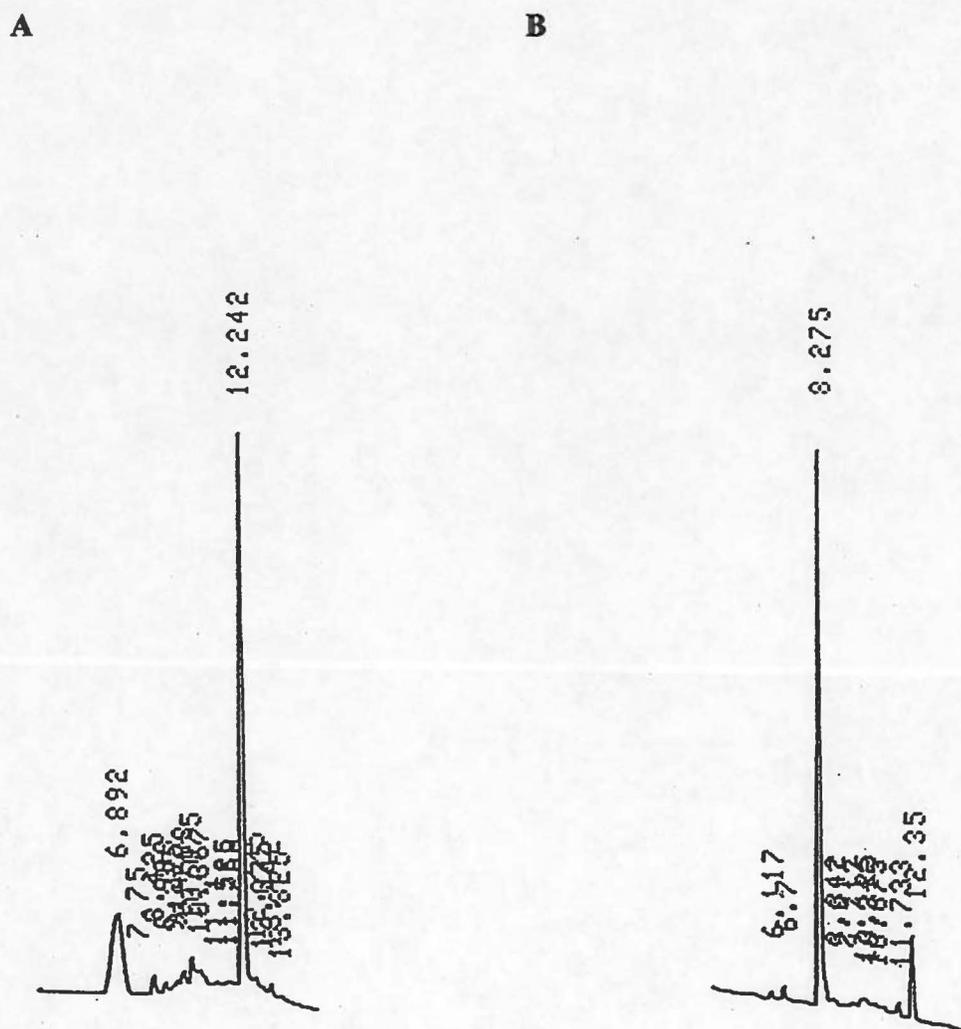
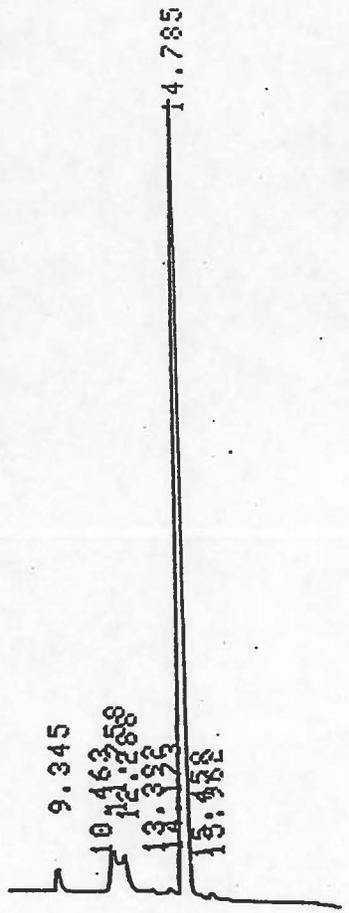


Figure 13: Chromatogrammes de l'analyse par HPLC du test de réduction au NaBH_4 sur le produit ($\text{Asp}^3\text{-Orn}^{11}$) hET-1 dit monocyclique.

A) avant le traitement au NaBH_4 ;

B) après 1 heure de traitement.

A



B

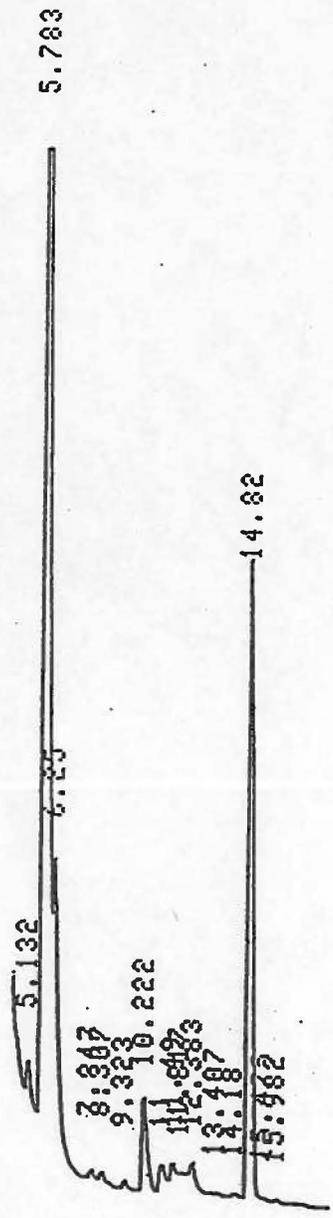


Figure 14: Chromatogrammes de l'analyse par HPLC du test de réduction au 2-mercaptoéthanol de (Asp³-Orn¹¹) hET-1.

A) avant le traitement au 2-mercaptoéthanol;

B) après 1½ heure de traitement au 2-mercaptoéthanol.

TABLEAU V: Caractérisation des analogues de l'ET-1 par EC et par HPLC

ANALOGUES	HPLC (% ACN)	EC (Tr en min.)
(Asp ¹ -Lys ¹⁵) bicyclique	54.5	10.0
(Asp ³ -Lys ¹¹) bicyclique	54.5	10.2
(Asp ¹ -Orn ¹⁵) bicyclique	54.5	9.7
(Asp ³ -Orn ¹¹) bicyclique	54.5	10.4
(Asp ¹ -Lys ¹⁵) linéaire	48.3	6.3
(Asp ³ -Lys ¹¹) linéaire	48.1	6.1
(Asp ¹ -Orn ¹⁵) linéaire	48.3	6.3
(Asp ³ -Orn ¹¹) linéaire	48.0	6.2
(Glu ¹ -Lys ¹⁵) linéaire	47.8	6.0
(Glu ³ -Lys ¹¹) linéaire	39.0	5.9

TABLEAU VI: Pureté des analogues de l'ET-1 tel que déterminée par HPLC

ANALOGUES	HPLC (%)
(Asp ¹ -Lys ¹⁵) bicyclique	71.2
(Asp ³ -Lys ¹¹) bicyclique	72.1
(Asp ¹ -Orn ¹⁵) bicyclique	81.6
(Asp ³ -Orn ¹¹) bicyclique	91.9
(Asp ¹ -Lys ¹⁵) linéaire	75.7
(Asp ³ -Lys ¹¹) linéaire	64.7
(Asp ¹ -Orn ¹⁵) linéaire	78.3
(Asp ³ -Orn ¹¹) linéaire	78.2
(Glu ¹ -Lys ¹⁵) linéaire	26.0
(Glu ³ -Lys ¹¹) linéaire	96.2

DISCUSSION

5. Élaboration de la méthode de synthèse

5.1 Justification de la sélection d'analogues à concevoir

· Les analogues sont des outils essentiels dans la compréhension du mécanisme moléculaire d'un peptide. L'ajout, la délétion ou le remplacement d'acides aminés permet de connaître les principaux éléments déclencheurs de l'activité biologique. Pour la conception d'analogues de choix, 2 approches sont considérées : (1) la méthode concertée consiste à remplacer des acides aminés sélectionnés dans un but précis; (2) la méthode dite systématique, permet de modifier plusieurs parties de la molécule, de façon successive en employant toujours le même élément de remplacement (Tam et *al.*, 1994).

Dans le cadre du présent projet, l'approche concertée est sélectionnée comme méthode de synthèse. Les ponts disulfures de l'ET-1 sont remplacés à tour de rôle par des ponts lactames. Le but de cette modification est de préciser le rôle des cystéines dans le mécanisme moléculaire. En effet, plusieurs hypothèses laissent présager une interaction des groupements des cystéines de la molécule avec celles de la partie extracellulaire du récepteur. Parmi les études déjà effectuées dans ce domaine, il faut mentionner celle de Hagiwara qui a démontré que les récepteurs d'ET-1 sont sensibles à l'acide p-chloromercuriphénylsulfonique (PCMS), un agent alkylant des groupements sulfhydriles (Hagiwara et *al.*, 1990). De plus, l'année suivante, un autre groupe de recherche démontre que la liaison d'ET-1 est inhibée par le cadmium, un métal lourd. Ce genre d'interaction s'explique par la formation d'un lien de coordination entre le soufre d'un groupement thiol du récepteur et l'ion métallique (Wada et *al.*, 1991).

Enfin, en 1993, Spinella et son équipe démontrent qu'il y a perte d'efficacité lors de la liaison molécule-récepteur en présence de NEM (N-éthylmaléimide), un autre agent alkylant des sulfhydriles. De plus cette même équipe de recherche prouve, par

électrophorèse, que la bande correspondant au complexe molécule-récepteur disparaît en présence d'agents réducteurs. C'est à la suite de ces diverses observations et, à l'aide de l'antagoniste [Dpr¹-Asp¹⁵]ET-1 que Spinella propose un modèle d'interaction pour l'ET-1 et ses récepteurs. Cette interaction se produirait par le biais de 2 conformations distinctes de l'ET-1. La structure bicyclique de l'ET-1 correspondrait ainsi à la conformation de liaison au récepteur, alors qu'une structure plus ouverte, comme la structure monocyclique, correspondrait à la conformation d'activation du récepteur (Spinella et *al.*, 1993).

Pour effectuer les modifications chez les analogues, le choix des acides aminés substitués s'est arrêté sur les résidus suivants; Asp, Glu, Orn et Lys. Effectivement, il est possible de former un lien amide entre les groupements carboxyliques des chaînes latérales de Asp et Glu d'une part, et les groupements amines latéraux de Orn et Lys d'autre part. Toutes les combinaisons possibles entre ces résidus sont à étudier. Ainsi, en plus de vérifier l'importance des Cys, ces combinaisons d'analogues permettront d'analyser un second paramètre. En effet, lors d'une étude sur des analogues du GRF (*Growth Hormone-Releasing Factor*), il a été démontré que la taille d'un cycle formé par un lien interne avait une influence sur l'activité biologique du peptide. Un cycle trop petit ou trop grand entraîne peu ou même pas du tout d'activité. Dans le cas du GRF, le cycle par excellence est constitué de 21 ou 22 chaînons (Campbell, Bongers et Félix, 1995). Ainsi, l'étude de cette option dans le présent projet, permettra de vérifier si l'endothéline adopte ce même type de comportement.

5.2 Choix du matériel et des réactifs de synthèse

5.2.1 Choix de la résine

Afin de réaliser la synthèse des analogues sélectionnés par la méthode en phase solide, il est nécessaire de se procurer un support polymérisé insoluble dans les solvants requis pour la filtration et les lavages. Cette résine doit également posséder des groupements fonctionnels capables de fixer de manière covalente le groupement carboxylique en position

α du résidu C-terminal du peptide (Merrifield, 1963). Dans le cas présent, la résine employée est un copolymère de styrène ponté avec 1% de divinylbenzène et fonctionnalisé avec le groupement phénylacétamidométhyle (PAM) (Figure 15). Cette résine est une variante améliorée de la résine chlorométhylée classique de Merrifield (Figure 16). Cette résine PAM est recommandée lors de la synthèse de peptides relativement longs. Son groupement phénylacétamidométhyle possède un effet stabilisateur sur le lien ester, contribuant ainsi à la réduction des pertes lors de l'acidolyse (Stewart et Young, 1984). La résine PAM permet aussi d'obtenir après une déprotection finale, une extrémité N-terminale libre et un groupement carboxy-terminal libre après le clivage (Figure 17).

5.2.2 Choix des groupements protecteurs de la fonction α -aminée

Pour s'assurer qu'à chaque cycle de couplage, un seul acide aminé est ajouté, le groupement N-terminal de la position α doit être protégé. Lors de la synthèse en phase solide, 2 groupements protecteurs sont principalement utilisés, le *t*-butyloxycarbonyle (Boc) et le 9-fluorenylméthoxycarbonyle (Fmoc). Le Boc est labile en milieu acide et généralement, en cours de synthèse, il est retiré en présence de TFA. Le Fmoc, quant à lui, s'enlève en milieu basique donc en présence de base organique telle la pipéridine (Stewart et Young, 1984) (Figure 19). Dans le cadre du présent projet, le Boc a été choisi pour sa facilité à éliminer les produits secondaires de la réaction de déprotection. Effectivement, lors de cette étape, de l'isobutylène et du dioxyde de carbone, tous deux gazeux, sont évacués facilement du milieu de réaction, ce qui permet d'éviter la contamination. Toutefois, lors de la déprotection, un ion carbonium tertiaire très réactif est formé. Cet intermédiaire subit l'attaque de l'atome de soufre des cystéines et/ou celui de la méthionine. Il est possible d'intervenir pour minimiser le problème en ajoutant dans le TFA, lors de la déprotection, de l'éthanedithiol (1%) qui est un capteur de carbocations. De plus, le Boc possédant un excellent groupe électrodonneur, il diminue de façon importante la racémisation en cours de synthèse (Figure 18).

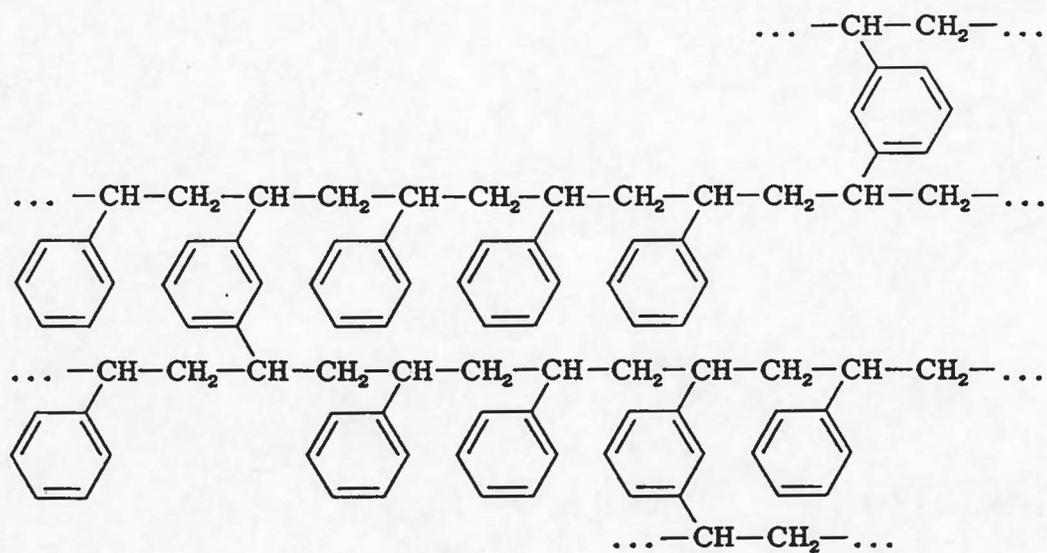


Figure 15: Structure partielle d'un copolymère de styrène ponté avec du divinylbenzène

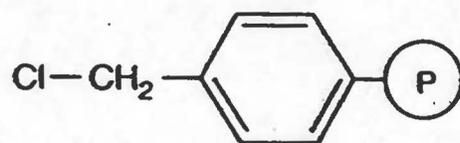


Figure 16 : Structure de la résine classique de Merrifield.

Le P représente le copolymère de styrène fonctionnalisé avec 1% de divinylbenzène.

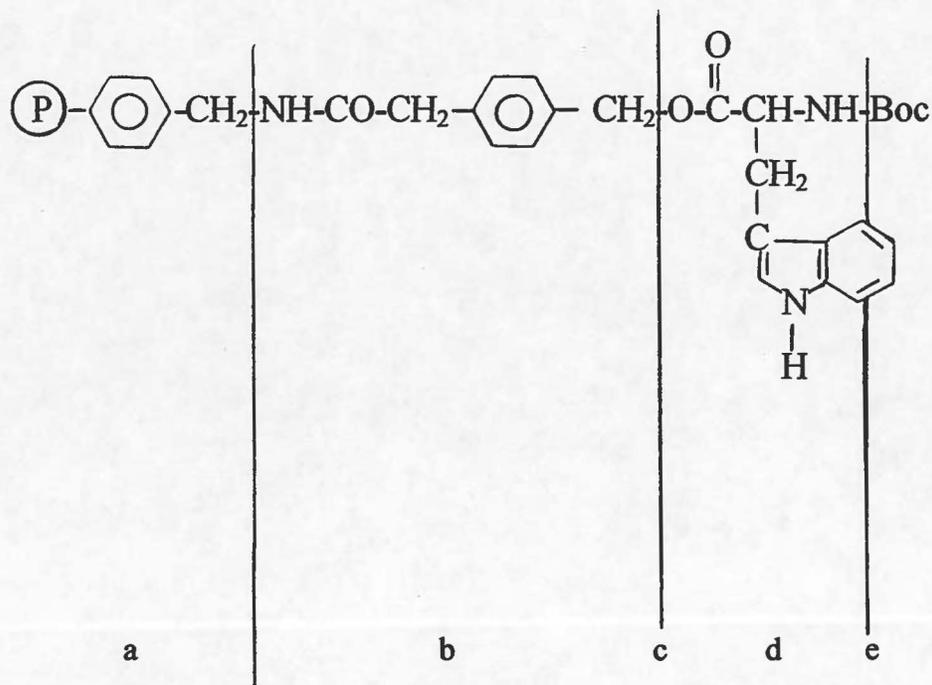


Figure 17 : Représentation schématique de la résine fonctionnalisée avec le groupement PAM à laquelle est déjà fixé l'acide aminé C-terminal de l'ET-1, soit le Trp.

- a) Le « P » représente le copolymère de styrène ponté avec 1% de divinylbenzène.
- b) Le groupement PAM permet de fonctionnaliser la résine.
- c) Site du bris de lien lors du clivage au HF.
- d) Le dernier acide aminé de l'ET-1, soit le Trp. À remarquer qu'il est fixé par son extrémité C-terminale au groupement fonctionnel de la résine.
- e) Site de clivage lors de la déprotection au TFA. Le Boc est retiré et l'acide aminé ayant ainsi son extrémité N-terminale libre peut maintenant recevoir l'acide aminé suivant.

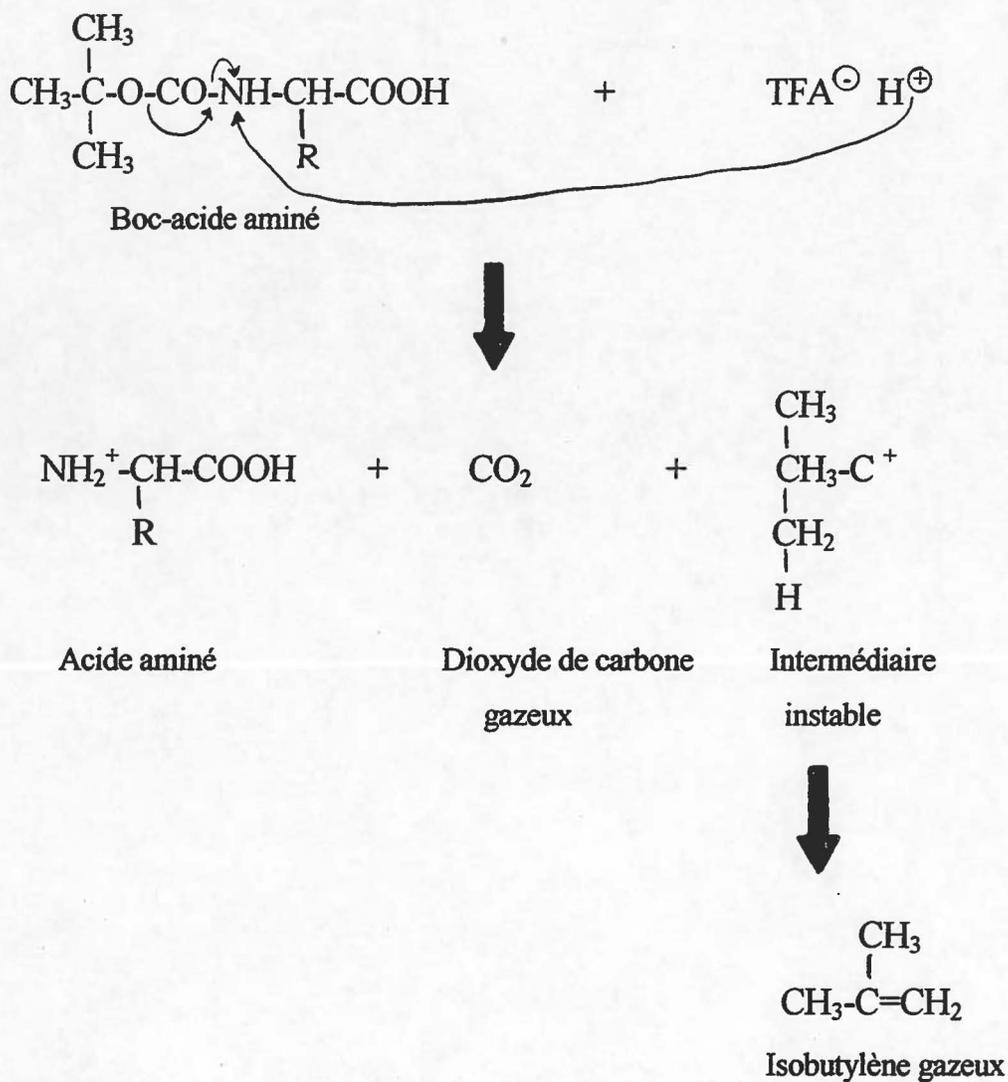


Figure 18 : Mécanisme de la réaction de déprotection de la fonction N-terminale de l'acide aminé par retrait du groupement Boc.

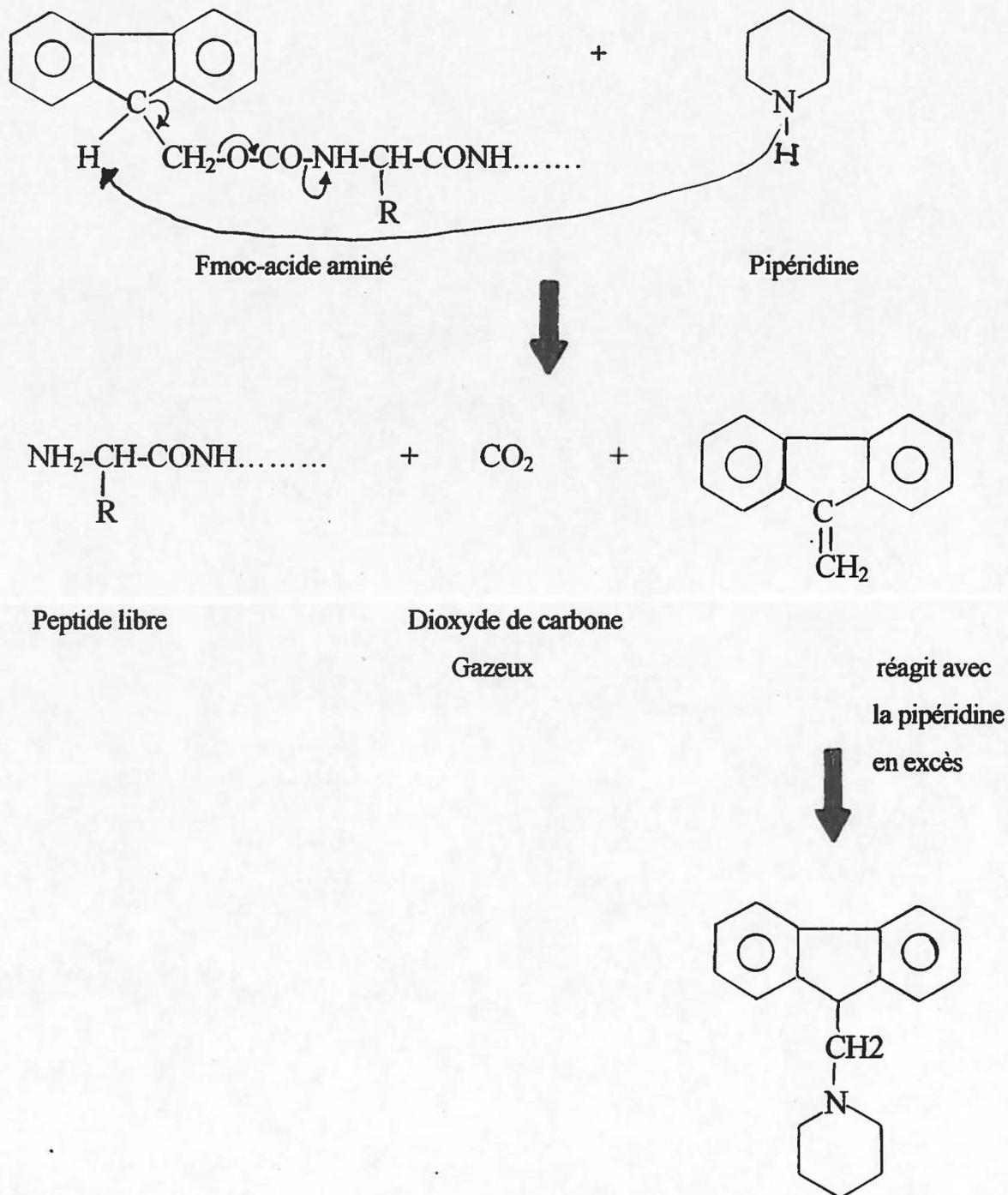


Figure 19 : Mécanisme de la déprotection de la fonction N-terminale de l'acide aminé par le retrait du groupement Fmoc.

5.2.3 Choix du réactif de couplage

Le choix de l'agent de couplage s'est arrêté sur le BOP introduit par Castro en 1975. Ce réactif figure parmi les meilleurs. Il est disponible sous forme de sel non-hygroscopique donc il a l'avantage d'être très stable à la température de la pièce et, de plus, il est soluble dans tous les solvants utilisés pour la synthèse (Castro *et al.*, 1975). Des études comparatives ont démontré que le BOP est plus efficace, en terme de temps et de rendement, que le DCC, tout en permettant une production d'une pureté comparable (Fournier, Wang et Félix, 1988). Dans le cadre du présent projet, le BOP est utilisé avec le DMF comme solvant. Ce dernier étant un solvant polaire aprotique, la réaction de couplage y est exécutée plus rapidement et plus efficacement qu'en présence d'autres solvants. Aussi, contrairement à d'autres agents de couplages, le BOP permet d'éviter des réactions secondaires fréquentes telles que la cyclisation de Gln et la déshydratation de Asn. De plus, le BOP n'entraîne pratiquement pas de racémisation (Nguyen et Castro, 1987). Lors de la réaction de couplage, c'est la séquence suivante qui se produit au niveau moléculaire. La présence de l'amine tertiaire permet de transformer le peptide en amine libre et, l'acide aminé venant d'être ajouté en carboxylate. De cette façon, ce dernier a la capacité d'attaquer le phosphore du BOP qui possède une charge positive, pour former l'acyloxyphosphonium et/ou un ester actif neutre. Par la suite, ces deux produits intermédiaires sont piégés par l'amine présente en solution pour former un lien amide et contribuer ainsi, à l'assemblage de la chaîne peptidique (Nguyen et Castro, 1987) (Figure 20).

5.2.4 Sélection des groupements protecteurs des chaînes latérales

Les groupements terminaux des chaînes latérales de certains acides aminés sont très réactifs. Ainsi, pour réduire les risques de provoquer des réactions indésirables en cours de synthèse, des résidus protégés sur la chaîne latérale sont utilisés. Un groupement formyle est utilisé pour protéger le noyau indole du tryptophane. Il est bien connu que ce noyau est très sensible à la présence d'acide et le groupement formyle permet de prévenir les réactions

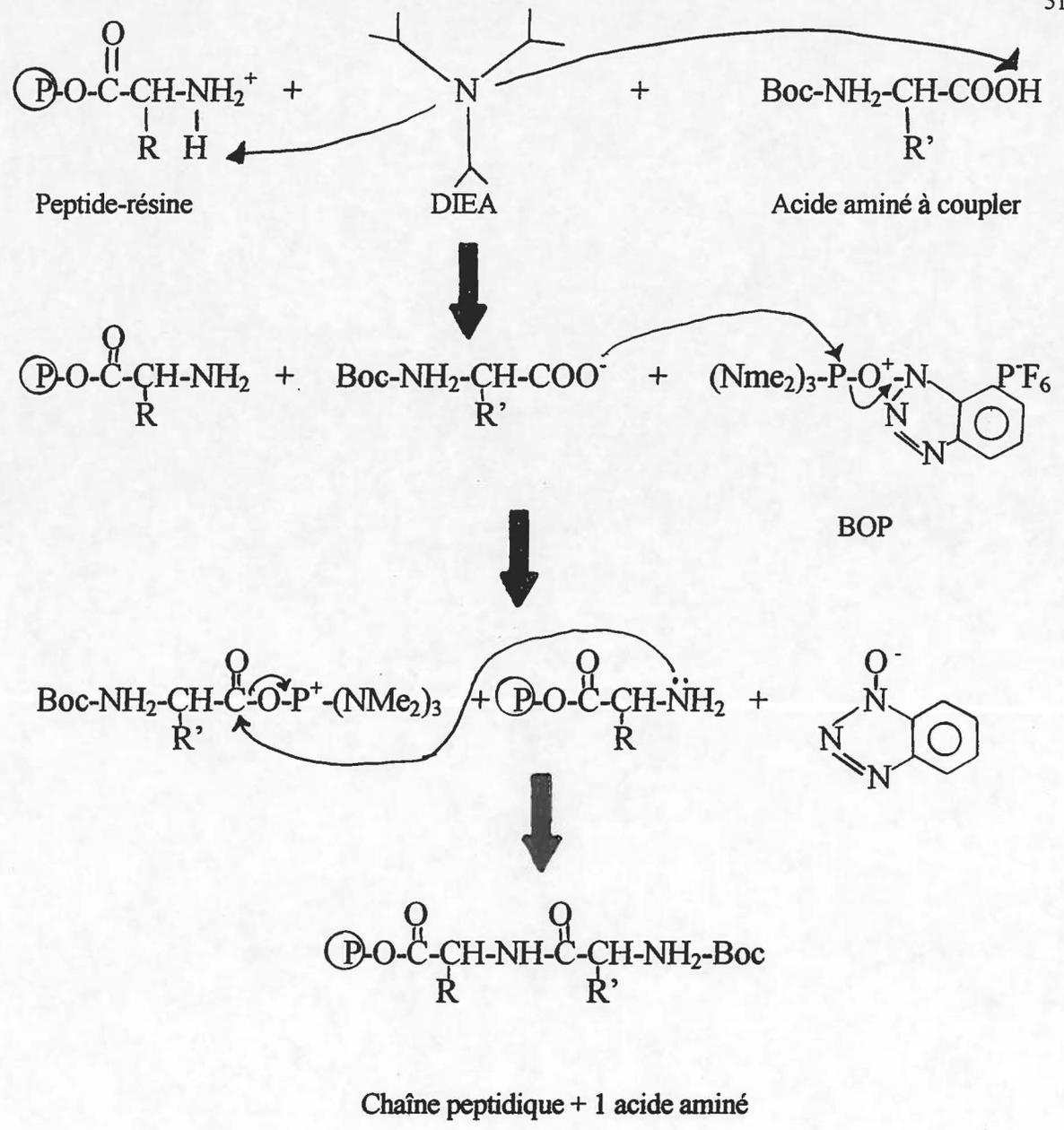


Figure 20 : Mécanisme de réaction de l'étape de couplage avec utilisation du BOP.

d'oxydation et d'alkylation qui peuvent survenir et engendrer des mélanges complexes de produits. L'acide aspartique, quant à lui, avec un deuxième groupement carboxylique sur sa chaîne latérale, peut causer plusieurs problèmes, notamment en présence de TFA. Dans ces conditions, le résidu se ferme pour former un aspartimide stable. Par la suite, une molécule d'eau attaque l'un des deux groupements $-COOH$, causant une réouverture du résidu pour résulter soit dans le bon produit peptidique, soit en un peptide ayant subi une transpeptidation (β -Asp). Pour éviter toutes ces réactions secondaires, l'utilisation d'un acide aspartique protégé par un groupement cyclohexyle sur sa fonction carboxylique latérale est requis. En ce qui concerne l'acide glutamique, il est lui aussi protégé par un groupement cyclohexyle. Comme dans le cas de Asp, Glu a une forte tendance à former des cycles très stables de 5 ou 6 chaînons et, conduisant à de nombreuses réactions secondaires. Effectivement, Glu peut se cycliser en pyrrolidone ou en glutarimide. L'intermédiaire pyrrolidone peut conduire à l'autohydrolyse du peptide alors que le glutarimide agit comme intermédiaire dans une réaction de transpeptidation (Bodansky et Martinez, 1981). L'histidine est un acide aminé particulièrement sensible à la racémisation à cause de sa chaîne latérale imidazole. Le blocage de son azote distal par le groupement *p*-toluènesulfonyl (Tos) diminue de façon importante ce type de réaction (Stewart et Young, 1984). Avec la lysine, un problème de ramification survient. Puisque la chaîne latérale se termine par une fonction amine, le prochain acide aminé à entrer a la possibilité de se fixer à deux endroits; soit à la fonction amine de la position α , tel que désiré ou soit à la fonction amine de la position ϵ pour former un peptide non désiré. L'ajout d'un groupement 2-chlorobenzoyloxycarbonyl (2-ClZ) sur la fonction ϵ - NH_2 va donc permettre de contrer cette possibilité de ramification. En ce qui concerne la sérine, sa chaîne latérale se termine par une fonction hydroxyle. À cause de sa nature très nucléophile, ce groupement OH peut être à l'origine d'un déplacement $N \rightarrow O$ entraînant ainsi, la formation d'un peptide non désiré. La protection de cette fonction hydroxyle de Ser par un groupement benzyle (Bzl) va freiner ce type de réaction. Enfin, un groupement 2-bromobenzoyloxycarbonyl (BrZ) est requis pour protéger la fonction hydroxyle phénolique de la tyrosine, afin d'éviter des réactions indésirables d'alkylation (Bodanszky et Martinez, 1981).

Pour ce qui est des cystéines, elles doivent être protégées sur leurs groupements sulfhydriles afin de réduire les risques de cyclisation intra et intermoléculaires aléatoires. En matière de protection, deux possibilités se présentent. Premièrement, un groupement 4-méthylbenzyle (MeBzl) peut être employé. Celui-ci est retiré lors du clivage au HF et l'oxydation se fait par la suite, en présence de $K_3Fe(CN)_6$. La seconde possibilité est un groupement acétamidométhyle (Acm) qui résiste lors du clivage. Il permet donc la production de peptides linéaires. Le retrait de ce groupement Acm se fait conjointement à l'oxydation et ce, lors d'une réaction en présence d'iode. Au cours du présent projet, ces deux éventualités de protection sont utilisées. Ainsi, comme le but premier est de conserver une partie des analogues sous forme linéaire, le groupement Acm sert de protection aux Cys employées lors de la synthèse de la première série d'analogues. Cependant, lors de la synthèse de la seconde série d'analogues, l'option des Cys protégées par MeBzl est privilégiée car une oxydation beaucoup plus douce est visée.

Finalement, pour ce qui est de la protection des acides aminés substitués en l'occurrence, Asp et Glu d'une part et, Orn et Lys d'autre part, ils doivent être protégés sur leur fonction latérale de manière stratégique. Effectivement, ces groupements doivent être présents jusqu'au moment de la formation du pont lactame. L'usage de groupements labiles en milieu acide est déconseillé car le retrait de ceux-ci s'exécuterait de façon concomitante à celui du Boc, par exemple. Alors des peptides non désirés, avec des ramifications seraient synthétisés. Il est donc important d'opter pour un schéma de protection tout autre que ceux déjà utilisés. Ici, le choix s'est arrêté sur des groupements protecteurs labiles en milieu basique. Ainsi, dans le cas de Glu et Asp, leur fonction carboxylique en position β et α respectivement, sont protégés par le groupement fluorénylméthyle (OFm). Le groupement 9-fluorénylméthoxycarbonyl (Fmoc), quant à lui protège les fonctions amines en position ϵ et γ des résidus Lys et Orn respectivement. Ces deux derniers groupements protecteurs sont labiles en milieu basique et par conséquent peuvent être enlevés en présence de pipéridine.

5.2.5 Schéma de protection orthogonale

Un schéma de protection orthogonale vient d'être établi. C'est-à-dire que la labilité et la puissance des groupements protecteurs sélectionnés suivent un ordre précis. Premièrement, pendant l'assemblage du peptide, à chaque cycle de couplage, le Boc, groupement protecteur de la fonction amine α doit être retiré pour permettre l'ajout de l'acide aminé suivant. Cependant, tous les autres groupements doivent rester en place. Le retrait du Boc s'effectue donc en présence de TFA. La plupart des groupements protecteurs des chaînes latérales requièrent un acide plus fort que le TFA pour être enlevés. En second lieu, l'intérêt est de cycliser le peptide en formant le pont lactame. C'est alors le moment de retirer les groupements Fmoc et OFm des résidus substitués. Tel que mentionné précédemment, cette réaction s'effectue en présence de pipéridine. Une fois la cyclisation terminée, il n'y a presque plus de risques de réactions secondaires. L'étape suivante est donc le clivage au HF qui sépare le peptide de son support et qui, par la même occasion, libère tous les autres groupements protecteurs à l'exception de l'Acm sur les Cys et le formyle sur le Trp. Pour sa part, l'Acm se dégage de la fonction thiol des Cys lors de la réaction à l'iode, laquelle permet aussi la cyclisation du pont disulfure. Le groupement formyle, quant à lui, est libéré en présence d'un nucléophile. Dans le cas présent, puisque la base utilisée pour le retrait des groupements protecteurs Fmoc et OFm possède une certaine capacité nucléophile, il faut alors s'attendre à ce que le CHO du tryptophane soit lentement clivé à cette étape.

5.2.6 Préparation des résidus Asp et Glu protégés par Ofm

Ces deux résidus n'ont pas été achetés tel quel. Ils ont plutôt été obtenus à la suite de transformations effectuées dans notre laboratoire. Le matériel utilisé était, à l'origine, le Boc-L-Asp- α -OBzl ainsi que le Boc-L-Glu- α -OBzl (Bachem, Torrance, CA). Le processus de transformation s'effectue en 2 étapes. Dans un premier temps, les résidus sont traités pour protéger la fonction carboxylique de leur chaîne latérale avec le groupement ester de 9-fluorénylméthyle (Figure 21). La seconde étape consiste en une hydrogénation qui permet

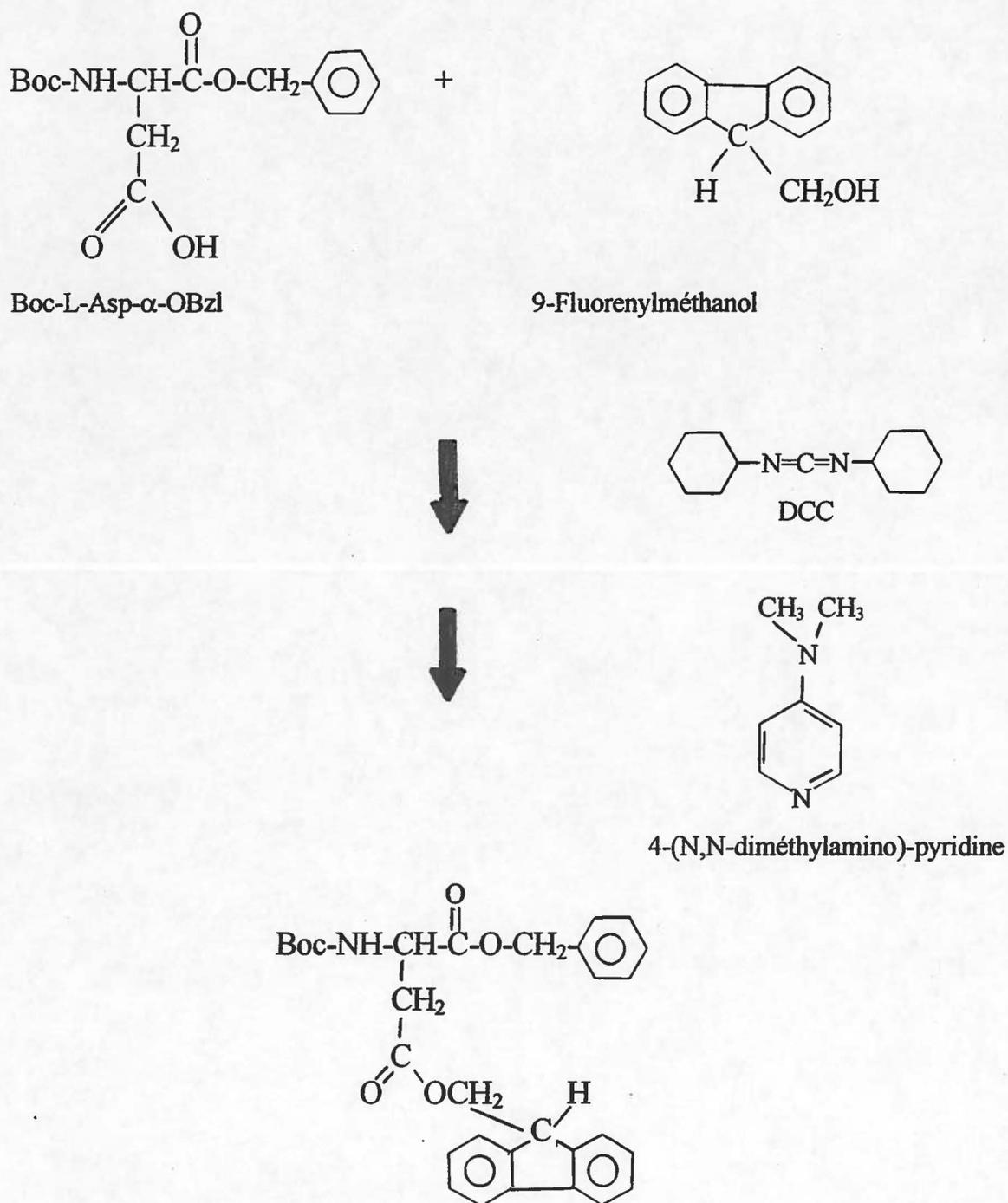


Figure 21 : Schéma illustrant la première étape de la préparation des résidus Asp et Glu, soit l'ajout du groupement O_{fm} sur la chaîne latérale.

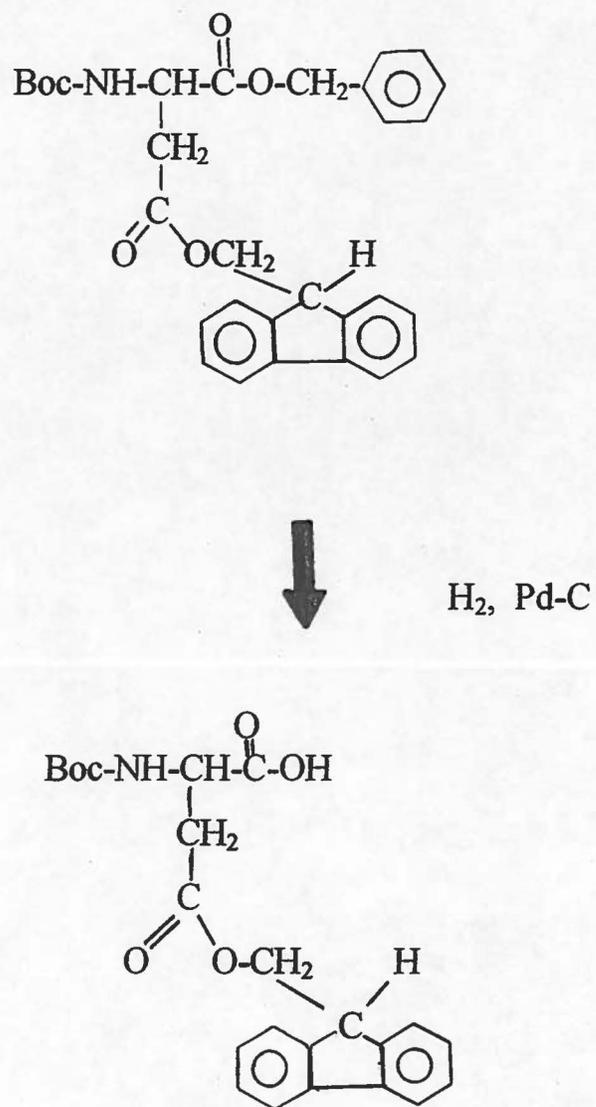


Figure 22 : Schéma illustrant la seconde étape du processus de transformation, soit l'hydrogénation permettant de retirer le groupement Obzl.

d'éliminer le groupement OBzl protecteur de la fonction carboxylique de la chaîne principale (Figure 22). Au cours des deux étapes, divers traitements sont nécessaires après la réaction principale. Parmi ceux-ci, on traite notamment le produit de la réaction avec une solution aqueuse de NaHCO_3 2,5% (p/v) qui favorise la conversion de l'acide aminé en son sel. Cette procédure permet de se débarrasser des produits secondaires non désirés qui sont encore présents dans la phase organique. Ensuite, le tout est acidifié avec de l'acide citrique 10% pour permettre au résidu de retourner à sa forme acide initiale et l'acide aminé est extrait avec de l'acétate d'éthyle. Enfin, la phase organique est traitée au MgSO_4 afin d'éliminer l'eau.

5.2.7 Procédure de synthèse des peptides

Le principe de base de la synthèse de peptides en phase solide repose sur la répétition de la séquence suivante. Dans un premier temps, le résidu C-terminal du peptide est fixé au groupement fonctionnel de la résine par son extrémité C-terminale. Le lien ester qui les unit est un lien covalent. Ensuite, le groupement Boc qui protégeait l'amine est retiré. Enfin, après quelques rinçages, le couplage du second acide aminé est en mesure d'être exécuté.

Après le traitement au TFA, le résidu déprotégé est présent sous la forme d'un sel. Toutefois, il peut être transformé en base libre via un traitement avec une amine tertiaire telle le DIEA (Stewart et Young, 1984). Il est avantageux d'utiliser le DIEA car cette molécule présente des ramifications qui créent un certain encombrement stérique. Ainsi, l'accessibilité à l'atome d'hydrogène du carbone est diminuée, ce qui minimise la racémisation lors de la synthèse. En l'utilisant dans les rinçages en présence de DMF, la réaction de couplage est favorisée car la transformation du sel en structure neutre est déjà amorcée. Cependant, l'usage de DMF/DIEA 1% est déconseillé après la déprotection de Glu et Gln car la base libre de ces résidus engendre une réaction intramoléculaire. L'acide aminé se retrouve alors sous forme cyclique et il devient impossible de poursuivre l'élongation de la chaîne peptidique. Dans ce cas, l'usage de DMF pur est recommandé lors des rinçages.

5.3 Justification du clivage à l'acide fluorhydrique

Cette procédure a pour but premier la séparation du peptide et de la résine. Cette étape sert également à retirer la plupart des groupements protecteurs (OcHex, Tos, 2-ClZ, Bzl, 4-MeBzl) des acides aminés. Cependant, les groupements Acn des cystéines ayant servi à la conception des analogues linéaires, ainsi que le groupement formyle du Trp sont résistants au clivage (Stewart et Young, 1984). Le réactif principal lors du clivage est le HF qui est un acide fort et volatil. Dans le cas présent, de l'éthanethiol est ajouté au milieu afin de capter les carbocations et ainsi minimiser les réactions secondaires.

6. Évaluation de la synthèse

6.1 Regard sur la 1^{ère} série d'analogues synthétisés

6.1.1 Évaluation des analogues linéaires

Après l'assemblage complet de la chaîne peptidique, une certaine quantité du peptide-résine est retirée. Celui-ci est prêt à subir un clivage car le produit peptidique résultant est conservé sous sa forme linéaire. Les produits obtenus après traitement au HF sous forme de poudre présentent, dans le cas des 6 analogues conçus, une coloration légèrement violacée. Après purification par HPLC préparative, dans 5 cas sur 6, un pic majeur est isolé. Ces produits offrent une pureté supérieure à 70%, ce qui est suffisamment intéressant pour les tests biologiques préliminaires qui doivent être exécutés. Quant au 6^e analogue soit le (Glu¹-Lys¹⁵)hET-1 linéaire, il présente une pureté de 26%. Ce résultat peut s'expliquer par la présence du résidu Glu en position N-terminale. Effectivement, la présence de cet acide aminé en position N-terminale peut être très problématique. Le clivage au HF favorise la formation de pyrrolidone chez les peptides avec un acide glutamique à l'extrémité N-terminale. Il est aussi possible que le Glu, toujours à cette même position, forme un pyroglutamyl en présence de base ou d'acide carboxylique (Bodanszky et Martinez, 1981). Ces deux types d'intermédiaires donnent naissance à une variété de produits secondaires ce qui affecte alors, la pureté du produit. La solution à ce problème, lors d'une reprise de cette synthèse serait d'intégrer le résidu Glu en position 15 et le Lys en 1.

6.1.2 Évaluation des analogues monocycliques

Sur le reste du produit peptide-résine, une déprotection à la pipéridine permet de retirer les Fmoc et OFm protégeant les fonctions latérales des acides aminés substitués. Ensuite, s'effectue la cyclisation qui permet de former le pont lactame. Puisqu'il s'agit d'un lien amide, le BOP utilisé en cours de synthèse, sert également d'agent de couplage lors de

cette réaction. D'ailleurs, des études comparatives ont démontré que le BOP est supérieur aux autres agents de couplages pour ce type de cyclisation. Effectivement, dans le cas de l'analogue [Ala¹⁵]-GRF (1-29)-NH₂, la formation intramoléculaire d'un pont lactame entre les résidus 3 et 12, s'effectue en 2 heures en présence de BOP. Cette même réaction en présence de DCC (dicyclohexylecarbodiimide) comme agent de couplage s'effectue en 6 jours (Felix et *al.*, 1988). Les données relatives au temps, découlant de l'étude sur le GRF ont servi de références pour notre étude (Campbell, Bongers et Felix, 1995). Ainsi, après une période de cyclisation de 2 heures, le test de Kaiser permet de vérifier l'état de complétion du pont. Une coloration bleue foncée s'est alors révélée, signifiant que beaucoup de fonctions amines libres sont toujours présentes. Une autre tentative de cyclisation a été reprise. Une fois de plus, après 2 heures, la formation du pont lactame n'est pas complétée. Une coloration verte foncée s'est développée lors du test à la ninhydrine. Enfin, une dernière tentative, pendant 1½ heure, pour compléter la cyclisation s'est avérée vaine. Le résultat du test Kaiser présentait alors, une coloration verte. En se basant sur les résultats obtenus avec le GRF et, le fait que le test de Kaiser n'était pas complètement indicatif, nous avons jugé que la réaction était presque complète et, nous avons passé à l'étape suivante. Le clivage au HF a permis d'obtenir une poudre mauve foncée. Une analyse de ce produit par HPLC analytique révèle un profil en forme de "cloche" avec aucun pic vraiment distinct (figure 7A). Des essais de purification de ces produits ont été tentés sur HPLC préparative, sans toutefois être fructueux. Aucun pic principal n'a pu être obtenu. (figures 7B et C)

6.1.3 Analyse de la synthèse de cette 1^{ère} série d'analogues

En cours de synthèse, plusieurs couplages ont dû être répétés à deux ou trois reprises. De plus, au fur et à mesure que les cycles de couplage se répétaient et que la synthèse avançait, la résine a pris une coloration violacée. L'analyse de ces observations conduit à certaines conclusions. Des études déjà réalisées démontrent que la coloration mauve concorde avec la présence d'un tryptophane ayant son noyau β -indole libre. Effectivement, un test qualitatif avec le réactif d'Ehrlich (*p*-diméthylaminobenzaldéhyde) peut confirmer la présence ou l'absence d'un groupement formyle sur le Trp. Lors de ce test, le *p*-

diméthylaminobenzaldéhyde réagit avec le noyau β -indole du Trp pour former un complexe mauve. La présence du formyle sur le tryptophane bloque cette réaction (Stewart et Young, 1984). La conclusion qu'il est alors possible de tirer, c'est qu'une déprotection du Trp s'effectue en cours de synthèse. Puisque seul un agent nucléophile libère le Trp de son groupement formyle, il faut alors supposer que des produits de réactions secondaires, dégagés en cours de synthèse, possèdent ce potentiel nucléophile. Au cours de cette série de synthèses, l'état du couplage est vérifié systématiquement au 40-45 minutes. Toutefois, après avoir tout bien considéré, certaines séquences de 2 acides aminés se lient entre elles plus facilement que d'autres. Par conséquent, leur temps de couplage est réduit. Donc, un trop long délai de couplage pourrait favoriser, inutilement, le développement de ces produits secondaires qui entraînent des déprotections partielles. De plus, une présence trop nombreuse de ces produits engendre, peut-être, de faux résultats au test de Kaiser, laissant croire que le couplage n'est pas tout à fait complet, alors qu'il l'est. Le nombre de double et triple couplages réduirait considérablement et la production de produits secondaires serait amoindrie. Dans le cas des analogues monocycliques, le retrait de Fmoc et OFm exige l'utilisation de la pipéridine qui est un agent nucléophile. Il est alors possible d'expliquer la coloration mauve foncée des produits post clivage. La pipéridine retire, par la même occasion, le groupement formyle du Trp. Le noyau indole libre du Trp participe alors à des réactions avec des produits secondaires formés lors des étapes des cycles de couplage. Il peut aussi s'oxyder. Toutes ces réactions sont susceptibles de se produire, ce qui expliquerait la multitude de produits engendrés.

6.2 Regard sur la 2^{ème} série d'analogues synthétisés

Suite à l'analyse des observations tirées de la 1^{ère} série de synthèses, des précautions ont été prises pour la conception de la seconde série. Ainsi, une vérification en continu de la synthèse a été effectuée. Plus précisément, l'état de complétion du couplage est vérifié toutes les 15 minutes, sans enlèvement des réactifs. Ainsi, dès que la réaction semble complète, le milieu est filtré et lavé. Un test de Kaiser vient quand même confirmer le résultat précédent. Cette vérification en continu a pour objectif d'éviter de laisser le peptide

trop longtemps en présence de réactifs et de produits secondaires. Ainsi, le nombre de couplages doubles et triples a diminué considérablement. Il est quand même normal que certains couplages doivent être repris, surtout en fin d'élongation du peptide. L'espace entre les chaînes peptidiques et la conformation qu'adoptent ces molécules peuvent contraindre la fixation des derniers acides aminés, exigeant ainsi une plus grande quantité d'équivalents des réactifs.

Un autre changement apporté dans le protocole de la seconde série de synthèse, est l'utilisation de groupements MeBzl pour protéger les Cys. Comme on l'a vu précédemment, les MeBzl sont retirés lors du clivage au HF et l'oxydation au $K_3Fe(CN)_6$ qui est alors requise, est beaucoup plus douce que celle exigée par les Cys protégées par AcM. Puisqu'au cours de la 1^{ère} série d'analogues, le Trp semblait se libérer de son groupement formyle lors de la déprotection à la pipéridine, une oxydation plus douce va minimiser les réactions secondaires sur le tryptophane lors de la formation du pont disulfure.

En ce qui concerne l'étape de cyclisation, elle a été effectuée avec les mêmes réactifs que la première fois. Cependant, cette fois-ci, nous avons laissé aller la réaction jusqu'à ce que le test de Kaiser confirme la complétion de la cyclisation. Toutefois, les réactifs ont été renouvelés, en moyenne aux 2 heures, pour forcer la réaction. Le pont lactame s'est avéré terminé après un total de 22 heures de réaction. C'est beaucoup plus long que dans le cas du GRF cité précédemment. Cette énorme différence peut s'expliquer par l'arrangement complexe de la molécule de l'endothéline avec son pont disulfure et son pont lactame. Aussi, la nature même des acides aminés qui composent le peptide peuvent favoriser ou non la réalisation de ce pont lactame.

6.2.1 Évaluation des analogues monocycliques de 2^{ème} série

Le clivage de ces produits s'est déroulé dans des conditions similaires à la première fois. Seule la quantité d'éthanedithiol ajoutée dans le milieu, a légèrement été augmentée. Sachant que le Trp, à cause de sa déprotection, est susceptible aux réactions secondaires, il

est jugé bon de prévenir l'oxydation en accroissant la présence du capteur de carbocations. Le produit obtenu de ce clivage est une poudre avec une coloration violacée, confirmant une fois de plus, la déprotection du Trp. Comme la figure 8 le démontre, la qualité des produits issus de la 2^{ème} série est nettement supérieure à celle des produits de 1^{ère} série. Avec ces produits traités au HF, l'isolement du pic majoritaire n'est plus un casse-tête. Effectivement, comme le montre la figure 9, après une purification par HPLC préparative, un grand pic se distingue bien. Le produit isolé peut alors subir l'étape suivante qui est la cyclisation du pont disulfure.

7. Évaluation de la formation du pont disulfure

Cette cyclisation consiste en la formation du pont disulfure intramoléculaire entre les deux cystéines se trouvant soit en position 1-15, soit en position 3-11. Au cours de la synthèse, ce sont des groupements 4-MeBzl qui assuraient la protection de ces résidus. Ces groupements protecteurs étant labiles en présence d'un acide fort, leur élimination a donc été effectuée au même moment que le clivage au HF. Dans ces conditions, il est donc possible de procéder à la cyclisation, avec une oxydation plus douce que celle exigée lorsque les groupements protecteurs sont encore présents sur les cystéines. Ainsi, l'oxydation sera réalisée à l'aide du ferricyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$). Après l'oxydation, le produit est une fois de plus purifié par HPLC préparative pour écarter les produits secondaires formés lors de cette dernière réaction. Un échantillon de produit a été conservé avant la réaction et un second a été gardé après la cyclisation. Ceux-ci ont été traités par HPLC analytique. La comparaison de leur analyse révèle que le temps de rétention est le même pour les 2 échantillons (Figure 10). Il y a donc ici, un problème qui a fait naître 3 hypothèses. Premièrement, peut-être le produit monocyclique a-t-il le même temps de rétention que le produit bicyclique. Dans un second temps, il est possible que la réaction de cyclisation n'ait pas été efficace. Enfin, il est aussi possible que la formation du pont disulfure ait déjà eu lieu avant cette réaction. Effectivement, il est bien connu que des groupements sulfhydryles libres s'oxydent très facilement à l'air. Pour résoudre ce problème, différents tests ont été entrepris.

7.1 Analyse du test de co-injection

Comme la figure 11 permet de le constater, ce test n'a pas été très concluant. En A et en B respectivement, le produit monocyclique et le produit bicyclique présentent pratiquement le même temps de rétention. Pour confirmer la première hypothèse, la coélution de ces deux produits aurait permis de distinguer 2 pics. Ce n'est, toutefois, pas le cas. Un seul pic bien distinct est issu de cette co-injection (Figure 11C). La conclusion qui

en est tirée, est alors la présence d'un seul et même produit. D'autres tests sont alors nécessaires.

7.2 Test de réduction au 2-mercaptoéthanol

Ce test a pour objectif de réduire le pont disulfure, s'il est déjà formé comme le laisse entendre la troisième hypothèse. Après 1½ heure, la réaction est arrêtée et, un échantillon est analysé. La comparaison de ce profil avec celui du produit pré-traitement ne permet pas de conclure quoi que ce soit. Le même temps de rétention est observé avant et après le traitement (Figure 14).

7.3 Évaluation du test de réduction au NaBH₄

Ce test sert à vérifier s'il y a eu oxydation à l'air des cystéines, avant même que l'oxydation chimique ne soit exécutée. En effet, les groupements sulfhydryles des cystéines sont très facilement oxydables. Ainsi, lors de la réaction avec le NaBH₄, il y a réduction des liens disulfures. Le borohydrure de sodium (NaBH₄) a un potentiel de réduction plus efficace que le 2-mercaptoéthanol (Gailit, 1993). Tout d'abord, la réaction est effectuée sur le produit bicyclique, c'est-à-dire le produit ayant subi la réaction d'oxydation au K₃Fe(CN)₆. Comme la figure 12 le démontre, après 30 minutes de réaction, un déplacement du temps de rétention est observé. Le produit pré-traitement présente un temps de rétention de 12,26 min. Quant à lui, le produit réduit pendant 30 min démontre un temps de rétention de 8,26 min. Alors, la différence entre l'élution du produit monocyclique et celle du produit bicyclique, est approximativement de 4 minutes. La figure 12 permet effectivement d'observer en B, un petit pic toujours présent à 12 min signifiant que la réaction n'est pas complètement terminée. En C, après 2 heures de traitement, il est possible de remarquer que le produit de départ est totalement éliminé. Pour confirmer ces résultats, le produit supposément monocyclique, celui n'ayant pas subi d'oxydation, est traité au NaBH₄ pendant 1 heure. Une analyse par HPLC des échantillons pré- et post-traitement, a été effectuée. La comparaison des profils ainsi obtenus, permet d'établir qu'une fois de plus, un déplacement

de 4 minutes du temps de rétention, est observé (figure 13). Ces résultats viennent vraisemblablement confirmer la troisième hypothèse. Le produit considéré comme monocyclique est en réalité bicyclique sans avoir subi la réaction d'oxydation. À cause de l'arrangement particulier de l'endothéline avec son pont lactame déjà formé, les deux Cys libres se retrouvent l'une face à l'autre. Et comme l'oxydation à l'air se fait aisément, les conditions sont ici idéales à la réalisation de cette réaction.

Après avoir analysé tous les résultats issus de ces tests au NaBH_4 , une conclusion au test du 2-mercaptoéthanol peut maintenant être tirée. Effectivement, en observant à nouveau les profils pré- et post-traitement, il est possible de remarquer un pic naissant, approximativement 4 minutes devant le pic du produit de départ. Celui-ci est passé inaperçu lors de la première analyse de ces résultats. Après 1½ heure de réduction, une plus grande quantité de produit transformé était attendue. La meilleure efficacité du test au NaBH_4 vient ici se confirmer, puisqu'après seulement 30 minutes de réaction, le produit est majoritairement transformé.

8. Évaluation de la pureté des analogues d'ET-1 conçus

La séparation par HPLC en phase inverse est basée sur l'hydrophobicité du composé. L'analyse par électrophorèse capillaire (EC), quant à elle, distingue les différents composants d'un échantillon selon leurs tailles et leurs charges (Novotny, Cobb et Liu, 1990). La complémentarité de ces deux techniques permet d'obtenir une combinaison parfaite pour l'analyse des analogues conçus. La séparation par EC, qui se base sur les propriétés physiques des composés, permet de distinguer des produits ayant pu être co-élus lors de la séparation par HPLC (Gordon et *al.*, 1988).

Cinq des 6 analogues linéaires dérivés de la première série de synthèse présentent, en HPLC analytique, une pureté variant de 65 à 96% (Tableau VI). Ces résultats sont relativement satisfaisants pour l'utilisation convoitée. Effectivement, les tests biologiques qui seront exécutés ne serviront qu'à déterminer de façon préliminaire, la capacité d'activité des analogues peptidiques étudiés. Seul le dérivé (Glu¹-Lys¹⁵)hET-1 est de qualité insuffisante. Les profils EC démontrent que ces produits ont un temps de rétention d'environ 6 minutes.

En ce qui concerne les analogues bicycliques, ils présentent en HPLC, une pureté variant de 71 à 92%. Comme dans le cas des analogues linéaires et, comme on s'y attendait, les résultats obtenus par EC sont moins purs que ceux obtenus par HPLC.

CONCLUSION

L'ET-1 est impliqué dans de nombreuses pathophysiologies humaines. Principalement, elle joue un rôle majeur dans les maladies du système cardiovasculaire mais, sa panoplie d'activités s'avère beaucoup plus grande. L'étude de son mode d'action demeure donc un centre d'intérêt privilégié en recherche. La connaissance de ce mécanisme permettrait de développer des outils pour prévenir, contrôler ou même encore guérir certaines des pathophysiologies entraînées par un déséquilibre de l'ET-1.

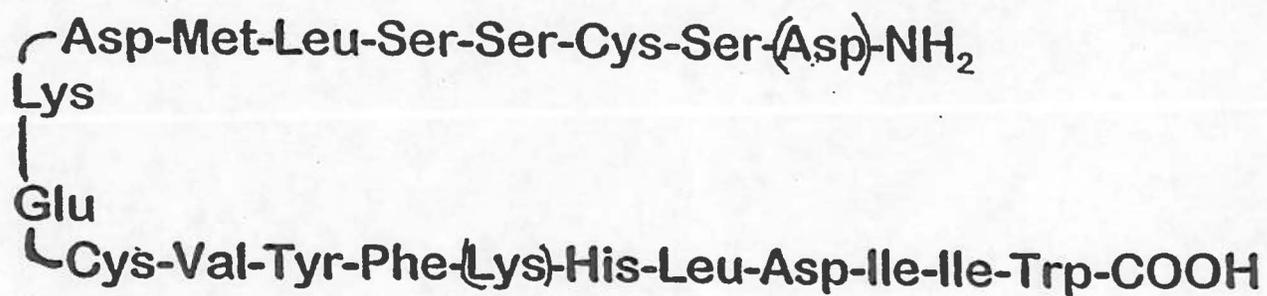
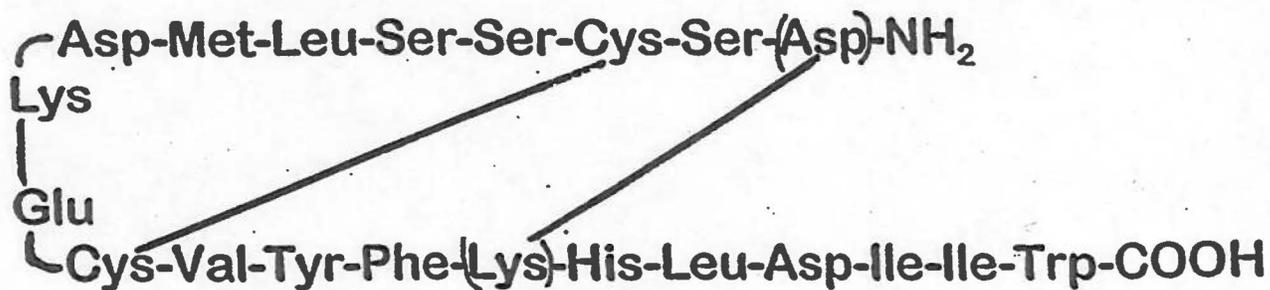
La fabrication d'analogues demeure une étape de choix dans l'étude des mécanismes moléculaires de l'ET-1. Jusqu'à ce jour, plusieurs études ont permis de penser que l'interaction ET-récepteur s'établissait probablement par un lien covalent de nature disulfure entre les résidus cystéines du récepteur et de la molécule. Le développement d'analogues de l'endothéline avec un pont disulfure substitué par un pont lactame permet de vérifier ces hypothèses. Les acides aminés Asp, Glu, Orn et Lys sont choisis comme résidus substitués pour leur capacité à former un lien amide entre les groupements fonctionnels de leurs chaînes latérales. Des analogues sont conçus avec un pont lactame, composés de diverses combinaisons de résidus substitués. Le but de ces modifications est de vérifier, par la même occasion, l'influence de la taille du cycle intramoléculaire sur l'activité biologique.

La synthèse de peptides en phase solide combinée à une stratégie adéquate de protection orthogonale constitue la technique par excellence pour le développement de tels analogues. Ainsi, la conception d'une première série d'analogues nous a permis d'obtenir des produits linéaires satisfaisants. Quant aux produits monocycliques issus de cette synthèse, ils étaient de qualité insuffisante. L'analyse par HPLC de ces produits présente des profils en forme de cloche indiquant la complexité du mélange de polymères obtenu. Les observations faites en cours de synthèse permettent de croire que le Trp se déprotège et que le noyau indole s'oxyde. Suite à cette constatation, le choix du groupement Acn pour protéger les Cys, a dû être révisé. Ce groupement protecteur est retiré en présence d'iode en même temps que l'oxydation qui permet la formation du pont disulfure. Toutefois, cette

réaction d'oxydation s'avère être assez puissante. À cause de la présence du Trp libre, une oxydation plus douce est préférable. Le choix de Cys protégé par 4-MeBzl est une meilleure option car ce groupement est retiré lors du clivage au HF. La cyclisation est alors exécutée en présence de $K_3Fe(CN)_6$ qui permet une oxydation beaucoup plus douce. Aussi, le temps de cyclisation n'est pas suffisamment assez long. La détermination du temps nécessaire à la lactamisation s'est faite à partir d'une étude sur le GRF dans laquelle des analogues de même type étaient formés en 2 heures. Dans notre cas, après 5½ heures, la réaction était incomplète. Ainsi, lors de la conception de la seconde série d'analogues, la réaction de lactamisation s'est poursuivie jusqu'à ce que le test de Kaiser révèle que la cyclisation était complète. La séquence en acide aminé propre à chaque peptide confère des propriétés aux analogues qui soit facilite, soit complique les réactions intramoléculaires telle la lactamisation.

De plus, nous avons réalisé, après la bicyclisation (soit la formation du pont disulfure) que l'analogue bicyclique a le même temps de rétention que l'analogue monocyclique. Divers tests nous ont finalement aidés à conclure qu'avant même que cette réaction n'ait eu lieu, le pont disulfure est déjà formé car l'oxydation des Cys à l'air libre est très propice. De plus, comme la molécule adopte une conformation particulière imposée par le pont lactame déjà formé, les Cys se retrouvent face à face et l'oxydation se voit facilitée.

L'élaboration d'une méthode de synthèse combinée à une stratégie de protection orthogonale adéquate, permet la production d'analogues d'ET-1. L'étude future de leurs activités agonistes ou antagonistes permettra de préciser le mécanisme moléculaire de ce peptide. Les connaissances alors retirées, permettront le développement d'outils pour le contrôle des nombreux effets biologiques causés par l'ET-1 et à l'origine de pathologies importantes.

APPENDICE AExemples des types d'analogues conçusAnalogues Linéaires[Asp¹-Lys¹⁵] hET-1Analogues Bicycliques[Asp¹-Lys¹⁵] hET-1

LISTE DE RÉFÉRENCES

- ADACHI, M., K. Hashido, A. Trzeciak, T. Watanabe, Y. Furuichi et C. Miyamoto. 1993. « Functional Domains of Human Endothelin Receptor ». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 22, suppl. 8, p. S121-S124.
- AGRICOLA, K.M., G. Rubanyi, R.J. Paul et R.F. Highsmith. 1984. « Characterization of a potent coronary artery vasoconstrictor produced by endothelial cells in culture ». Federation Proceedings, vol. 43, p. 899.
- ARAI, H., S. Hori, I. Aramori, H. Ohkubo et S. Nakanishi. 1990. « Cloning and expression of a cDNA encoding and endothelin receptor ». Nature, vol. 348, p. 730-732.
- BATTISTINI, B., P. D'Orléans-Juste et P. Sirois. 1992. « Les endothélines et le poumon ». Médecine/Science, vol. 8, p. 679-687.
- BECKER, A., E.B. Dowdle, U. Mechler, K. Kauser, P. Donner et W.D. Schleuning. 1993. « Bibrotoxin a novel Member of the Endothelin/Sarafotoxin Peptide Family, from the venom of the Burrowing Asp *Atractaspis bibroni* ». FEBS Letters, vol. 315, p. 100-103.
- BODANSZKY, M. et J. Martinez. 1981. « Side Reactions in Peptide Synthesis ». Synthesis, p. 333-356.
- CAMPBELL, R.M., J. Bongers et A.M. Felix. 1995. « Rational Design, Synthesis, and Biological Evolution of Novel Growth Hormone Releasing Factor Analogues ». Biopolymers (Peptide Sciences), vol. 37, p. 67-88.
- CASTRO, B., J.R. Dormoy, G. Evin et C. Selve. 1975. « Réactifs de couplage peptidique IV (1)-L'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdiméthylamino phosphonium (BOP) ». Tetrahedron Letters, no. 14, p. 1219-1222.
- CODY, W.H., et A.M. Doherty. 1995. « The Development of Potent Peptide Agonists and Antagonists for the Endothelin Receptors ». Biopolymers (Peptide Science), vol. 37, p. 89-104.
- DOHERTY, A.M. 1992. « Endothelin: a New Challenge ». Journal of Medicinal Chemistry, vol. 35, p. 1493-1508.

- D'ORLÉANS-JUSTE, P., S. Télémaque et A. Claing. 1991. « Different Pharmacological Profiles of Big-Endothelin-3 and Big-Endothelin-1 in vivo and vitro ». British Journal of Pharmacology, vol. 104, p. 440-444.
- EMORI, T., Y. Hirata et F. Marumo. 1990. « Specific Receptors for Endothelin-3 in Cultured Bovine Endothelial Cells and its Cellular Mechanism of Action ». FEBS Letters, vol. 263, p. 261-264.
- FELIX, A.M., C.T. Wang, E.P. Heimer et A. Fournier. 1988. « Applications of BOP reagent in solid phase synthesis. II. Solid phase side-chain to side-chain cyclization using BOP reagent ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 31, p. 231-238.
- FILEP, J.G., M.G. Sirois, A. Rousseau, A. Fournier et P. Sirois. 1991. « Effects of Endothelin-1 on Vascular Permeability in the Conscious Rat: Interactions with Platelet-Activating Factor ». British Journal of Pharmacology, vol. 104, p. 797-804.
- FOURNIER, A., C.T. Wang et A.M. Felix. 1988. « Applications of BOP reagent in solid Phase synthesis. Advantages of BOP reagent for difficult couplings exemplified by a synthesis of [Ala¹⁵]-GRF(1-29)-NH₂ ». International Journal of Peptide and Protein Research, vol. 31, p. 86-97.
- FURCHGOTT, R.F. et J.V. Zawadzki. 1980. « The Obligatory Role of Endothelial Cells in The Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine ». Nature, vol. 288, p. 373-376.
- GAILIT, J. 1993. « Restoring Free Sulfhydryl Groups in Synthetic Peptides ». Analytical Biochemistry, vol. 214, p. 334-335.
- 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 culture ». Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutics, vol. 236, p. 339-343.
- GORDON, M.J., X. Huang, S.L. Pentoney Jr et R.N. Zare. 1988. « Capillary Electrophoresis ». Science, vol. 242, p. 224-228.
- HAGIWARA, H., M. Kozuka, S. Eguchi, S. Shibabe, T. Ito et S. Hirose. 1990. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 172, p. 576-581.
- HÉLUY, V., M. Breuiller-Fouché, F. Cavallé, T. Fournier et F. Ferré. 1995 a). « Characterization of type A endothelin receptors in cultured human myometrial cells ». American Journal of Physiology, vol. 268 (Endocrinology Metabolism, 31), p. E825-E831.

- HELUY, V., G. Germain, T. Fournier, F. Ferré et M. Breuiller-Fouché. 1995 b). « Endothelin ET_A receptors mediate human uterine smooth muscle contraction ». European Journal of Pharmacology, vol. 285, p. 89-94.
- HICKEY, K.A., G. Rubanyi, R.J. Paul et R.F. Highsmith. 1985. « Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells ». American Journal of Physiology, vol. 248, p. C550-C556.
- HILEY, C.R., C.R. Jones, J.T. Pelton et R.C. Miller. 1990. « Binding of [¹²⁵I]-Endothelin-1 to Rat Cerebellar Homogenates and its Interactions with Some Analogues ». British Journal of Pharmacology, vol. 101, p. 319-324.
- HOLDEN, W.E. et E. McCall. 1983. « Hypoxia-induced contractions of porcine pulmonary artery strips depend on intact endothelium ». Experimental Lung Research, vol. 7, p. 101-112.
- HUGGINS, J.P., J.T. Pelton et R.C. Miller. 1993. « The structure and specificity of endothelin receptors: Their importance in physiology and medicine ». Pharmacology Therapeutics, vol. 59, p. 55-123.
- INOUE, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto et T. Masaki. 1989. « The Human Endothelin Family: Three Structurally and Pharmacologically Distinct Isopeptides Predicted by Three Separate Genes ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 86, p. 2863-2867.
- 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.
- KLOOG, Y., I. Ambar, M. Sokolovsky, E. Kochva, Z. Wollberg et A. Bdolah. 1988. « Sarafotoxin, a novel Vasoconstrictor Peptide: Phosphoinositide Hydrolysis in Rat Heart and Brain ». Science, vol. 242, p. 268-270.
- LANDAN, G., A. Bdolah, Z. Wollberg, E. Kochva et D. Graur. 1991. « The Evolutionary History of the Sarafotoxin/Endothelin/Endothelin-Like Superfamily ». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 17, p. S517-S519.
- LOTERSZTAJN, S. 1993. « Les endothélines ». Médecine/Science, vol. 9, p. 1084-1093.
- McMAHON, E.G., M.A. Palomo, W.M. Moore, J.F. McDonald et M.K. Stern. 1991. « Phosphoramidon Blocks the Pressor Activity of Porcine Big-Endothelin-1-(1-39) to Endothelin-1-(1-21) in vitro ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 88, p. 703-707.

- MERRIFIELD, R.B. 1963. « Solid Phase Peptide Synthesis I. The synthesis of a Tetrapeptide ». Journal of the American Chemical Society, vol. 85, p. 2149-2154.
- NAKAJIMA, K., S. Kubo, S.I. Kumagaye, H. Nishio, M. Tsunemi, T. Inui, H. Kuroda, N. Chino, T.X. Watanabe, T. Kimura et S. Sakakibara. 1989. « Structure-Activity Relationship of Endothelin : Importance of Charged Groups ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 163, p. 424-429.
- NGUYEN, D.L. et B. Castro. 1987. « BOP Reagent: Rising a "major" for peptide coupling ». Peptide Chemistry, p. 231-238.
- NOVOTNY, M.V., K.A. Cobb et J. Liu. 1990. « Recent Advances in Capillary Electrophoresis of Proteins, Peptides and Amino Acids ». Electrophoresis, vol. 11, p. 735-749.
- O'BRIEN, R.F. et I.F. McMurtry. 1984. « Endothelial cell (EC) supernates contract bovine pulmonary artery (PA) rings ». American Review of Respiratory Disease, vol. 129, p. A337.
- OPGENORTH, T.J., S. Kimura et J.R. Wu-Wong. 1995. « Characterization of Endothelin-Converting Enzymes ». Methods in Neurosciences, vol. 23, p. 251-265.
- SAIDA, K., Y. Mitsui et N. Ishida. 1989. « A novel Peptide, Vasoactive Intestinal Contractor, of a New (Endothelin) Peptide Family ». The Journal of Biological Chemistry, vol. 264, p. 14613-14616.
- SAKURAI, T., M. Yanagisawa, Y. Takuwa, H. Miyazaki, S. Kimura, K. Goto et T. Masaki. 1990. « Cloning of a cDNA a non-Isopeptide-Selective Subtype of the Endothelin Receptor ». Nature, vol. 348, p. 732-735.
- SAKURAI, T., M. Yanagisawa et T. Masaki. 1992. « Molecular characterization of endothelin Receptors ». Trends in Pharmacological Sciences, vol. 13, p. 103-108.
- SAWAMURA, T., Y. Kasuya, Y. Matsusihta, N. Suzuki, O. Shinmi, N. Kishi, Y. Sugita, M. Yanagisawa, K. Goto, T. Masaki et S. Kimura. 1991. « Phosphoramidon Inhibits the Intracellular Conversion of Big-Endothelin-1 to Endothelin-1 in Cultured Endothelial Cells ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 174, p. 779-784.
- SAWAMURA, T., S. Kimura, O. Shinmi, Y. Sugita, M. Kobayashi, Y. Mitsui, M. Yanagisawa et T. Masaki. 1990. « Characterization of endothelin converting enzyme activities in soluble fraction of bovine cultured endothelial cells ». Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 169, p. 1138-1144.

- SIROIS, M.G., J.G. Filep, A. Rousseau, A. Fournier, G.E. Plante et P. Sirois. 1992. « Endothelin-1 Enhances Vascular Permeability in Conscious Rats: Role of Thromboxane a₂ ». European Journal of Pharmacology, vol. 214, p. 119-125.
- SOKOLOVSKY, M. 1992. « Endotheline and Sarafotoxins physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. Pharmacology Therapeutics, vol. 54, p. 129-149.
- SOKOLOVSKY, M., I. Ambar et R. Galron. 1992. « A novel Subtype of Endothelin Receptors », The Journal of Biological Chemistry, vol. 267, p. 20551-20554.
- SPINELLA, M.J., R. Kottke, H.I. Magazine, M.S. Healy, J.A. Catena, P. Wilken et T.T. Andersen. 1993. « Endothelin-Receptor interactions: Role of a putative sulfhydryl on the endothelin receptor ». FEBS Letters, vol. 328, p. 82-88.
- SPINELLA, M.J., A.B. Malik, J. Everitt et T.T. Andersen. 1991. « Design and synthesis of a specific endothelin-1 antagonist: Effects on pulmonary vasoconstriction ». Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 88, p. 7443-7446.
- STEWART, J.M. et J.D. Young. 1984. Solid Phase Peptide Synthesis. Rockford, Illinois: Pierce Chemical Company, 176p.
- TAM, J.P., W. Liv, J.W. Zhang, M. Galantino, F. Bertolero, C. Christiani, F. Vaghi et R. De Castiglione. 1994. « Alanine Scan of Endothelin: Importance of Aromatic Residues ». Peptides, vol. 15, p. 703-708.
- TÉLÉMAQUE, S., J.P. Gratton, A. Claing et P. D'Orléans-Juste. 1993. « Pharmacologic Evidence for the Specificity of the Phosphoramidon-Sensitive Endothelin-Converting Enzyme for Big Endothelin-1 ». Journal of Cardiovascular Pharmacology, vol. 22 (Suppl. 8), p. 585-589.
- WADA, K., Y. Fujii, H. Watanabe, M. Satoh et Y. Furuichi. 1991. FEBS Letters, vol. 285, p. 71-74.
- WAGGONER, W.G., S.L. Genova et V.A. Rash. 1992. Life Sciences, vol. 51, p. 1869-1876.
- 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., A. Inoue, T. Ishikawa, Y. Kasuya, S. Kimura, S.I. Kumagaye,
K. Nakajima, T.X. Watanabe, S. Sakakibara, K. Goto et T. Masaki. 1988.
«Primary Structure, Synthesis, and Biological Activity of Rat Peptide».
Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 85, p. 6964-6967.